

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

**Auswirkungen von Kalkstickstoff-Düngung auf das Überleben und die Infektiosität von
Larven kleiner Strongyliden des Pferdes**

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

**vorgelegt von
Florina Dagmar Jung
Tierärztin
aus Bühl (Baden)**

Berlin 2021

Journal-Nr.: 4255

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Georg von Samson-Himmelstjerna
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Gehlen
Dritter Gutachter: PD Dr. Roswitha Gehlen

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

horses, strongylidae, animal parasitic nematodes, chalk, fertilizer analysis, fertilizers, pastures, grassland management, feeding, feeds, soil, faeces collection, nematode larvae

Tag der Promotion: 09.06.2021

Abkürzungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	3
2.1. Wichtige Helminthosen der Equiden.....	3
2.1.1. Strongyliden.....	3
2.1.1.1. Morphologie.....	3
2.1.1.2. Vorkommen.....	5
2.1.1.3. Epidemiologie.....	6
2.1.1.4. Immunität.....	7
2.1.1.5. Entwicklung.....	8
2.1.1.6. Entwicklung und Überleben der L3 auf der Weide.....	9
2.1.1.7. Pathogenese.....	10
2.1.1.8. Krankheitsbild.....	11
2.1.1.9. Diagnose.....	12
2.1.1.10. Therapie und Bekämpfungsmaßnahmen.....	13
2.1.2. Spulwurm des Pferdes.....	16
2.1.2.1. Morphologie.....	16
2.1.2.2. Vorkommen.....	17
2.1.2.3. Epidemiologie.....	18
2.1.2.4. Immunität.....	18
2.1.2.5. Entwicklung.....	19
2.1.2.6. Pathogenese.....	19
2.1.2.7. Krankheitsbild.....	20
2.1.2.8. Diagnose.....	21
2.1.2.9. Therapie und Bekämpfungsmaßnahmen.....	21
2.2. Parasitenmanagement.....	23
2.2.1. Chemotherapeutika.....	23
2.2.1.1. Makrozyklische Laktone.....	23
2.2.1.2. Benzimidazole.....	24
2.2.1.3. Pyrantel.....	24
2.2.1.4. Piperazin.....	25
2.2.2. Desinfektion.....	25
2.2.3. Weidemanagement und Weidehygiene.....	28
2.2.3.1. Weideform.....	28
2.2.3.2. Pflegemaßnahmen und Düngung von Pferdeweiden.....	29

2.3.	Kalkstickstoff.....	33
2.3.1.	Geschichte	33
2.3.2.	Herstellung.....	33
2.3.3.	Eigenschaften und Wirkungsweise.....	33
2.3.4.	Eigenschaften und Vorkommen von Cyanamid (H ₂ CN ₂).....	35
2.3.5.	Toxizität von Cyanamid.....	35
2.3.6.	Wirkung auf Weideparasiten	36
2.4.	Zielsetzung der Arbeit.....	39
3.	Material und Methoden.....	40
3.1.	Material	40
3.1.1.	Laborgeräte	40
3.1.2.	Larven.....	40
3.1.3.	Mehrwegmaterialien.....	40
3.1.4.	Einwegmaterialien.....	41
3.2.	Methoden	42
3.2.1.	Kotprobennahme während des Feldversuches	42
3.2.2.	Kotuntersuchung (Mini-FLOTAC)	42
3.2.3.	Larvenkulturen.....	43
3.2.4.	Larvenaufbereitung	44
3.2.5.	Herstellung der PBS-Tween-Lösung.....	45
3.2.6.	Grasprobenahme im Feld- und Töpfchenversuch	45
3.2.7.	Aufreinigung von Nematodenlarven aus Grasproben (Graswaschen).....	47
3.2.8.	Larvenfitnesstest.....	48
3.2.9.	Erdprobenahme im Feldversuch.....	50
3.2.10.	Aufreinigung von Nematodenlarven aus Erdproben.....	50
3.2.11.	Sterilisation der Erdproben.....	52
3.2.12.	Feldversuch zur Untersuchung der Wirkung von Kalkstickstoffdüngung gegen Larven der kleinen Strongyliden.....	52
3.2.13.	Untersuchung des nematoziden Effekts der Kalkstickstoffdüngung unter Verwendung von Grastöpfchen.....	54
3.2.14.	Bestimmung der Wasseraufnahmekapazität von verschiedenen Böden.....	56
3.2.15.	Bestimmung des Cyanamidgehalts aus Bodenproben	57
3.2.16.	Messung der Larvenmorphologie	57
3.2.17.	Vortest für den Larval-Migration-Inhibition-Assay (LMIA).....	58
3.2.18.	Durchführung des LMIA.....	59
3.2.19.	Datenaufbereitung und Statistik.....	60
3.2.19.1.	Auswertung der Feldversuchsdaten.....	60
3.2.19.2.	Auswertung der Daten aus den Grastöpfchenversuchen	61
3.2.19.3.	Auswertung der Larvenmessungen.....	61
3.2.19.4.	Auswertung der LMIA Vortests	61
3.2.19.5.	Auswertung der LMIA-Versuche	61

3.2.19.6. Auswertung der Ergebnisse der Cyanamidbestimmung in Bodenproben	62
4. Ergebnisse	63
4.1. Feldversuch	63
4.1.1. Kotproben der Pferde von Kontrollgruppe A und Kalkstickstoffgruppe B der Weiden am Mittelweg	63
4.1.2. Vorkommen von dritten Larven kleiner Strongyliden auf Gras- und Erdproben der Weiden am Mittelweg	64
4.1.3. Kotproben der Pferde auf den Weiden am Eichendamm	64
4.2. Ergebnisse Grastöpfchenversuch	66
4.2.1. Wiedergewinnungsrate	66
4.2.2. Ergebnisse des Larvenfitnesstests	66
4.2.3. Auswertung des Aufenthaltsorts der Larven	67
4.3. Grastöpfchenversuch mit erhöhter Kalkstickstoffdüngung	69
4.4. Wasseraufnahmevermögen verschiedener Böden	70
4.5. Larvenmessungen	71
4.6. Cyanamidgehalt verschiedener Erdproben	74
4.7. LMIA Vortests	76
4.8. LMIA	78
4.9. Zusammenfassung der Ergebnisse	80
5. Diskussion	81
5.1. Allgemein	81
5.2. Feldversuch	83
5.3. Grastöpfchenversuch	89
5.4. LMIA	94
5.5. Ausblick	97
6. Zusammenfassung	98
7. Summary	100
8. Literaturverzeichnis	102
Danksagung	120
Finanzielle Unterstützung/Interessenskonflikt	121
Selbstständigkeitserklärung	122

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
BZ	Benzimidazole
DL4	'developing fourth stage larvae' (frühe L4)
EL3	'early third stage larvae' (frühe L3)
EpG	Eier pro Gramm Kot
ERP	'egg reappearance period'
ESCCAP	'European scientific counsel companion animal parasites'
FEB	Fenbendazol
FEC	'fecal egg count'
FECRT	'fecal egg count reduction test' (Eizahlreduktionstest)
IVM	Ivermectin
L1	erste Larve
L2	zweite Larve
L3	dritte Larve
L3/kg TM	Anzahl L3 pro Kilogramm Trockenmasse Gras
LL3	'late third stage larvae' (späte L3)
LL4	'late fourth stage larvae' (späte L4)
LMIA	Larven-Migrations-Inhibitions-Assay ('larval migration inhabitation assay')
MDS	Magen-Darm-Strongyliden
ML	Makrozyklische Lakone
MOX	Moxidectin
p.i.	post infectionem
PIP	Piperazin
PYR	Pyrantel
spp.	Subspezies

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einordnung der Pferdestrongyliden (Deplazes et al., 2012a).....	3
Tabelle 2: Morphologie des dritten Larvenstadiums großer und kleiner Strongyliden (Schnieder, 2006).....	4
Tabelle 3: Die häufigsten vorkommenden Arten kleiner Strongyliden anhand beispielhaft ausgewählter Untersuchungen der intestinalen Wurmbürde.....	6
Tabelle 4: Einordnung von <i>Parascaris</i> spp. (Deplazes et al., 2012c).....	16
Tabelle 5: Dosierungen der Anthelminthika beim Pferd (Frey and Löscher, 2010a, 2010b).	23
Tabelle 6: In Deutschland aktuell auf dem Markt erhältlichen DVG-geprüften Desinfektionsmittel mit Wirkung gegen Parasitäre Würmer (Wurmeier) (Ausschuss der DVG e.V., Stand: 06.01.2019).....	26
Tabelle 7: Nährstoffbedarf in Abhängigkeit von der Weideform pro Jahr (KTBL, 2012)	32
Tabelle 8: Zeitplan des Feldversuches	53
Tabelle 9: Inhaltsangabe der CMI Blumenerde von OBI.....	54
Tabelle 10: Auswertung der Kotproben bezüglich der mittleren MDS-Eiausscheidung im Laufe der Weidesaison 2014 (\pm Standardabweichung)	63
Tabelle 11: Auswertung der Kotproben bezüglich <i>Parascaris</i> spp.-Eiausscheidung im Laufe der Weidesaison 2014 (\pm Standardabweichung).....	63
Tabelle 12: Anzahl der Larven in den Grasproben sowie Angabe der Larvenbelastung der Fläche pro kg TM Gras in Klammern.....	64
Tabelle 13: Ergebnisse der Grasproben am Eichendamm berechnet auf die Larvenzahl pro Kilogramm Trockenmasse Gras.....	65
Tabelle 14: Mittlere Wiedergewinnungsraten der Larven abhängig vom Zeitpunkt der Waschung der Töpfchen (%).....	66
Tabelle 15: Ergebnisse der Bestimmung der Wasseraufnahmekapazität von zwei verschiedenen Böden.....	70
Tabelle 16: Mittelwerte der Cyanamidbestimmung aus verschiedenen Erdproben zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Düngung (in mg Cyanamid / Töpfchen \pm Standardabweichung).....	75
Tabelle 17: Auswertung aller eingeschlossenen Durchgänge der Larvenassays.....	78
Tabelle 18: Inhibitorische Cyanamid Konzentrationen in %.....	79
Tabelle 19: Faktoren, die einen Feldversuch bezüglich der Wirkung von Kalkstickstoff auf Parasiten und deren Infektiösität beeinflussen können.....	85

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kleine Strongyliden im Pferdekot (Quelle: Dr. Martin Bilger).....	4
Abbildung 2: Schema für die strategische Entwurmung bei adulten Pferden mit Weidegang (ESCCAP Guideline 08, 2019).....	14
Abbildung 3: Entwurmungsschema und Schlüsselmaßnahmen im Rahmen der selektiven Behandlung von Infektionen mit kleinen Strongyliden bei adulten Pferden (ESCCAP Guideline 08, 2019).....	14
Abbildung 4: adulte Pferdespulwürmer nach Ausscheidung mit dem Kot (Quelle: privat)	17
Abbildung 5: Parascaris spp. - Ei unter dem Mikroskop (Quelle: Florina Jung)	17
Abbildung 6: Reaktion von Kalkstickstoff im Boden (AlzChem Group AG)	34
Abbildung 7: Vorbereitung von Kotproben für das Mini-FLOTAC Verfahren.....	43
Abbildung 8: befülltes Mini-FLOTAC, fertig zum Auszählen.....	43
Abbildung 9: Abpipettieren von Larven aus gestülpten Larvenkulturen	44
Abbildung 10: modifiziertes Baermann-Wetzel Trichterverfahren zur Larvenaufbereitung ...	45
Abbildung 11: Schema Grasprobenahme	46
Abbildung 12: In PBS-Tween eingeweichte Grasproben	47
Abbildung 13: Aufbau zum Graswaschen	48
Abbildung 14: Leerer und befüllter Larvenfitnesstest.....	49
Abbildung 15: Stülpfen der Siebe	49
Abbildung 16: Strongyliden-L3 unter dem Mikroskop (erkennbar an der Scheide und dem langen Scheidenschwanz) (Quelle: Florina Jung)	50
Abbildung 17: Aufbau zur Aufreinigung von Nematoden aus Erdproben.....	51
Abbildung 18: Schema der Weide am Mittelweg.....	52
Abbildung 19: Anzucht von Grastöpfchen im Klimaschrank.....	54
Abbildung 20: Dünger für ein Töpfchen (d (Schale) = 10cm)	55
Abbildung 21: links: Töpfchen im laufenden Versuch in einzelner Styroporummhüllung, rechts: Styroporhüllen von unten, mit und ohne Untersetzer.....	56
Abbildung 22: ausgemessene kleine Strongyliden L3 (links: hitzeimmobilisiert, rechts: Lugol'sche Lösung).....	58
Abbildung 23: Ansatz einer 24-Well-Platte zur Inkubation mit verwendeten Cyanamidkonzentrationen (PK=Positivkontrolle, NK=Negativkontrolle)	60
Abbildung 24: Vergleich des Anteils der im Fitnesstest gewanderten Larven zwischen ungedüngten (blau) und mit Kalkstickstoff-gedüngten Töpfchen (grün).....	67
Abbildung 25: Vergleich des Anteils der auf dem Gras befindlichen Larven zwischen ungedüngten (blau) und mit Kalkstickstoff-gedüngten Töpfchen (grün).....	68
Abbildung 26: Vergleich der Anteile der im Fitnesstest gewanderten Larven in den verschieden stark gedüngten Töpfchen (n pro Gruppe = 4).....	69

Abbildung 27: Histogramm für Messwerte aller 211 Larven.....	71
Abbildung 28: Histogramm für Werte der 176 mit Lugol'scher Lösung immobilisierten Larven	72
Abbildung 29: Histogramm für Werte der 35 mit Hitze immobilisierten Larven	72
Abbildung 30: Mittelwerte der Cyanamidbestimmung aus verschiedenen Erdproben zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Düngung.....	74
Abbildung 31: Anteil der in der Negativkontrolle (hitzegetötete L3) durch die Siebe gefallenen Strongylidenlarven bei unterschiedlicher Maschenweite	76
Abbildung 32: Anteil der in der Positivkontrolle (frische, motile L3) durch die Siebe gewanderten Strongylidenlarven bei unterschiedlicher Maschenweite.....	77
Abbildung 33: Dosis-Wirkungskurve von Cyanamid auf die Wanderungsfähigkeit infektiöser Strongyliden L3	78

1. Einleitung

Bei Pferden und anderen Equiden kommen eine Reihe unterschiedlicher Endoparasiten vor. Neben den Trematoden und Cestoden sind jedoch Vertreter der Nematoden vorherrschend, speziell der Pferdespulwurm (*Parascaris* spp.) und die kleinen Strongyliden (v.a. Cyathostominae) werden zurzeit, entsprechend der Meinung vieler Parasitologen, als die wichtigsten Parasiten beim Pferd angesehen (Peregrine et al., 2014). Aufgrund der negativen Auswirkungen der Parasiten auf den Wirt, wie Leistungseinbußen und Gewichtsverlust bzw. Verringerung der Gewichtszunahme, Kolik oder Durchfall, ist die Bekämpfung ein wichtiges Thema (Stromberg et al., 2012; Gasbarre & Douvres, 1987). Anders als bei den Nutztieren, bei denen der wirtschaftliche Verlust im Vordergrund steht, geht es bei den in Deutschland überwiegend als Sport- oder Freizeitpartner eingesetzten Pferden um die individuelle Gesunderhaltung und Leistungsfähigkeit. Die chemische Parasitenbekämpfung mit Anthelminthika steht dabei gegenwärtig im Vordergrund. In der Vergangenheit wurde vor allem eine planmäßige Behandlung vier Mal im Jahr empfohlen (Hertzberg et al., 2014).

Durch die häufige, meist unüberlegte Anwendung der wenigen für Pferde zugelassenen Produkte durch die Pferdehalter, schreitet die Entwicklung von Resistenzen immer weiter fort (Geurden et al., 2014; Molento et al., 2012; von Samson-Himmelstjerna, 2012; Brady and Nichols, 2009; Lyons et al., 1999; Sangster, 1999; Waller, 1987). Unter Fachleuten besteht derzeit Einigkeit, dass ein Strategiewechsel in der Helminthenkontrolle nötig ist (Hertzberg et al., 2014). Hierbei werden verschiedene Ansätze verfolgt. Die selektive Entwurmung ist eine Möglichkeit, den Einsatz von Wurmmitteln und somit die Resistenzentwicklung, zu reduzieren (Larsen et al., 2011). Bei dieser werden nur Pferde entwurmt, die Eier von Magen-Darm-Strongyliden (MDS) über einem bestimmten Grenzwert ausscheiden. Es kann so, in der jeweiligen Pferdegruppe, mit deutlich weniger Entwurmungen eine Reduktion der gesamten Wurmeiausscheidung erreicht und somit die Weidekontamination verringert werden. Aufgrund der nötigen regelmäßigen Kotuntersuchungen aller Pferde ist der zeitliche und finanzielle Aufwand größer, was eine Ablehnung vieler Pferdehalter zur Folge hat. Zudem werden die Parasiteneier intermittierend ausgeschieden und es gibt keine Korrelation zwischen der Höhe der Eiausscheidung und der Wurmbürde im Pferd. Es besteht also die Gefahr, dass beim Einzeltier Infektionen unerkannt und nicht behandelt werden. Da diese Methode speziell gegen die kleinen Strongyliden abzielt, muss des Weiteren die Bekämpfung anderer Endoparasiten, wie Spulwürmer, Bandwürmer oder Magendasseln, zusätzlich erfolgen. Bei Fohlen und Jungpferden bis fünf Jahren wird, aufgrund des erhöhten Parasitenbefalls speziell mit Spulwürmern, weiterhin die regelmäßige strategische Behandlung empfohlen (Hertzberg et al., 2014; Nielsen et al., 2014a; Schneider et al., 2014; Nielsen, 2012; Fritzen et al., 2010).

Der Bedarf an alternativen Bekämpfungsmethoden besteht und kann in Zukunft bei abnehmender Wirksamkeit der Anthelminthika noch steigen. Die chemotherapeutische Bekämpfung tötet die Parasiten im Wirt ab und unterbindet somit eine weitere Vermehrung und Ausscheidung von Vermehrungsprodukten. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, in den externen Entwicklungskreislauf der Parasiten einzugreifen, mit dem Ziel infektiöse Stadien zu eliminieren bzw. zu reduzieren und somit einer Infektion der Pferde vorzubeugen. Dieser Ansatz kann für die kleinen Strongyliden als Weideparasiten unter der Bezeichnung weidehygienische Maßnahmen zusammengefasst werden. An erster Stelle steht hier die Entfernung des Pferdemists von der Weide und somit auch die Entfernung der darin enthaltenen Parasitenstadien, um den Infektionsdruck auf der Weide zu senken (KTBL, 2012; Love and Duncan, 1991; Herd, 1986). Ein weiterer Ansatz, die Kalkstickstoffdüngung der Weide, soll in dieser Arbeit untersucht werden. Kalkstickstoff reagiert über Zwischenprodukte, unter anderem Cyanamid, zu pflanzenverfügbarem Ammonium und Nitrat. Cyanamid ist toxisch für Organismen und tötet in ausreichender Dosierung Parasitenlarven ab (Podstatzky, 2013; Podstatzky, 2012; Bauer, 2006; Gevrey, 1965;

Pecheur, 1962). Verschiedene Studien hauptsächlich mit Wiederkäuern und deren Weideparasiten weisen auf eine Reduzierung der Larvenstadien auf der Weide durch Kalkstickstoffdüngung hin (Cabaret and Mangeon, 1994; Brozeit and Wieners, 1976; Leiper, 1937). Dies soll in der vorliegenden Arbeit auch für Strongyliden der Pferde getestet werden. Bei guter Wirkung wäre die Kalkstickstoffdüngung eine Möglichkeit, die Zahl der infektiösen Parasitenstadien auf der Weide zu senken und somit Helmintheninfektionen bei den Pferden zu vermindern. Auch die Akzeptanz der Pferdehalter für eine solche Anwendung wäre vermutlich recht groß, da eine Düngung intensiv genutzter Pferdeweiden meist jährlich notwendig ist und man somit die Weidepflege und -hygiene sehr gut vereinbaren könnte. Durch eine solche weidehygienische Maßnahme, kombiniert mit einer durchdachten Entwurmungsstrategie, ließe sich der Einsatz von Anthelminthika deutlich reduzieren und somit die Resistenzentwicklung aufhalten.

2. Literaturübersicht

2.1. Wichtige Helminthosen der Equiden

2.1.1. Strongyliden

Zur Familie der Strongylidae zählt man die Unterfamilie der Strongylinae mit den Arten der Gattung *Strongylus*, welche allgemein als „große Strongyliden“ bekannt sind. *Strongylus vulgaris*, *Strongylus equinus* und *Strongylus edentatus* sind die drei wichtigen Vertreter beim Pferd. Weitere zugehörige Gattungen sind *Oesophagodontus*, *Triodontophorus*, *Bidentostomum* und *Craterostomum*, deren Larven jedoch keine Körperwanderung unternehmen (Lichtenfels et al., 2008).

Desweiteren findet man die Unterfamilie der Cyathostominae, die sogenannten „kleinen Strongyliden“ mit wiederum vielen weiteren Gattungen und Arten (Blackhall et al., 2006).

Bei den Equiden sind über 50 Arten der kleinen Strongyliden bekannt, zehn davon jedoch nur in Eseln und Zebras vorkommend (Lichtenfels et al., 2002). Eine Spezifizierung und Überarbeitung der Taxonomie und Entdeckungen neuer Spezies wird vor allem durch Hilfe neuerer molekularbiologischer Techniken ermöglicht.

Mischinfektionen von mehreren Cyathostominae-Spezies sind die Regel. Bis zu 29 Arten konnten bisher gleichzeitig aus einem Wirt identifiziert werden (Lichtenfels et al., 2002).

Tabelle 1: Einordnung der Pferdestrongyliden (Deplazes et al., 2012a)

	Metazoa	
	Helminthen	
Stamm	Nematoda	
Klasse	Secernentea	
Ordnung	Strongylida	
Überfamilie	Strongyloidea	
Familie	Strongylidae	
Unterfamilie	Strongylinae	Cyathostominae (kleine Strongyliden)
Gattung	<i>Strongylus</i> spp. (große Strongyliden)	<i>Cyathostomum</i> , <i>Cylicocyclus</i> , etc.
Art	<i>S. vulgaris</i> , <i>S. edentatus</i> , <i>S. equinus</i>	<i>Cylicocyclus nassatus</i> , <i>Cyathostomum coronatum</i> , <i>Cylicostephanus</i> spp.

2.1.1.1. Morphologie

Nematoden der Familie *Strongylidae* sind typischerweise an ihrer großen, von einem doppeltem Blätterkranz (Corona radiata) umgebene Mundkapsel, sowie der gut entwickelten Bursa copulatrix der Männchen mit 2 langen dünnen Spicula zu identifizieren (Deplazes et al., 2012a).

Die gelb-weißen, teils auch rötlich gefärbten kleinen Strongyliden sind zwischen 0,5 und 1,5 cm (Weibchen) bzw. 0,5 und 2,0 cm (Männchen) lang. Bei einigen Gattungen können die Männchen eine Länge von bis zu 3 cm, die Weibchen bis zu 2 cm erreichen. Die

Mundkapsel der kleinen Strongyliden ist weniger stark ausgeprägt wie die der *Strongylus* spp. und tonnenförmig, rechteckig oder zylindrisch geformt (Bürger, 2006a).

Mit einer Länge von 1,0 - 5,0 cm überschneidet sich die Größe der großen Strongyliden mit der Größe der Cyathostominae. Jedoch sind diese eher gelb-bräunlich gefärbt und deutlich an ihrer großen, dickwandigen Mundkapsel zu unterscheiden (Deplazes et al., 2012a).

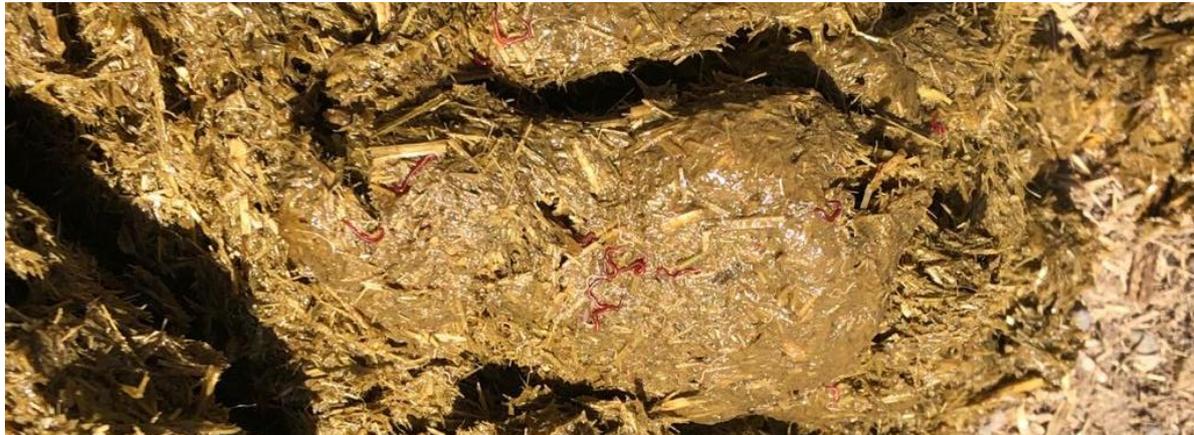


Abbildung 1: Kleine Strongyliden im Pferdekot (Quelle: Dr. Martin Bilger)

Die Eier der großen sowie der kleinen Strongyliden entsprechen dem Typ der MDS-Eier. Sie sind mit einer Länge von 60 - 80 µm und einer Breite von ca. 40 µm mittelgroß. Sie besitzen eine dünne Schale und beinhalten Furchungszellen oder, im fortgeschrittenen Stadium, die erste Larve (L1) vor ihrem Schlupf.

Durch jeweils eine Häutung (Ecdysis) entwickelt sich über vier Larvenstadien (L1 bis L4) der präadulte Wurm, welcher ohne weitere Häutung in das Stadium des adulten Wurmes übergeht. Die Entwicklung zur dritten, infektiösen Larve (L3) ist durch eine unvollständige Häutung gekennzeichnet, weshalb die L3 von einer Scheide umhüllt ist (Deplazes et al., 2012a; Lucius, 1997; Clayton, 1986). Typisch für Pferdestrongylidenlarven ist der lange Scheidenschwanz, wodurch man sie leicht von anderen Parasitenlarven und Bodennematoden abgrenzen kann. Die 800-1000 µm langen Drittlarven großer und kleiner Strongyliden lassen sich anhand morphologischer Merkmale und vor allem durch die Anzahl ihrer Mitteldarmzellen voneinander unterscheiden, wie Tabelle 1 zu entnehmen ist (Kornas et al., 2009a; Russell, 1948).

Tabelle 2: Morphologie des dritten Larvenstadiums großer und kleiner Strongyliden (Schnieder, 2006)

	Form und Größe	Oesophagus	Mitteldarmzellen	Hinterende	Scheidenschwanz/Verhältnis: Körper zu Schwanzende
Kleine Strongyliden	Plump, klein, um 850 µm lang und 24 µm breit	Lang, filariform	Cyathostominae: 8 Andere kleine Strongyliden: 12-20	Plötzlich verjüngt	Fadenförmig, sehr lang / 1,5:1
<i>S. edentatus</i>	Ziemlich schlank, klein, um 800 µm	Ziemlich lang, filariform	20 (meist undeutlich)	Sehr allmählich verjüngt	Fadenförmig, mäßig lang / 2:1

<i>S. equinus</i>	Sehr schlank, groß, um 1000 µm	Lang, filariform	16	Sehr allmählich verjüngt	Fadenförmig, kurz / 2,8:1
<i>S. vulgaris</i>	Plump, groß, um 1000 µm	Kurz, filariform	32 (sehr deutlich, dunkel granuliert)	Allmählich verjüngt	Fadenförmig, kurz / 2,5:1

2.1.1.2. Vorkommen

Strongyliden kommen weltweit in Pferdebeständen vor. Auf Bestandsebene kann man von einem ubiquitären Vorkommen ausgehen (Relf et al., 2013; Gawor, 2000; Lyons et al., 1999), bei Einzeltieruntersuchungen kann diese schwanken, liegt jedoch meist zwischen 50 – 100 %. So lag die Prävalenz von Strongyliden bei einer Untersuchung von 22 Gestüten in England bei 56 % (Relf et al., 2013), bei 400 Schlachtpferden in Deutschland bei 60,8 % (Rehbein et al., 2013) und in tropischen Gebieten bei bis zu 94 % (Kyvsgaard et al., 2011; Upjohn et al., 2010). Untersucht man nur die Fohlen mit einem Alter unter einem Jahr liegen die Werte meist niedriger. 32 % der untersuchten Fohlen in Kentucky waren positiv für MDS, zusätzlich liegen jedoch häufig Infektionen mit *Parascaris* spp. und *Strongyloides westeri* vor (Lyons et al., 2006).

Der Befall und die Höhe der Eiausscheidung ist stark vom Alter des Wirts, Zeitpunkt der letzten Entwurmung und von der Weidehygiene abhängig. Auch saisonale Unterschiede und der geografische Standort spielen eine Rolle (Reinemeyer et al., 1986). Bei Jungtieren im Alter von 1 - 4 Jahren konnte die größte Eiausscheidung beobachtet werden (Relf et al., 2013), auch die totalen Wurmbürden sind bei Pferden dieses Alters am höchsten (Lyons et al., 1999).

Die kleinen Strongyliden sind ubiquitär vorhanden und in Deutschland momentan vorherrschend. Mischinfektionen mehrerer Arten sind typisch und bei fast 90 % der Pferde vorkommend (Collobert-Laugier et al., 2002). Häufige Arten sind Tabelle 3 zu entnehmen. Große Strongyliden sind aufgrund ihres längeren Entwicklungszyklus von sechs bis elf Monaten in Gegenden mit regelmäßigem Entwurmungsmanagement sehr selten geworden (Duncan and Love, 1991; Herd and Gabel, 1990). Bei einer Untersuchung der Kotproben von 1887 Pferden in Deutschland wurden in 841 Proben MDS-Eier gefunden. Nur in zwei Proben wurden *S. vulgaris* - Larven gefunden (Schneider et al., 2014). Auf Bestandsebene liegt die Prävalenz für *S. vulgaris* nach einer Studie von 2011 in Brandenburg bei 0,8 %. In dieser Studie wurden neben dem kombinierten Sedimentations - Flotations - Verfahren auch das McMaster- und das Baermann-Wetzel-Trichter-Verfahren angewendet, sowie bei vorher gefundenen MDS-Eiern Kotkulturen angelegt (Hinney et al., 2011). Der vermehrte Einsatz der selektiven Entwurmung, um den Anthelminthikaresistenzen kleiner Strongyliden entgegenzuwirken, birgt jedoch das Risiko der Rückkehr großer Strongyliden (Nielsen et al., 2012; Nielsen et al., 2014a). In Ländern ohne planmäßige Entwurmung findet man die *Strongylus* spp. bei Kotprobenuntersuchungen deutlich häufiger. So lag bei der Untersuchung von Därmen geschlachteter Arbeitspferde in Polen die Prävalenz für *S. vulgaris* bei 80.5 %, für *S. equinus* bei 9.8 % und für *S. edentatus* bei 4.9 % (Kornas et al., 2009b).

Tabelle 3: Die häufigsten vorkommenden Arten kleiner Strongyliden anhand beispielhaft ausgewählter Untersuchungen der intestinalen Wurmbürde

Boxell et al., 2004 (Australien)	Collobert-Laugier et al., 2002 (Frankreich)	Gawor, 2000 (Polen)	Reinemeyer et al., 1984 (USA)	Cirak et al., 1996 (Deutschland)
<i>Cyathostomum catinatum</i>	<i>C. catinatum</i>	<i>C. catinatum</i>	<i>C. catinatum</i>	<i>C. catinatum</i>
<i>Cylicocyclus nassatus</i>	<i>C. nassatus</i>	<i>C. nassatus</i>	<i>C. nassatus</i>	<i>C. nassatus</i>
<i>Cylicostephanus goldi</i>	<i>C. goldi</i>	<i>C. goldi</i>	<i>C. goldi</i>	
<i>Cylicostephanus longibursatus</i>		<i>C. longibursatus</i>	<i>C. longibursatus</i>	<i>C. longibursatus</i>
	<i>Cylicocyclus insigne</i>	<i>C. insigne</i>	<i>C. insigne</i>	<i>C. insigne</i>
	<i>Cylicostephanus calicatus</i>	<i>C. calicatus</i>	<i>C. calicatus</i>	
	<i>Cylicostephanus minutus</i>	<i>C. minutus</i>	<i>C. minutus</i>	<i>C. minutus</i>
	<i>Cyathostomum coronatum</i>		<i>C. coronatum</i>	<i>C. coronatum</i>
		<i>Cylicocyclus leptostomus</i>	<i>C. leptostomus</i>	
	<i>Cyathostomum labiatum</i>	<i>Cylicocyclus ashworthi</i>	<i>Cyathostomum pateratum</i>	<i>Triodontophorus serratus</i>
	<i>Cylicocyclus ultrajectinus</i>	<i>Coronocyclus coronatus</i>		<i>Cylicostephanus poculatus</i>
	<i>Poteriostomum imparidentatum</i>			<i>Cyathostomum labratum</i>
				<i>Cylicocyclus triramosus</i>

2.1.1.3. Epidemiologie

Die wichtigste MDS-Ansteckungsquelle für Pferde ist die Weide. Hier wird die infektiöse L3 oral mit dem Gras aufgenommen (Love and Duncan, 1992). Auch im Stall ist eine Ansteckung durch sich in der Umgebung entwickelnde L3, die mit dem Kot ausgeschieden worden sind, oder infektiöses Grünfutter möglich. Beides spielt jedoch epidemiologisch eine untergeordnete Rolle. Die Präpatenz kleiner Strongyliden, also die Zeit von der Aufnahme infektiöser Stadien bis zum Beginn der Ausscheidung von Parasiteneiern, beträgt ca. sechs bis zwölf Wochen. So kann ein Pferd, welches sich kurz nach der Entwurmung neu infiziert, schon nach einigen Wochen wieder Eier Ausscheiden und zur Kontamination der Umgebung beitragen (Mirck, 1981). Die lange, d.h. bis zu mehreren Jahren andauernde Patenz kleiner Strongyliden, ist ebenfalls zu beachten. Die Larven können in der Darmschleimhaut über längeren Zeitraum in ihrer Weiterentwicklung verharren. Dieser Zustand wird als Hypobiose bezeichnet. Die enzystierten, ruhenden Larven werden von den meisten Anthelminthika nicht erreicht und können, da es sich um larvale Stadien in der Schleimhaut handelt, auch durch Kotuntersuchungen nicht nachgewiesen werden. Praktisch bedeutet dies, dass eine

vollkommene Parasitenfreiheit bei weidenden Pferden nicht gewährleistet werden kann (Eysker, 1984).

Bei den großen Strongyliden beträgt die Zeitspanne der Präpatenz je nach Subspezies 6,5 - 11 Monate und ist somit wesentlich länger (Deplazes et al., 2012a).

Die Kontamination der Weide mit MDS - Eiern zu Beginn der Weidesaison erfolgt u.a. durch im Vorjahr infizierte Pferde, die den Winter über Träger geblieben sind. Im Frühjahr werden hypobiotische Stadien aktiviert und die Entwicklung zu adulten Würmern fortgesetzt, wodurch die Eiausscheidung verstärkt wird. Auch die Überwinterung von Strongyliden - L3 ist in unserem Klima möglich. Neuinfektionen im Frühjahr sind daher auch durch die auf der Weide überwinterten Larven möglich, vor allem wenn die Flächen intensiv für die Pferdehaltung genutzt werden (Kuzmina et al., 2006; Mirck, 1981).

Die Entwicklung vom Ei zur infektiösen L3 kann bei genügend Feuchte und Temperaturen zwischen 25 und 30°C innerhalb einer Woche stattfinden. Bei niedrigeren Temperaturen läuft die Entwicklung langsamer oder gar nicht mehr ab (Mfitlodze and Hutchinson, 1987). Auch bei längerer Trockenheit stagniert diese (Courtney and Asquith, 1985). Die infektiösen L3 sind jedoch sehr widerstandsfähig. Für L3 von *Cooperia oncophora* wurde nachgewiesen, dass diese Trockenperioden in tieferen Erdschichten überstehen (Knapp-Lawitzke et al., 2014a). Die Anzahl der überwinterten Larven ist abhängig vom Kontaminationsgrad der Weide im Herbst sowie den Witterungsbedingungen (Temperatur, Feuchte, Schneedecke) im Winter (Nielsen et al., 2007; Kuzmina et al., 2006; Polley, 1986). Doch auch nur wenige Larven reichen im Frühjahr aus, um erneute Infektionen hervorzurufen. Durch aufkommende Neuinfektionen, Aktivierung hypobiotischer Stadien und Ausscheidung von Eiern durch latent infizierte Tiere, steigt die Larvenanzahl auf der Weide erst langsam an (Eysker et al., 1989b). Im Spätsommer kommt es, vor allem in feuchten Sommern, zu einem Höhepunkt der Larvenbürde auf der Weide in Folge hoher Ausscheidungsraten, einer schnelleren Entwicklung zur L3 bei warmen Temperaturen sowie guten Überlebensbedingungen (Duncan, 1974; Eysker et al., 1989a; Mirck, 1981; Ogbourne, 1972).

2.1.1.4. Immunität

Nach wiederholter Infektion mit kleinen Strongyliden entwickelt sich scheinbar eine gewisse Immunität, so haben ältere Pferde meist geringere Strongylideneizahlen im Kot und längere „Egg reappearance periods“ (ERP) nach der Entwurmung. Einige Studien mit Pferden, die natürlich mit kleinen Strongyliden infizierten waren und andere mit experimentell infizierten Pferden ließen die Beobachtung zu, dass sich durch wiederholten Kontakt mit kleinen Strongyliden im Alter eine unvollständige Immunität ausbildet (Monahan et al., 1998; Love and Duncan, 1992). Diese kann gegen alle Stadien gerichtet sein mit dem Ziel, die Entwicklung der Parasiten zu verlangsamen oder die Etablierung der Wurmbürde zu minimieren. Mögliche vorstellbare Mechanismen wären z.B. die Ausscheidung eindringender L3 oder die Aktivierung der Hypobiose dieser Larven. Die Tötung und Ausscheidung von Larvenstadien in der Darmwand sowie eine Ausscheidung luminaler adulter Stadien ist nur in gewissen Graden möglich (Klei and Chapman, 1999).

Auch eine gewisse genetische Komponente wird diskutiert. KORNAS et. al. veröffentlichte 2015 eine Studie in der 789 Araber Stuten eines Gestüts acht Jahre koproskopisch untersucht wurden. Die beobachteten Variationen der Ergebnisse der Kotproben scheinen zu unter 10% genetisch bedingt zu sein. Betrachtet man nur Pferde ab einem Alter von drei Jahren liegt der Wert bei 21 % (Kornas et al., 2015).

Bei den großen Strongyliden induziert eine vorangegangene Infektion eine Immunreaktion. Bei wiederholter Infektion sind die Krankheitserscheinungen und pathologischen Veränderungen reduziert (Dennis et al., 1992). Eine orale Immunisierung mit strahlenattenuierten L3 ruft den gleichen Effekt hervor (Deplazes et al., 2012b). Zehn bis 21

Tage nach Infektion mit *S. vulgaris* - Larven konnte BAILEY eine Antigen-induzierte lymphozytische Immunantwort beobachten, gefolgt von einer biphasischen Antikörper-Reaktion sowie einer Eosinophilie. Bei einer Reinfektion war die lymphozytische Reaktion erhöht (Bailey et al., 1989). Auch durch Ivermectin-Gabe scheint sich, bei erneuter Infektion, die Immunantwort gegenüber *S. vulgaris* nicht zu verändern (Dennis et al., 1992).

2.1.1.5. Entwicklung

Die externe, präparasitische Entwicklung läuft bei großen und kleinen Strongyliden gleichermaßen ab. Die mit dem Kot ausgeschiedenen Eier enthalten acht oder mehr Furchungszellen. Wenn die erste Larve fertig entwickelt ist, schlüpft diese und häutet sich bald zur L2. Nach einer weiteren, jedoch unvollständigen Häutung, entsteht die infektiöse L3, welche von einer schützenden Scheide umgeben ist. L1 und L2 ernähren sich von Fäkalbakterien und lagern Vorratsstoffe in den Mitteldarmzellen ein, von welchen die dritte Larve zehrt, bis sie oral von ihrem Wirt aufgenommen wird (Deplazes et al., 2012a). Die nun folgende interne, parasitische Entwicklung der kleinen Strongyliden unterscheidet sich von denen der Strongylus Arten.

Im Laufe der Magen-Dünndarm Passage streifen die aufgenommenen Larven der kleinen Strongyliden ihre Hülle ab (Deplazes et al., 2012a). Im Dickdarm angekommen enzystieren sich die sogenannten „early third stage larvae“ (EL3) und dringen in die Mukosa bzw. Submukosa der Kolon- und Zäkumschleimhaut ein. Die „late third stage larvae“ (LL3) entwickelt sich zur „developing fourth stage larvae“ (DL4), welche die Schleimhaut verlässt. Die jetzt als „late fourth stage larvae“ (LL4) bezeichneten Larven entwickeln sich im Lumen zu adulten Würmern weiter (Chapman et al., 1999).

Die Ruhephase bzw. Hypobiose in der Schleimhaut wurde erstmals von Gibson beschrieben (Gibson, 1953) und kann zwischen ca. 2 Monate und 3 Jahre andauern. Durch die Hypobiose wird die Fortpflanzung der Parasiten in ungünstigen Jahreszeiten, d.h. der Winterzeit, verhindert. Ab Mitte des Jahres steigt die Anzahl der enzystierten Larven. Im Winter kann ihr Anteil bis zu 95 % der Gesamtpopulation ausmachen (Deplazes et al., 2012b). Die Hypobiose, eine temporäre Unterbrechung der larvalen Entwicklung kommt auch bei anderen Nematodem im dritten, vierten oder fünften Larvenstadium vor. So ist dieses Phänomen z.B. auch bei *Chabertia ovina* (Haus- und Wildwiederkäuer), *Oesophagostomum* spp. (Wiederkäuer und Schwein), den Trichostrongyliden (v.a. Arten der Hauswiederkäuer wichtig) und bei *Dictyocaulus viviparus* (Lungenwurm der Rinder) bekannt (Langrova et al., 2008; Almeria et al., 1996; Vercruysse, 1983). Beeinflusst wird die Hypobiose vermutlich durch jahreszeitliche Einflüsse, die Anzahl der luminal residenten Adulten, Prozesse in der Populationsdynamik und dem Immunstatus des Wirts (Deplazes et al., 2012b; Chapman et al., 2003; Chapman et al., 2001; Klei and Chapman, 1999; Monahan et al., 1998; Love and Duncan, 1992; Eysker et al., 1991; Eysker et al., 1990; Eysker and Mirck, 1986; Reinemeyer and Herd, 1986; Eysker et al., 1984).

Nach Reaktivierung und Entwicklung zum adulten Wurm findet die Begattung der Weibchen statt. Diese produzieren Eier, die vom Wirt mit dem Kot ausgeschieden werden. Auch die Larven der großen Strongyliden verlieren ihre Scheide nach Aufnahme durch den Wirt und Passage des Magens. Ihre Larven unternehmen ausgedehnte Körperwanderungen, welche mit großen Schäden für den Wirt einhergehen.

Die Larven von *S. vulgaris* entwickeln sich in der Submukosa von Ileum, Zäkum oder Kolon zur L4. Diese dringen in die Darmarteriolen ein und wandern retrograd bis auf die Höhe der Arteria ileocaecocolica bzw. A. mesenterica cranialis (DeLay et al., 2001). Die Wanderung erfolgt auf oder in der inneren Gefäßwand. Einige Larven können auch bis in die Aorta und in die von dort abzweigenden Gefäße gelangen, werden dort aber mit dem Blutstrom in andere Organe abgeschwemmt. Durch Entzündungsreaktionen kann es in den durchwanderten Gefäßen zu Verdickung der Gefäßwand, Aneurysmen und Thrombenbildung um die Larven kommen. Zwischen dem 90. und 120. Tag nach der Infektion (p.i.) häuten sich die L4 zum präadulten Stadium. Nach Abbau der Thromben erreichen die L4 bzw. Präadulten mit dem Blutstrom die Arteriolen der Darmwand und verursachen auch hier wieder Thrombenbildung

und Entzündungsreaktionen. Hierdurch wird die Darmwand geschädigt und die jungen *S. vulgaris* - Parasiten können erst in die Darmwand und schließlich ins Darmlumen einwandern. Dort entwickeln sie sich innerhalb von sechs bis acht Wochen zu geschlechtsreifen Würmern, die sich bevorzugt im Zäkum aufhalten. Die Präpatenz beträgt 6,5 Monate, die Patenz bis zu 1,5 Jahren (Bürger et al., 2006a; DeLay et al., 2001; Duncan, 1974; Duncan & Pirie, 1972).

Die Larven von *S. equinus* dringen im Dün- oder Dickdarm in die Schleimhaut ein, um sich zur L4 zu entwickeln. Ein Teil der Larven kann einige Monate in der Darmwand persistieren, der größte Teil beginnt jedoch die Wanderung über die Bauchhöhle zur Leber. Hier halten sich die Larven einige Zeit auf, nehmen deutlich an Größe zu und wandern im Leberparenchym umher, bis sie zwischen der 15. und 17. Woche p.i. das Pankreas erreichen. Nach der Häutung zum präadulten Stadium dringen sie ca. 40 Wochen p.i. über den angrenzenden Zäkumkopf wieder ins Darmlumen ein. Adulte findet man vor allem am Übergang von Zäkum zu Kolon und im ventralen Kolon. Einige Larven können auch von der beschriebenen Wanderroute abweichen und in anderen Körperbereichen und Organen gefunden werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass sie von dort zurück ins Darmlumen gelangen, um die Entwicklung abzuschließen, ist jedoch gering. Die Präpatenz beträgt insgesamt ca. 8,5 bis 9 Monate (Eckert, 2012; McCraw and Slocombe, 1985).

Die Larven von *S. edentatus*, die nach der Magenpassage ihre Scheide abgelegt haben, dringen in die Venen von Kolon und Zäkum ein und gelangen über das Pfortadersystem in die Leber, wo sie schon zwei Tage p.i. nachzuweisen sind. Nach Häutung zur L4 und längerem Aufenthalt in der Leber migrieren die Larven durch die Leberbänder, um sich retroperineal in der Flankengegend anzusiedeln und sich, um die 16. Woche p.i., zum präadulten Stadium zu häuten. Dieses wandert wieder in das Darmlumen ein und wächst zum Adulten heran, die ab der 40. Woche p.i. in Zäkum und Kolon zu finden sind. Auch hier ist eine Abweichung der Larven, von dem für sie optimalen Wanderweg, häufig der Fall. Die Präpatenz beträgt 10,5 bis 11 Monate (Bürger et al., 2006a; McCraw and Slocombe, 1974).

2.1.1.6. Entwicklung und Überleben der L3 auf der Weide

Die Entwicklung der mit dem Kot ausgeschiedenen MDS - Eier auf der Weide, ist von der Temperatur und der Feuchtigkeit des Bodens abhängig. Unter Laborbedingungen konnte festgestellt werden, dass eine Entwicklung zur L3 nur bei Temperaturen zwischen 10 und 35°C stattfindet. Unter 6°C fand keine Entwicklung der Eier statt, zwischen 6 - 8°C entwickelte sich das Ei, aber erst bei Temperaturen über 8°C schlüpfte die Larve (Mfitilodze and Hutchinson, 1987). Es konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Entwicklungseigenschaften der Eier zwischen den verschiedenen Strongyliden - Spezies festgestellt werden. Auch Tests mit Pferde-Strongyliden aus tropischen Ländern fielen gleich aus. Bei einer Feuchte von weniger als 15 – 20 % in Kotballen wurde in diesen keine Entwicklung zur infektiösen L3 nachgewiesen (Mfitilodze and Hutchinson, 1987). Das Wetter und die Jahreszeit nehmen somit Einfluss auf die Entwicklung der Parasitenstadien. KORNAS et. al. konnten in einer 11-jährigen Studie beweisen, dass das Klima einen signifikanten, wenn auch nur kleinen, Einfluss auf den Strongyliden-EpG-Befund der Pferde hat (Kornas et al., 2010b).

Die L3 können passiv vom Kothaufen aus verbreitet werden, z.B. durch Auswaschung durch Regen, Verschleppung durch Insekten oder mechanische Verbreitung (Deplazes et al., 2012b). Auch eine aktive Bewegung der Larven in einem Flüssigkeitsfilm, bis zu 30 cm in die Weite und 10 cm in die Höhe, ist möglich (Dias et al., 2007; Stromberg, 1997). Dies ermöglicht es ihnen bei entsprechender Feuchte von ihrem Hauptreservoir der Erde bzw. den Kotballen die Grashalme hinauf zuwandern und dort von grasenden Pferden aufgenommen zu werden (Krecek et al., 1990). So sind früh morgens bei Tau die meisten Larven auf dem Gras zu finden (dos Santos et al., 2011; Couto et al., 2008; Quinelato et al., 2008). KNAPP-LAWITZKE et. al. fanden in einem Versuch mit Larven der bei Wiederkäuern

vorkommenden Art *C. oncophora* heraus, dass sich die Larven bei länger andauerndem Trockenstress in die oberste Erdschicht zurückziehen und dort die Trockenphasen überstehen können (Knapp-Lawitzke et al., 2014a). Somit ist die Erde zusammen mit den Kothaufen ein wichtiges und zuvor unterschätztes Reservoir für infektiöse Larvenstadien. Geschützt vor Dehydratation, hohen Temperaturen und UV-Strahlen können sie länger überleben und, bei entsprechend günstigeren Bedingungen, ihren Lebenszyklus fortsetzen (Knapp-Lawitzke et al., 2014a).

Die tatsächlichen Überlebenszeiten der Larven auf der Weide sind schwer zu bestimmen und stark abhängig von äußeren Wettereinflüssen. In Brasilien bei tropischem Klima wird eine Überlebenszeit der L3 kleiner Strongyliden von sieben Wochen in der Regenzeit und von zehn Wochen in der Trockenzeit angegeben (Quinelato et al., 2008). Bei einem Feldversuch in der Ukraine, bei dem Kothaufen mit MDS - Eiern zu verschiedenen Zeitpunkten auf der Weide platziert und untersucht worden sind, zeigte sich, dass in den wärmeren Monaten 6 – 11 % der Larven ein bis zwei Monate überleben. Ein ganzes Jahr von April 2003 bis April 2004 überlebten nur 0,03 % der Larven. Die besten Überwinterungschancen hatten L3, die im September auf der Weide platziert wurden. Von diesen Larven überlebten 42 % bis zum nächsten Frühjahr, über 90 % davon in den Kothaufen und nur wenige in der Umgebung. Alle Eier und früheren Larvenstadien starben in der kalten Jahreszeit (Kuzmina et al., 2006). Auch in der kanadischen Prairie konnte eine Überwinterung der L3 belegt werden. Von den im Juli und August auf der Weide platzierten Kothaufen konnten 1 % der Larven (in Bezug zur initialen Eizahl des Kothaufens) im Spätsommer des Folgejahrs gefunden werden (Polley, 1986).

2.1.1.7. Pathogenese

Kleine Strongyliden wurden lange Zeit, auf Grund der fehlenden Körperwanderung der Larven, im Vergleich zu den großen Strongyliden, als nicht pathogen angesehen. Die meisten Infektionen verlaufen latent und ohne klinische Symptome, auch wenn hohe Wurmbürden vorliegen. Jedoch besitzen die Larven durch ihr Stadium in der Darmwand und die somit notwendige Ein- und Auswanderung in und aus der Mukosa ein gewisses, nicht zu unterschätzendes Pathogenitätspotential, welches jedoch u.a. von der Anzahl der Parasiten abhängig ist. So können klinische Symptome wie chronischer Durchfall oder Abmagerung mit dem Vorhandensein kleiner Strongyliden in Zusammenhang gebracht werden (Love et al., 1999). Besonders die sogenannte larvale Cyathostominose, bei der es zur Reaktivierung und Auswanderung einer großen Anzahl hypobiotischer Stadien kommt, führt zu großflächiger Schädigung der Darmwand und im schlimmsten Fall zum Tode des betroffenen Pferdes (Deplazes et al., 2012b).

LOVE et al. fanden Larven in der Darmwand mit einer Dichte von 20 - 50 Stück pro Quadratzentimeter. Sie verursachen eine katarrhalische bis fibrinöse Entzündung von Zäkum und Kolon, diffuse hämorrhagische Foki, Darmwandödem sowie vergrößerte mesenteriale Lymphknoten (Love et al., 1999). Entzündungsreaktionen entstehen durch direkte Schädigung des Gewebes sowie Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus bestimmten Zellen. So sind in betroffenen Darmabschnitten die Cytokine IL-4 und IL-10 und bei Auswanderung der Larven TNF-alpha-Werte erhöht (Deplazes et al., 2012b).

Histopathologisch gesehen penetrieren Larven die Epithelzellen der tubulösen Drüsen und provozieren eine fibroblastische Reaktion sowie Hyperplasie und - trophie der Becherzellen. In der Darmwand sind zelluläre Infiltrationen von Lymphozyten, Makrophagen, Eosinophilen und einigen Plasmazellen zu finden, welche diffus verteilt oder fokal um die bindegewebig eingekapselten Larven liegen (Love et al., 1999).

Durch die Körperwanderung der Larven besitzen die großen Strongyliden ein großes Pathogenitätspotential, eine Infektion kann für das Pferd tödlich enden. Im Dickdarm sind

durch die Auswanderung der Larven hämorrhagische Herde und entzündliche, reaktive Knötchen zu finden. Durch wandernde *S. vulgaris* - Larven werden vor allem die arteriellen Gefäßwände geschädigt. Es kommt zu Thrombarteritis, Aneurysmabildung und Bildung größerer Thromben vor allem im Bereich der vorderen Gekrösearterie. Embolien und Darminfarkte in diesem Bereich führen aufgrund fehlender Durchblutung zum Absterben von Darmbereichen, welches sich in starken Koliken äußern kann. Desweiteren sind Gefäßwandschäden in der Aorta und weiteren Gefäßen zu finden. So kann eine Infektion mit *S. vulgaris* auch eine mögliche Ursache des intermittierenden Hinkens durch Verlegung der A. femoralis sein. Auch Schäden im Gehirn und Rückenmark sind durch abgeschwemmte Larven möglich.

S. equinus und *S. edentatus* Infektionen gehen mit entzündlichen Reaktionsherden und Fibrosen der durchwandernden Gewebe und Organe wie Leber, Pankreas und Peritoneum einher.

Die Adultstadien großer Strongylyden saugen sich mit ihrer großen Mundkapsel an der Darmschleimhaut fest und ernähren sich von austretendem Blut und Gewebe. Einzelne dieser oberflächlichen Schleimhauterosionen sind pathologisch nicht relevant, großer Befall kann zu Störungen der Darmmotilität, sowie geringgradigen Albumin- und Blutverlust führen (Deplazes et al., 2012b).

2.1.1.8. Krankheitsbild

Ein Befall mit Parasiten geht nicht immer mit klinischen Symptomen einher. Abhängig von verschiedenen Faktoren, wie beispielsweise Infektionsdruck, Alter und Immunstatus des Wirts, kann ein Parasitenbefall unbemerkt vonstattengehen. In diesem Fall spricht man von subklinischen Parasitosen (Schnieder, 2006).

Die Cyathostominose äußert sich mit eher unspezifischen Symptomen wie Gewichtsverlust, Diarrhö, subkutanem Ödem oder auch Fieber und Koliken (Love et al., 1999). Es werden verschiedene Krankheitsbilder mit unterschiedlich schwerem Verlauf beschrieben. Die chronische Cyathostominose tritt meist gegen Ende der Weideperiode bei Jungtieren auf. Einzeltiere oder mehrere Tiere der Gruppe können betroffen sein und zeigen gestörte Gewichtszunahme, struppiges Haarkleid und wechselnde Kotkonsistenz. Die Laborwerte sind meist normal, bei der Kotuntersuchung sind MDS-Eier zu finden (Deplazes et al., 2012b).

Fälle von chronischer Diarrhö können auch während des gesamten Jahres auftreten. Hauptsächlich sind jüngere Pferde noch unter einem Jahr alt betroffen, die aufgrund der geschädigten Darmwand rekurrenden Durchfall zeigen. Auch Hypalbuminämie, Neutrophilie und Erhöhung der alkalischen Phosphatase sowie von Fructosaminen im Serum sind möglich. Letztere können als Indikator für Proteinverlust, bzw. verringerten Protein-Turnover angesehen werden (Love et al., 1999). MDS-Eier können in kleiner bis großer Anzahl im Kot vorhanden sein, aber auch negative Ergebnisse kommen vor (Deplazes et al., 2012b).

Die schwerste Verlaufsform ist die larvale Cyathostominose, wegen ihres saisonalen Auftretens auch Winter-Cyathostominose genannt. Die Fälle treten überwiegend im Winter und Frühjahr auf, vor allem von November bis Mai. Betroffen sind meist Pferde zwischen zwei und acht Jahren. Typisch sind ein akut auftretender, persistierender Durchfall und rapider Gewichtsverlust oft mit letalem Verlauf. Weitere mögliche klinische Äußerungen sind Fieber, subkutane Ödeme und Koliken durch Störungen der Darmmotilität. Auch in der Hämatologie und der Blut-Chemie sind Änderungen wie Hypalbuminämie, Hyper- β -Globulinämie, Neutrophilie sowie Erhöhung der alkalischen Phosphatase und Fructosamine zu finden. Bei der rektalen Examination sind häufig Larven aus dem 4. Stadium zu finden, eine Eiausscheidung findet in den meisten Fällen nicht statt. Ursache ist die plötzliche

synchrone Auswanderung der hypobiotischen Larvenstadien aus der Darmwand, wodurch diese massiv geschädigt wird (Deplazes et al., 2012b; Schnieder, 2006; Love et al., 1999; Giles et al., 1985).

Die Strongylose kommt häufiger in der chronischen Form vor (Deplazes et al., 2012b). Die in ihrem Verlauf meist dramatischeren, akuten Fälle sind oft durch die wandernden Larvenstadien noch in der präpatenten Phase verursacht. Dann kann es zu Inappetenz, Fieber, Lethargie und Kolik kommen. Des Weiteren können Veränderungen der Peritonealflüssigkeit, erhöhte Werte von Laktat, alkalischer Phosphatase und γ -Glutamat-Transpeptidase im Serum sowie Hypalbuminämie auftreten (Deplazes et al., 2012b). In einzelnen Fällen kann die Infektion schnell letal verlaufen. Nach künstlicher Infektion mit 2500 bis 5000 *S. vulgaris* Larven starben neun von elf Fohlen zwei bis drei Wochen nach Infektion (Drudge and Lyons, 1966).

Die chronische Strongylose äußert sich, ähnlich anderer chronischen Parasitosen, mit unspezifischen Symptomen, die verschieden schwer verlaufen können, wie z.B. Inappetenz, Abmagerung, schlechtes Fell und intermittierender Durchfall, sowie rezidivierende Koliken, Hypalbuminämie, Hyper- β -Globulinämie, transiente Neutrophilie und Eosinophilie (Deplazes et al., 2012b).

2.1.1.9. Diagnose

Während einer patenten Infektion kann man die Fortpflanzungsprodukte der Parasiten in den Ausscheidungen des Wirtstieres finden. So kann mithilfe einer Kotflotation ein Befall mit MDS diagnostiziert werden (Deplazes et al., 2012b; Schnieder, 2006). Die mittelgroßen Eier (60 -80 μm lang, 40 μm breit) sind an ihrer dünnen Schale und den enthaltenen Furchungszellen gut zu erkennen (Deplazes et al., 2012b). Jedoch ist anhand der Eizahl, welche in Eiern pro Gramm Kot (EpG) angegeben wird, kein ausreichend genauer Rückschluss auf die Höhe der Wurmbürde möglich (Nielsen et al., 2010; Warnick, 1992). Auch die Differenzierung zwischen kleinen und großen Strongyliden ist nicht möglich, hierfür ist das Anlegen einer Larvenkultur (siehe 3.2.3) notwendig. Die morphologische Untersuchung des dritten Larvenstadiums lässt eine Unterscheidung kleiner und großer Strongyliden, sowie eine Artdiagnose der *Strongylus* spp. zu. Auch molekularbiologische Methoden nehmen bei der Differenzierung immer mehr an Bedeutung zu (Nielsen et al., 2012; Hodgkinson et al., 2005; Dowdall et al., 2003a; Hodgkinson et al., 2003; Pape et al., 2002; Hodgkinson et al., 2001; Hung et al., 1999a; Hung et al., 1999b; Pape et al., 1999; Hung et al., 1997; Campbell et al., 1995).

In klinischen Fällen kann die Eiausscheidung fehlen. Dann können eine ausführliche Anamnese, klinische Symptome und Laborbefunde Hinweise auf eine Parasitose geben, sind jedoch nicht pathognomonisch (Deplazes et al., 2012b). So ist das Totalprotein zu Beginn der Infektion aufgrund des Anstiegs der β -Globulin-Fraktion erhöht, später durch den Proteinverlust über die geschädigte Darmwand erniedrigt (Love et al., 1999; Giles et al., 1985).

Bei der larvalen Cyathostominose ist auch die rektale Untersuchung hilfreich, bei der man möglicherweise Viertlarvenstadien am Handschuh findet oder verdickte Darmwand palpieren kann. Eine sichere Diagnose ist oft nur während der Sektion möglich, hier gibt es auch verschiedene Methoden um die wandständigen Larvenstadien nachzuweisen (Bürger et al., 2006b; Duncan et al., 1998; Ribbeck et al., 1997). DOWDALL et. al. konnten diagnostische Antigene (20 kDa), die spezifisch für kleine Strongyliden sind, identifizieren, sodass auch eine serologische Diagnose der larvalen Cyathostominose möglich erscheint (Dowdall et al., 2003).

2.1.1.10. Therapie und Bekämpfungsmaßnahmen

Zur chemotherapeutischen Behandlung bei Befall mit MDS kommen die für Pferde zugelassenen Anthelminthika zum Einsatz. Fenbendazol aus der Gruppe der Benzimidazole, das Tetrahydropyrimidin Pyrantele, Piperazinzitrat, sowie die beiden makrozyklischen Laktone Ivermectin und Moxidectin wirken in üblicher Dosierung gut gegen adulte Stadien. Praziquantel wird nur bei der Bekämpfung gegen Cestoden eingesetzt.

Ivermectin und Moxidectin haben gegen adulte MDS eine gute Wirksamkeit, die im Eizahlreduktionstest meist bei 99 % und höher liegt, auch die Wirkung gegen luminale L4 liegt um 98 % (Lester et al., 2013; von Samson-Himmelstjerna, 2012; Larsen et al., 2011; Becher and Pfister, 2010; Fritzen et al., 2010; Xiao et al., 1994; Eysker et al., 1992). Ivermectin hat keine Wirkung gegen mukosale Drittlarvenstadien der kleinen Strongylyden, Moxidectin wirkt nicht gegen frühe Drittlarvenstadien (EL3), hat aber dennoch eine moderate Wirksamkeit von 62-79 % gegen enzystierte späte Drittlarven (LL3) (Xiao et al., 1994; Eysker et al., 1992). Piperazin besitzt eine Teilwirkung gegen große und kleine Strongylyden. So konnte bei der Behandlung von Pferden, die mit Benzimidazol-resistenten kleinen Strongylyden infiziert waren bei Kombination von Fenbendazol und Piperazin eine deutlich höhere Eizahlreduktion erreicht werden, als bei alleiniger Behandlung mit Benzimidazolen. Die Wirkung liegt jedoch deutlich unter der von Makrozyklischen Laktone oder Pyrantele (Britt and Clarkson, 1988; DiPietro et al., 1985). Von Resistenzen und verminderter Wirksamkeit auch in Kombination mit anderen Anthelminthika wurde auch schon berichtet (Drudge et al., 1988). Fenbendazol ist bei einer fünftägigen Behandlung ebenfalls gegen wandständige Stadien einsetzbar (Duncan et al., 1998), jedoch sollte beim Einsatz von Benzimidazolen gegen kleine Strongylyden ebenfalls die aktuelle Resistenzlage beachtet werden (Lester et al., 2013; Traversa et al., 2012; von Samson-Himmelstjerna, 2012; Reinemeyer, 2012). Von Resistenzen der Cyathostominae gegen Pyrantele werden vor allem in den USA berichtet, wo dieses täglich als Fütterungsarzneimittel eingesetzt wird. Doch auch in Europa kann nicht mehr von einer allgemein guten Wirksamkeit ausgegangen werden. 2008 wurden bei 25 % der untersuchten Betriebe in Deutschland, Italien und Großbritannien Pyrantele-Resistenzen gefunden (Smith et al., 2015; Traversa et al., 2009; Kaplan et al., 2004). Ivermectin, Moxidectin und Fenbendazol wirken ebenfalls gegen die durch den Körper wandernde L4 großer Strongylyden (Monahan et al., 1995; Slocombe et al., 1983; Slocombe and McCraw, 1982; Slocombe et al., 1982; Slocombe and McCraw, 1980).

Beim Einsatz von Anthelminthika sind verschiedene Behandlungsschemata möglich. Bei strategischer, also regelmäßiger Behandlung ist ein Befall mit großen Strongylyden, aufgrund des langen Entwicklungszyklus, sehr selten. Adulte Pferde mit Weidegang werden zwei bis viermal im Jahr, abhängig vom Monitoring, welches Kotprobenuntersuchungen vier mal jährlich vorsieht, entwürmt (ESCAPP Guideline 08, 2019). Das vom 'European Scientific Counsel Companion Animal Parasites' (ESCCAP) empfohlene Schema ist Abbildung 2 zu entnehmen. Einmal jährlich sollte ein 'faecal egg count reduction test' (FECRT) durchgeführt werden, um die Wirksamkeit des eingesetzten Anthelminthikums zu testen. Hierbei werden quantitative Kotprobenuntersuchungen vor und nach der Entwurmung durchgeführt, um die Reduktion des EpGs zu überprüfen.

Um der Resistenzentwicklung der kleinen Strongylyden entgegen zu wirken, ist die selektive Entwurmung ein weiterer Ansatz, bei dem nur Pferde, die bei der Kotuntersuchung einen Grenzwert des EpGs überschritten haben, behandelt werden. Die selektive Entwurmung sollte nur bei Adulten Pferden angewendet werden und auf Betrieben mit negativem Nachweis für große Strongylyden. Sie zielt nur auf die Bekämpfung kleiner Strongylyden ab. ESCCAP sieht hierbei eine drei bis viermalige (im ersten Jahr) individuelle, quantitative Kotprobenuntersuchung und Behandlung bei einem EpG über 200 vor. Nach Abschluss der Weidesaison werden auch alle in diesem Jahr unbehandelten Pferde (da immer <200 EpG) mit geeignetem Mittel entwürmt (ESCCAP Guideline 08, 2019; Hertzberg et al., 2014; Larsen et al., 2011).

Time point of treatment	Indication	Drug class ²	Animals to be treated	Remarks
February/March	Cyathostomins	BZ or PYR ⁴	All horses, however only if monitoring provided evidence of infection	Monitoring ³ by faecal examination
1–2 months post turn out (June/July)	Cyathostomins, possibly large strongyles	ML	All horses	Monitoring ³ by faecal examination
4–5 months post turn out (August/September)	Cyathostomins, possibly tapeworms	BZ or PYR ⁴ , PZQ but only if tapeworms found on farm	All horses, however only if infection was proven by prior monitoring	Monitoring ³ by faecal examination
At housing (November/December)	Cyathostomins, possibly <i>Gasterophilus</i> , tapeworms, large strongyles	ML, PZQ but only if tapeworms found on farm	All horses	Monitoring ³ by faecal examination, if positive possibly conduct FECRT ⁵

¹ Treatment plans need to be adapted specifically to the farm and region.

² Drug classes: benzimidazoles incl. pro-benzimidazoles (BZ), macrocyclic lactones (ML), the tetrahydropyrimidine pyrantel (PYR) and the isochinoline praziquantel (PZQ).

³ Monitoring: These dates are suitable for the qualitative monitoring of the overall herd infection status. Individual animal testing provides the most reliable data and is the preferred approach. However where this is not feasible, pooled sample testing (e.g. of up to 5 horses) can provide qualitative information on the spectrum of parasites present. If performed quantitatively, the analysis of a pooled faecal sample may also provide an estimate of the strongyle egg shedding intensity in the respective group. If monitoring provides positive results, a faecal egg count reduction test could be performed to confirm drug efficacy.

⁴ BZ-resistance in cyathostomins is widespread and PYR-resistance also common therefore these drug classes should only be used if efficacy has been confirmed on the farm using post-treatment coproscopic testing.

⁵ FECRT: faecal egg count reduction test.

Abbildung 2: Schema für die strategische Entwurmung bei adulten Pferden mit Weidegang (ESCCAP Guideline 08, 2019)

Year 1	Year 2 and later
<ul style="list-style-type: none"> ■ Four FECs² starting in April/May until Oct/Nov ■ Treat all horses with strongyle FEC ≥ 200 ■ Do post-treatment faecal analysis check-ups ■ Perform large strongyle testing (larval culture/PCR) ■ Treat all horses with evidence for other parasite infections (e.g. <i>Parascaris</i>, tapeworm, large strongyles)³ ■ Keep one treatment at the end of the year for those horses who have not received diagnostic-based treatment during the season (employ drug with activity against migratory stages of large strongyles) ■ Perform strict quarantine procedure (see chapter 5) 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Same procedure as in year 1 but frequency of faecal egg counts can be reduced to three if the epidemiological situation is stable

¹ It is recommended that selective treatment is only employed in adult horses and not in stables harbouring large strongyles. Monitoring can be adapted regionally based on epidemiological evidence. The selective treatment concept is preferably employed as a 'whole stable approach' and not for single horses grazing together with unmonitored horses.

² Faecal egg counts (FECs) based on methods with at least a lower detection limit of 50 eggs per gram.

³ Sensitivity of larval culture is lower than a combination of larval culture and PCR. These methods can only detect patent infections while disease is caused during prepatency by larval stages.

Abbildung 3: Entwurmungsschema und Schlüsselmaßnahmen im Rahmen der selektiven Behandlung von Infektionen mit kleinen Strongyliden bei adulten Pferden (ESCCAP Guideline 08, 2019)

Desweiteren sind Maßnahmen, die den Infektionsdruck senken elementar im Parasitenmanagement. Hierzu gehören ein gutes Weidemanagement, sowie die Weidehygiene. Hierauf wird im Kapitel 2.2.3 noch näher eingegangen.

Die klinische Cyathostominose und Strongylose erfordert oft eine Intensivbehandlung aller auftretenden Symptome. Eine anthelminthische Behandlung ist durch die schon

vorhandenen Schäden durch den Wurmbefall eher nebensächlich (Mair, 1994; Mair, 1993; Giles et al., 1985; Blackwell, 1973).

2.1.2. Spulwurm des Pferdes

Parascaris spp., der Spulwurm des Pferdes, gehört zur Familie der Ascarididae, zu welcher auch andere wichtige Vertreter, wie zum Beispiel den Schweinespulwurm (*Ascaris suum*) zählen. Systematisch wird er in das Reich der Metazoa (Vielzeller), den Stamm der Nematoda (Rund-/Fadenwürmer), die Klasse der Secernentea, die Unterklasse der Spirurida (Rollschwänze), die Superfamilie der Ascaridoidea, die Ordnung der Ascaridida (Spulwürmer) und schließlich in die Familie der Ascarididae eingeordnet. Neben *Parascaris equorum* existiert eine weitere Art, *Parascaris univalens*, die morphologisch jedoch nicht abgrenzbar ist. Nur durch aufwändigere Untersuchungen lassen sich die verschiedenen Karyotypen (*P. univalens* $2n = 2$ und *P. equorum* $2n = 4$) unterscheiden. Mittlerweile zeigen Studien, dass scheinbar *P. univalens* mit über 90% die weit verbreitetere Spezies ist und *P. equorum* nur selten vorkommt (Nielsen et al., 2014b; Goday and Pimpinelli, 1984). Im Folgenden wird, um beiden Arten gerecht zu werden, nur von *Parascaris* spp. gesprochen.

Tabelle 4: Einordnung von *Parascaris* spp. (Deplazes et al., 2012c))

Reich	Metazoa
	Helminthen
Stamm	Nematoda
Klasse	Secernentea
Unterklasse	Spirurida
Superfamilie	Ascaridoidea
Ordnung	Ascaridida
Familie	Ascarididae
Arten	<i>P. equorum</i> <i>P. univalens</i>

2.1.2.1. Morphologie

Die Weibchen des Pferdespulwurmes können eine Länge von bis zu 40 cm erreichen, die Männchen sind mit 15 - 28 cm etwas kleiner. Der spindelförmige, weiß-gelbliche Körper ist bindfaden- bis bleistiftstark und im Querschnitt kreisrund. Die Mundöffnung ist von drei großen, herzförmigen Lippen eingerahmt, die Männchen sind durch die zwei Spicula am Hinterende zu identifizieren (Deplazes et al., 2012c).



Abbildung 4: adulte Pferdespulwürmer nach Ausscheidung mit dem Kot (Quelle: privat)

Die 90 - 100 μm großen, kugeligen Eier werden mit dem Kot ausgeschieden und sind von einer typischen, dicken Hülle umgeben. Diese besteht aus einer inneren Lipidschicht und einer chitinhaltigen Schicht, auf welche außen zusätzlich Mucopolysaccharide und Proteine aufgelagert sind (Deplazes et al., 2012c).

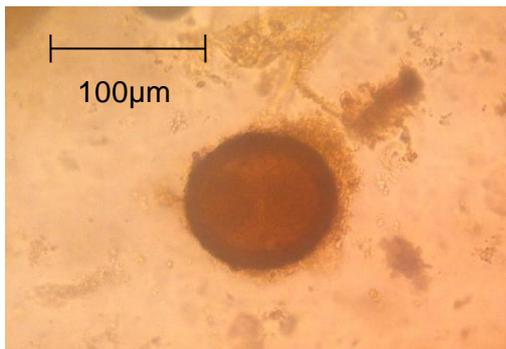


Abbildung 5: *Parascaris* spp. - Ei unter dem Mikroskop (Quelle: Florina Jung)

2.1.2.2. Vorkommen

Parascaris spp. ist weltweit bei allen Equiden, jedoch überwiegend bei Fohlen und Jährlingen mit Prävalenzen bis zu über 90 %, zu finden (Rieder et al., 1995). Auf großen Gestüten scheint der Infektionsdruck, wegen der hohen Zahl von Fohlen und Jungpferden, deutlich höher (Kornas et al., 2010b). Auf einem Warmblutgestüt in Norddeutschland waren im Herbst 95,6 % der untersuchten Fohlen mit *Parascaris* spp. infiziert. Die ersten Infektionen sind bei Fohlen ab der 9. Lebenswoche koproskopisch nachzuweisen, ab der 15. Lebenswoche steigt die Wahrscheinlichkeit für eine positive Kotprobe deutlich an. Die

höchste ermittelte koproskopische Prävalenz für eine *Parascaris*-Infektion der Fohlen lag in der 21. Lebenswoche, danach sank die Prävalenz wieder (Köhler, 2016).

Typischerweise findet man bei Zuchtstuten durch ihren engen Kontakt zu Fohlen und langen Weideaufenthalt höhere Belastungen mit Spulwürmern, als zum Beispiel bei Reitpferden (Dopfer et al., 2004). In Kentucky lag die ermittelte Prävalenz für *Parascaris* spp. auf Einzeltierebene von 10 bis 223 Tage alten Fohlen bei 22,4 % (Lyons and Tolliver, 2004), in Schweden bei 48 % (Lind and Christensson, 2009) und in einer französischen Studie bei Fohlen mit dem Durchschnittsalter von 5,5 Monaten bei 30,5 % (Laugier et al., 2012). Eine 2011 in Brandenburg durchgeführte Untersuchung ermittelte bei unter einem Jahr alten Pferden eine Prävalenz von 33 %. Jedoch gaben die Autoren zu bedenken, dass diese Zahl wahrscheinlich höher sein müsste, da sie viele Fohlen, die erst kürzlich entwurmt worden waren, von ihrer Studie ausschlossen. Nur noch 6 % der ein- bis zweijährigen Pferde und 1 % der adulten Tiere waren mit *Parascaris* spp. infiziert (Hinney et al., 2011).

2.1.2.3. Epidemiologie

Die mit dem Kot ausgeschiedenen unreifen Eier sind sehr widerstandsfähig und können auch auf der Weide mehrere Jahre überleben (Clayton, 1986). Durch die klebrige Schale haften diese gut an Stallwänden und Pflanzen. Infektionen sind so bei Stall- und Weidehaltung möglich (Clayton, 1978). Bei optimalen Temperaturen von 25 bis 27°C entwickelt sich die infektiöse L3 im Ei innerhalb von zwei Wochen (Bürger et al., 2006c). Bei Temperaturen unter 10°C bricht die Entwicklung ab, bis wieder günstigere Bedingungen erreicht sind. Schaden nehmen die Eier erst ab 40°C und Trockenheit, was jedoch in Regionen mit gemäßigttem Klima, keine große Rolle spielt (Clayton, 1986).

Die orale Infektion kann bei Fohlen schon in den ersten Lebenstagen stattfinden (Clayton and Duncan, 1978) und wird durch Koprophagie, also orale Aufnahme von Kot, welche zu Superinfektionen mit hoher Befallsdichte führen kann, begünstigt (Kornas et al., 2010a; Crowell-Davis and Haupt 1985). Pränatale oder galaktogene Infektionen sind nicht beschrieben, werden aber aufgrund des Vorhandenseins dieser Übertragungswegen bei anderen Askariden nicht ausgeschlossen (Clayton, 1978).

In experimentell infizierten Fohlen betrug die Präpatenz, also die Zeitspanne von der Infektion bis zum ersten Auftreten von Eiern im Kot, 79 - 110 Tage (Lyons et al., 1976). RUSSELL (1984) fand bei natürlich infizierten Fohlen frühestens ab dem 84. Lebenstag Askariden-Eier im Kot, was wiederum eine Infektion in den ersten Lebenstagen bestätigt. Mit der höchsten Eiausscheidung ist im Alter von 16 - 21 Wochen zu rechnen (Köhler, 2016; Russell, 1948).

Durch Koprophagie scheinen auch unter zehn Wochen alten Fohlen oder Fohlen wenige Tage nach der Entwurmung infiziert zu sein. Durch Aufnahme von eihaltigem Kot der Stute kann ein Fohlen Eier ausscheiden, ohne adulte Würmer im Darm zu beherbergen (Kornas et al., 2010a).

2.1.2.4. Immunität

Ab einem Alter von sechs Monaten scheint sich eine protektive Immunität einzustellen. Dabei scheint eine Erreger-Exposition nicht unbedingt erforderlich zu sein (Clayton and Duncan, 1979). Bei älteren Pferden sind die Prävalenzen, auch bei starkem Infektionsdruck, deutlich geringer (Hinney et al., 2011). Es kommen zwar noch patente Infektionen vor, diese gehen aber mit einer sehr geringen Wurmbürde sowie niedriger Eiausscheidung einher, solange das Immunsystem nicht anderweitig belastet ist (Clayton, 1986). Die Immunabwehr scheint

auf Ebene von Lunge und Leber abzulaufen, da die Larven zwar ihre Wanderung beginnen, aber nur noch wenige bis in den Magen-Darm-Trakt zurückkehren (Clayton, 1978).

2.1.2.5. Entwicklung

Der Entwicklungszyklus von *Parascaris* spp. ist homoxen, der Parasit befällt also lediglich Equiden. Unembryonierte Eier werden über den Kot ausgeschieden. In ihnen entwickeln sich bei günstigen Umweltbedingungen (25 - 35°C) innerhalb von zwei bis drei Wochen die L3. Nach oraler Aufnahme von infektiösen Eiern, schlüpfen die Larven im Dünndarm und durchbohren die Darmwand (Bürger et al., 2006c; Clayton, 1978). Es folgt eine histotrope Organphase, bevor die eigentliche intestinale Phase beginnt. Innerhalb von 24 Stunden wandern die Larven über das Pfortadersystem bis zur Leber. Anschließend erfolgt eine Migration über die Vena cava caudalis und das Herz bis in die Lunge. Hier sind 7 - 14 Tage p.i. die meisten Larven zu finden. Sie dringen in die Alveolen ein, erreichen über die kleinen Luftwege die Trachea und werden hochgehustet. Nach Abschlucken in den Ösophagus finden sie sich erneut im Magen-Darm-Trakt wieder (Bürger et al., 2006c). 17 Tage p.i. befindet sich der Großteil der Larven wieder im Dünndarm. Zu diesem Zeitpunkt sind noch Larven in der Lunge, jedoch keine mehr in der Leber zu finden, solange es nicht zwischenzeitlich zu einer weiteren *Parascaris* spp.-Infektion gekommen ist (Lyons et al., 1976).

Im Duodenum und proximalen Jejunum erfolgt innerhalb von 10 - 12 Wochen die Entwicklung bis zur Geschlechtsreife (Clayton, 1978). Das Größenwachstum wird dabei durch die Infektionsrate beeinflusst. Bei einem Fohlen, welches mit einer Dosis von 160 *Parascaris*-Eiern infiziert wurde, fand man 40 Tage später in der Sektion 140 adulte Würmer mit einer Größe von 8 – 14 cm. Ein anderes, mit einer Infektionsdosis von 8000 Eiern infiziertes Fohlen, beherbergte 6350 Askariden mit einer maximalen Größe von nur 3 cm (Clayton, 1986).

Die Würmer schwimmen frei in der Ingesta und nehmen diese über pharyngeales Pumpen, d.h. zyklische An- und Entspannung der pharyngealen und oesophagealen Muskulatur, auf (Clayton et al., 1980).

Adulte Spulwürmer haben eine extrem hohe Reproduktionsrate. So kann ein Weibchen täglich bis zu 100.000 Eier produzieren (Anderson et al., 2009). LYONS et al. berechneten eine totale Eiausscheidung von bis zu über einer Million am Tag (Lyons et al., 1976). In Kotuntersuchungen wurden maximale Werte von 17.500 EpG gefunden (Clayton and Duncan, 1978).

Die Parasiteneier werden durch den Wirt mit dem Kot ausgeschieden und stellen, aufgrund ihrer hohen Tenazität die durch die protektive, dreischichtige Schale vermittelt wird, über mehrere Jahre eine erneute Infektionsquelle dar (Clayton, 1978).

2.1.2.6. Pathogenese

Aufgrund der Migration der Larven findet man vor allem in der Leber und der Lunge pathologische Veränderungen. Während der Wanderung durch die Leber sind fokale Hämorrhagien unter der Kapsel typisch. Später sind dagegen kleine, weiße, bindegewebig vernarbte Läsionen auf der Oberfläche und im Leberparenchym sichtbar. Diese stellen sich entweder als umschriebene, runde, subkapsulär leicht erhabene Knoten oder als diffuse, unregelmäßige Areale dar.

Mikroskopisch zeigen sich in den Wurmgingen, die vor allem unter der Kapsel und entlang der Septen verlaufen, Infiltrationen von Eosinophilen und mononuklearen Zellen (Brown and Clayton, 1979). Bei längeren Infektionen kommt es zu lymphozytärer Infiltration und zu

Fibrosen zwischen den Leberläppchen und um die Lebergänge und –gefäße herum (Clayton, 1978).

In älteren Tieren sind weitere Veränderungen zu finden, wie Thrombosen der Gefäße, große Ansammlungen von Lymphozyten und Granulome, welche sich um den Zelldebris und tote Larven bilden.

Auch in der Lunge rufen die Larven kurze Zeit später ähnliche Läsionen hervor. Makroskopisch sind, neben vergrößerten mediastinalen Lymphknoten, Petechien und Ekchymosen sichtbar, sowie 0,3 - 1,0 cm große subpleurale Knoten, welche am zahlreichsten um die 4. bis 6. Woche p.i. zu finden sind. Sie sind von einer Kapsel umhüllt und enthalten eine Zellmasse aus Lymphozyten und toten Larven (Clayton, 1978).

Das mikroskopische Bild ist durch die Eosinophilie geprägt. Neben eosinophiler Bronchitis, Bronchiolitis und Alveolitis sind Ansammlungen von Eosinophilen um die Gefäße, sowie zusammen mit Oedembildung subpleural und entlang der interlobulären Septen zu finden. Fokaler alveolärer Kollaps und vereinzelte Anschnitte von Larven sind ebenfalls sichtbar. Ab dem 73. Tag p.i. sind bei Einzelinfektionen fast alle subpleuralen Knoten verschwunden. Das Zellbild ist überwiegend lymphozytär (Nicholls et al., 1978).

Bei Laboruntersuchungen fällt vor allem die Eosinophilie auf. Die Steigerung der Blut-Eosinophilen ist proportional zum Grad der Infektion und tritt während der Migrationsphase der Larven, 10 – 40 Tage p.i. auf (Clayton, 1986).

Durch die freie Art der Futteraufnahme der adulten Spulwürmer entstehen keine großen pathologischen Veränderungen der Darmwand (Clayton et al., 1980). Es kann lokal zu Rötung der Schleimhaut kommen, sowie zur Infiltration der Darmwand mit Eosinophilen (Clayton, 1986). Bei Fohlen kann ein intestinaler Spulwurmbefall jedoch durchaus pathogenetische Bedeutung haben und geht mit verminderter Futteraufnahme bis hin zu Dünndarmobstruktionen oder sogar -rupturen einher (Cribb et al., 2006).

2.1.2.7. Krankheitsbild

Von klinischen Krankheitsanzeichen betroffen sind überwiegend Fohlen, bei älteren Pferden liegen größtenteils subklinische Infektionen vor.

Neben intestinalen Symptomen durch die Wurmstadien im Darm, kann es während der Migrationsphase der Larven zu respiratorischen Symptomen kommen. Betroffene Tiere husten und haben mukösen Nasenausfluss. Dieser beherrscht auch das Bild bei endoskopischer Untersuchung der Luftwege (Clayton, 1978). Meistens kommt es trotz Fresslust zu Konditionsverlust und die Gewichtszunahme infizierter Fohlen ist um 50% reduziert (Clayton and Duncan, 1978). In einzelnen Fällen kann es auch zu Fieber, Lethargie und Inappetenz kommen. KÖHLER (2016) konnte einen signifikanten Zusammenhang zwischen einem Nasenausflussbefund bei Fohlen und der ersten positiven Kotprobe für *Parascaris* spp. elf Wochen später zeigen. Es wurde jedoch kein statistischer Zusammenhang zwischen einer Spulwurminfektion der Fohlen und einer durchgeführten Lungen- oder Nabeltherapie, einer Leukozytose oder einer Plasmainfusionstherapie festgestellt. Auch die Mittelwerte der Nasenausflussbefunde und Lungenultraschallbefunde waren nicht statistisch signifikant einhergehend mit einer Spulwurminfektion. Jedoch haben Fohlen, die mit *Parascaris* spp. infiziert waren ein 2,6-fach höheres Risiko auch an einer MDS-Infektion zu erkranken (Köhler, 2016).

Durch hohe Wurmbürden adulter Parasiten kann es zu einem mechanischen Ileus des Dünndarms kommen, welcher häufig zum Tode führen kann. Im Zusammenhang mit *Parascaris*-Obstruktionen sind Darmrupturen, Volvulus und Invaginationen des Dünndarms beschrieben. Die Tiere zeigen in diesen Fällen typische Koliksymptome (Clayton, 1978).

CLAYTON et al. konnten mithilfe einer Radioisotopentechnik eine verlangsamte Ingestapassage feststellen und folgerten, dass bei infizierten Fohlen die Darmmotilität beeinträchtigt ist (Clayton et al., 1980).

Auffällig ist das Auftreten von Wurm-Koliken 24 Stunden nach der Entwurmung, meist mit schnell wirkenden Anthelminthika wie Avermectinen oder Pyrantelmonat. Dies war bei 72 % von 25 retrospektive untersuchten Fällen der Fall. Vermutlich verursachen die schnell paralysierten Würmer zusammen mit dem hypomotilen Darm die Obturation (Cribb et al., 2006; Clayton et al., 1980).

2.1.2.8. Diagnose

Klinische Befunde und Laborbefunde, sowie Alter des Tieres lassen eine Verdachtsdiagnose zu. Der Nachweis von *Parascaris*-Eiern oder Wurmstadien im Kot bestätigt die Diagnose. Möglich ist ebenfalls der Nachweis von Larven und Eosinophilen aus dem Mukus der Luftwege (Bürger et al., 2006c).

Für den Einachweis empfiehlt sich die Flotationstechnik in gesättigter Salzlösung mit anschließender Betrachtung unter dem Mikroskop (s. 3.2.2.). Wichtig ist zu beachten, dass die Eiausscheidung von Tag zu Tag stark variiert und keinen Rückschluss auf die intestinale Wurmbürde zulässt (Clayton, 1986). Eine weitere Technik, um adulte Askariden bei Fohlen nachzuweisen, ist der transabdominale Ultraschall. Wurmlasten von zehn Würmern und mehr können so verlässlich dargestellt werden. Die adulten Askariden lassen sich im Dünndarm als parallele hyperechogene Linien darstellen (Nielsen et al., 2016).

2.1.2.9. Therapie und Bekämpfungsmaßnahmen

Anthelmintische Behandlungsmaßnahmen gegen eine *Parascaris* spp.-Infektion haben häufig, wie bei den großen Strongyliden, metaphylaktischen Charakter und das Ziel, eine Körperwanderung der Larvenstadien mit allen einhergehenden Symptomen möglichst zu verhindern. Hierfür sollten Fohlen und Jungpferde ab einem Alter von sechs bis acht Wochen regelmäßig entwurmt werden und auch die Mutterstuten in das Management mit einbezogen werden. Bei älteren Pferden ohne Kontakt zu Jungtieren ist die Prävalenz von Spulwürmern sehr gering (siehe 2.1.2.2) und eine Behandlung wird nur bei Bedarf durchgeführt. Makrozyklische Laktone kommen häufig als Breitspektrum-Anthelminthika zum Einsatz und haben den Vorteil auch gegen larvale Wanderstadien wirksam zu sein (Monahan et al., 1995). Aufgrund der heutigen Resistenzlage, mit einer oft nicht ausreichenden Effektivität von unter 90 % von Ivermectin und Moxidectin, ist ein Einsatz von makrozyklischen Laktonen bei der Bekämpfung von Spulwürmern jedoch nicht ohne eine vorhergehende Überprüfung der Wirksamkeit auf dem jeweiligen Pferdebestand anzuraten. Hierzu sollte vor dem Einsatz die Wirksamkeit mit Hilfe FECRT überprüft werden (Alanazi et al., 2017; Lassen and Peltola, 2015; Laugier et al., 2012; Veronesi et al., 2010; Veronesi et al., 2009; Lind and Christensson, 2009; Schougaard and Nielsen, 2007; von Samson-Himmelstjerna et al., 2007).

Pyrantel ist wirksam gegen luminale Stadien von *Parascaris* spp.. Es werden Werte im FECRT zwischen >90 – 100 % angegeben (Veronesi et al., 2009; Lindgren et al., 2008; Slocombe et al., 2007; von Samson-Himmelstjerna et al., 2007b). Auch Fenbendazol kann gegen *Parascaris* spp. angewendet werden (Lindgren et al., 2008; Slocombe et al., 2007). Durch eine Elimination der Adulten wird die Eiausscheidung für ca. acht Wochen gestoppt und somit der Infektionsdruck gemindert (Clayton, 1978). Einige Studien weisen jedoch schon auf eine ungenügende Effektivität von Pyrantel und Fenbendazol hin (Armstrong et al., 2014; Reinemeyer, 2012; Lyons et al., 2008).

Eine Klinik, die sich häufig respiratorisch äußert, muss neben der Parasitenbekämpfung, symptomatisch behandelt werden. Bei einer auftretenden Kolik durch Wurm-Ileus hilft meist nur die operative Behandlung (Bürger et al., 2006c). Bei sehr hohen Wurmbürden empfiehlt es sich auf den Einsatz schnell paralyisierender Substanzen zu verzichten und mit der Entwurmung in niedrigen Dosierungen zu beginnen, um eine partielle Elimination der Würmer in mehreren Schritten zu erreichen. Ein gleichzeitiges Absterben aller Würmer könnte bei der Elimination wiederum zu einem Ileus führen (Cribb et al., 2006; Boersema et al., 2002; Schusser et al., 1988).

Neben chemischen Bekämpfungsmöglichkeiten sind Hygienemaßnahmen auf der Weide und im Stall sehr wichtig, um den Spulwurmbefall einzudämmen und neue Infektionen zu verhindern. Das Absammeln des Kotes von der Weide, welcher die infektiösen Spulwurmeier enthält, minimiert das Infektionsrisiko. Im Stall ist eine regelmäßige Reinigung und Desinfektion vor allem der Abfohlboxen zu empfehlen, da die *Parascaris*-Eier sehr widerstandsfähig gegen Umwelteinflüsse sind. Mit ihrer klebrigen Oberfläche können sie gut an Stallwänden, Gerätschaften und ähnlichem haften und für erneute Infektionen sorgen (Clayton, 1986). Dementsprechend sollte auf eine gute Wirksamkeit der Desinfektionsmittel gegen Spulwurmeier geachtet werden (Bürger et al., 2006c; Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V., Stand 06.01.2019).

2.2. Parasitenmanagement

2.2.1. Chemotherapeutika

Eine chemische Bekämpfung der oben beschriebenen Helminthen ist mit Endoparasitika möglich. Für Pferde sind momentan Präparate mit folgenden vier Wirkstoffen auf dem Markt: Ivermectin (IVM), Moxidectin (MOX), Fenbendazol (FEB), Pyrantel (PYR) und Piperazin (PIP). Sowie Präparate zur Bandwurmbehandlung mit dem Wirkstoff Praziquantel, auf welchen hier jedoch nicht näher eingegangen werden soll (www.vetidata.de). Üblicherweise sind dies orale Formulierungen, die als Pasten oder Gels verabreicht werden.

Tabelle 5: Dosierungen der Anthelminthika beim Pferd (Frey and Löscher, 2010a, 2010b)

Wirkstoff	IVM	MOX	FEB	PYR	PIP
Dosierung	0,2 mg/kg p.o.	0,4 mg/kg p.o.	7,5-10 mg/kg p.o.	19 mg/kg p.o.	180- 400 mg/kg p.o.

2.2.1.1. Makrozyklische Laktone

Nach ihrer Entdeckung 1976 wurden die makrozyklischen Laktone (ML) ab Anfang der 80er-Jahre kommerziell für die Parasitenbekämpfung in der Veterinärmedizin eingesetzt (Vercruyse and Rew, 2002). Partialsynthetisch hergestellt aus Fermentationsprodukten von *Streptomyces* spp., sind die ML wegen ihres großen Wirkungsspektrums gegen Endo- und Ektoparasiten auch als Endektozida bekannt. Neben Wirkung gegen adulte Parasiten und die meisten Larvenstadien im Darm, werden auch histotrope und wandernde Larvenstadien erfasst (Frey and Löscher, 2002b). Durch die dauerhafte Aktivierung von Glutamat- und GABA-gesteuerten Cl⁻-Kanälen in der Membran inhibitorischer Nerven, kommt es zur Hyperpolarisation der Zelle und somit zu einer schlaffen Lähmung und schnellen Immobilisation der Parasiten. Durch das Fehlen von Glutamat gesteuerten Chloridkanälen beim Säuger und das Vorhandensein der P-Glykoprotein-Effluxpumpe in der Blut-Hirn-Schranke, bleibt die ML-Konzentration im Gehirn des Säugetiers unterhalb der toxischen Grenze (Ausnahmen wie beim Collie mit MDR1-Gendefekt müssen bei der Anwendung beachtet werden) (Frey and Löscher, 2002b).

ML sind stark lipophil, wodurch sie sich hauptsächlich ins Fettgewebe und die Leber verteilen. Über 90 % des unveränderten Wirkstoffs werden über den Kot ausgeschieden und in der Umwelt nur langsam, mit Halbwertszeiten von bis zu 240 Tagen, abgebaut.

Neben IVM aus der Gruppe der Avermectine, ist mit MOX ein Wirkstoff aus der Gruppe der Milbemycine erhältlich. Hinsichtlich MOX ist die gute Wirkung gegen hypobiotische Larvenstadien kleiner Strongyliden und die Langzeitwirkung hervorzuheben, eine Eiausscheidung kleiner Strongyliden wird bis zu 3 Monaten unterdrückt (Cobb and Boeckh, 2009).

Resistenzen gegen ML treten durch vermehrte Genexpression von Varianten des Transporter-P-Glycoproteins auf, welche einen verstärkten Efflux des Wirkstoffs aus den Zellen bewirkt (David et al., 2018; Peachey et al., 2017; Bygarski et al., 2014; Kerboeuf and Guegnard, 2011; James and Davey, 2009; Wolstenholme and Rogers, 2005; Drogemuller et al., 2004). Vor allem für *Parascaris* spp. gibt es viele Berichte von ungenügender ML-Wirksamkeit (Alanazi et al., 2017; Wilkes et al., 2017; Beasley et al., 2015; Lassen and Peltola, 2015; Armstrong et al., 2014; Bishop et al., 2014; Reinemeyer et al., 2010; von Samson-Himmelstjerna et al., 2007b). Doch auch für kleine Strongyliden gibt es, speziell für IVM, Beobachtungen zu verkürzter Hemmung der Eiausscheidung (verkürzte egg

reappearance period), die als Anzeichen für Resistenzen angesehen wird (Bishop et al., 2014; Geurden et al., 2014; von Samson-Himmelstjerna et al., 2007b; Borgsteede et al., 1993).

2.2.1.2. Benzimidazole

Die ersten Stoffe der großen Gruppe der Benzimidazole (BZ) kamen in den 60er-Jahren auf den Markt. Für Pferde steht nur FEB als orale Formulierung zur Verfügung. Durch Hemmung der Polymerisation von Tubulin wird die Mikrotubulin-Bildung gestört. Dies hat verschiedene, für den Parasiten relevante Folgen, wie Schädigung bei der Bildung des Cytoskeletts der Zellen, Störung der Spindelbildung bei der Mitose und Beeinträchtigung von Aufnahme und Transport von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten in der Zelle. Die daraus resultierende ATP-Verarmung hat ein langsames Absterben der Parasiten zur Folge. BZ haben ein sehr breites Wirkungsspektrum gegen Nematoden und sind vermizid, larvizid und ovizid. Auch eine gewisse Wirkung gegen Cestoden und Trematoden ist vorhanden (Deplazes et al., 2012d; Robinson et al., 2004; Frey and Löscher, 2002a; Lacey, 1988; Barrowman et al., 1984).

Die letale Wirkung tritt jedoch erst nach bis zu zwei bis drei Tagen und nach ausreichend langer Kontaktzeit ein, weswegen bei gewisser Indikation, wie z. B. bei der Bekämpfung hypobiotischer Cyathostominae-Larven, eine wiederholte Applikation notwendig ist (Duncan et al., 1998).

Fenbendazol ist wie die anderen BZ-Verbindungen ebenfalls sehr lipophil und wird teilweise sehr langsam resorbiert. Somit ist eine Wirkung gegen intra- und extraintestinale Stadien gegeben. Die Ausscheidung geschieht größtenteils über den Kot.

Als Resistenzmechanismus gegen BZ konnten Einzel-Nukleotidpolymorphismen an Position 167, 198 und 200 des β -Tubulin-Gens verantwortlich gemacht werden, was zu einem Verlust der Bindungsstelle für Benzimidazole führt (von Samson-Himmelstjerna et al., 2007a; Elard and Humbert, 1999; Elard et al., 1996; Kwa et al., 1994). Resistenzen gegen BZ sind vor allem bei den kleinen Strongyliden weit verbreitet. Auf Betriebsebene zeigen sich auf deutlich über 50 % der Farmen Resistenzen gegen kleine Strongyliden, einige der weltweit durchgeführten Studien berichten von ungenügender Wirksamkeit auf >90 % der Farmen (Traversa et al., 2012; Traversa et al., 2009; Slocombe et al., 2007; Cirak et al., 2004; Kaplan et al., 2004; Varady et al., 2000; Craven et al., 1999; Ihler, 1995; Lumsden et al., 1989; Slocombe et al., 1989; Dorny et al., 1988; Ryan et al., 1987; Drudge et al., 1979; Barger & Lisle, 1979; Slocombe & Cote, 1977).

2.2.1.3. Pyrantel

Pyrantel, zur Gruppe der Tetrahydropyrimidine gehörig, reagiert mit dem nikotinergen Acetylcholinrezeptor, einem transmembranen Kanal, dessen Öffnung zu Kationeneinstrom und somit zur Depolarisation und Muskelkontraktion führt. Als 100-fach stärkerer cholinerges Agonist führt Pyrantel also zur spastischen Paralyse der Parasiten (Atchison et al., 1992; Martin et al., 1991; Pinnock et al., 1988; Aubry et al., 1970).

Von den drei Salzen des Pyrantels, Pyrantelhydrochlorid, Pyranteltartrat und Pyrantelpamoat (auch als Pyrantelemonat bezeichnet), sind nur letztere beiden Formulierungen für Pferde erhältlich. Das Pyrantelemonat ist schlecht wasserlöslich und nur schwer vom Magen-Darm-Trakt absorbierbar, der größte Teil wirkt im Darmlumen und wird dann unverändert über den Kot ausgeschieden (Frey and Löscher, 2002a). Das Pyranteltartrat ist deutlich besser wasserlöslich und absorbierbar. Resorbiertes Pyrantel wird schnell metabolisiert und durch Hydroxylierung in der Leber inaktiviert, sodass auch beim Pyranteltartrat nur niedrige maximale Blutspiegel erreicht werden (Frey and Löscher, 2002a). Durch die geringe

systemische Wirkung besitzt Pyrantel eine große therapeutische Breite und nur geringe Toxizität. Auch eine vielfache Überdosierung zeigte keine toxischen Effekte (Smith, 1973).

Die Wirkung von Pyrantel ist sehr hoch gegen luminale Wurmstadien. Gegen Bandwürmer beim Pferd besteht eine Wirkung in erhöhter Dosierung, gegen wandernde Larvenstadien, hyobioten Darmwandstadien, Magendasseln und *Strongyloides westeri* ist Pyrantel wirkungslos (DiPietro and Todd, 1987; Slocombe, 1979; Lyons et al., 1974; Conway et al., 1970; Cornwell and Jones, 1969).

PYR-Resistenzen treten vor allem bei kleinen Strongyliden, oft auch in Kombination mit Kreuzresistenzen gegen Benzimidazole, auf (Becher and Pfister, 2010; Traversa et al., 2009; Molento et al., 2008; Brazik et al., 2006; Craven et al., 1998).

2.2.1.4. Piperazin

Piperazin, welches seit den 50er Jahren auf dem Markt ist, wird heute immer weniger eingesetzt. Piperazin bewirkt eine schlaffe Lähmung der Parasiten durch eine hohe Affinität an GABA-gesteuerte Chloridkanäle (Martin, 1985; Martin, 1982; Terada et al., 1982). Neben der anticholinergen Wirkung greift Piperazin auch in den Stoffwechsel der Nematoden-Zelle ein und senkt den Phospholipidgehalt sowie die Bildung von Succinat (Frey and Löscher, 2002a).

Im Vergleich zu den anderen Wirkstoffen ist sein Wirkungsspektrum deutlich schmäler. Gegen adulte *Parascaris* spp. und *Oxyuris equi* wirkt Piperazin sehr gut (DiPietro et al., 1985; Lyons et al., 1976). Larven und unreife Wurmstadien sind deutlich weniger empfindlich, histotrope Larvenstadien werden gar nicht erfasst, gegenüber kleinen und großen Strongyliden besteht eine Teilwirkung (Saes et al., 2016; Reinemeyer, 2009).

2.2.2. Desinfektion

Als Desinfektion wird die Reduktion von Krankheitserregern durch Abtötung oder Inaktivierung auf eine Zahl, die eine Infektion verhindert oder als sehr unwahrscheinlich macht, verstanden. Dieses Ziel wird auch bei der Desinfektion von Stallungen angestrebt. Eine Sterilisation dagegen, also das Erreichen einer völligen Keimfreiheit ist hier weder möglich noch nötig (Lage et al., 2010).

Die Desinfektion von Pferdeställen steht beim Parasitenmanagement nicht im Fokus, da bei den MDS die Weide die Hauptinfektionsquelle darstellt. Bei anderen Parasiten wie dem Pferdespulwurm oder dem Pflriemenschwanz *Oxyuris equi* spielt jedoch auch die Infektion im Stall eine Rolle. Da der Spulwurm vor allem bei Jungpferden und Fohlen vorkommt, ist die Desinfektion von Pferdeställen, speziell auch von Abfohlboxen, auf Gestüten besonders wichtig. Jedoch stehen hier meist andere Organismen, wie Erreger von Durchfall- oder Atemwegkrankungen im Vordergrund.

Nur wenige Desinfektionsmittel sind auch oder speziell gegen parasitische Wurmstadien wirksam. Die Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG) prüft Desinfektionsmittel nach eigenen Richtlinien basierend auf den EU-Vorgaben und gibt Listen für die Bereiche Lebensmittelproduktion und -verarbeitung, Tierhaltung und Tierarztpraxen heraus. Im Bereich Tierhaltung sind momentan 88 Desinfektionsmittel gelistet, die bei 10°C und 20°C und Einwirkzeiten von 30, 60 und 120 Minuten getestet wurden, davon 16 mit antiparasitärer Wirkung. Die Prüforganismen der DVG werden so ausgewählt, dass ihre biologischen Eigenschaften alle in der Anwendung wichtigen Keime abdecken. In der Kategorie Parasitäre Würmer werden die sehr widerstandsfähigen Eier von *Ascaris suum* zur Prüfung verwendet. Somit sollten entsprechende Desinfektionsmittel ebenfalls wirksam gegen Umwelstadien

(Eier, Larven) aller parasitischen Rundwürmer sein. Wirksamkeiten wurden bisher nur bei 20°C und einer Einwirkzeit von mindestens 120 Minuten belegt, die aktuell in Deutschland auf dem Markt erhältlichen, antiparasitären, DVG-geprüften Desinfektionsmittel sind Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6: In Deutschland aktuell auf dem Markt erhältlichen DVG-geprüften Desinfektionsmittel mit Wirkung gegen Parasitäre Würmer (Wurmeier) (Ausschuss der DVG e.V., Stand: 06.01.2019)

Produkt	Hersteller	Wirkstoff
AGAKOK 2.5	Anti-Germ Deutschland GmbH (Memmingen)	Chlorkresol
Aldovet KOK	Lysiform Vetfarm GmbH (Berlin)	Chlorkresol
Aldecoc CMK	THESEO Deutschland GmbH (Wietmarschen)	p-Chlor-m-Kresol
ascarosteril AB (2-Komponenten-Produkt)	KESLA PHARMA WOLFEN GmbH (Wolfen)	o-Hydroxydiphenyl-Fettsäure-Eutetikum, Peressigsäure
BEG Endo Kok	BEG Schulze Bremer GmbH (Dülmen-Rorup)	Chlorkresol
BERGODES komplett	Bergophor Futtermittelfabrik Dr. Berger GmbH (Kulmbach)	p-Chlor-m-Kresol
calgonit sterizid KOK	Calvatis GmbH (Ladenburg)	Chlorkresol
DESINTEC FL-coc garant	AGRAVIS Raiffeisen AG	p-chlor-m-kresol
DESINTEC FL-des ALLROUND (2-Komponenten-Produkt)	AGRAVIS Raiffeisen AG (Münster)	Sauerstoffabspalter
ENDOSAN FORTE S NEU	H. Wilhelm Schaumann (Pinneberg)	Kresole
HTB COC	Stallhygiene Huntenburg GmbH & Co. KG (Bippen)	Kresole
IGAVET PARA-DES 2.5	COS OHLSEN Chemie & Gerätevertrieb GmbH (Geltorf-Esprehm)	Chlorkresol
IGAVET PARA-DES N	COS OHLSEN Chemie & Gerätevertrieb GmbH (Geltorf-Esprehm)	Kresole
INTERASK	InterHygiene GmbH (Cuxhaven)	Kresole
INTERKOKASK	linterHygiene GmbH (Cuxhaven)	Kresole

Kokzi Des	Arthur Schopf Hygiene GmbH & Co. KG (Neubeuern)	Kresole
Neopredisan 135-1	Menno-Chemie Vertrieb GmbH (Norderstedt)	p-Chlor-m-Kresol
ROTIE-KOK total N	Rotie-pharm GmbH & Co. KG (Osnabrück)	p-chlor-m-kresol
WKC 2500	Wuttke und Schwarz GmbH (Aulendorf)	Chlorkresol

Zu den verschiedenen Klassen der Desinfektionsmittel gehören Oxidationsmittel, halogenabspaltenden Verbindungen, Aldehyde, Alkalien, organische Säuren, Alkohole, Phenolderivate, Schwermetalle, Detergentien und Farbstoffe. Zum oben genannten Einsatz kommen hauptsächlich Phenolderivate, zu denen auch die Kresole gehören.

Phenole und Phenolderivate werden zur Grob- und Oberflächendesinfektion in Stallungen eingesetzt und wirken mikrobizid, indem sie ins Zellinnere von Infektionserregern diffundieren und dort den Eiweißstoffwechsel stören. Durch die in Folge geschädigte Zellmembran diffundieren Inhaltsstoffe nach außen. Ein saurer pH-Wert und hohe Temperaturen verbessern die Wirkung. Phenol ist gut wasserlöslich, Haut und Schleimhaut reizend und ist durch Resorption nephro- und neurotoxisch. Die hohe Beständigkeit in Abwässern führt zu Problemen für den Umweltschutz und die Wasserwirtschaft.

Alkylphenole, zu denen auch die methylierten Phenole wie Kresol und Xylol gehören, zeichnen sich durch einen guten Reinigungseffekt, ausgezeichnetes Penetrationsvermögen auch bei Kot oder Schmutz und ihre gute desinfizierende Wirkung aus. Durch eine Chlorierung, wie beim p-chlor-m-kresol, wird die Wirkung noch einmal erhöht und zudem die Toxizität vermindert (Frey and Löscher, 2002c).

Zur Desinfektion von Stallungen allgemein sind folgende Schritte notwendig: Grobreinigung, Einweichen, Reinigung, Spülen, Trocknen und zum Schluss das Desinfizieren. Ein gründliches Einweichen kann die Reinigungsdauer deutlich verkürzen. Diese wird vorzugsweise mit einem Hochdruckreiniger von oben nach unten vorgenommen bis alle Oberflächen und Gegenstände visuell sauber sind und das abfließende Wasser frei von Schmutzpartikeln ist. Eingesetzte Reinigungsmittel müssen gut abgespült werden und der Stall muss nach der Reinigung komplett trocknen, um eine erfolgreiche Desinfektion zu gewährleisten. Da Desinfektionsmittel Verbindungen mit organischen Stoffen eingehen, kommt es sonst zum sogenannten Eiweißfehler bzw. Seifenfehler. Auch vom Temperaturfehler wird gesprochen, wenn die Umgebungstemperatur nicht geeignet für den Einsatz des gewählten Desinfektionsmittels ist. Einwirkzeiten sollten auf jeden Fall eingehalten werden und betragen meist zwischen 2-4 Stunden. Auch die Menge und Konzentration soll wie angegeben verwendet werden und 0,4 L/m² nicht unterschreiten. Geeignete Geräte mit max. 10-12 bar, werden für ein gleichmäßiges Ausbringen der Desinfektionsmittel empfohlen. Natürlich sollte beim gesamten Vorgang der Arbeitsschutz beachtet und auf die eigene Sicherheit geachtet werden. Eine Dokumentation, sowie eine gelegentliche Kontrolle der Desinfektion, empfiehlt sich auch im privaten Bereich (Lage et al., 2010).

2.2.3. Weidemanagement und Weidehygiene

2.2.3.1. Weideform

Schon die Weideform hat Einfluss auf den parasitären Infektionsdruck der Pferde. Vor allem Infektionen mit kleinen und großen Strongyriden, den typischen Weideparasiten, können durch ein gutes Management verringert werden. RUSSEL (1948) konnte zeigen, dass auf einem Gestüt mit großem Grasangebot auf der Weide, Wechselbeweidung der Wiesen mit Rindern und zweimal wöchentlichem Abäppeln der Weiden im Sommer deutlich weniger MDS-Infektionen bei Stuten und Fohlen auftraten als bei einem anderen Gestüt. Dieses hatte ein vergleichsweise geringes Angebot an Weidefläche, welche deutlich mit Pferden überbesetzt war, auch wurde der Mist nicht abgesammelt und die Koppeln und Paddocks waren schlecht drainiert, sodass sie oft unter Wasser standen. Dagegen scheinen Spulwurminfektionen unabhängig vom Weidemanagement aufzutreten, einen größeren Einfluss hat hier die Hygiene der Abfohlboxen (Russel, 1948).

Die Standweide besteht meist aus einer größeren Fläche, welche den Pferden Futter und Bewegung bieten soll. Die Managementanforderungen an den Pferdehalter scheinen auf den ersten Blick gering, durch den ununterbrochenen Verbiss ist jedoch eine ausreichende Pflege notwendig, da es sonst zu einer irreversiblen Narbendegeneration kommen kann. Eine Standweide kann über die Weidesaison keinen gleichmäßigen Futterwert bieten, infektiöse Parasitenstadien akkumulieren im Laufe der Weidesaison, da auf Grund des großen Arbeitsaufwandes ein Absammeln des Pferdemists meist nicht erfolgt (Bender, 2013a). Als Richtwert für die Besatzdichte einer Standweide ohne Zufütterung werden 0,5 GVE/ha empfohlen (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen). Je größer die Besatzdichte und die Verschmutzung der Weide durch Kothaufen, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit für eine MDS-Infektion (Thamsborg et al., 1999; Thamsborg, 1996).

Gut bewirtschaftete Umtriebsweiden bieten dagegen stets Futter und parasitenarme Flächen. Hierfür wird die gesamte Weidefläche in mehrere Koppeln unterteilt, die im Wechsel genutzt werden. Vorteilhaft ist auch ein Nutzungswechsel zwischen Beweidung und Futtergewinnung (Heu, Silage). Optimal ist ein Umtrieb auf frische, im aktuellen Jahr noch nicht beweidete Flächen. Bei gutem Management kann dann von einem geringeren parasitären Infektionsrisiko als bei der Standweide ausgegangen werden (Smith et al., 2009; Larsson et al., 2007; Larsen et al., 2002; Stromberg and Averbeck, 1999). Eine intensive Rotation mit mehrmaliger Beweidung der gleichen Stücke scheint keinen positiven Effekt auf das Infektionsrisiko zu haben (Smith et al., 2009; Stromberg and Averbeck, 1999). Eine Studie aus Deutschland, bei der Kotuntersuchungen in verschiedenen Ställen und Gestüten durchgeführt wurden, konnte bei der statistischen Auswertung kein signifikanter Effekt von einer Weiderotation auf die Prävalenz von Strongyriden-Infektionen gezeigt werden. Jedoch gibt es keine genaueren Angaben wie, das Management der Rotationsweide aussah. Bei der unifaktoriellen Analyse der Daten gab es aber ein Effekt der Weidedauer auf den ‚fecal egg count‘ (FEC) der Pferde, bei der multifaktoriellen Analyse war kein signifikanter Einfluss mehr festzustellen (Fritzen et al., 2010).

Die Tages-Portionsweide lässt sich auch mit weniger vorhandener Fläche bewerkstelligen. Die Weide wird hierbei mit einem beweglichen Elektrozaun abgeteilt, der jeden Tag ein Stück weitergesteckt wird und den Pferden somit ein Stück frische Weide bietet. Vorteilhaft durch die kleine Fläche ist die Zeitersparnis beim Absammeln des Kotes, außerdem werden durch das rationierte Futterangebot auch weniger schmackhafte Pflanzen gefressen. Die Entfernung des Mists ist jedoch obligatorisch, da sonst auf der kleinen Fläche das gleiche Problem besteht wie auf einer überbelegten Standweide. Bei hoher Verschmutzung grasen die Pferde direkt neben den Kothaufen und das Risiko parasitärer Infektionen steigt. Nachteile sind dagegen das begrenzte Angebot an Bewegungsfläche, sowie der wiederholte

Verbiss des rückwärtigen Teils (Bender, 2013a; Thamsborg et al., 1999; Thamsborg et al., 1996).

Die Überlegung durch Zufütterung auf der Weide, die Zeit des Grasens und somit die MDS-Infektionen zu reduzieren, konnte in einer Studie mit Rindern nicht gezeigt werden (Larsson et al., 2017).

Neben den bereits vorgestellten Weideformen stellt die Wechselbeweidung mit Rindern oder Schafen einen Spezialfall dar. Sie ist sicherlich nur in wenigen Fällen durchführbar, da die Haltung von Rindern nur für die Pflege von Pferdeweiden große Anforderungen und Extrakosten darstellt, sie bietet jedoch einige Vorteile. Das Grasungsverhalten von Rindern und Pferden ist unterschiedlich, Rinder rupfen mit ihrer Zunge das Gras nicht so tief und somit schonender ab, als Pferde mit ihren Zähnen. Auch fressen sie nicht ganz so selektiv wie Pferde (Celaya et al., 2011). Aus parasitologischer Sicht kann eine Wechselbeweidung Wurminfektionen eindämmen. Nehmen die Rinder als Fehlwirte Pferdeparasitenlarven auf und umgekehrt, wird deren Zyklus unterbrochen (Eysker et al., 1986; Eysker et al., 1983; Archer, 1980). Jedoch gibt es auch einige gemeinsame Parasiten, auf die geachtet werden sollte, hier ist vor allem der Magenwurm *Trichostrongylus axei* hervorzuheben. So zeigte EYSKER in mehreren Studien mit Wechselbeweidung von Pferden und Schafen einen Anstieg der *T. axei*-Infektionen bei den Pferden. Diese zeigten sich durch einen Serum-Pepsinogen Anstieg zwei Wochen nach Wechsel auf die zuvor von Schafen beweidete Fläche (Eysker et al., 1986; Eysker et al., 1983). Rinder grasen grundsätzlich zwar auch an Geilstellen von Pferden, sind diese jedoch stark verschmutzt werden sie auch von Rindern gemieden. Insgesamt kann man also durch die Wechselbeweidung von Pferden und Rindern von einer deutlichen Reduktion des parasitären Infektionsdruckes ausgehen, eine vollständige Elimination der Parasitenstadien kann jedoch nicht erreicht werden (Bender, 2013a).

2.2.3.2. Pflegemaßnahmen und Düngung von Pferdeweiden

Die Pflegemaßnahmen haben das Ziel eine geschlossene, vielseitige Grasnarbe auf der Pferdeweide zu erhalten. Dies ist bei einer durchgehenden Beweidung in der Saison (meist von April bis November), wie bei der Dauerweide, nahezu unmöglich (Bender, 2013b). Empfohlen wird deswegen eine Anpassung von Weidedauer und Besatzdichte, sowie eine regelmäßige Weidennutzung von Beweidung und Heunutzung (KTBL, 2012). Wie vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen empfohlen, sollte die Besatzdichte auf einer Standweide 0,5 GVE/ha betragen, bei starkem Aufwuchs ist ein Besatz von bis zu 2 GVE/ha möglich (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz). Beim System der Umtriebsweide sollten pro Pferd mindestens 1 a (= 100 m²) zur Verfügung stehen. Es sollte darauf geachtet werden, dass der Verbiss des Grases eine Höhe von 5 cm nicht untersteigt, eine darauffolgende Ruhezeit von drei bis sechs Wochen zur Erholung des Grasaufwuchses muss eingehalten werden (Elsaesser and Thumm).

Das Abschleppen im Frühjahr dient zur Belüftung der Grasnarbe, Beseitigung von abgestorbenem Gras und Plättung von Maulwurfshügeln und wird vor Schossbeginn der Gräser, wenn keine Nachtfrostgefahr mehr besteht, durchgeführt (KTBL, 2012). Ein Walzen des Bodens um den Bodenschluss der Narbe wiederherzustellen ist nur bei lockeren, humosigen Böden oder nach winterlichem Auffrieren notwendig. Bei Schäden der Grasnarbe ist zum Ende der Weidesaison eine Nachsaat mit schnell wachsenden Gräsern (z.B. Deutsches Weidelgras) empfehlenswert (Elsaesser and Thumm).

Die wichtigste Pflegemaßnahme während der Weidesaison, nicht nur um den parasitären Infektionsdruck zu senken, sondern auch um die Bildung großer Geilstellen zu vermeiden, ist das Absammeln des Pferdemists. Dies sollte möglichst alle ein bis zwei Tage gemacht werden, da sonst die Parasitenlarven aus dem Mist in den Boden darunter wandern oder z.B. durch Insekten oder Regen weiter verteilt werden (Herd and Gabel, 1990; Herd, 1986).

Durch die Vermeidung der Geilstellen wird auch der ungenutzte Futteraufwuchs verringert und eine gleichmäßigere Beweidung der Fläche erreicht. Hierfür wird bis auf geeignetes Werkzeug und Arbeitskraft nichts weiter benötigt, außerdem bleiben Pferd und Umwelt unbelastet. Diese Art der Weidehygiene wird immer wieder empfohlen und auch von Experten als wirksam angesehen (Herd, 1990; Herd, 1986; Archer, 1980). Eine manuelle Entfernung der Pferdeäpfel ist mit viel Arbeit verbunden, weswegen immer mehr technische Hilfsmittel auf den Markt kommen, wie z.B. der Paddock Cleaner (Rampelmann & Spliethoff GmbH & Co. KG) oder der Super Scooper aus Australien (Super Scooper, Australia). Jedoch gab es längere Zeit keine Studien ausreichender Größe mit statistischer Auswertung, die dies belegen. Erst 2014 wurde eine Studie veröffentlicht, bei der auf einer Esselfarm in Großbritannien das zweimal wöchentliche manuelle Kotabsammeln mit der maschinellen Kotentfernung und einer Kontrollgruppe ohne Entfernung des Kotes verglichen wurden (Corbett et al., 2014). Die Gruppen mit manueller und maschineller Kotentfernung zeigten im Mittel einen 20% niedrigeren EpG im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Larvenzählungen auf den Weiden unterschieden sich jedoch nicht signifikant. Wichtig ist hier die rechtzeitige Entfernung der Kothaufen, bevor die Larven aus diesen auswandern bzw. passiv verteilt werden. Genauere Untersuchungen, in wie weit häufigeres Kot Absammeln den positiven Effekt verstärkt und auch signifikante Unterschiede in der Larvenbelastung auf der Wiese sichtbar werden, sind notwendig. Auch sollte bei der mechanischen Kotentfernung das Risiko der suboptimalen Entfernung und die Verteilung des Mistes auf der Wiese beachtet werden. Die meisten Hilfsgeräte scheinen nur bei planer Weide und kurzem Grasaufwuchs mit zufriedenstellender Wirkung einsetzbar zu sein.

Nach Umstellen der Pferde und Entfernung des Pferdemists wird eine Mahd der Weide empfohlen. Die von den Pferden gemiedenen, weniger schmackhaften Pflanzen gewinnen sonst die Oberhand und können sich weiter ausbreiten. Die Schnitthöhe sollte 6-8 cm nicht unterschreiten, damit ein rascher Neuaustrieb aller Pflanzen möglich ist (KTBL, 2012). Nester von Problempflanzen, wie Brennesseln oder Disteln, sollten möglichst 4x/ Jahr per Hand abgemäht werden. Vor allem bei kleineren Flächen ist die Mahd wichtig, um eine akzeptable Weidefläche zu erhalten. Im Spätherbst nach Weideabtrieb fördert die Mahd die Winterfestigkeit der Grasnarbe (Bender, 2013b; Elsaesser and Thumm).

Beim Einsatz von Düngemitteln sind neben den EU-Vorschriften und nationalen Gesetzen auch die regionalen Gegebenheiten vor Ort und die jeweiligen Landschaftsschutzregeln (Wasserschutzgebiet, Gebirge, o.ä.) zu beachten. Diese stellen bei den eher extensiv genutzten Pferdeweiden meist kein Problem dar. Um die optimale Düngung zu garantieren, ist die Entnahme und Untersuchung von Bodenproben notwendig, eine Probe pro 500 m² ist empfehlenswert. Diese können entweder im Frühjahr vor Beginn oder im Herbst nach der Weidesaison genommen werden (KTBL, 2012; Bender, 2013c). Je nach Nährstoffgehalt des Bodens und gewünschter Nutzungsintensität gibt das Labor Empfehlungen für die Düngung.

Neben Wasser, Luft und Sonnenenergie benötigen die Pflanzen einige Hauptnährstoffe wie Stickstoff, Phosphat, Kalium, Kalzium und Magnesium, sowie in kleineren Mengen Spurenelemente (z.B. Kobalt, Kupfer, Selen).

Wirtschaftsdünger aus intensiver Tierhaltung (Gülle, Jauche) enthält Stickstoff und Grundnährstoffe und darf nur strikt nach Düngeverordnung eingesetzt werden. Der Einsatz auf Pferdeweiden ist aus hygienischen Gründen nur in Einzelfällen vorzunehmen. In der Rindergülle z.B. sind entwicklungsfähige Eier von *Fasciola hepatica* und *Ascaris suum* und lebensfähige infektiöse *Strongyliden* und *Trichostrongyliden* Larven zu finden (Enigk et al., 1965). Möglich ist eine Gülledüngung z.B. im Herbst nach Weideaustrieb oder im Frühjahr mit anschließender Schnittnutzung der Fläche. Eine Düngung mit Pferdemist wird ebenfalls aus hygienischen Gründen nicht empfohlen. Es konnte eine erhöhte Infektionsrate mit *Parascaris* spp. auf Betrieben festgestellt werden, die mit Pferdemist düngen (Fritzen et al., 2010).

Methoden zum unschädlich machen des Mistes werden beschrieben, wie z.B. das Kalken, welches auch im Seuchenfall zur Desinfektion des Mistes genutzt wird (Europäischer Kalkverband, 2008). Zumindest sollte der Pferdemist vorher ausreichend lange kompostiert werden und nicht frisch ausgebracht werden, da der hohe Ammoniumgehalt zu Pflanzenschäden auf dem Grünland führt (Landratsamt Zollernalbkreis). Optimal durchgeführt kommt es während der Heißphase der Rotte zur Hygienisierung des Mistes, dies ist aber mit einem erhöhten Arbeitsaufwand verbunden. Eine Studie, die auf einem Gestüt in Kentucky durchgeführt wurde, untersuchte die Auswirkung einer Schwaden Kompostierung von Pferdemist auf die Eier von *Parascaris* spp.. Bei Temperaturen zwischen 40 und 58°C in der Schwade waren nach sechs (bei wechselnder Platzierung inner- und außerhalb der Schwade) bzw. acht (bei Platzierung in der Schwade) Tagen keine entwicklungsfähigen Eier mehr vorhanden. Eine Kompostierung des Pferdemistes wurde als effektive und effiziente Methode angesehen um die darin enthaltenen *Parascaris* spp.-Eier unschädlich zu machen (Gould et al., 2013).

Falls die Koppeln während der Weidesaison nicht vom anfallenden Mist befreit werden, sollte beachtet werden, dass dieser schon einen Nährstoffbeitrag leistet, was bei der Düngung mit einberechnet werden muss (Elsaesser and Thumm).

Unter einer Grunddüngung versteht man die Düngung mit Grundnährstoffen ohne Stickstoff. Als benötigter Bestandteil von Eiweißen und Chlorophyll regt die Stickstoffdüngung das Mengenwachstum und die Grünfärbung der Pflanzen an. Sie sollte nur in den Bedarfsgrenzen vorgenommen werden, da eine übermäßige Stickstoffzufuhr zu Verbrennung der Pflanze und Umweltschäden wie z.B. Grundwasserbelastung durch Nitrat führt (Bender, 2013d).

Bei der Art der Bereitstellung der Nährstoffe wird zwischen organischer und mineralischer Düngung unterschieden. Bei organischen Düngern sind die Nährstoffe organisch gebunden und müssen erst durch Bodenorganismen in pflanzenverfügbare Stoffe umgewandelt werden. Hierzu zählen tierische Exkremente, Horn-/ Feder- oder Knochenmehl, Kompost, Pflanzenjauche oder im weiteren Sinne auch Gesteinsmehl. Sie haben eine Langzeitwirkung und begünstigen die Artenvielfalt, geben aber keine raschen Wachstumsreize. Mineralische Dünger sind meist chemisch produziert und können Pflanzen schnell die benötigten Nährstoffe zur Verfügung stellen. Dies ist vor allem in der intensiven Landwirtschaft nötig um die Nährstoffverluste des Bodens auszugleichen. Problematisch zu sehen ist, dass bei mineralischen Düngern ein Teil der Nährstoffe auch schnell ausgewaschen wird und ins Grundwasser gelangt.

Um den pH-Wert des Bodens zu regulieren können Kalkdünger eingesetzt werden. Kalk bindet die Bodensäure und kann den Säuregehalt des Bodens heben. Ein neutraler pH-Wert liegt zwischen 6,5-7,2, die meisten Pflanzen bevorzugen einen leicht sauren pH-Wert von 5,5-6,5. Kalkverluste durch Entzug und Auswaschung aus dem Boden sind ca. alle 3 Jahre auszugleichen, auch hier empfiehlt sich jedoch die vorherige Bestimmung des Säuregehalts des Bodens um ein übermäßiges Kalken zu vermeiden (KTBL, 2012; Diepolder and Hartmann, 2013).

Zur Steigerung des Weideertrages kann eine Stickstoffdüngung durchgeführt werden. Hiernach ist eine Ruhezeit von mindestens 3 Wochen einzuhalten um die Ertragssteigerung auszunutzen (Diepolder and Hartmann, 2013). In Tabelle 7 ist der Bedarf einiger Nährstoffe in Abhängigkeit von der Weideform dargestellt. Diese sind jedoch stark abhängig von unterschiedlichen Faktoren, wie Standort, botanischer Zusammensetzung und Bestandsdichte. Bei der Stickstoffdüngung empfiehlt es sich, mehrere Gaben übers Jahr zu verteilen und nicht die gesamte Menge auf einmal zu geben. Eine Einzelgabe sollte die Menge von 30-40 kg N/ha nicht überschreiten (KTBL, 2012).

Tabelle 7: Nährstoffbedarf in Abhängigkeit von der Weideform pro Jahr (KTBL, 2012)

<u>Weideform</u>	<u>Nährstoffbedarf (kg/ha)</u>		
	N (Stickstoff)	P2O5 (Phosphat)	K2O (Kalium)
Standweide	40	0-60	0-80
Umtriebsweide	200	80-120	80-120
Portionsweide	300	80-120	100-160

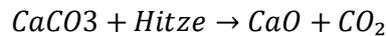
2.3. Kalkstickstoff

2.3.1. Geschichte

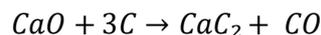
Erste Versuche zur Bindung von Luftstickstoff führten bereits R. BUNSEN et.al. 1845 durch. 1877 konnte DRECHSEL erstmals Kalkstickstoff (CaCN_2) aus einer Kalziumcyanamidschmelze isolieren. FRANK und CARO stellten 1894 fest, dass Stickstoff durch die Carbide der Erdalkalien gebunden wird (Pirani et al., 1930, S. 195). Das nach Ihnen benannte Frank-Caro-Verfahren, das im Prozess mit dem Initialzündungsverfahren arbeitet, wird noch heute bei der Kalkstickstoff-Herstellung angewandt (Neumann, 1939, S. 425). Neben diesem Verfahren wird auch mit dem Polzenius-Verfahren gearbeitet, bei dem die Temperatur der Azotierungsreaktion, durch Zugabe von Kalziumchlorid, gesenkt werden kann.

2.3.2. Herstellung

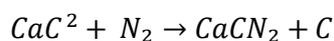
Die Rohstoffe zur Kalkstickstoff-Herstellung sind Kalkstein (CaCO_3), Kohle und Luftstickstoff (N). Im ersten Schritt wird der möglichst reine, hochprozentige Kalkstein (min. 95 % Kalk) im Ofen unter Hitze zu Branntkalk (CaO) verarbeitet.



Zur Carbid-Herstellung (CaC_2) wird der Branntkalk zusammen mit Kohle (C) im elektrischen Carbidofen erhitzt, alternativ können als Kohlenstofflieferanten Koks oder Anthrazit eingesetzt werden. Die Carbidbildung beginnt ab einer Temperatur von 1620°C , technisch werden Temperaturen von $2200\text{-}2300^\circ\text{C}$ eingesetzt, um die Reaktion zu beschleunigen. Bei noch höheren Temperaturen zerfällt das Carbid wieder. Um 1 kg Carbid herzustellen werden je nach Ofen 2,83-12,7 kWh verbraucht.



Im dritten Schritt wird schließlich unter Bindung von Luftstickstoff Kalziumcyanamid (= Kalkstickstoff) gebildet. Die Stickstoffbindung beginnt ab einer Temperatur von 800°C . Um technisch brauchbare Geschwindigkeiten dieser Reaktion zu erreichen, sind um die 1100°C nötig. Alternativ ist eine Beschleunigung der Stickstoffaufnahme bei 800°C durch Zugabe von 10% Kalziumchlorid möglich (Polzenius-Verfahren).



Die entstandenen Kalkstickstoffblöcke werden gebrochen, zermahlen und schließlich granuliert und auf die gewünschte Korngröße gesiebt (AlzChem Group AG; Neumann, 1939, S. 425-9).

2.3.3. Eigenschaften und Wirkungsweise

Kalziumcyanamid ist ein grauschwarzes Pulver mit einem spezifischen Gewicht von 2,3 und einem Stickstoffanteil von 20-25%. Davon fallen 92-95% auf Cyanamidstickstoff, 0,01-0,4% auf Dicyandiamid- und Harnstoff-Stickstoff und der restliche Anteil auf höhermolekulare Stickstoffverbindungen (Pirani et al., 1930, S. 198).

Unter Einwirkung von Wasser zerfällt Kalkstickstoff, Temperatur und pH-Wert beeinflussen diesen Vorgang. Bei einem pH-Wert zwischen 5-7 und Temperaturen $<40^\circ\text{C}$ entstehen Cyanamid und Kalkhydrat (Pirani et al., 1930, S. 198). Cyanamid kann bei basischem pH weiter zu Dicyandiamid reagieren, bzw. bei saurem pH-Wert unter 5 zu Harnstoff, welcher sich weiter zum pflanzenverfügbaren Ammonium (NH_4) umwandelt (Pirani et al., 1930, S. 198). Die Nitrifikation von Ammonium durch *Nitrosomonas*-Bakterien zu Nitrit (NO_2) und weiter durch *Nitrobacter spp.* zu Nitrat (NO_3), welches ebenfalls als Nährstoff den Pflanzen zur Verfügung steht, kann durch Dicyandiamid verzögert werden. Dadurch kommt es zu

einer langsamen Nährstofffreisetzung und somit verlängerten Düngerwirkung. Das komplette Cyanamid wird zu Ammonium und Nitrat abgebaut, sodass die Pflanzen Ihren Stickstoffbedarf decken können. Mit einem Kalkgehalt von 50% ist der Kalkwert des Kalkstickstoffdüngers PERLKA® positiv (+30) und der Dünger somit ein guter Kalklieferant (AlzChem Group AG).

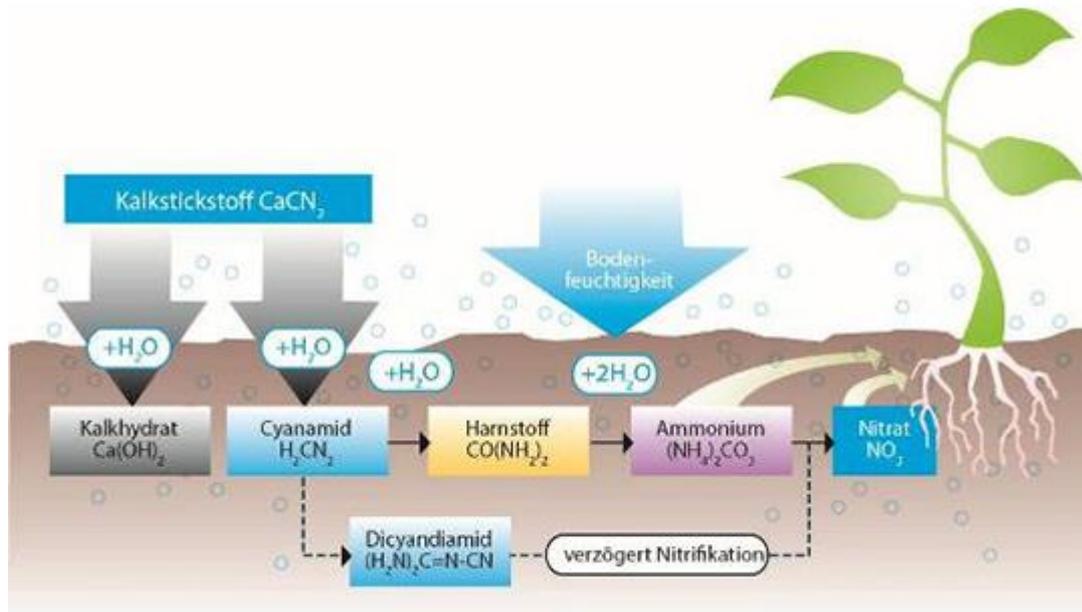


Abbildung 6: Reaktion von Kalkstickstoff im Boden (AlzChem Group AG)

Bei Anwendung von Kalkstickstoffdünger kommt es zu einer Beeinflussung der Mikroorganismen im Boden. Nach Wirkung des Cyanamids kommt es erst zu einem Keimabfall danach wieder zu einem Anstieg. Nach einer Untersuchung von LIU erreichten die Bodenorganismen ihr ursprüngliches Level 14 Tage nach der Behandlung mit Cyanamid (Liu et al., 2016). Abhängig von der Aufbringungsmenge des Kalkstickstoffdüngers variiert die Zusammensetzung von Pilzen und Bakterien im Boden. Vor allem bei niedrigen Kalkstickstoffgaben wird das Pilzwachstum gefördert. Mit ausreichender Konzentration ist eine Bekämpfung pathogener Bodenpilze möglich (Müller, 1955). So kann zum Beispiel durch Kalkstickstoffbehandlung mit 200g/m² *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* langanhaltend um über 90% reduziert werden, ohne dabei die Bodenbakterien zu schädigen (Shi et al., 2009). In China konnte das pflanzenpathogene Bakterium *Ralstonia solanacearum* mit Kalziumcyanamid gut unterdrückt werden. Hier wird aber bei gleich guter Wirkung eine Behandlung mit Ammonium-Wasser (mit gleicher Dosierung von 0,25 g N/kg Erde) vorgezogen, da dies den Boden pH-Wert nicht so stark erhöht wie Kalkstickstoff (Liu et al., 2016).

Typische Saprophyten wie *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. oder *Mucor* spp., sind dagegen deutlich weniger empfindlich gegen Kalkstickstoff. Einige Organismen können Kalkstickstoff auch als Stickstoff-Quelle nutzen und verstoffwechseln, wie z. B. *Penicillium* spp., *Cladosporidium stemonitis*, *Bacteroides pyocyaneum*, *Pseudomonas fluorescens* und *Aspergillus* spp.. Dies hat zur Folge, dass Kalkstickstoff-Dünger nicht nur rein katalytisch im Boden umgesetzt wird, sondern dass Mikroorganismen ab der Cyanamidstufe in den Reaktionsweg mit eingreifen (Müller, 1955).

2.3.4. Eigenschaften und Vorkommen von Cyanamid (H₂CN₂)

Viele Eigenschaften von Kalkstickstoffdünger sind auf die Wirkung des Cyanamids zurückzuführen. Dieses bildet sich bei Kontakt des Düngers mit Bodenwasser und wird dann innerhalb von sieben bis 14 Tagen weiter abgebaut zu Ammonium und Nitrat.

Reines Cyanamid, von der Firma AlzChem auch als Cyanamid F 1000 vermarktet, besteht aus farblosen, hygroskopischen Kristallen mit einem Schmelzpunkt von 46°C und einem Siedebereich von 132-138°C. Außerdem ist eine 50% wässrige Lösung, Cyanamid L 500, erhältlich. Diese hat einen pH-Wert von 4,5 und einen Gefrierpunkt von -8°C. Im Boden liegt Cyanamid gelöst im Wasser vor (Wehrstedt et al., 2009).

Auch ein natürliches Vorkommen von Cyanamid konnte nachgewiesen werden, es ist ein Produkt von einigen Hülsenfrüchten und wird dort vor allem in den Blättern aus dem Vorläufermolekül L-canavanine, vermutlich zum Fraßschutz, gebildet (Kamo et al., 2015). Jedoch konnte diese Fähigkeit nur bei drei von 553 untersuchten Pflanzenarten festgestellt werden, *Vicia villosa* spp., *V. cracca* sowie *Robinia pseudo-acacia* (Kamo et al., 2008; Kamo et al., 2003).

Auf Pflanzen übt Cyanamid einen oxidativen Stress aus, dieser ist abhängig von der Dosierung und der Länge der Cyanamidanwendung (Maninang et al., 2015). Es reagiert mit schwermetallhaltigen Enzymen, blockiert deren Wirkung und beeinflusst somit den pflanzlichen Stoffwechsel. Dies wurde anhand der Wirkung auf die Katalase und Peroxidase, Hilfsenzyme der Atmung bei Pflanzen, nachgewiesen. Unter Cyanamideinfluss akkumuliert Wasserstoffperoxid (H₂O₂) das Substrat dieser Enzyme und es kann zu einer tödlichen Wasserstoffvergiftung kommen. Anfangs wird die Hemmung der sensibleren Katalase durch eine Erhöhung der Peroxidaseaktivität ausgeglichen, wird diese jedoch ebenfalls geschädigt kommt es zum Gewebsuntergang der Pflanze (Amberger, 1961).

Durch Beeinflussung der Zellteilung wird das Wurzelwachstum und das Längenwachstum des Hypokotyls negativ beeinflusst (Soltys et al., 2012; Soltys et al., 2011). Dies wird sichtbar durch die Verringerung mitotischer Zellen, reduzierte Randzellen in den Wurzelspitzen, verringerte Frequenz der Zellteilung sowie weiteren verdächtigen Veränderungen in den Wurzelzellen, wie vermehrte Vakuolisierung und Modifikation des Zytoskeletts (Soltys et al., 2014; Soltys et al., 2011). Cyanamid kann auch die Keimung von Samen und das Wachstum der Keimlinge vieler Pflanzen hemmen (Soltys et al., 2013). Dies wird auch beim Einsatz des Kalkstickstoffdüngers genutzt, der das Wachstum unerwünschter Pflanzen auf der Weide unterdrückt, bringt man den Dünger zum Zeitpunkt des Auskeimens dieser Pflanzen aus (AlzChem Group AG).

Cyanamid kann andererseits auch zur Unterbrechung der Wachstumsverzögerung z.B. bei Weintrauben eingesetzt werden. Auch hier macht man sich den oxidativen Stress zu Nutze, da verringerte Sauerstoffkonzentrationen den Samen zum Auskeimen stimulieren (Rubio et al., 2014).

2.3.5. Toxizität von Cyanamid

Durch die Hemmung der Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH), welche auch einen wichtigen Schritt im Abbau von Alkohol katalysiert, ist eine Aufnahme von Cyanamid vor allem in Kombination mit Alkoholkonsum gefährlich, da es zu einer Akkumulation von Acetaldehyd kommt (Marchner and Tottmar, 1978). Durch Kombination von Alkohol und Cyanamid kann die toxische Wirkung um das 30-fache gesteigert werden (Dauderer, 1984). Diese zeigt sich durch Rötung des Kopfes, Hitzegefühl im Kopf, Nacken und Oberkörper, Tachykardie und Dyspnoe bis hin zum Herzstillstand. Dies macht man sich bei der Behandlung von Alkoholikern zu Nutze, die mit Cyanamid behandelt werden und somit schon bei der

Aufnahme kleinster Alkoholmengen größeres Unwohlsein entwickeln (Kojima et al., 1997; Gessa, 1990; Schiele et al., 1981). Im schlimmsten Fall kann ein andauernder Alkoholgenuss trotz Cyanamideinnahme zum Tod führen, wie der Fall einer 34-Jährigen Frau zeigte. Bei dieser traten nach Einnahme von 20 ml einer 1 %-igen Cyanamid-Lösung und 129 g Ethylalkohols schweres Erbrechen und Bewusstlosigkeit auf, schließlich verstarb sie (Kojima et al., 1997).

Risikogefährdet sind weiterhin Arbeiter aus Fabriken, die Cyanamid oder Kalziumcyanamid herstellen, sowie die Landwirte als Anwender dieser Substanzen. Hier kann es zu Hautkontakt oder Einatmung von Stäuben und Dämpfen kommen, letzteres führt zu Reizung der Atemwege, Kopfschmerzen und Schwindel (Dauderer, 1984). Bei Kontakt mit Dormex, einem Pflanzenwachstumsregulator mit Cyanamid, kam es zu schweren Hauteruptionen (Foti et al., 2008). Bei sechs von 22 Arbeitern einer Kalkstickstofffabrik, die ein bis sieben Stunden nach der Arbeit Alkohol konsumierten, traten geringe bis sieben sehr schwache Nebenwirkungen auf. Bei einer Studie mit 65 Arbeitern eines Kalkstickstoff-Fabrikanten konnten keine Erkrankungsanzeichen in den Organsystemen gefunden werden. Maximal gemessene Kalziumcyanamid-Konzentrationen lagen bei 8,3 mg/m³. Die empfohlene maximale alveoläre Konzentration (MAC) liegt bei 1-2,5 mg/m³ (Schiele et al., 1981).

Auch bei Tieren gibt es Berichte zu toxischen Reaktionen nach Kontakt mit Kalkstickstoff oder Aufnahme von Cyanamid. So kam es nach Beimengung von Kalziumcyanamid in die Einstreu von Kühen, mit dem Ziel umweltbedingte Mastitiden zu verhindern, bei den Tieren zu schweren Kontaktdermatitiden. Diese begannen an den Körperstellen die Bodenkontakt hatten und breiteten sich dann weiter aus. Ein daraufhin durchgeführter „Patch-test“ mit den Wirkstoffen Kalkstickstoff, Cyanamid, Harnstoff und Ammoniumbicarbonat bestätigten die Vermutung, drei von vier Tieren reagierten auf Cyanamid und Calciumcyanamid (Onda et al., 2008).

Auch Vergiftungserscheinungen von Rindern nach Aufnahme von größeren Mengen der Zottelwicke (*Vicia villosa*), welche natürlicherweise selber Cyanamid produziert, wurden berichtet. Acht Tiere einer Rinderherde in den USA zeigten, während einer Weidezeit von 20 Tagen auf einer Weide mit großem Anteil der Zottelwicke, Konjunktivitis, Rhinitis, Dermatitis, Haarverlust und Fieber und verstarben innerhalb von 15 Tagen. Nachdem die verbliebenen Tiere von der Weide umgestellt worden waren, erkrankten keine weiteren Kühe. Bei der Sektion der verendeten Tiere zeigten sich Vergrößerung der Leber und Milz, Blutungen in den Bauch, nekrotisierende-granulomatöse Myokarditis, interstitielle Nephritis sowie nekrotisierende Cholangitis. Weitere ähnliche Fälle sind bekannt (Odriozola et al., 1991; Peet and Gardner, 1986; Panciera et al., 1966).

2.3.6. Wirkung auf Weideparasiten

Über die Wirkung von Kalkstickstoffdünger auf externe Stadien von Weideparasiten gibt es verschiedene Studien (Podstatzky, 2015, 2013, 2012; Bauer, 2006; Cabaret, 1994; Pouplard and Pecheur, 1977, S. 28-41; Brozeit and Wieners, 1976; Gevrey and Euzéby, 1965; Pecheur, 1962; Leiper, 1937). Neben Versuchen auf dem Feld wurden unterschiedliche Wirksamkeitsstudien im Labor durchgeführt. Für die meisten Untersuchungen wurden Magen-Darm-Parasiten von Wiederkäuern genutzt, nur eine Studie untersuchte die Wirkung von Kalkstickstoff auf die Parasiten von Pferden (Leiper, 1937). In einem in-vitro Versuch im Labor konnte er feststellen, dass in einer 0,25 %-igen Kalkstickstofflösung (mit Aqua dest) alle Sclerostomen-Larven starben (Sclerostomen = alter, vereinfachender Begriff für die verschiedenen Gattungen der Strongyliden bei Pferden). In einer 0,1 %-igen Lösung überlebten die Larven sieben Tage lang. In einem weiteren Versuch wurden die Larven mit 110 g Erde und verschiedenen Mengen Kalkstickstoff (2 g, 1 g, 0,5 g, 0,25 g) in Petrischalen untersucht. Hierbei starben bei einer Menge von 2 g Kalkstickstoff alle Larven innerhalb von 19 Stunden, bei 0,25 g starb keine Larve innerhalb von 48 Stunden. Für das ‚Indoor Experiment‘ wurden auf Grasstücken im Innenbereich 10.000 Sclerostomen-L3 ausgebracht

und mit umgerechnet 560 und 1120 kg/ha Kalkstickstoff gedüngt. Die Larven wurden im Anschluss mit dem Baerman-Trichter Verfahren wiedergewonnen und ausgezählt. Hier lagen die Mortalitätsraten der gewonnenen Larven bei 59 % (560kg/ha) bzw. 90 % (1120kg/ha) und bei 3-6 % in der Kontrolle. Im abschließenden ‚Outdoor Experiment‘ wurde im Februar auf einer kleinen Parzelle (1 sq ft = 929 cm²) Kalkstickstoff in einer Dosierung von 784 kg/ha sowie 250.000 L3 der Pferdeparasiten aufgebracht. Von den nach acht und 18 Tagen wiedergewonnenen Larven lag die Mortalitätsrate bei Kalkstickstoffdüngung bei rund 50 %, in der ungedüngten Kontrolle bei 2-3 % (Leiper, 1937).

PECHEUR untersuchte im Labor den Einfluss des pH-Wertes und die Wirkung von verschiedenen Kalkstickstoffkonzentrationen (75, 150 und 300 kg/ha) in Mischungen aus Torf und Kot auf Entwicklungsstadien von *Trichostrongylus* spp. und *Strongyloides* spp.. Die ovizide und larvizide Wirkung war proportional zur eingesetzten Düngermenge und bei unreifen Larvenstadien deutlich besser als bei der infektiösen L3. So lag die Reduktion durch 300 kg/ha Kalkstickstoff für L1 und L2 bei 80-99 %, bei den L3 nur bei etwa 25 % (Pecheur, 1962).

In vitro Tests mit Larven von *H. contortus* und *Ostertagia* spp. ergaben ähnliche Ergebnisse. Kalkstickstoff wirkte deutlich besser gegen unreife Larvenstadien. Um eine Reduktion aller L3 oben genannter Parasiten in vier Tagen zu erreichen, war eine Dosierung von 1000 kg/ha notwendig (Gevrey and Euzéby, 1965).

In einem vierjährigen Feldversuch von 1972-1975 wurden jedes Jahr zwei Jungrindherden mit ca. acht Tieren untersucht. Die Weideführung beider Gruppen war gleich, bis auf die Düngung, die auf einer Weide mit 400 kg Kalkstickstoff /ha und auf der Kontrollgruppe mit reinem Stickstoffdünger durchgeführt wurde. Je Tiergruppe stand eine Fläche von 2 ha zur Verfügung, welche in vier Teile à 0,5 ha unterteilt war, auf denen die Tiere während der Weidesaison rotierten. Monatlich wurden Kotproben der Tiere untersucht, sowie Gewichtskontrollen durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass die Tiere aus der Kontrollgruppe mehr positive Kotproben hatten und die EpG-Werte der Proben bis zu 3x höher, als die der Kalkstickstoff-Gruppe waren. Um einen Anstieg der EpG-Werte im Herbst zu verhindern muss jedoch eine Nachdüngung im Sommer mit Kalkstickstoff erfolgen. Die Tiere aus der Kalkstickstoffgruppe hatten im Durchschnitt einen Körpergewichtsmehrwert von 23 kg. Eine statistische Auswertung der Ergebnisse wurde nicht durchgeführt (Brozeit and Wieners, 1976).

Ein ähnlicher Versuch wurde in den 70er Jahren in Belgien durchgeführt, mit je sechs Jungrindern pro Weide. Über drei Jahre wurden verschiedene Methoden der Kalkstickstoffdüngung ausprobiert. Eine Düngung mit 400 kg/ha im April, Düngung mit 300 kg/ha im Februar oder Düngung mit 300 kg/ha im November des Vorjahres wurden verglichen. Auch hier wurden die Ergebnisse deskriptiv ausgewertet. Die Autoren beschreiben einen geringeren Wurmbefall der Tiere auf der Kalkstickstoffweide im ersten Jahr, sowie im Mittel 12 kg Mehrzunahme des Körpergewichts. Jedoch fehlt auch hier die statistische Analyse. Nach der Düngung im Februar war der Unterschied bezüglich der EpG-Werte der beiden Gruppen minimal. Auffallend und als negativ zu bewerten war jedoch der Wachstumsschock des Grases auf der Kalkstickstoffweide durch die frühe Düngung im Februar, und die somit auf dieser Weide ungenügende zur Verfügung stehende Grasmenge für die Rinder. Auch die Düngung im Vorjahr scheint keine großen Unterschiede bezüglich der Parasitenbelastung der Tiere zu bewirken. In den ersten vier Monaten der Weidezeit waren die EpGs ähnlich hoch, erst zum Ende der Weidezeit im August konnte ein Anstieg der EpG-Werte in der Kontrollgruppe festgestellt werden, woraufhin alle Tiere entwurmt wurden (Pouplard and Pecheur, 1977). In Rindergülle töteten 8 kg Kalkstickstoffdünger bzw. 1 L Alzogur / m³ Gülle bei Temperaturen zwischen 5-20°C erfolgreich >99 % der enthaltenen L1 und L2 von *O. ostertagi* und *C. oncophora*. Um eine vergleichbare Wirkung von >95 % gegen die infektiösen L3 zu erreichen waren dagegen 10 kg Kalkstickstoff bzw. 5 L Alzogur /

m³ Gülle nötig. Weder 10 kg Kalkstickstoff noch 10 L Alzogur / m³ Gülle konnten die Entwicklung von *A. suum* Eiern verhindern (Pouplard and Pecheur, 1977).

In einem Weideversuch mit Schafen, bei dem mit 1000 kg/ha Scoramid (Kalkstickstoff + Schlacke) gedüngt wurde, konnte keine signifikante Wirkung auf die L3 von MDS vom Schaf festgestellt werden. Jedoch war die Düngung signifikant negativ korreliert mit Infektionen von *Moniezia* spp. (Bandwürmer) und *Muellerius capillaris* (kleiner Lungenwurm). Für präadulte *Ceratomyxa virgata* (Sandheideschnecke), welche unter anderem als Zwischenwirt für *M. capillaris* fungiert, wurde in in vitro-Tests für Kalziumcyanamid ein LD50 von 1100 kg/ha benötigt (Cabaret and Mangeon, 1994).

Mit einem in-vitro Test wurde am Institut für Parasitologie der Justus-Liebig-Universität in Giessen ein in-vitro Test durchgeführt, bei dem die Wirkung von Cyanamid-Lösung auf die Drittlarven von *Haemonchus contortus* untersucht wurde. Bei Konzentrationen der wässrigen Cyanamid-Lösung zwischen 0,075 % und 2,5 % und verschiedenen Temperaturen (4°C, 22°C) und Einwirkzeiten (24 h, 72 h, 8 d) wurde visuell die Motilität der Larven bestimmt und ausgewertet. Mit einer Einwirkzeit von 24 h bei 22°C ergaben sich folgende inhibitorischen Konzentrationen der Cyanamid-Lösung: ED50 = 1,3; ED95 = 2,7. Bei längerer Einwirkzeit (72 h, 8 d) verringern sich die ED-Werte um jeweils bis zu 50 %. Bei 4°C sind 2,6- bis 4-fach höhere Konzentrationen notwendig, um die gleiche Wirkung wie bei Raumtemperatur zu erreichen. Die Ergebnisse wurden deskriptiv in Tabellen ausgewertet, ein statistischer Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und den Gruppen in Cyanamid-Lösung wurde nicht vorgenommen (Bauer, 2006).

In einem weiteren Laborversuch wurde die Wirksamkeit von Kalkstickstoff, neben anderen Stoffen wie Branntkalk, Kalk, Beizmitteln und effektiven Mikroorganismen, auf *H. contortus* Stadien überprüft. Dazu wurden Drittlarven oder Kotproben mit einem hohen EpG auf Holzspäne oder auf Grastöpfchen gegeben, zusammen mit dem zu testenden Mittel. Aufgrund der niedrigen Wiederholungsrate von drei Durchgängen je Variante wurden die Daten nur deskriptiv ausgewertet. Außerdem konnte ein Durchlauf der Grastöpfchen aufgrund von Schimmel nicht ausgewertet werden. Die Gewinnung der Larven erfolgte mit dem Baermann-Wetzel-Trichter Verfahren. Die Wiederfindungsraten der Larven bei den Proben der Grastöpfchen ohne Wirkstoff lagen bei 20-30 %, bei den Hobelspänen zwischen 53-62 %. Durch Kalkstickstoff konnte die Rate auf 0-11,5 % bei den Grastöpfchen und 2,6 % bei den Holzspänen gesenkt werden, was einer Reduktion im Vergleich zu den Kontrollen um ca. 60 % bzw. 95 % entspricht. Zu erwähnen ist die Verwendung der doppelten Menge Kalkstickstoff gegenüber den Herstellerangaben (Podstatzky, 2013; Podstatzky, 2012). PODSTATZKY führte 2013 und 2014 weitergehend einen Feldversuch durch, bei dem er mit Kalk und mit effektiven Mikroorganismen behandelte Weiden von Schafen mit einer Kontrollgruppe verglich. Im ersten Versuchsjahr gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich der EpG-Werte. Im zweiten Jahr wies die Gruppe auf der mit Kalk behandelten Weide signifikant höhere EpG-Werte auf als die anderen Gruppen (Podstatzky, 2015).

2.4. Zielsetzung der Arbeit

Dem Kalkstickstoff-Dünger Perlka werden laut Hersteller zahlreiche Zusatzwirkungen zugeschrieben. Neben Verbesserung der Bodenstruktur, gesundem Pflanzenwachstum und Steigerung der Bodenfruchtbarkeit durch Erhöhung der biologischen Aktivität im Boden, soll Kalkstickstoff die Kontamination von Grünland mit Weideparasitenlarven reduzieren. Vom Hersteller wird für diese Anwendung eine Düngung mit 300-400 kg/ha Perlka zur Zeit der Forsythienblüte empfohlen (AlzChem Group AG). Verschiedene Studien scheinen eine gewisse Wirkung von Kalkstickstoff-Dünger auf Weideparasiten zu bestätigen (Brozeit and Wieners, 1976; Pouplard and Pecheur, 1977; Podstatzky, 2012), jedoch sind die Studien teils schon über 50 Jahre alt. In den Untersuchungen auf dem Feld sowie im Labor wird häufig eine deutliche höhere Kalkstickstoffmenge eingesetzt, als vom Hersteller für den Einsatz auf Grünland empfohlen (Podstatzky, 2012, 2013, 2015; Bauer, 2006; Pouplard and Pecheur, 1977; Brozeit and Wieners, 1976; Pecheur, 1962; Cabaret, 1994, Gevrey and Euzéby, 1965). Auch fehlt meist die statistische Auswertung. Schwierig ist auch die Vergleichbarkeit der Studien, aufgrund der verschiedenen eingesetzten Methoden. Abgesehen von der Studie von LEIPER (1937) wurde die Wirksamkeit bei Pferdeparasiten noch nicht untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung von Kalkstickstoff-Dünger auf das Überleben und die Infektiosität von Drittlarven kleiner Strongyliden beim Pferd zu untersuchen. Diese sind die häufigsten Weideparasiten beim Pferd und wären somit das Hauptziel einer solchen hygienischen Düngung. Dafür wurde in einem Weideversuch mit zwei homogenen Herden aus jeweils 32 weiblichen Jährlingen die Wirkung von Kalkstickstoff nach einmaliger Düngung vor Weidebeginn getestet. Eine Infektion der Pferde wurde anhand der Untersuchung von Kotproben im Laufe der Weidesaison überwacht und es wurde versucht, die Kontamination der Weide durch regelmäßige Untersuchung von Grasproben auf infektiöse Drittlarven zu ermitteln. Die eingesetzten Untersuchungsmethoden entsprechen den heutigen Standards (wie z. B. die Kotflotation mit dem Mini-FLOTAC) oder sind relativ neu etabliert, aber schon für ähnliche Versuche erfolgreich eingesetzt worden (Demeler et al., 2012; Knapp-Lawitzke et al., 2014a).

Um die Wirkung des Kalkstickstoffdüngers genauer zu untersuchen, wurden zusätzlich Versuche mit Grastöpfchen im Labor unter einheitlichen Bedingungen durchgeführt. Zudem wurden Erdproben gedüngter Töpfchen auf ihren Cyanamid-Gehalt untersucht, sowie Larvenassays mit Cyanamidlösung durchgeführt, um so eine Dosis-Wirkungskurve erstellen zu können.

Mithilfe dieser Untersuchungen sollte eine wissenschaftliche Grundlage für die Beurteilung der Verwendung von Kalkstickstoff für die Verbesserung der Weidehygiene, speziell hinsichtlich der Kontamination mit Larven kleiner Strongyliden der Pferde, geschaffen werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Laborgeräte

- Klimaschrank: APT.line KBWF, Pflanzenwachstumsschrank mit Programmregelung für Klima und Beleuchtung, Fa. Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
- Zentrifuge: Heraeus Multifuge X3R, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland
- Waage 1: Sartorius universal, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
- Waage 2: Acculab Sartorius Group, ALC 1100,2, 22211796, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
- Magnetrührgerät: IKA-Combimag RCO, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
- Datenlogger für Temperatur und Feuchte: LT15.1, 11028052, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- Lötpistole: Lötpistole Standard, 9200UC, Weller Tools GmbH, Besigheim, Deutschland
- Mikroskop: Zeiss, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
- Pipetten: Eppendorf Research plus, 1000 µl (3120000054), 100 µl (3120000062), Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Handzählgeräte: z.B. IVO Handzähler

3.1.2. Larven

- L3 von kleinen Pferdestrongyloidenlarven (nicht weiter differenziert) aus Larvenkulturen von natürlich infizierten, institutseigenen Ponys

3.1.3. Mehrwegmaterialien

- Schraubgläser: Neutralglas 500g Original mit 80er Schraubdeckel gold, 6110, Heinrich Holtermann KG, Brockel, Deutschland
- Petrischalen: Petrischalen STERIPLAN, Kalk-Soda-Glas, autoklavierbar, T939.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- Spritzflaschen: Rotilabo-Spritzflaschen, 250 ml, 5330.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- Messer: z.B. Fleischermesser 15 cm, 300500, Mulex Bestecksvertrieb GmbH, Gelsenkirchen, Deutschland
- Schere: feine Schere, z.B. gerade/spitz/spitz, BC060R, Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
- Eimer: 5 l Haushaltseimer, Kunststoff und 20 l Baueimer, Kunststoff, z.B. Nölle Profi Brush, Wuppertal, Deutschland
- Metall-Siebe: Test Sieves (Maschenweite: 250 µm, 200 µm, 150 µm, 20 µm), RETSCH GmbH, Haan, Deutschland
- Kunststoff-Sieb: Sieb, Kunststoff, d= 18cm, Maschenweite ca. 1 mm, 2668000802, Roller GmbH & Co. KG, Gelsenkirchen-Buer, Deutschland
- Zentrifugengefäße: Nalgene PPCO-Zentrifugengefäße, 250 ml, 3120-0250, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland
- Trichter: Kunststofftrichter, farblos, z.B. Behr-Labortechnik GmbH, Düsseldorf, Deutschland

- Siebe für LMIA: selbst gebastelt (22, 28 µm)
- Zählkammer
- Falconständer: Plastik, für 50ml- und 15ml- Falcons
- Tabletts: Kunststoff, unterschiedliche Fabrikate
- Sprühflasche: Neptun 100, Bahag AG, Mannheim
- Teesiebe: unterschiedliche Fabrikate
- Mini-FLOTAC: Kammern + Mikroskopschiene, Unità di Parassitologia e Malattie Parassitarie, Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzione Animali, Università degli Studi di Napoli Federico II

3.1.4. Einwegmaterialien

- Handschuhe: duoSHIELD PFH Nitrile 240, puderfrei, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
- Transferpipetten: 3,5ml, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
- Falcons, 50ml, 114x28mm, PP, Sarstedt, Nürnberg
- Falcons 15ml, 120x17mm, PP, Sarstedt, Nürnberg
- 24-Well-Platten, Sigma-Aldrich, TPP tissue culture plate, 24 well plate, flat bottom, polystyrene, 1.86 cm², sterile, 72/cs, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Holzspatel: Wood Tongue Depressor, 100 Stück, 441142, DELTALAB S.L., Rub (Barcelona), Spanien
- Markier-Klebeband: Time Med Labeling Systems, Inc., Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
- Sägespäne: Lignocell S 8-15, J. RETTENMAIER & SÖHNE GmbH + Co. KG, Rosenberg, Deutschland
- Blumenerde: CMI, Universal Blumenerde, 4405072, OBI Heimwerkermarkt Systemzentrale GmbH, Wermelskirchen, Deutschland
- Grassamen: Living Garden Rasen-Nachsaat, Deutsches Weidelgras, 4469490, OBI Heimwerkermarkt Systemzentrale GmbH, Wermelskirchen, Deutschland
- Alu Schalen: Alu-Tropfschalen groß, Weber, Ingelheim, Deutschland, OBI (5886544)
- Blumentopfuntersetzer: Outdoor-Untersetzer Universal, 12 cm, 1002248, Good(s)factory B.V, BC's-Hertogenbosch, Niederlande
- Dünger: Kalkstickstoff PERLKA, AlzChem AG, Trostberg, Deutschland
- Cyanamid: ALZOGUR, L500, AlzChem AG, Trostberg, Deutschland
- Zellkulturflasche: T-25, REF 83.3910, Standard-Wachstumsoberfläche für adhärenente Zellen, Schräghals, 2-Positionen-Schraubkappe, rot, steril, pyrogenfrei, nicht zytotoxisch, SARSTEDT, Nürnberg, Deutschland
- Zellkulturflasche: T-175, Standard-Wachstumsoberfläche für adhärenente Zellen, Schräghals, 2-Positionen-Schraubkappe, rot, steril, pyrogenfrei, nicht zytotoxisch, SARSTEDT, Nürnberg, Deutschland
- Verbandmull: 8cm x 5m, gerollt, 20-fädig, 4-fach, DIN EN14079, 40672, Helbig Medizintechnik Vetriebs-GmbH & Co. KG, Neuenstadt am Kocher, Deutschland
- Pipettenspitzen: epT.I.P.S. Lo Retention Reloads, Eppendorf Quality, 2-200µl: 0030072065, 50-1000µl: 0030072073, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Serologie-Pipetten: Sarstedt Serological Pipette, 25ml, steril, REF 86.1685.001, SARSTEDT Aktiengesellschaft & Co., Nürnberg, Deutschland
- Einweg-Plastik-Trinkbecher: 0,4l, Getränke Hoffmann GmbH, Blankenfelde-Mahlow, Deutschland
- PBS-Tween: Stammlösung: 80 g NaCl + 2 g KCl + 14,24 g + Na₂HPO₄ x 2H₂O + 2 g KH₂PO₄ + 1000 ml Aqua bidest, PBS-Tween: 100 ml Stammlösung + 900 ml Aqua bidest + 0,5 ml Tween

- gesättigte Zuckerlösung: Berliner Leitungswasser mit Haushaltszucker bis zur Sättigung gemischt
- gesättigte Kochsalzlösung: Berliner Leitungswasser mit Haushaltssalz bis zur Sättigung gemischt
- Larvenwasser: Berliner Leitungswasser gemischt mit destilliertem Wasser bis zu einer Leitfähigkeit von 0,43-0,45 mS

3.2. Methoden

3.2.1. **Kotprobennahme während des Feldversuches**

Während des Feldversuchs wurde aus arbeitstechnischen Gründen auf eine rektale Kotprobennahme verzichtet. Die einjährigen Pferde standen 24 Stunden auf der Weidefläche und es gab keine Fixationsmöglichkeit. So wurde, um frische, individuelle Kotproben zu sammeln, längere Zeit auf der Weide verbracht. Sobald ein Pferd Kot absetzte, wurde dieser mit einem frischen Einmalhandschuh, der umgestülpt, zugeknötet und mit der Halsbandnummer des Pferdes beschriftet wurde, aufgesammelt. Die Proben wurden im Anschluss direkt im Labor untersucht oder bis zur Untersuchung maximal einen Tag im Kühlschrank bei ca. 6°C gelagert, um das Schlüpfen der Larven und eine dadurch verminderte Eizahl zu verhindern.

3.2.2. **Kotuntersuchung (Mini-FLOTAC)**

Zum Nachweis von Magen-Darm-Parasiten, wurde für die Kotuntersuchung die Mini-FLOTAC-Methode eingesetzt, welche auf dem Prinzip der Flotation von Parasiteneiern in gesättigter Salzlösung beruht. Das Mini-FLOTAC ist eine Weiterentwicklung des FLOTAC-Verfahrens und wurde in der veterinärmedizinischen Parasitologie schon erfolgreich für den Nachweis unterschiedlicher Parasiten, wie zum Beispiel Askariden, Hakenwürmern, Trichuriden, gastrointestinale Nematoden oder Leberegel in Haus- und Nutztieren, eingesetzt (Lima et al., 2015; Djokic et al., 2014; Maurelli et al., 2014; Rinaldi et al., 2012). Die Methode ist mit einer unteren Nachweisgrenze von fünf Eiern pro Gramm Kot genauer als andere quantitative Verfahren, wie das McMaster-Verfahren. Das Mini-FLOTAC hat eine hohe Reproduzierbarkeit und ist aufgrund der Einfachheit und der wenigen benötigten Materialien sehr benutzerfreundlich, auch ein Zentrifugationsschritt ist nicht notwendig (Donoghue et al., 2015; Godber et al., 2015; Barda et al., 2014a; Barda et al., 2014b; Maurelli et al., 2014; Barda et al., 2013a; Barda et al., 2013b).

Das zugehörige Fill-FLOTAC wurde nicht eingesetzt, da eine Nutzung mit dem strukturreichen Pferdekot nicht möglich war. Stattdessen wurden zwei Glasgefäße (hier Honiggläser) genutzt. In das erste wurde mithilfe einer Waage und einem Holzspatel eine Menge von fünf Gramm der Kotprobe überführt. 45 ml der gesättigten Salzlösung wurden dazugegeben (Mischverhältnis von 1:9) und der Kot unter Rühren mit dem Holzspatel gut darin aufgelöst. Der Inhalt des ersten Glases wurde durch ein Teesieb in das zweite Glas gegossen und die groben Bestandteile im Sieb verworfen. Mit Hilfe einer Transfer-Pipette wurden nun, nach jeweils vorherigem Schwenken der Lösung im Glas, die beiden 1 ml-fassenden Flotationskammern des Mini-FLOTAC befüllt. Nach einer Wartezeit von zehn Minuten konnte der obere Teil des Mini-FLOTAC um 90° gedreht und beide Felder ausgezählt werden. Hierfür war eine spezielle Adapter-Schiene vorhanden, welche es ermöglichte, das Mini-FLOTAC direkt unter dem Mikroskop durchzumustern. Mit folgender Formel, welche sich aus dem Mischverhältnis von Kot und Salzlösung ergibt, konnte die Eizahl pro Gramm Kot (EpG) berechnet werden:

$$\text{Ausgezählte Parasiteneier} \times 5 = \text{EpG}$$



Abbildung 7: Vorbereitung von Kotproben für das Mini-FLOTAC Verfahren

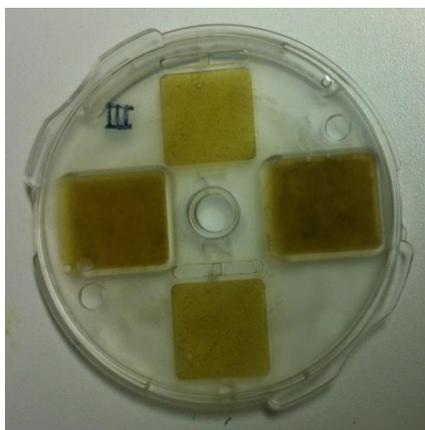


Abbildung 8: befülltes Mini-FLOTAC, fertig zum Auszählen

3.2.3. Larvenkulturen

Das Ziel der Larvenkultur ist die Entwicklung von Drittlarvenstadien aus MDS-Eiern im Pferdekot. Frischer, möglichst wenig verunreinigter Pferdekot wurde mit Einmalhandschuhen in einem sauberen Eimer gesammelt. Die Pferdeäpfel wurden per Hand aufgebrochen, sodass eine feuchte, krümelige Masse entstand. Bei sehr weicher Kotkonsistenz wurden einige Sägespäne hinzugegeben, um diesen Zustand zu erreichen. Die Kotmasse wurde aus dem Eimer locker in Schraubgläser gefüllt, welche nicht verschlossen, sondern der Deckel nur locker aufgelegt wurde, damit die Luft zirkulieren konnte.

Die so gefüllten Gläser wurden, beschriftet auf Tablett, entweder im Inkubator bei 37°C und 70 % Luftfeuchte zehn Tage gelagert oder, bei Platzmangel, auch in einem geschlossenen Schrank bei Zimmertemperatur zwei bis drei Wochen stehen gelassen. In dieser Zeit schlüpft die L1 aus dem Ei und entwickelt sich bis zur infektiösen L3. Um diese zu gewinnen, wurden

die Deckel von den Kulturen abgenommen und diese bis zum oberen Rand vollständig mit Leitungswasser aufgefüllt. Eine Petrischale wurde über das Honigglas gestülpt und beides zusammen auf den Kopf gedreht. Dabei muss darauf geachtet werden, die Petrischale gut anzupressen, damit kein Wasser beim Stülpen herausläuft. Die Petrischalen wurden mit Hilfe einer Spritzflasche ebenfalls mit Leitungswasser aufgefüllt. Die Larven wanderten nun aus der Kultur in die Petrischale aus, da hier der Wasserdruck geringer ist. Nach 12 -24 Stunden wurde mit einer Transfer-Pipette das Wasser aus den Petrischalen, je nach Anzahl der Kulturen in 50 ml-Falcons oder ein größeres Glasgefäß überführt. Die letzten Schritte wurden ein bis drei Mal wiederholt, jedes Mal mit frischem Wasser in den Petrischalen. Um das Volumen zu vermindern, wurde das überständige Wasser nach Sedimentation der Larven abgegossen. Die gewonnene Larvensuspensionen wurden nun noch mit dem Baermann-Wetzel-Trichterverfahren aufgereinigt (siehe 3.2.4) und dann in speziell belüfteten Kulturflaschen gelagert.



Abbildung 9: Abpipettieren von Larven aus gestülpten Larvenkulturen

3.2.4. Larvenaufbereitung

Das Baermann-Wetzel-Verfahren wurde als koproskopisches Nachweisverfahren entwickelt, um aus Kotproben die Larven lebendgebärender Parasiten nachzuweisen (Baermann, 1917; Eysker, 1997). Hier wurde es modifiziert angewendet um aus Kotkulturen gewonnene Larven aufzureinigen oder auch um nach längerer Lagerung nicht-vitale Larven herauszufiltern. Dies ist im Besonderen vor weiteren Versuchen mit den Larven wichtig, da man hier möglichst vitale Larven benötigt.

In einen Trichterständer wurden mehrere Trichter, welche am Ablauf mit einem Stück Gummischlauch versehen sind, aufgebaut. Der Schlauch war mit einer Metallklemme verschlossen. Zum Filtern wurden kleine, runde Stickrahmen, mit zum Trichter passendem Durchmesser mit vier Schichten Verbandsmull bespannt. Der Trichter wurde nun genau bis zum Mull mit Wasser befüllt und darauf die Larvensuspension in den Stickrahmen gegeben. Vitale Larven sind so beweglich, dass sie durch die Gaze dringen, im Trichter nach unten sinken und sich unten im Gummischlauch sammeln. Diese Larven konnten nun über die Metallklemme abgelassen und in belüftete Zellkulturflaschen gefüllt werden. Diese wurden bis ca. 100 ml mit Larvenwasser aufgefüllt und liegend im Kühlraum bei 4°C gelagert.

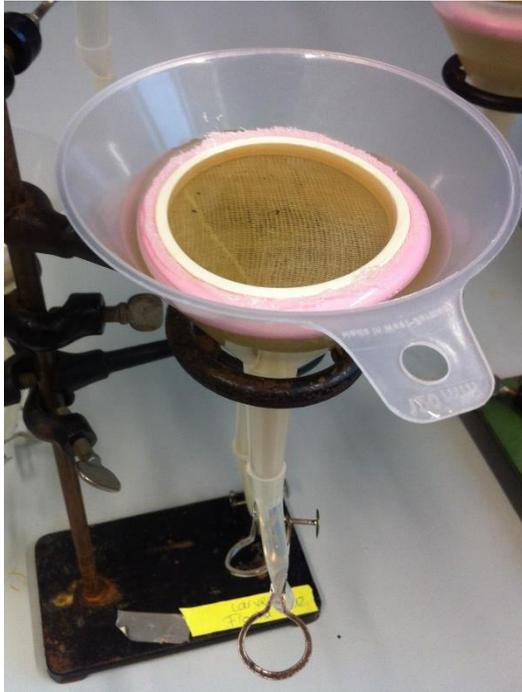


Abbildung 10: modifiziertes Baermann-Wetzel Trichterverfahren zur Larvenaufbereitung

3.2.5. Herstellung der PBS-Tween-Lösung

Zuerst wurde eine Stammlösung angesetzt, für die auf einer Waage 80 g Natriumchlorid (NaCl), 2 g Kaliumchlorid (KCl), 14,24 g Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) und 2 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) abgewogen wurden. Auf einer Rührplatte wurden in einem Messzylinder 1000 ml Aqua bidest vorgelegt. Unter Rühren des Magnetfisches wurden nun die zuvor abgewogenen pulverigen Chemikalien hinzugegeben und auf deren Lösung im Wasser gewartet.

100 ml der Stammlösung ergeben mit weiteren 900 ml destilliertem Wasser und 0,5 ml Tween die gebrauchsfertige Lösung, die in 5 Liter-Kanistern aufbewahrt wurde.

3.2.6. Grasprobenahme im Feld- und Töpfchenversuch

Die Grasprobenahme wurde nach dem Schema von TAYLOR (1939) durchgeführt. Dabei wurden die Proben auf zwei sich kreuzenden „W“- oder längeren Zickzacklinien genommen, sodass diese möglichst gleichmäßig verteilt sind (Taylor, 1939). Die Larven sind hauptsächlich in engerem Umkreis um Geilstellen und Pferdeäpfel angesiedelt. Mit oben genannter Probenahme versucht man, ein möglichst umfassendes Bild der Kontamination der Weide mit Parasiten zu gewinnen.

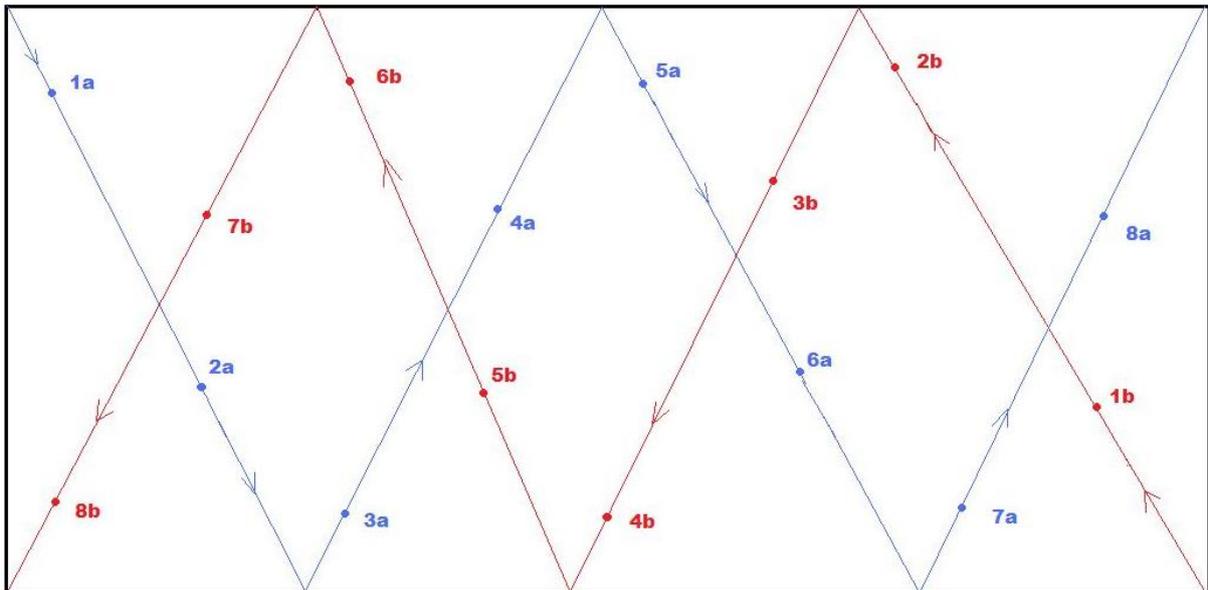


Abbildung 11: Schema Grasprobenahme

Auf jedem Teil der beiden Versuchsweidern wurden je 16 Proben genommen, insgesamt also 32 Proben. Das Zickzackschema wurde per Augenmaß abgelaufen, hierbei dienen Futtertröge, Tränken oder Zaunpfähle als grobe Orientierung. Bei einer folgenden Probenahme wurden die Grasproben somit im selben Bereich der Weide, aber nie genau an der gleichen Stelle genommen.

Der Zeitpunkt wurde immer früh morgens gegen sechs Uhr gewählt. Um diese Zeit befindet sich noch Tau auf den Gräsern. Da der Aufenthaltsort der Larven abhängig von Feuchtigkeit und Temperatur ist und diese einen Flüssigkeitsfilm benötigen, um die Grashalme zu erklimmen, ist eine Probenahme mit gleichen Bedingungen wichtig. Bei zu starker Trockenheit ziehen sich die Larven in die oberen Bodenschichten zurück. Auch nach starkem Regen können möglicherweise keine Larven auf dem Gras gefunden werden, da diese herunter gewaschen wurden (English, 1979a; English, 1979b).

Um eine Grasprobe zu nehmen, wurde ein Grasbüschel mit der Hand gefasst und mit einem Messer mit Sägezahnschneide dicht über dem Boden abgeschnitten. Jede Probe wurde in einem Schraubglas gesammelt, welches mit seinem Deckel verschlossen und eindeutig beschriftet wurde. Am Ende der Probenahme wurden die Gläser mit PBS-Tween aufgefüllt, in welchem die Grasproben nun 4 h einweichten. Mehrmaliges Schütteln und Schwenken in dieser Zeit ist förderlich (Demeler et al., 2012). Die eingeweichten Proben wurden nach Berlin überführt und direkt im Anschluss im Labor bearbeitet.



Abbildung 12: In PBS-Tween eingeweichte Grasproben

Bei der Grasprobenahme aus den selbst angezuchteten Grastöpfchen wurde der gesamte Bewuchs mithilfe einer feinen Schere dicht über der Erde abgeschnitten und in ein Probenglas überführt. Zur Probenahme wurden Einmalhandschuhe getragen und die Grasbüschel mit Daumen und Zeigefinger fixiert. Bei der Zugabe von PBS-Tween ins Probengefäß wurden die benutzten Finger sowie die Schere über dem Glas mit abgespült, um eventuell daran haftende Larven nicht zu verlieren.

3.2.7. Aufreinigung von Nematodenlarven aus Grasproben (Graswaschen)

Das Graswaschen, zur Gewinnung der auf dem Gras vorhandenen Larven, wurde nach einer kürzlich am Institut für Parasitologie der FU Berlin entwickelten Methode nach DEMELER et. al. durchgeführt (Demeler et al., 2012). Diese geben eine Wiederfindungsrate von 68-98 % in selbst angepflanzten Grastöpfchen an, abhängig von der Zahl der aufpipettierten Larven.

Nachdem die Grasproben für vier Stunden in der PBS-Tween-Lösung eingeweicht wurden, wurden diese weiterverwendet. Hierfür wurde die Probe auf ein Küchensieb gegeben, welches, noch von einem Sieb mit einer Maschenweite von 250 μm unterlagert, auf einem fünf Liter fassenden Eimer liegt. Das Probenglas sowie Deckel wurden mit Leitungswasser ausgespült und ebenfalls über die Siebe in den Eimer gegossen. Mit festem Wasserstrahl wurde nun das Gras abgespült. Die gesamte Spülmenge im Eimer sollte maximal einen Liter betragen, um die nachfolgenden Zentrifugationsschritte einhalten zu können. Das Gras und grobe Dreckbestandteile verbleiben in den beiden Sieben, die Maschenweite war jedoch groß genug, um die Larven, aber auch feinere Schmutzpartikel hindurch zulassen.



Abbildung 13: Aufbau zum Graswaschen

Die Waschlösung aus dem Eimer wurde mithilfe eines Trichters in vier 250 ml-Zentrifugengefäße umgefüllt. Vorhergehendes Schwenken war nötig, um den Absatz am Boden aufzuschwemmen. Vor der Zentrifugation wurden die Gefäße gewogen und austariert. Die folgende Zentrifugation wurde für zehn Minuten mit 890 G, einer Beschleunigung von neun und einer Entschleunigung von vier durchgeführt. Mit einer Vakuum-Pumpe wurde nun der Überstand vorsichtig abgesaugt. Das Sediment wurde aufgeschüttelt und in beschriftete 50 ml-Falcons überführt, welche ein zweites Mal wie oben beschrieben zentrifugiert wurden. Der wässrige Überstand wurde erneut mit der Vakuum-Pumpe abgesaugt und die Falcons bis maximal ein Zentimeter unter den Rand mit gesättigter Zuckerlösung aufgefüllt. Die Falcons wurden verschlossen und gut geschüttelt, bis sich das gesamte Pellet, in dem sich auch die Parasitenlarven befanden, in der Zuckerlösung verteilt hat. Der nachfolgende dritte Zentrifugationsschritt hatte das Ziel, die Larven von dem noch vorhandenen Schmutz aufzureinigen. Die Larven sind leichter als die Zuckerlösung und befanden sich nach der Zentrifugation an der Oberfläche, die Schmutzpartikel sind schwerer und sanken nach unten. Die Zucker-Zentrifugation wurde fünf Minuten bei 1200 G, einer Beschleunigung von neun und einer Entschleunigung von sechs durchgeführt. Anschließend wurden die Larven mit Hilfe eines Eimers und einem engmaschigen Sieb (20 µm Maschenweite) von der Zuckerlösung getrennt. Hierfür wurde der obere Teil der zentrifugierten Zuckerlösung mit den Larven aus den Falcons einer Grasprobe (meistens zwei Stück) auf das Sieb gegeben. Von dem im Eimer schräg gestellten Sieb wurde nun mit sehr seichem Wasserstrahl die Zuckerlösung weggespült. Die Larven sammelten sich so im unteren Rand des Siebes und konnten mit einer Transfer-Pipette mit nur noch wenig Wasser in ein 15 ml-Falcon überführt und entweder für den Fitnessstest weiterverwendet oder im Kühlschrank bei 4-6°C gelagert werden.

3.2.8. Larvenfitnessstest

Der Larvenfitnessstest, soll eine Differenzierung vitaler und nicht-vitaler Larven der kleinen Strongyloiden ermöglichen und ist angelehnt an das Prinzip des LMIA, siehe 3.2.18. Hierfür wurden die frisch gewonnenen Larven aus der Gras- bzw. Erdwaschung verwendet. Pro 24-Well-Platte waren zwei Reihen Siebe nötig, hier mit einer Maschenweite von 22 µm, die nach vorheriger Kontrolle auf Dichtigkeit in Reihe A und C eingesetzt wurden. Reihe B und D blieben frei. In die Siebe wurden nun die wässrigen Proben mit den Larven pipettiert, sodass das Sieb unter dem Wasserspiegel lag, aber das Well nicht überlief. Wichtig war eine gute

Beschriftung der Platten, um die Proben noch zuordnen zu können. Über Nacht hatten die Larven Zeit, bei ausreichend vorhandener Vitalität, durch die Maschen der Siebe zu wandern und mit der Schwerkraft nach unten zu sinken. Tote und bewegungsarme Larven blieben auf dem Sieb liegen.



Abbildung 14: Leerer und befüllter Larvenfitnesstest

Zum Stülpen der Siebe wurde eine 1000 µl-Pipette und ein kleines Becherglas mit Leitungswasser benötigt. Die Siebreihe wurde nun angehoben, aber noch über ihrer ursprünglichen Reihe gehalten und mithilfe der Pipette von außen mit 500-1000 µl Wasser abgespült. Erst jetzt wurden die Siebe vorsichtig in die darunterliegende freie Reihe (B bzw. D) umgedreht und die darin verbliebenen Larven mit ca. 2000 µl Wasser in die Wells gespült.



Abbildung 15: Stülpen der Siebe

Nun konnten die gewanderten, sowie die nicht-gewanderten Larven ausgezählt werden. Eine Addition beider Zahlen ergab die Gesamtlarvenzahl der Probe. Aufgrund von einigen Verunreinigungen im Probenwasser, welche sich trotz vorheriger Aufreinigung durch einen Zentrifugationsschritt mit gesättigter Zuckerlösung nicht vermeiden ließen, erfolgte die Auszählung der Larven nicht direkt in der Well-Platte, sondern in Zählkammern, wo eine zusätzliche Verdünnung der Probe möglich war. Nun wurden unter dem Mikroskop alle vorhandenen Strongyloiden-L3 gezählt.



Abbildung 16: Strongyliden-L3 unter dem Mikroskop (erkennbar an der Scheide und dem langen Scheidenschwanz) (Quelle: Florina Jung)

3.2.9. Erdprobenahme im Feldversuch

Auf dem freien Feld wurde für die Entnahme von Erdproben ein Metallrohr aus dem Baumarkt und ein Gummihammer verwendet. Die Probenahme wurde nach dem gleichen Schema wie bei den Grasproben durchgeführt. An gewünschter Stelle wurde nun das Metallrohr ca. 10 cm mit dem Gummihammer in den Boden getrieben. Unter Hin-und-her-Bewegen des Rohres konnte dieses wieder aus dem Erdboden gezogen werden und die darin enthaltene Erde mit Hilfe eines, im Durchmesser etwas kleineren, Holzstocks in das Probengefäß herausgedrückt werden.

Die Erde aus den selbst angezuchteten Grastöpfchen wurde aus dem Töpfchen in eine Plastischale überführt und dort mit einem großen Messer in drei Schichten geteilt (obere Schicht 2 cm, mittlere Schicht 4 cm, untere Schicht 4 cm).

3.2.10. Aufreinigung von Nematodenlarven aus Erdproben

Die Methode zur Aufreinigung von Nematodenlarven aus der Erde wurde nach einem Protokoll von KNAPP-LAWITZKE et. al. durchgeführt (Knapp-Lawitzke et al., 2014b). Solche passiven Methoden sind den aktiven Methoden, wie zum Beispiel dem modifizierten Baermann-Trichter-Auswanderungsverfahren, bei dem die Larven selbst aktiv aus der Erde auswandern müssen, überlegen. Es können auch nicht-vitale, tote und kryptobiotische (im Stadium mit eingeschränktem Stoffwechsel) Larven durch den Waschvorgang aus der Erde isoliert werden. Die Wiedergewinnungsrate wird von den Autoren zwischen 60,8 und 88,6 % angegeben.

Es wurden zwei Siebe benötigt, die übereinander gestapelt werden. Das obere hat eine Maschenweite zwischen 150 und 200 µm, sodass hier die Larven durchgewaschen werden konnten. Im unteren Sieb mit einer Maschenweite von 20 µm wurden die Larven dagegen

aufgefangen. Die beiden Siebe wurden anfangs auf einem Eimer gelagert und das sich darin sammelnde Waschwasser immer wieder ins Waschbecken verworfen. Alternativ, um den Arbeitsvorgang zu vereinfachen, wurde ein Gitter über das Waschbecken gelegt, worauf die Siebe standen, damit das Waschwasser direkt ablaufen konnte. Die Erdprobe wurde auf das obere Sieb überführt und das entsprechende Probenbehältnis ebenfalls noch einmal über den Sieben ausgewaschen. Bei einer großen Erdprobe ist es ratsam, diese in mehreren Schritten zu waschen, da zu große Erdmengen die Siebe schnell verstopfen und das Waschwasser nicht mehr ablaufen kann.

Die Erdprobe wurde mit einem stärkeren Strahl der Handdusche gewaschen, sodass sich Larven und feine Erdbestandteile im unteren Sieb ansammelten. Während des Waschens war es wichtig, in regelmäßigen Abständen das obere Sieb anzuheben und den Wasserstand im unteren Sieb zu prüfen, damit dieses nicht überlief. Leichtes Schwenken und Rotieren der Siebe half den Ablauf des Wassers zu verbessern. Der Inhalt des unteren Siebes wurde mithilfe von einem Holzspatel und abgeschnittener Transfer-Pipette in beschriftete 50 ml-Falcons überführt. Das obere Sieb wurde solange auf einem Tablett gelagert, welches am Ende ebenfalls noch einmal über den Sieben abgespült wurde, um eventuell dort abgetropfte Larven nicht zu verlieren. Es wurde so lange gewaschen, bis sich im unteren Sieb nahezu keine feinen Erdpartikel mehr ansammelten.



Abbildung 17: Aufbau zur Aufreinigung von Nematoden aus Erdproben

Die 50 ml-Falcons wurden nun bei 890 G mit einer Beschleunigung von neun und einer Entschleunigung von vier für zehn Minuten zentrifugiert und der wässrige Überstand mit der Vakuum-Pumpe abgesaugt und verworfen. Wie bei der Gewinnung von Nematodenlarven von Grasproben wurden die Falcons nun mit gesättigter Zuckerlösung aufgefüllt. Hier war es einfacher, die Falcons erst nur bis zur Hälfte zu befüllen um dann das Pellet gut aufschütteln zu können. Erst wenn sich dieses komplett aus der unteren Falconspitze gelöst hatte, wurde das Falcon vollständig mit Zuckerlösung aufgefüllt und ebenfalls noch einmal gut geschüttelt. Der zweite Zentrifugationsschritt wurde fünf Minuten bei 1200 G, einer Beschleunigung von neun und einer Entschleunigung von sechs durchgeführt. Der abschließende Aufreinigungsschritt der Larven aus der Zuckerlösung entspricht dem der Grasproben (s. 0).

3.2.11. Sterilisation der Erdproben

Die im Versuch mit den Grastöpfchen eingesetzte Erde sollte frei von Erdnematoden und sonstigen Bodenorganismen sein. Um dies zu erreichen, wurde sie in hitzebeständigen Gefäßen bei 100°C für circa 30 h im Wärmeschrank gelagert. Hier wurden die Unterteile von alten Labor-Mäusekäfigen genutzt. Die Erde wurde während des Trocknens mehrere Male durchmischt.

3.2.12. Feldversuch zur Untersuchung der Wirkung von Kalkstickstoffdüngung gegen Larven der kleinen Strongyliden

Der Feldversuch fand von April bis September 2014 auf dem Gestüt Lewitz in Mecklenburg-Vorpommern statt. Die Lewitz war ursprünglich eine sumpfige Bruch- und Niedermoorlandschaft. Nach dem zweiten Weltkrieg wurde die Gegend, nach großflächigen Meliorationsmaßnahmen zur intensiven Wiesen- und Weidewirtschaft genutzt (Gestüt Lewitz). Lange Zeit war hier ein Rinderstammzuchtbetrieb ansässig, seit 1972 die Ponyzucht der Lewitzschecken und schließlich die Warmblutzucht von Paul Schockemöhle mit rund 4000 Pferden auf ca. 3000 Hektar (ha) Land.

Es stand eine längliche Fläche von 12 ha, die Weide am Mittelweg, zur Verfügung, die seit sechs Jahren intensiv als Pferdeweide genutzt wird. Hier wurden vor Weideaustrieb Gras- und Erdproben genommen. Aus betrieblichen Gründen wurde die Weide im Mai der Schnittnutzung unterzogen. Anschließend wurde die Hälfte der Fläche maschinell mit 400 kg/ha Kalkstickstoffdünger Perlka der Firma AlzChem gedüngt, der andere Teil mit normalem NPK-Dünger.



Abbildung 18: Schema der Weide am Mittelweg

Nach Entwurmung der Pferde im April mit Panacur (Fenbendazol) und Equest (Moxidectin) erfolgte der Weideaustrieb Anfang Juni. Jede der beiden sechs Hektar großen Testflächen wurde jeweils noch einmal in drei Teilstücke unterteilt, um dem Prinzip der Rotationsweide nachzugehen. Auch dies war betriebsbedingt vorgegeben. Je eine Gruppe von 32 Pferden stand für die Weidesaison von Juni bis September auf der Kontrollweide, beziehungsweise auf der mit Kalkstickstoff gedüngten Weide. Beide Gruppen bestanden aus einjährigen Stuten. Kotproben der Pferde wurden vor Weideaustrieb und über die gesamte Weidesaison gesammelt. Da es keine Fixationsmöglichkeit für die Pferde gab, wurde frisch abgesetzter Kot gesammelt (3.2.1). Die Grasprobenahme wurde anfangs ca. alle zwei Wochen durchgeführt, immer nach dem Umtrieb der Pferde von einem Weidedrittel auf das nächste. Jede Maßnahme wurde bei der Kontroll- und der Kalkstickstoffgruppe parallel durchgeführt.

Im Juli wurden die Teilstücke der beiden Weiden geöffnet, sodass die zwei Pferdeguppen auf je einer großen Fläche grasen konnten. Mitte August wurden je Herde noch zwölf Pferde zusätzlich auf die Weide gestellt. Die ganze Zeit über wurden die Pferde mit einer Totalen Mischration (TMR) auf der Basis von Gras- und Maissilage zugefüttert. Eine letzte Grasprobenahme der Weiden am Mittelweg wurde im August durchgeführt, bevor die Pferde Anfang September die Weide verließen.

Parallel zum Hauptversuch wurde noch eine zweite Weide am Eichendamm in den Versuch miteinbezogen. Hier standen bis Anfang August dreijährige Hengste, die im Rahmen der parasitologischen Bestandsbetreuung mit einer hohen Anzahl von MDS-Eiern im Kot aufgefallen waren. Hier wurden Grasproben genommen, dann die Pferde umgestellt und ein Teilstück der Weide (Stück 2) mit 400 kg Kalkstickstoff / ha gedüngt. Ein weiteres (Stück 7) diente als Kontrolle und blieb unbehandelt. Zwei und vier Wochen nach der Düngung wurden beide Weiden beprobt (16 Grasproben pro Fläche). Außerdem gab es eine zusätzliche Untersuchung mit nur je vier Proben pro Fläche, drei Wochen nach der Düngung.

Die genauen zeitlichen Abläufe sind Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8: Zeitplan des Feldversuches

Datum	
29.04.2014	Entwurmung Gruppe B (Kalkstickstoff-Gruppe) mit Panacur und Equest
30.04.2014	Entwurmung Gruppe A (Kontroll-Gruppe) mit Panacur und Equest
06.05.2014	1. Grasprobenahme am Mittelweg (komplette Fläche)
19.05.2014	Weide am Mittelweg gemäht
23.05.2014	Erdprobenahme am Mittelweg (komplette Fläche)
26.05.2014	Kalkstickstoffdüngung am Mittelweg (Stück B)
10.06.2014	Weideaubtrieb der beiden Herden (Kalkstickstoff-Gruppe auf B1, Kontroll-Gruppe auf A1)
18./19.06.2014	Umtrieb der Herden auf Stücke A2 bzw. B2
19.06.2014	2. Grasprobenahme am Mittelweg (Stück A1 und B1)
30.06.2014	Umtrieb der Herden auf Stücke A3 bzw. B3
03.07.2014	3. Grasprobenahme am Mittelweg (Stück A2 und B2)
10.07.2014	Öffnung der Litzen der Teilstücke zu jeweils einer großen Weide (A bzw. B)
17.07.2014	4. Grasprobenahme am Mittelweg (Stück A3 und B3) + Probegrasproben der Flächen vom Eichendamm
31.07.2014	1. Grasprobenahme Eichendamm (Stück 2 und 7)
08.08.2014	Kalkstickstoffdüngung des Teilstückes 2 am Eichendamm
18.08.2014	Neue Pferde in die Herden am Mittelweg zugestellt
21.08.2014	2. Grasprobenahme am Eichendamm (Stück 2 und 7)
28.08.2016	5. Grasprobenahme am Mittelweg (Stück A und B)
04.09.2014	3. Grasprobenahme am Eichendamm (Stück 2 und 7)
10.09.2014	Umtrieb der beiden Herden vom Mittelweg auf die Ochsenweide

3.2.13. Untersuchung des nematoziden Effekts der Kalkstickstoffdüngung unter Verwendung von Grastöpfchen

Die Anzucht der Grastöpfchen erfolgte ca. zwei Monate bevor der eigentliche Versuch angesetzt war, damit das Gras ausreichend Zeit für den Aufwuchs hatte. In die Plastiktrinkbecher wurden mit einer Lötpistole fünf Löcher in den Boden gebrannt, sodass diese ähnlich wie Blumentöpfe belüftet waren. Auf einer Höhe von 10 cm wurde mit einem Edding eine Markierung angebracht, diese zeigte die spätere Füllhöhe der Erde. Die Blumenerde wurde 38 Stunden bei 100°C in hitzebeständigen Gefäßen im Trockenschrank aufbewahrt, um Erdnematoden abzutöten. Anschließend wurde die trockene Erde bis zur Markierung in die Plastikbecher gefüllt, welche zu sechs Stück in Alu-Schalen standen. Das Gewicht der trockenen Erde pro Töpfchen betrug zwischen 180 und 200 g. Dann wurde die Erde mehrmalig gut gewässert, bis der ganze Boden wieder feucht war. Für jedes Töpfchen wurden nun 0,38 g Grassamen abgewogen und auf die Erdoberfläche möglichst gleichmäßig ausgestreut.



Abbildung 19: Anzucht von Grastöpfchen im Klimaschrank

Tabelle 9: Inhaltsangabe der CMI Blumenerde von OBI

Blumenerde:

pH = 6,5 (CaCl₂), Salz: 2,5 g
150 mg/l N Stickstoff (CaCl₂), 200 mg/l P₂O₅ Phosphat (CAT), 900 mg/l K₂O Kalium (CAT)

Die Töpfchen wurden im Klimaschrank bei 22°C und einem Tag-Nacht-Lichtrhythmus im Klimaschrank aufbewahrt und nach Bedarf gegossen. Nach fünf Wochen wurde das hochgewachsene Gras mit einer Schere auf eine Höhe von ungefähr 2 cm herunter geschnitten. Am 4.12.2014 wurden 36 Grastöpfchen angesetzt und dann etwas zeitversetzt noch 24 weitere am 9.12.2014 und am 16.12.2014, sodass für den Versuch von Januar bis März 2015 84 Töpfchen zur Verfügung standen.

Es wurde ein Zeitplan aufgestellt, in welcher Reihenfolge und zu welchen Zeitpunkten jedes Töpfchen mit kleinen Strongylidenlarven besetzt, gedüngt und gewaschen werden sollte. Tag Null war für jedes Töpfchen der Düngezeitpunkt, zwei Tage davor wurden die Larven aufs Gras pipettiert. Die Töpfchen wurden an Tag zwei, fünf, acht, elf oder vierzehn nach der Düngung gewaschen, um die Larven wiederzugewinnen. Für jeden Zeitpunkt wurden sechs

gedüngte Töpfchen verwendet, sowie parallel dazu sechs ungedüngte Töpfchen als Negativkontrolle.

Die Strongylidenlarven (L3) wurden aus selbst angelegten Kotkulturen gewonnen und lagerten in belüfteten Flaschen bei 4-6°C im Kühlraum (3.2.3). Vor Benutzung wurden diese immer noch einmal getrichtert (3.2.4) und dann die Anzahl der Larven in der Flasche ausgezählt. Dafür wurden fünf Tropfen à 10 µl Larvensuspension auf einen Objektträger gegeben und die Anzahl der Larven in jedem Tropfen unter dem Mikroskop gezählt. Anschließend wurde das Volumen der auf das Gras aufzutragenden Larvensuspension per Dreisatz berechnet. Pro Töpfchen wurden 1000 Larven mit einer Eppendorf-Pipette aufs Gras transferiert. Vor dem Aufbringen der Larven wurde das Gras noch einmal auf eine Höhe von wenigen Zentimetern herunter geschnitten. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Töpfchen in einer selbst gebastelten Styropor-Umhüllung mit eigenem Untersetzer im Klimaschrank aufbewahrt. Diese wurden mit einer spezifischen Nummer, sowie Zeitpunkt des Larven und Dünger Aufbringens und des geplanten Waschzeitpunktes beschriftet. Außerdem wurden die Töpfchen nun nicht mehr gegossen, sondern nur noch mit einer Sprühflasche von oben mit Wasser besprüht, um ein Auswaschen des Düngers und ein Abwaschen der Larven vom Gras zu verhindern.

Die benötigte Menge Dünger pro Töpfchen wurde wie folgt berechnet:

Durchmesser Töpfchen = 8,5cm → Fläche: $A = \pi \times r^2 = 56,745\text{cm}^2$

Empfohlene Menge Dünger: $\frac{400\text{kg}}{1\text{ha}} = \frac{400.000\text{g}}{1.000.000\text{cm}^2} = 0,004 \frac{\text{g}}{\text{cm}^2}$

Dünger pro Töpfchen: $0,004 \frac{\text{g}}{\text{cm}^2} \times 56,745\text{cm}^2 = 0,23\text{g}$



Abbildung 20: Dünger für ein Töpfchen (d (Schale) = 10cm)



Abbildung 21: links: Töpfchen im laufenden Versuch in einzelner Styroporhülle, rechts: Styroporhüllen von unten, mit und ohne Untersetzer

Der Kalkstickstoffdünger wurde in einer kleinen Schale abgewogen und an Tag Null gleichmäßig auf der Erde des jeweiligen Töpfchens verteilt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Düngerkörnchen nicht am Gras kleben blieben, sondern auf dem Erdboden lagen. Das Temperaturprofil des Klimaschranks orientierte sich an der Empfehlung des Herstellers für den Dünge-Zeitpunkt. Dieser wurde zum Zeitpunkt der Forsythienblüte angegeben, also Ende März. Die Auswertung von Wetterdaten der letzten Jahre ergaben nachts die meisten Werte zwischen -3 und $+6^{\circ}\text{C}$ und tagsüber Werte zwischen 5 und 20°C , sowie ein Sonnenaufgang um 6.30h und ein Sonnenuntergang um 19.30h. Im Inkubator wurde eine elfstündige Phase bei 17°C simuliert (Tag) sowie eine neunstündige Phase bei 5°C (Nacht). Dazwischen gab es jeweils eine zweistündige Dämmerphase, bei der die Temperatur langsam gesenkt oder erhöht wurde.

Pro Tag konnten drei komplette Töpfchen gewaschen werden. Diese wurden nach den oben beschriebenen Protokollen (0 und 3.2.10) gewaschen und anschließend ein Larvenfitnesstest (3.2.8) mit den wiedergewonnenen Larven durchgeführt. Nachdem das Gras mit einer feinen Schere bodennah abgeschnitten war, wurde die Erde vor dem Waschen mithilfe der stumpfen Seite eines großen Messers in fünf Portionen aufgeteilt. Die obere 2 cm dicke Schicht wurde zuerst gewaschen, anschließend die mittlere und untere je 4 cm dicke Schicht, die zum Waschen jeweils in zwei Portionen geteilt wurden.

Die aufgereinigten Larven wurden direkt in 24-Well-Platten pipettiert, die mit Sieben der Maschenweite $22\ \mu\text{m}$ bestückt waren. Am nächsten Morgen wurde der Larvenfitnesstest abgeschlossen und mikroskopisch ausgewertet.

Im Anschluss an den eben beschriebenen Grastöpfchen-Versuch wurden einige zuvor nicht benötigten Grastöpfchen für zusätzliche Untersuchungen verwendet. Es wurden vier Kontrolltöpfchen nur mit Larven ohne Dünger angesetzt, sowie jeweils vier Töpfchen mit der einfachen Kalkstickstoffmenge von $0,23\ \text{g}$, der doppelten Menge von $0,5\ \text{g}$ und der zehnfachen Menge von $2,3\ \text{g}$. Ablauf und Bedingungen dieses Versuches waren identisch zu dem oben beschriebenen Grastöpfchen-Versuch. Gewaschen wurden die Töpfchen nach 14 Tagen und mit den gewonnenen Larven ebenfalls ein Fitnesstest durchgeführt.

3.2.14. Bestimmung der Wasseraufnahmekapazität von verschiedenen Böden

Da Cyanamid wasserlöslich ist stellte sich die Frage, ob sich die Wirksamkeit in Böden mit unterschiedlicher Wasseraufnahmekapazität unterscheidet. Hierfür wurde die

Wasseraufnahmekapazität der im Grastöpfchen-Versuch verwendeten Blumenerde, sowie der von Rand eines Feldwegs gesammelten Erde getestet.

Beide Erden wurden zunächst im Wärmeschrank komplett getrocknet und dann bis zur 10 cm Markierung in die Plastikbecher eingefüllt. Diese wurden zuvor leer gewogen, sowie mit Wasser bis zur Markierung. Jetzt wurden die mit Erde befüllten Becher bis zur Sättigung gewässert und erneut gewogen.

Anhand der ermittelten Werte, abzüglich des Eigengewichts der Becher, ließ sich daraufhin der Anteil des aufgenommenen Wassers berechnen.

3.2.15. Bestimmung des Cyanamidgehalts aus Bodenproben

Es wurden zwei verschiedene Böden untersucht, einmal die Blumenerde, die auch im Grastöpfchenversuch verwendet wurde, sowie die sandige Erde vom Rand eines Feldweges in Berlin. Es wurden Proben mit der einfachen Düngermenge (0,23 g) und der doppelten Düngermenge (0,5 g) angesetzt, die je nach zwei, sieben und 14 Tagen bei -80°C eingefroren wurden. Von jeder Probe wurden drei Wiederholungen angesetzt und zusätzlich drei Proben je Bodentyp ohne Dünger, sodass insgesamt 36 Erdproben zur Analyse bereitstanden.

Die Erdproben wurden in den Bechern, die zuvor zur Anzucht der Grastöpfchen genutzt wurden, angesetzt. Bei gleicher Füllhöhe betrug das Trockengewicht der Blumenerde ca. 100 g, das der Feldwegerde ca. 150 g. Die Töpfchen wurden bis zur Sättigung gewässert, nach Plan gedüngt und danach weiterhin mit der Sprühflasche feucht gehalten. Zum jeweiligen Zeitpunkt wurden die Erdproben in Gefrierbeutel gefüllt und bei -80 °C im Gefrierschrank eingefroren, um den Cyanamidgehalt zu diesem Zeitpunkt zu konservieren und weitere Abbauprozesse zu stoppen. Die gefrorenen Proben wurden auf Trockeneis zum Labor der Firma AlzChem AG, Trostberg geschickt und dort analysiert. Als Analysemethode wurde die photometrische Bestimmung von Cyanamid in wässriger Lösung genutzt. Hierbei werden nach dem SOP-Protokoll 006-018/2 der Firma AlzChem 2,6 ml der Probe mit 4,0 ml Natriumcarbonatlösung und 0,4 ml Ammoniumdinatrium-pentacyanoamminferratlösung in ein Reagenzglas pipettiert. Letzteres reagiert zusammen mit Cyanamid bei pH 10,5 zu einem roten Komplex und kann nach 45 min photometrisch bei einer Wellenlänge von 530 nm gemessen werden. Ist die Lösung nicht klar, kann man diese vorher durch einen Membranfilter mit 0,45 µm Maschenweite filtrieren.

Jede einzelne Probe wurde doppelt analysiert und aus beiden Werten ein Mittelwert bestimmt, welcher in mg Cyanamid pro Kilogramm (mg Cy / kg) angegeben wird.

Um das Verfahren auf Störungen hin zu untersuchen, wurde bei mehreren Proben eine Aufdotierung mit Cyanamid-Standardlösungen bekannter Konzentration durchgeführt. Nach einer nun durchgeführten Analyse wurde die Wiederfindungsrate des Standards berechnet. Wenn 70-120 % des Standards nach Abzug des Blindwertes wiedergefunden werden, gilt die Methode als valide.

3.2.16. Messung der Larvenmorphologie

Unter einem Mikroskop mit Anschluss an eine Kamera und einem Computer mit dem Bildaufnahme und -verarbeitungsprogramm wurde eine größere Anzahl von Larven ausgemessen. Das Augenmerk lag hier vor allem auf der Bestimmung der Breite, jedoch wurde bei einem Teil der Larven auch die Länge des Körpers und der Scheide ermittelt. Die Breite wurde am Übergang vom Ösophagus zu den Darmzellen gemessen, sowohl die alleinige Breite der Larve als auch die der Larve mit umgebender Scheide. Die Werte dienen

der Überprüfung der Einheitlichkeit von Larven aus einer Cyathostominae-Mischkultur. Eine Immobilisierung der Larven war notwendig, hierfür wurde entweder Lugol'sche-Lösung verwendet oder die Larvensuspension vorher für einige Minuten auf der Wärmeplatte erhitzt. Einige Tropfen wurden auf einen Objektträger gegeben, mit Deckelchen abgedeckt, unter dem Mikroskop durchgemustert und alle Larven ausgemessen.

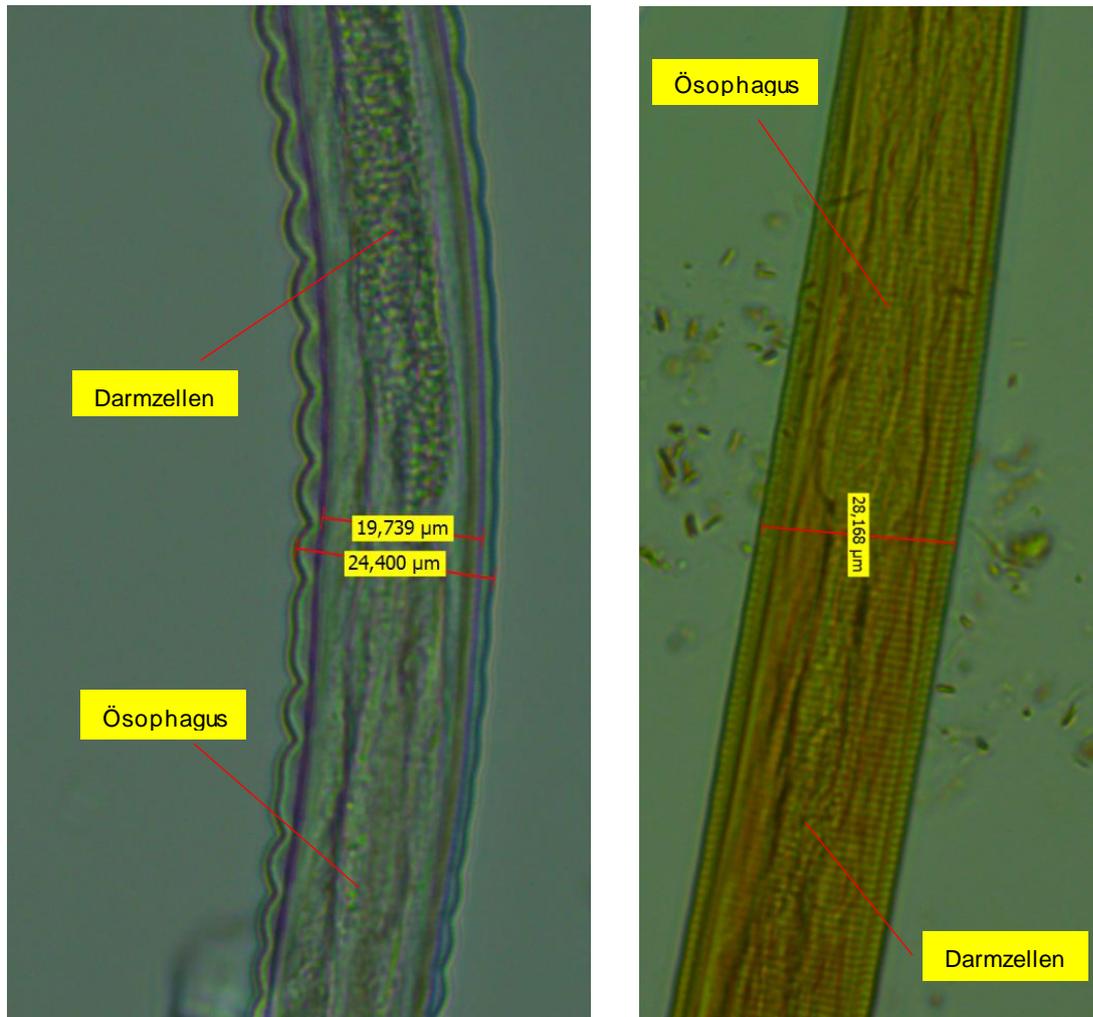


Abbildung 22: ausgemessene kleine Strongyloiden L3 (links: hitzeimmobilisiert, rechts: Lugol'sche Lösung)

3.2.17. Vortest für den Larval-Migration-Inhibition-Assay (LMIA)

Da der LMIA für kleine Strongyloiden noch nicht standardisiert wurde, existieren keine präzisen Empfehlungen bezüglich der Maschenweite der zu verwendenden Siebe. Deswegen wurden mit allen vorliegenden Sieben, mit den Maschenweiten von 20 µm, 22 µm, 25 µm und 28 µm, jeweils sechs Durchläufe mit frischen Larven bzw. sechs Durchläufe mit hitzegetöteten Larven durchgeführt. Die Bedingungen für die Wanderung sind mit 24 h bei 27°C denen im LMIA identisch. Pro Well wurde frische Larvensuspension, welche eine Anzahl von 150 Larven enthält, hinzugegeben und mit Wasser auf 2 ml ergänzt. Hilfreich war es, die Siebe vorher zu befeuchten, sowie zuerst das Wasser vorzulegen, um anschließend die Larvensuspension hinzu zu pipettieren. Nach 24 Stunden wurden die Siebe gestülpt und die Larven in jedem Well mikroskopisch ausgezählt.

3.2.18. Durchführung des LMIA

Der LMIA wurde entwickelt, um die Wirkung von Anthelminthika zu testen. Für kleine Strongylidenlarven ist dieser Assay nicht standardisiert, jedoch gibt es Protokolle für die Untersuchung von Resistenzen von Wiederkäuer-Nematoden gegen Ivermectin (Demeler et al., 2010a; Demeler et al., 2010b). Hier wurde der LMIA eingesetzt, um den Wirkungsgrad von Cyanamid auf infektiöse Strongylidenlarven zu bestimmen.

Als zu untersuchende Substanz lag eine reine 50 %-ige Cyanamidlösung vor (512 mg Cyanamid/l), welche von der Firma AlzChem auch als Alzogur verkauft wird. Diese wurde durch Zugabe von Aqua bidest wie unten beschrieben verdünnt. Pipettiert wurde mit Hilfe von 10 ml und 25 ml serologischen Pipetten und Peleus Ball.

Die Stammlösung wurde wie folgt in einer Schraubflasche aus Glas angesetzt:

10 ml Alzogur (50 %) + 90 ml Aqua bidest = Cyanamid-Lösung (5 %)

Die weiteren Konzentrationsstufen wurden in 50 ml Falcons pipettiert:

20 ml Cyanamid-Lösung (5 %) + 20 ml Aqua bidest = Cyanamid-Lösung (2,5 %)

20 ml Cyanamid-Lösung (2,5 %) + 20 ml Aqua bidest = Cyanamid-Lösung (1,25 %)

20 ml Cyanamid-Lösung (1,25 %) + 20 ml Aqua bidest = Cyanamid-Lösung (0,6 %)

20 ml Cyanamid-Lösung (0,6 %) + 20 ml Aqua bidest = Cyanamid-Lösung (0,3 %)

20 ml Cyanamid-Lösung (0,3 %) + 20 ml Aqua bidest = Cyanamid-Lösung (0,15 %)

20 ml Cyanamid-Lösung (0,15 %) + 20 ml Aqua bidest = Cyanamid-Lösung (0,08 %)

20 ml Cyanamid-Lösung (0,08 %) + 20 ml Aqua bidest = Cyanamid-Lösung (0,04 %)

20 ml Cyanamid-Lösung (0,04 %) + 20 ml Aqua bidest = Cyanamid-Lösung (0,02 %)

Der erste Teil des Assays bestand aus einer Inkubationsphase für 24 Stunden im Wärmeschrank bei 27°C. Hierfür wurden 200 L3 in jedes Well der 24-Well Platte pipettiert. Die Menge der Larvensuspension wurde mit Wasser addiert, sodass in jedem Well 1 ml Wasser mit Larven vorlagen. Anschließend wurde 1 ml Cyanamid-Lösung hinzugegeben. Diese wies eine um eine Konzentrationsstufe höhere Konzentration als die gewünschte Konzentration auf, da die Cyanamid-Lösung durch das vorgelegte Wasser verdünnt wurde.

Pro 24-Well-Platte konnten drei Wiederholungen angesetzt werden. Jeder einzelne Ansatz bestand aus sechs Konzentrationsstufen des Cyanamids, sowie einer Positiv- und Negativkontrolle. Bei der Positivkontrolle wurden hitzegetötete Larven verwendet, welche für einige Minuten auf der 80°C heißen Wärmeplatte unter Rühren mit Magnetfisch immobilisiert wurden.

Begonnen wurde mit folgenden Endkonzentrationen der Cyanamidlösung, welche bei einem ähnlichen Versuch des Parasitologie Instituts der Justus-Liebig-Universität in Gießen mit *H. contortus*-Larven verwendet wurden:

2,5 %, 1,25 %, 0,6 %, 0,3 %, 0,15 % und 0,08 %.

Diese wurden jedoch nach ersten Versuchen noch einmal um zwei Konzentrationen nach unten korrigiert auf folgende Werte, die für alle weiteren Assays verwendet wurden:

0,6 %, 0,3 %, 0,15 %, 0,08 %, 0,04 % und 0,02 %.

Nachdem anfangs die Wanderungsrate der Larven auch in der Negativkontrolle nicht zufriedenstellend waren, wurden für die Assays nur noch frisch aus Kotkulturen gewonnene Larven verwendet, die maximal wenige Tage lagerten, bevor sie nochmals im modifizierten Baermann-Trichter aufgereinigt und für die Versuche verwendet wurden.

	1	2	3	4	5	6
A	0,6	0,3	0,15	0,08	0,04	0,02
B	"	"	"	"	"	"
C	"	"	"	"	"	"
D	PK	PK	PK	NK	NK	NK



Abbildung 23: Ansatz einer 24-Well-Platte zur Inkubation mit verwendeten Cyanamidkonzentrationen (PK=Positivkontrolle, NK=Negativkontrolle)

Nach der Inkubationsphase folgt eine 24-stündige Wanderphase bei gleicher Temperatur im Wärmeschrank. Hierfür wurde der Inhalt der Inkubationsplatte auf zwei Platten, welche jeweils in Reihe A und C mit Sieben mit einer Maschenweite von 28 µm ausgestattet wurden, übertragen. Mit einer 1000 µl Pipette wurde vorsichtig der oberste Milliliter Flüssigkeit aus jedem Well in das Sieb des entsprechenden Wells der Wanderplatte vorgelegt. Dann wurde mit Hilfe der Pipette der letzte Milliliter im Well der Inkubationsplatte aufgemischt, um die am Boden abgelagerten Larven zu verteilen und diese dann ebenfalls in das Sieb zu überführen. Die Pipettenspitze wurde nach jedem Well gewechselt.

Nach der 24-stündigen Wanderphase wurden die nicht-gewanderten Larven aus den Sieben in die nächste, vorher leergelassene Reihe gespült, genauso wie beim Fitness test (s. 3.2.8). Nun konnten die gewanderten und nicht-gewanderten Larven für jede Cyanamid-Konzentration, sowie die Positiv- und Negativkontrollen mikroskopisch ausgezählt werden.

3.2.19. Datenaufbereitung und Statistik

3.2.19.1. Auswertung der Feldversuchsdaten

Die Daten der aus den Kot- und Grasprobenahmen auf den Weiden am Mittelweg und Eichendamm ermittelten Wurmei- und Larvenzahlen wurden zuerst mit Hilfe von Microsoft Office Excel 2013 deskriptiv aufgearbeitet.

Hinsichtlich der Grasproben wurde aus der Anzahl der gezählten Strongyliden-L3 und des Trockengewichts der Grasproben, unter Einbeziehung aller 16 Proben einer Weide, die Larvenbelastung pro Kilogramm Trockenmasse Gras (L / kg TM Gras) berechnet.

Auf eine statistische Auswertung der Ergebnisse der Grasproben wurde verzichtet. Die Larvenbelastung der Weide am Mittelweg vor der Düngung war auf beiden Versuchsstücken negativ bis sehr gering, sodass eine Reduktion der Parasitenlarven nicht zu berechnen war. Auch die Gras- und Kotproben der Weide am Eichendamm wurden lediglich deskriptiv ausgewertet.

Für die Auswertung der parasitologischen Ergebnisse der Kotproben der Pferde am Mittelweg bestand die Problematik, dass mehrere Wiederholungsmessungen erfolgten, jedoch nicht zu jedem Tier an jedem Zeitpunkt. Außerdem wurden zahlreiche negative Befunde erhoben. Um dieser ungleichen Verteilung gerecht zu werden, wurden die Daten mithilfe des Statistikprogramms IBM SPSS Statistics 22 in ein binäres System transformiert, dabei steht die 0 für negative Kotproben und die 1 für positive Kotproben. Dann wurde mit

Hilfe eines verallgemeinerten, linearen, gemischten Modells, bei dem die Zielvariable logistisch verknüpft wurde, die Wahrscheinlichkeit für einen positiven Erregernachweis berechnet. Das Tier wurde als Subjekt und die verschiedenen Zeitpunkte als Wiederholungsvariable festgelegt. Dann wurde getestet, in wie weit die Faktoren „Gruppe“ (Kalkstickstoff-Gruppe / Kontrollgruppe) und „Zeitpunkt“ Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit eines positiven Erregernachweises nehmen.

Ein gleiches Modell wurde ebenfalls noch einmal für die Ergebnisse der Kotprobenuntersuchungen von *Parascaris* spp. berechnet.

3.2.19.2. Auswertung der Daten aus den Grastöpfchenversuchen

Die Ergebnisse der Larvenzählungen aus den Grastöpfchenversuchen wurden in dem Programm Microsoft Office Excel 2013 in Tabellen übersichtlich dargestellt. Die Wiederfindungsrate wurde ermittelt, indem die für jedes Töpfchen gefundenen Larven in Bezug zur anfangs aufgebrauchten Larvenzahl von 1000 gesetzt wurde.

Es wurden die Anteile der Larven in Prozent berechnet, die im Larvenfitnesstest gewandert sind, sowie der Anteil der Larven, die nur auf dem Gras gefunden wurden. Des Weiteren wurden die Ergebnisse mit Excel und SPSS graphisch aufgearbeitet. Nach positiven Tests von Kolmogorow-Smirnow und Shapiro-Wilk der Daten auf Normalverteilung mit dem Statistikprogramm IBM SPSS Statistics 22, konnte berechnet werden ob, sich die gedüngten Töpfchen signifikant von den ungedüngten Töpfchen unterscheiden. Hierfür wurde auf Grund der Normalverteilung der Daten eine einfaktoriellen Varianzanalyse (univariate ANOVA) verwendet, mit dem Faktor Düngung als Zwischensubjektfaktor. Bei einem p-Wert kleiner 0,05 wurde der Unterschied als signifikant angesehen.

Bei den zusätzlich angelegten Grastöpfchen war die Besonderheit, dass diese mit unterschiedlichen Mengen gedüngt wurden. Nach Überprüfung der Daten auf Normalverteilung (Kolmogorow-Smirnow und Shapiro-Wilk) wurden die Mittelwerte ebenfalls mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse verglichen und anschließend die Gruppen mit dem Tukey-Post Hoc-Test gegen die Kontrolle verglichen.

3.2.19.3. Auswertung der Larvenmessungen

Bei der Auswertung der Messergebnisse der Strongyliden-L3 wurde ebenfalls mit Microsoft Office Excel 2013 und IBM SPSS Statistics 22 gearbeitet. Die Verteilung der Messwerte wurde in Histogrammen dargestellt. Ein Vergleich der Messwerte Lugol- und hitzegetöteter Larven fand mit Hilfe deskriptiver Statistiken und einem T-Test statt.

3.2.19.4. Auswertung der LMIA Vortests

Mithilfe von IBM SPSS Statistics 22 wurde für die Tests mit lebenden, sowie immobilisierten Larven explorative Datenanalysen durchgeführt, sodass Mittelwerte der Durchgänge mit den verschiedenen Maschenweite verglichen werden konnten.

3.2.19.5. Auswertung der LMIA-Versuche

Bei der Durchführung des LMIA wurde für jede Wirkstoffkonzentration die Anzahl der durch die Siebe gewanderten Larven, sowie die Anzahl der Larven, die in den Sieben verblieben sind, ermittelt. Es wurde durch Addition dieser Werte die ursprüngliche Gesamt-Larvenzahl jedes Wells berechnet. Die Erstellung von Übersichtstabellen aller Wiederholungen, sowie

die Berechnung der Anteile der gewanderten Larven wurden mit Microsoft Office Excel 2013 durchgeführt.

Die Tabelle wurde dann in das Programm GraphPad Prism überführt mit dem Ziel eine Konzentrations-Wirkungskurve zu erstellen, um den Einfluss der Cyanamidkonzentration auf die Wanderungsfähigkeit der Larven zu zeigen. In die Auswertung wurden alle Messreihen mit einbezogen die in der Positivkontrolle maximal 10 % und in der Negativkontrolle mindestens 75 % Wanderung besaßen. Anschließend wurden zuerst die Konzentrationen auf der x-Achse durch Logarithmieren transformiert ($x = \lg(x)$). Danach wurde mit Hilfe nichtlinearer Regression eine Dosis-Wirkungskurve erstellt, bei der die Wirkung des Inhibitors, hier der Cyanamid-Lösung, auf die Wanderungsfähigkeit der Larven dargestellt wird. Erwartet wurde eine Verringerung der Wanderrate der Larven bei Erhöhung der Cyanamid-Konzentration.

3.2.19.6. Auswertung der Ergebnisse der Cyanamidbestimmung in Bodenproben

Die analysierten Werte der Bodenproben (mg Cyanamid pro kg) wurden deskriptiv aufgearbeitet und die Mittelwerte vergleichend in einem Diagramm dargestellt.

Zusätzlich wurden der Cyanamidgehalt, zum besseren Vergleich, auf das Volumen pro Töpfchen umgerechnet, da bei gleicher Füllhöhe das Gewicht der Töpfchen durch die unterschiedliche Erde differierte. Hier wurde bei den Töpfchen mit Blumenerde, bei einem eingefüllten Trockengewicht von 100 g und einem Wasserbindungsvermögen von 50%, ein Gesamtfüllgewicht von 150 g als Berechnungsgrundlage genutzt. Bei den Töpfchen mit Feldwegerde mit einem Trockengewicht von 150 g und einem Wasserbindungsvermögen von 19% ergab dies ein Gesamtgewicht von 178,5 g.

4. Ergebnisse

4.1. Feldversuch

4.1.1. Kotproben der Pferde von Kontrollgruppe A und Kalkstickstoffgruppe B der Weiden am Mittelweg

Die ersten Kotproben im Juni 2014 wurden vor und kurz nach Weideaustrieb gesammelt und untersucht. Wie nach der erst ca. vier Wochen zurückliegenden Entwurmung mit Fenbendazol und Moxidectin zu erwarten, waren in keiner Probe MDS-Eier zu finden. Jedoch waren 25 % der Proben von Gruppe A und 23 % der Proben von Gruppe B positiv für *Parascaris* spp., mit Werten zwischen 5 und 115 Eiern pro Gramm Kot. In den nächsten Monaten waren noch vereinzelt *Parascaris*-positive Proben zu finden, zum Ende der Weidesaison waren alle untersuchten Proben *Parascaris*-negativ.

Befunde mit MDS-Eiern traten erst einen Monat nach Weideaustrieb bzw. zwei Monate nach der Entwurmung wieder auf. In der Vergleichsgruppe (A) waren Anfang Juli 19 % der Proben positiv, in der Kalkstickstoffgruppe (B) 6 %. Im Laufe der Weidesaison waren diese Werte steigend und erreichten ihr Maximum Ende August in beiden Gruppen mit 91 % positiven Proben und mit einem Höchstwert von 1810 EpG in Gruppe B.

Tabelle 10: Auswertung der Kotproben bezüglich der mittleren MDS-Eiausscheidung im Laufe der Weidesaison 2014 (\pm Standardabweichung)

	Juni	Anfang Juli	Ende Juli	Anfang August	Ende August	Anfang Sep.
Mittelwerte Gruppe A (EpG/Pferd)	0 \pm 0	8 \pm 22	2 \pm 6	11 \pm 16	45 \pm 48	61 \pm 128
Mittelwerte Gruppe B (EpG/Pferd)	0 \pm 0	1 \pm 4	0 \pm 0	10 \pm 25	374 \pm 618	96 \pm 133
Positive Proben Gruppe A (%)	0	19	18	71	91	57
Positive Proben Gruppe B (%)	0	6	0	31	91	86

Tabelle 11: Auswertung der Kotproben bezüglich *Parascaris* spp.-Eiausscheidung im Laufe der Weidesaison 2014 (\pm Standardabweichung)

	Juni	Anfang Juli	Ende Juli	Anfang August	Ende August	Anfang Sep.
Mittelwerte Gruppe A (EpG/Pferd)	5 \pm 13	26 \pm 92	0 \pm 2	2 \pm 6	0 \pm 0	0 \pm 0
Mittelwerte Gruppe B (EpG/Pferd)	14 \pm 33	9 \pm 38	0 \pm 0	3 \pm 10	0 \pm 0	0 \pm 0
Positive Proben Gruppe A (%)	25	31	9	14	0	0
Positive Proben Gruppe B (%)	23	6	0	13	0	0

Der Faktor „Gruppe“, also die Kalkstickstoff-Düngung, hat keinen signifikanten Einfluss auf einen positiven Erregernachweis ($p = 0,992$). Der Faktor „Zeit“ ist dagegen signifikant ($p <$

0,001). Dies lässt sich in einem weiteren Schritt noch genauer darstellen. Bei Definition der Zeitpunkte als Kategorie lässt sich nun jeder Zeitpunkt (2 – 6) der Kotprobenuntersuchung im Laufe der Weidesaison mit dem Referenzzeitpunkt (1) der ersten Probenahme vergleichen. Anfang September liegt die Wahrscheinlichkeit für einen positiven MDS-Befund um ein Vielfaches höher, als direkt nach dem Weideaustrieb (und vorhergehender Entwurmung) im Juni (Odds Ratio: 1378).

Auch bei der Betrachtung der Wahrscheinlichkeit des Nachweises von *Parascaris* spp. ist der Faktor „Gruppe“ nicht signifikant ($p = 0,997$). Hier ist jedoch das Risiko für einen positiven Nachweis zu Beginn höher als zum Ende der Weidesaison.

4.1.2. Vorkommen von dritten Larven kleiner Strongyliden auf Gras- und Erdproben der Weiden am Mittelweg

Bei der einmaligen Erdprobenahme der Weide am Mittelweg zum Zeitpunkt vor der Kalkstickstoffdüngung konnte in keiner der 32 Proben infektiöse Strongyliden-L3 gefunden werden.

Die erste Grasprobenahme Anfang Mai 2014 zeigte eine sehr geringe Belastung der Weide mit infektiösen Strongyliden-L3. Auf der Teilfläche A wurden in den Proben mit einer Gesamt-trockenmasse von 47,77 g keine Larven gefunden. Auf der Teilfläche B wurden in den Proben mit einer Gesamt-trockenmasse von 59,81 g fünf Strongyliden-L3 gezählt, was einer Belastung von 84 Larven pro kg Trockenmasse (L3/kg TM) Gras entspricht. Nach der Kalkstickstoffdüngung auf Fläche B blieben die folgenden Proben am 19.06.2014 und 03.07.2014 auf beiden Weideflächen negativ. Erst am 17. Juli wurde eine sehr geringe Larvenbelastung von 37 L3/kg TM Gras auf der Vergleichsfläche A nachgewiesen, die bis Ende August noch bis 354 L3/kg TM Gras anstieg. Zum gleichen Zeitpunkt im August lag die Larvendichte auf der mit Kalkstickstoff gedüngten Weide B bei 648 L3/kg TM Gras.

Eine Wirkung des Kalkstickstoffdüngers ist auf Grund der niedrigen Larvenbelastung sowohl vor als auch nach der Düngung schwer bewertbar.

Tabelle 12: Anzahl der Larven in den Grasproben sowie Angabe der Larvenbelastung der Fläche pro kg TM Gras in Klammern

	Vergleichsfläche A	Kalkstickstoff-Fläche B
06.05.14	0	5 (84 L3/kg TM Gras)
19.06.14	0	0
03.07.14	0	0
17.07.14	1 (38 L3/kg TM Gras)	0
28.08.14	26 (354 L3/kg TM Gras)	52 (648 L3/kg TM Gras)

4.1.3. Kotproben der Pferde auf den Weiden am Eichendamm

Von Herde 1 am Eichendamm wurden neun Kotproben untersucht, von denen acht positiv für MDS-Eier waren. Die Werte lagen zwischen 190 EpG und 1280 EpG, der Mittelwert aller neun Proben betrug 530 EpG.

Acht von zehn Kotproben von Herde 2 waren ebenfalls positiv, hier waren die EpG-Werte insgesamt niedriger und lagen zwischen 30 und 860. Auch der Mittelwert lag mit 131 EpG etwas unter dem der ersten Herde.

4.1.4. Vorkommen von dritten Larven kleiner Strongyliden auf Grasproben der Weiden am Eichendamm vor und nach der Kalkstickstoffdüngung

Die Ausgangswerte der Larvenbelastung der beiden Versuchsflächen am Eichendamm waren deutlich höher als am Mittelweg und lagen bei der ersten Untersuchung am 01. August 2014 bei 46.494 L3/kg TM Gras auf der Vergleichsfläche beziehungsweise bei 50.954 L3/kg TM Gras auf der Versuchsfläche. Letztere wurde am 08. August 2014 mit 400 kg/ha Kalkstickstoff gedüngt, nachdem die Pferde von beiden Flächen herunter gestellt worden waren. In den zwei Wochen später genommenen Grasproben von der ungedüngten Vergleichsfläche war eine Reduktion der Larvenbelastung bei 94 % zu verzeichnen, in den Grasproben vom Kalkstickstoff gedüngten Versuchsstück lag die Reduktion bei 64 %.

Einen Monat nach der Kalkstickstoff-Düngung waren auf dem Vergleichsstück noch 18 % der Larven vom Ausgangswert zu finden, auf dem Kalkstickstoff-Stück noch 23 %.

Tabelle 13: Ergebnisse der Grasproben am Eichendamm berechnet auf die Larvenzahl pro Kilogramm Trockenmasse Gras

	Vergleichsfläche (Stück 2)	Kalkstickstoff-Fläche (Stück 7)
01.08.14	46.494 L3/kg TM Gras	50.954 L3/kg TM Gras
08.08.14	-	Kalkstickstoffdüngung
22.08.14	2.869 L3/kg TM Gras	18.562 L3/kg TM Gras
28.08.14	8.413 L3/kg TM Gras	27.614 L3/kg TM Gras
04.09.14	8.379 L3/kg TM Gras	12.173 L3/kg TM Gras

4.2. Ergebnisse Grastöpfchenversuch

4.2.1. Wiedergewinnungsrate

Die Wiedergewinnungsrate der Larven lag im Mittel bei 27 %. Das heißt von den 1000 L3, die auf ein Töpfchen pipettiert wurden, konnten im Schnitt 274 durch Gras- sowie Erdwaschung wiedergewonnen werden. Bei einem einzigen der 57 Töpfchen konnten nur 65 Larven gefunden werden, bei 10,5 % der Töpfchen lag die Wiederfindungsrate zwischen 10 und 20 %. Über die Hälfte der Töpfchen (56,1 %) hatte eine Wiederfindungsrate zwischen 20 und 30 %, bei 24,6 % lag diese zwischen 30 und 40 % und je zwei Töpfchen (3,5 %) erreichten Werte zwischen 40 und 50 % beziehungsweise 50-60 %.

Zeitlich gesehen war die Wiedergewinnungsrate bei den Töpfchen die an Tag fünf gewaschen wurden mit 34 % am höchsten und mit 23 % am 14. Tag am niedrigsten.

Tabelle 14: Mittlere Wiedergewinnungsraten der Larven abhängig vom Zeitpunkt der Waschung der Töpfchen (%)

	2d	5d	8d	11d	14d	gesamt
Ungedüngte Töpfchen	24 ± 5	31 ± 2	24 ± 5	27 ± 7	19 ± 10	25 ± 7
Gedüngte Töpfchen	29 ± 5	36 ± 11	32 ± 9	25 ± 3	27 ± 6	30 ± 8
gesamt	27 ± 5	34 ± 8	28 ± 8	26 ± 5	23 ± 9	27 ± 8

4.2.2. Ergebnisse des Larvenfitnesstests

Bei der Auswertung des Larvenfitnesstests erhält man die Anteile der Larven, die durch die Siebe gewandert sind, sowie die, die in den Sieben liegen geblieben sind. Bei guter Wirkung des Düngers wäre eine deutlich verringerte Wanderung der Larven in den gedüngten Töpfchen zu erwarten.

Insgesamt lag der Anteil der gewanderten Larven immer um die 50 %. Hier unterschieden sich die Kalkstickstoff-gedüngten Töpfchen keineswegs von den ungedüngten Töpfchen. Statistisch gesehen ist eine Düngung, bezüglich der Beeinflussung der Wanderungsrate der *Strongyliden*-Drittlarven nicht signifikant ($p = 0,406$).

Es fällt jedoch auf, dass die Wanderrate bei allen Töpfchen leicht sinkt je später man sie nach Aufnahme in den Versuch, also nach Tag null wäscht und auswertet.

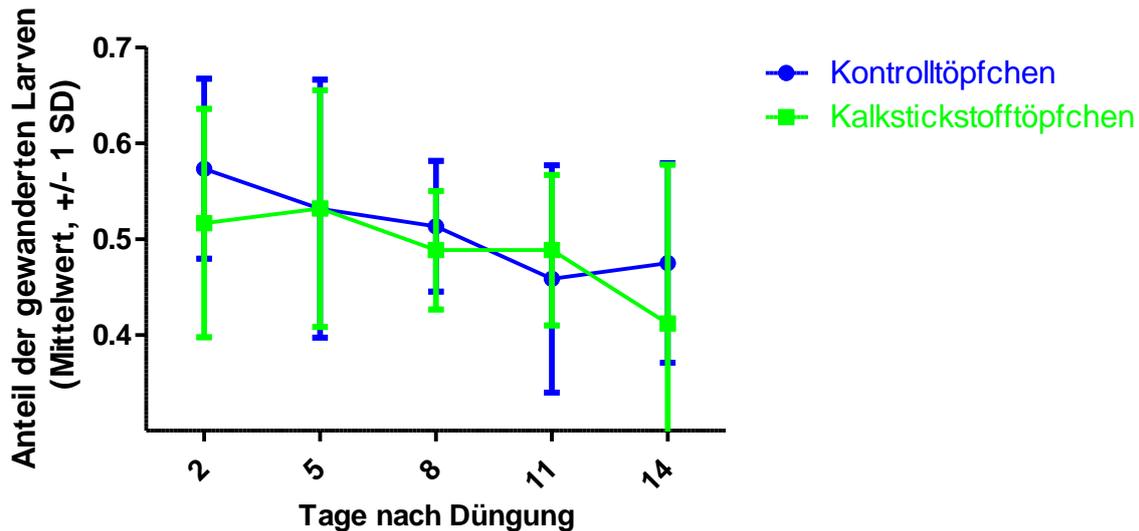


Abbildung 24: Vergleich des Anteils der im Fitnessstest gewanderten Larven zwischen ungedüngten (blau) und mit Kalkstickstoff-gedüngten Töpfechen (grün)

4.2.3. Auswertung des Aufenthaltsorts der Larven

Da das Gras und drei Erdschichten pro Töpfechen separat gewaschen und als getrennte Proben den Fitnessstest durchliefen, war auch eine Auswertung bezüglich des Aufenthaltsortes der Larven möglich. Betrachtet wurde, ob sich die Larven auf dem Gras oder in der Erde aufhielten. Zwischen den Erdschichten wurde nicht mehr differenziert, da sich nahezu 100 % der Larven aus der Erde in der obersten 2 cm dicken Schicht aufhielten, in den tieferen Schichten waren nur noch vereinzelt Larven zu finden. In der statistischen Auswertung zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$). Es befanden sich bei den ungedüngten Töpfechen signifikant mehr Larven auf dem Gras als bei den Kalkstickstoff-gedüngten Töpfechen.

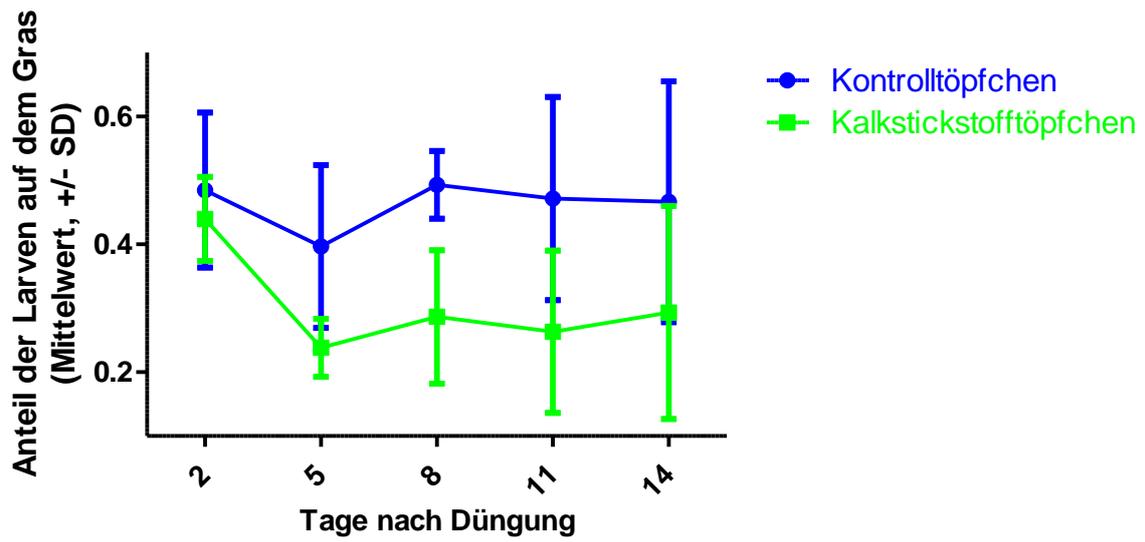
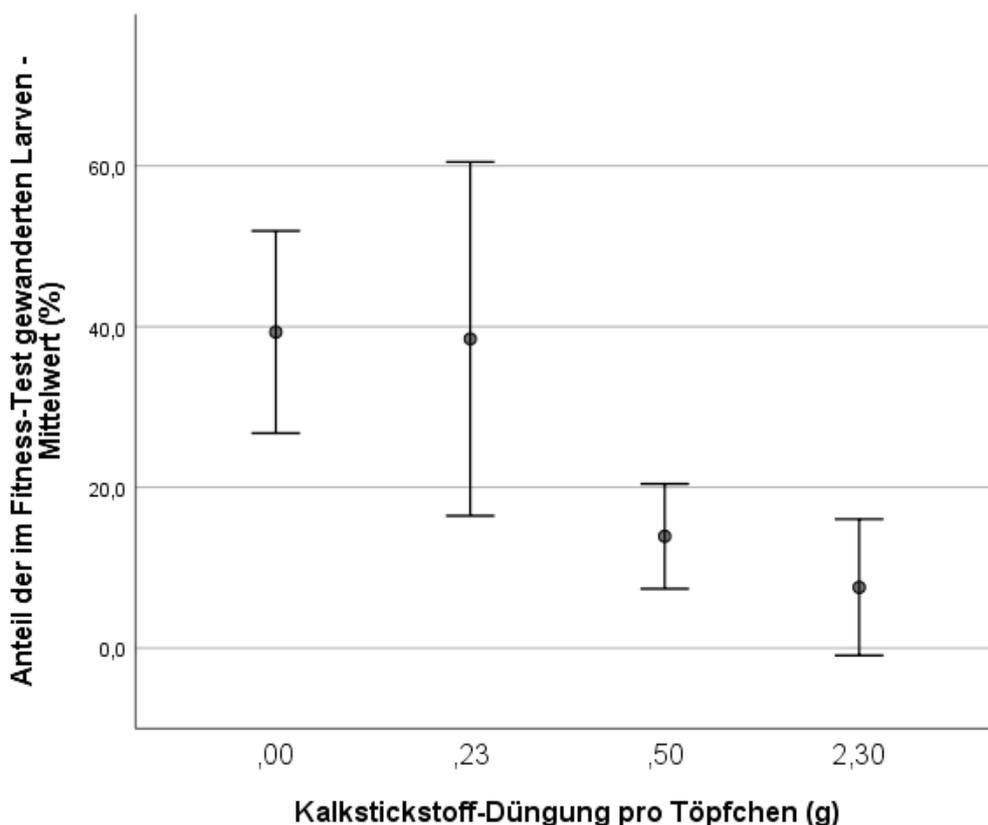


Abbildung 25: Vergleich des Anteils der auf dem Gras befindlichen Larven zwischen ungedüngten (blau) und mit Kalkstickstoff-gedüngten Töpfchen (grün)

4.3. Grastöpfchenversuch mit erhöhter Kalkstickstoffdüngung

Die Wiedergewinnungsrate der 16 zusätzlich angesetzten Grastöpfchen lag mit 29 % im gleichen Bereich wie bei dem vorangegangenen Grastöpfchen-Versuch (s. 4.2.1). Beim Vergleich des Anteils der gewanderten Strongylidenlarven im Fitnessstest gab es auch hier keinen Unterschied zwischen den ungedüngten Töpfchen und den mit der einfachen Menge Kalkstickstoff gedüngten Töpfchen ($p = 0,998$). Jedoch ergab der Vergleich der mit der doppelten sowie zehnfachen Menge gedüngten Töpfchen mit den Kontrolltöpfchen einen signifikanten Unterschied. Bei den stärker gedüngten Töpfchen wanderten signifikant weniger Larven im Fitnessstest (doppelte Düngermenge $p = 0,001$, zehnfache Düngermenge $p < 0,001$).

Hinsichtlich des Anteils der Strongylidenlarven, die ausschließlich vom Gras wiedergewonnen wurden, wurde in keiner der Dünger-Gruppen ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe festgestellt ($p = 0,589$).



Fehlerbalken: 95% CI

Abbildung 26: Vergleich der Anteile der im Fitnessstest gewanderten Larven in den verschieden stark gedüngten Töpfchen (n pro Gruppe = 4)

4.4. Wasseraufnahmevermögen verschiedener Böden

Das Trockengewicht der Blumenerde war bei einfacher Durchführung der Messung bei einer Füllhöhe des Bechers von 10 cm mit ca. 230 g deutlich geringer als das der Feldwegerde. Diese ist sandiger und ihr Trockengewicht von ca. 475 g bei gleichem Volumen gut doppelt so hoch wie das der Blumenerde.

Bis zur Sättigung nahm die Blumenerde ca. 240 g Wasser auf, die Feldwegerde dagegen nur ca. 110 g. Dies ergab ein Wasseraufnahmevermögen in Gewichtsprozent von 50 % bei der Blumenerde und 19 % bei der Feldwegerde.

Tabelle 15: Ergebnisse der Bestimmung der Wasseraufnahmekapazität von zwei verschiedenen Böden

	Blumenerde	Feldwegerde
Gewicht Becher leer	6,78 g	6,78 g
Gewicht Becher + Wasser gefüllt	Gesamt: 402,23 g Ohne Becher: 395,45 g	Gesamt: 402,23 g Ohne Becher: 395,45 g
Gewicht Becher + trockene Erde	Gesamt: 237,10 g Ohne Becher: 230,32 g	Gesamt: 481,57 g Ohne Becher: 474,79 g
Gewicht Becher + mit Wasser gesättigte Erde	Gesamt: 477,18 g Ohne Becher: 470,40 g	Gesamt: 592,10 g Ohne Becher: 585,32 g
Gebundene Wassermenge	470,40 g – 230,32 g = 240,08 g	585,32 g – 474,79 g = 110,53 g
Wassergehalt (Gewichtsprozent)	240,08 g / 477,18 g = 0,50 → 50 %	110,53 g / 585,32 g = 0,19 → 19 %

4.5. Larvenmessungen

Insgesamt wurde die Breite mit Scheide von 211 Larven ausgemessen, mit einem Minimalwert von 20,7 μm , einem Maximum von 37,7 μm und einem Mittelwert von 24,9 μm . Die Standardabweichung betrug hierbei 2,1 μm . Tests nach Kolmogorow-Smirnow und Shapiro-Wilk ergaben, dass die Daten nicht normalverteilt waren.

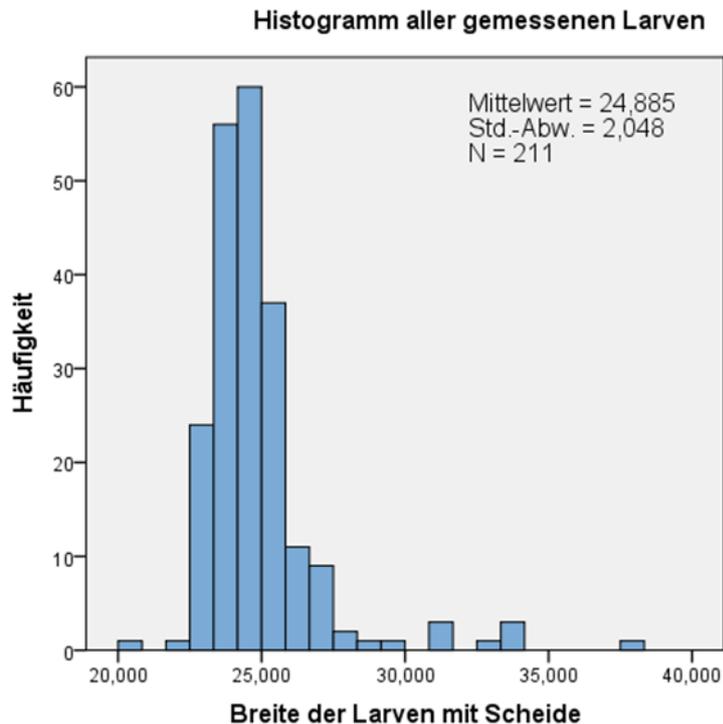


Abbildung 27: Histogramm für Messwerte aller 211 Larven

Es zeigten sich Unterschiede analysiert man die Werte der Larven die durch Hitze bzw. Lugol'sche Lösung immobilisiert wurden. Bei den hitzegetöteten Larven zeigten sich die Werte normalverteilt und ohne Ausreißer, der maximale Wert beträgt hier 26,6 μm . Dagegen wurden hinsichtlich der mit Lugol'scher Lösung immobilisierten Larven insgesamt etwas größere Messwerte sowie einige Ausreißer nach oben festgestellt, die Werte waren nicht normalverteilt.

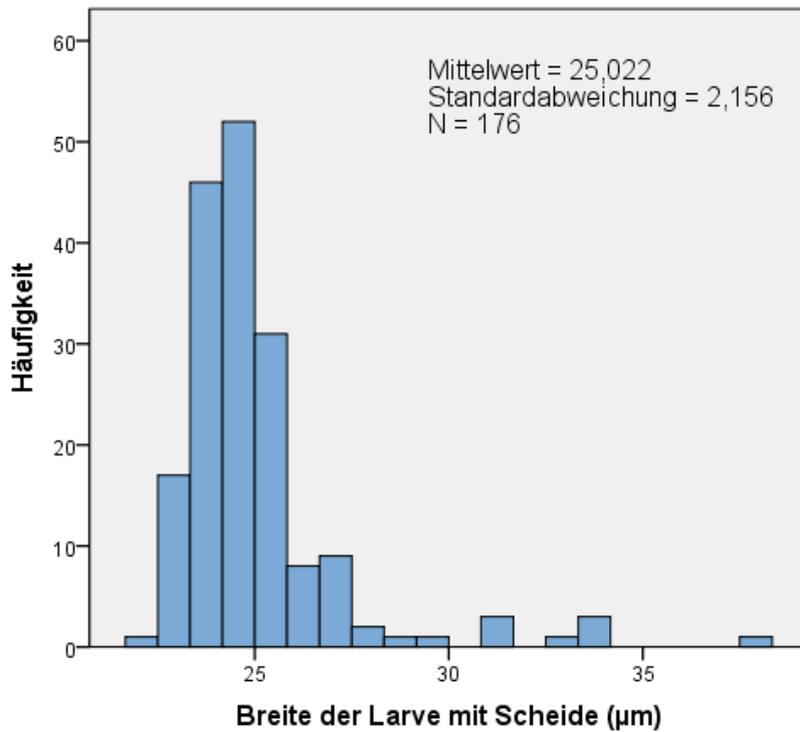


Abbildung 28: Histogramm für Werte der 176 mit Lugol'scher Lösung immobilisierten Larven

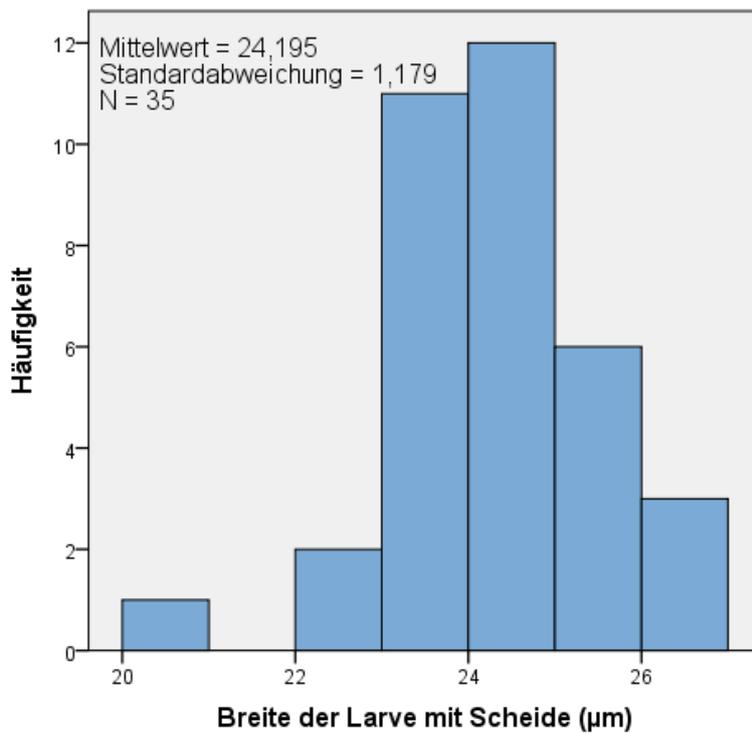


Abbildung 29: Histogramm für Werte der 35 mit Hitze immobilisierten Larven

Bei einem Vergleich der beiden Immobilisationsmethoden ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,033$). Auch nach Ausschluss aller Ausreißer, die außerhalb der dreifachen Standardabweichung lagen, blieb der Unterschied der Messwerte immer noch signifikant.

4.6. Cyanamidgehalt verschiedener Erdproben

Schon im ungedüngten Boden konnte ein geringer Cyanamidgehalt festgestellt werden. Dieser lag bei beiden Erden mit 17 mg Cy/kg (Feldwegerde) bzw. 15 mg Cy/kg (Blumenerde) ähnlich hoch. Zwei Tage nach der Düngung konnte ein deutlicher Anstieg des Cyanamidgehalts verzeichnet werden, welcher dann wieder stetig absank, wie an den Werten sieben bzw. 14 Tage nach Düngung zu beobachten war. Hierbei lagen die Werte der Blumenerde immer etwas über denen der Feldwegerde.

Ein statistischer Unterschied im Cyanamidgehalt (mg/kg) der Erdtypen zeigte sich an Tag zwei ($p = 0,026$) und Tag sieben ($0,23 \text{ g Cy}$, $p = 0,008$ und $0,5 \text{ g Cy}$, $p = 0,013$). Vor der Düngung lag der Cyanamidgehalt in allen Erdproben im ähnlichen Bereich und auch nach 14 Tagen nach der Düngung näherten sich die Werte soweit an, dass kein signifikanter Unterschied nachweisbar war.

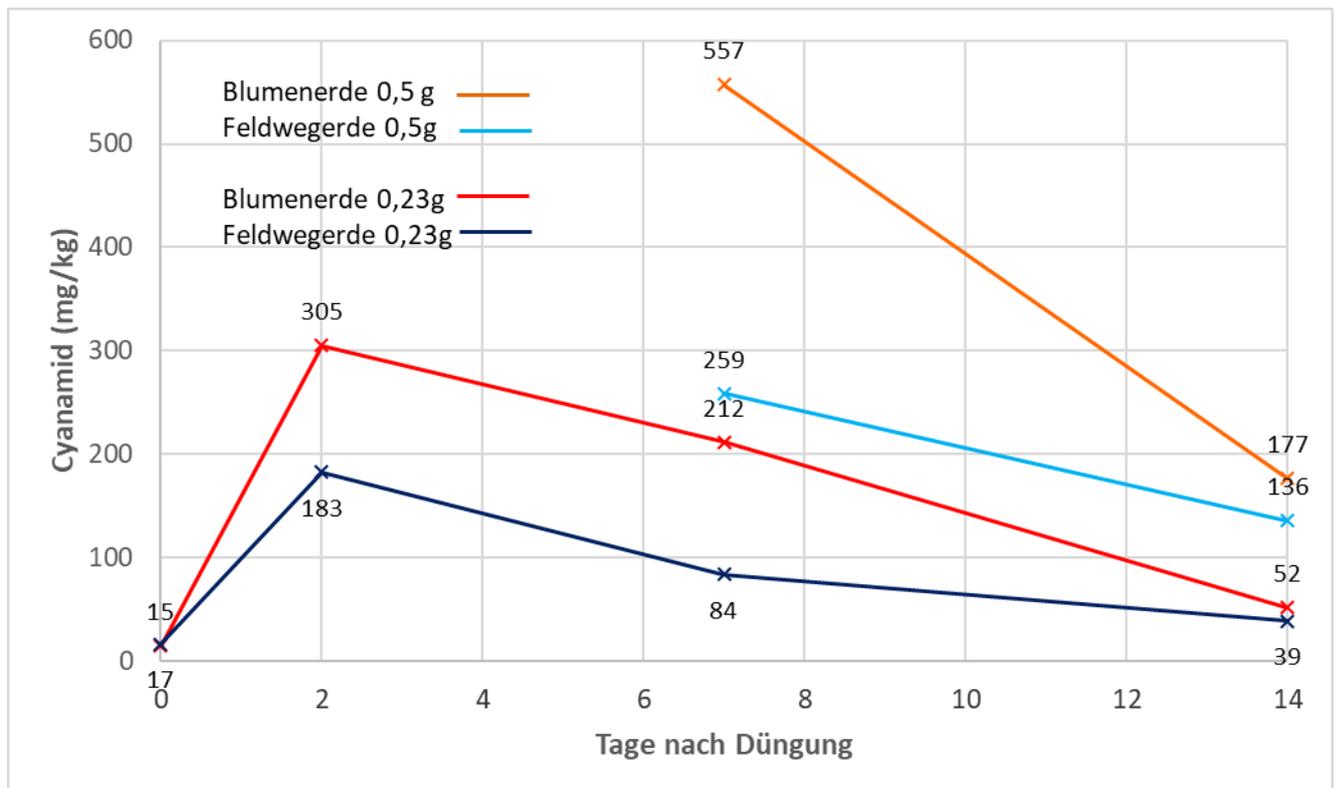


Abbildung 30: Mittelwerte der Cyanamidbestimmung aus verschiedenen Erdproben zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Düngung

Aufgrund des unterschiedlichen Gewichts der verschiedenen Erden wurde der im Labor ermittelte Cyanamidgehalt von „mg Cyanamid/ kg Erdprobe“ auf „mg Cyanamid/ Töpfchen“ umgerechnet. So kann verglichen werden ob, aufgrund der verschiedenen Erden, bei gleicher Kalkstickstoffdüngung, ein unterschiedlich hoher Cyanamidgehalt in den Töpfchen vorliegt.

Tabelle 16: Mittelwerte der Cyanamidbestimmung aus verschiedenen Erdproben zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Düngung (in mg Cyanamid / Töpfchen \pm Standardabweichung)

Menge Kalkstickstoff	Erdtyp	Tag 0	Tag 2	Tag 7	Tag 14
0,23 g	Blumenerde	2,3 \pm 0,4	45,8 \pm 6,6	31,8 \pm 5,5	7,8 \pm 5,1
	Feldwegerde	3,0 \pm 0,5	32,7 \pm 7,6	15,0 \pm 4,7	7,0 \pm 1,4
0,5 g	Blumenerde	-	-	83,6 \pm 16,1	26,6 \pm 1,1
	Feldwegerde	-	-	46,2 \pm 9,7	24,3 \pm 8,0

4.7. LMIA Vortests

Aufgrund der höchsten mittleren Wanderungsrate von 88 % der Larven bei einer Maschenweite von 28 μm und der noch gerade akzeptablen Durchfallrate von knapp unter 10 %, wurden für die LMIA Siebe mit ebendieser Maschenweite gewählt. In folgenden Boxplots sind die Anteile der gewanderten Larven bei den verschiedenen Maschenweiten dargestellt. Die Boxen zeigen das 2. und 3. Quartil getrennt vom Median (mittlere Querlinie) dar, Minimum und Maximum der Werte stellen die äußeren Begrenzungen nach oben und unten dar.

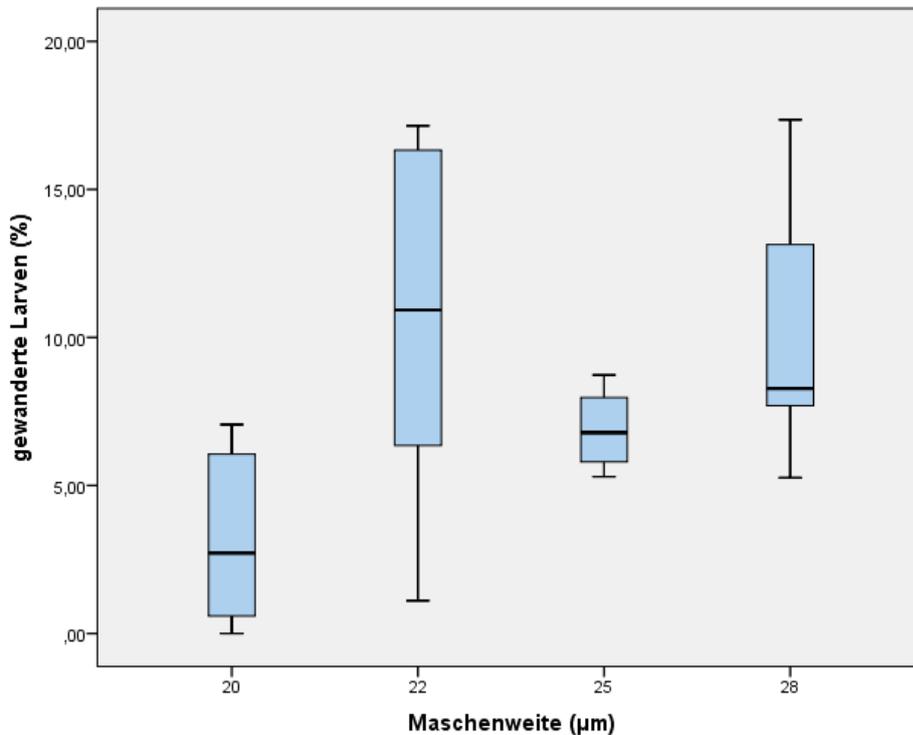


Abbildung 31: Anteil der in der Negativkontrolle (hitzegetötete L3) durch die Siebe gefallenen Strongyloidenlarven bei unterschiedlicher Maschenweite

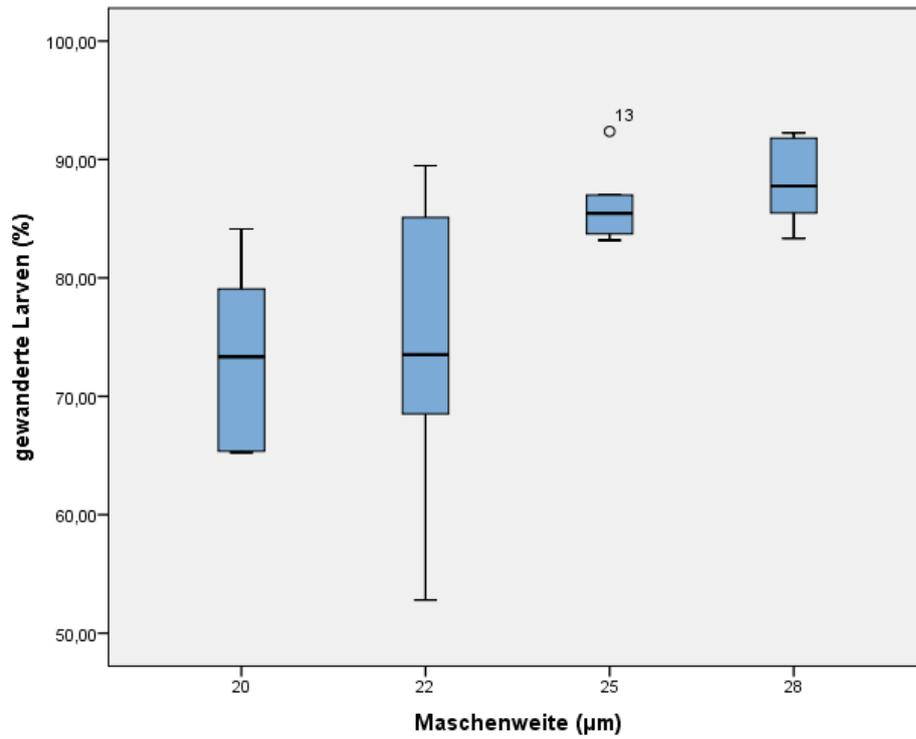


Abbildung 32: Anteil der in der Positivkontrolle (frische, motile L3) durch die Siebe gewanderten Strongylidenlarven bei unterschiedlicher Maschenweite

4.8. LMIA

In Tabelle 17 ist der Anteil der gewanderten Larven im Mittel bei der jeweilig eingesetzten Cyanamidkonzentration dargestellt. Auffällig ist die erhöhte Wanderung in den beiden niedrigsten Konzentrationen, die bei 0,04 %-iger Cyanamidlösung (entspricht 0,4 g Cyanamid/l) mit 93 % Wanderung im Mittel um 10 % höher im Vergleich zur Negativkontrolle war. Bei höheren Cyanamid-Konzentrationen sank der Anteil der gewanderten Strongylydenlarven signifikant ab ($p < 0,001$). In der Positivkontrolle (hitzegetötete Larven) sind im Mittel nur noch 4,24 % der Larven im Well gewandert.

Tabelle 17: Auswertung aller eingeschlossenen Durchgänge der Larvenassays

Cyanamidkonzentration (%)	NK	0,02	0,04	0,08	0,15	0,3	0,6	PK
Gewanderte Larven (%) Mittelwert aller Durchgänge mit Standardabweichung	83,82 ± 0,05	86,28 ± 0,11	93,00 ± 0,07	64,70 ± 0,14	14,08 ± 0,08	6,72 ± 0,07	6,91 ± 0,07	4,24 ± 0,03

Durch lineare Regression ließ sich die in Abbildung 33 dargestellte Kurve erstellen. Eine Inhibition von 50 % der Larvenwanderung wird durch eine 0,09 %-ige Cyanamidkonzentration erreicht. Um 95 % der Larven zu hemmen, ist eine inhibitorische Cyanamid-Konzentration (IC) von 0,17 % notwendig. Weitere ICs können Tabelle 18 entnommen werden.

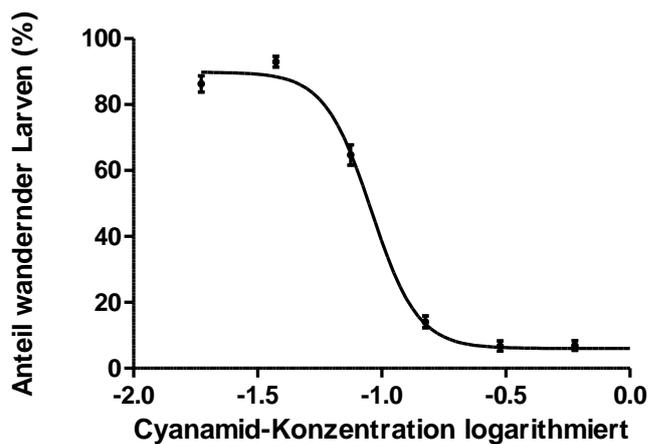


Abbildung 33: Dosis-Wirkungskurve von Cyanamid auf die Wanderungsfähigkeit infektiöser Strongylyden L3

Tabelle 18: Inhibitorische Cyanamid Konzentrationen in %

Anteil inhibierter Larven	Cyanamid-Konzentration (%)	Cyanamid-Konzentration (g/l)
IC97	0,192	2,0
IC95	0,171	1,8
IC90	0,146	1,5
IC50	0,091	0,9
IC10	0,056	0,6
IC5	0,048	0,5

4.9. Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Feldversuch zeigte sich, nach einmaliger Kalkstickstoffdüngung im Mai vor Weideaustrieb, kein Unterschied zwischen der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe bezüglich der Larvenbelastung auf der Weide und der Parasitenbelastung der Pferde. Jedoch konnte vor der Düngung nur eine minimale Larvenbelastung auf der Weide nachgewiesen werden. Zu beobachten war jedoch in beiden Gruppen eine Zunahme der Eiausscheidung von Magen-Darm-Strongyliden der Pferde beider Gruppen sowie nachfolgend ein Anstieg der Larvenbelastung auf beiden Weiden im Laufe über den Sommer. Zu Weidebeginn überwogen die Spulwurminfektionen bei den Pferden, ab August waren jedoch keine *Parascaris* spp. Eier mehr im Kot nachzuweisen.

Auch nach einer späteren Kalkstickstoff-Düngung einer stark mit Larven belasteten Weide, konnte kein stärkerer Rückgang der Larven durch Kalkstickstoff im Vergleich zum dem unbehandelten Kontrollstück gezeigt werden.

Im Töpfchenversuch konnte mit der einfachen Menge des Kalkstickstoff Düngers (entspricht 400 kg/ha) kein Rückgang der Wiedergewinnungsrate der Strongylidenlarven erreicht werden. Auch bei der Wanderung im Fitness-Test war kein signifikanter Unterschied zwischen den Larven aus den gedüngten und ungedüngten Töpfchen zu sehen. Nach Zugabe der doppelten Menge Kalkstickstoffdünger, konnte eine signifikante Reduktion der wiedergewonnenen Larven im Fitness-Test erreicht werden.

In den analysierten Bodenproben wurden zwei Tage nach der Düngung die höchsten Cyanamid-Werte gemessen, 183 mg/kg (Feldwegerde) bzw. 305 mg/kg (Blumenerde aus dem Töpfchenversuch).

Die hitzegetöteten L3 kleiner Pferdestrongylidenlarven mit Scheide waren im Mittel $24,2 \pm 1,2 \mu\text{m}$ breit. Nach Wanderung im Larven-Migrations-Inhibitions-Assays durch Siebe mit einer Maschenweite von $25 \mu\text{m}$, lag die IC₅₀ der Cyanamid-Lösung bei 0,09% (922 mg/l). Um 95% der Larven zu hemmen, ist eine 0,17%-ige Lösung (1741 mg/l) notwendig.

5. Diskussion

5.1. Allgemein

Endoparasitäre Erkrankungen bei Pferden und deren Bekämpfung waren und sind ein wichtiger Aspekt in der Gesunderhaltung der Pferde. Neben subklinischen Verläufen können diese Parasiteninfektionen negative Auswirkungen, wie Durchfall und Koliken auf den Wirt haben, welche zu Leistungseinbußen, Gewichtsverlust und auch Todesfällen führen können (Stromberg et al., 2012; Cribb et al., 2006; Gasbarre & Douvres, 1987). Ein optimales parasitäres Management erfordert die Zusammenarbeit von Tierärzten und Pferdehaltern und beinhaltet neben der chemischen Bekämpfung mit Anthelminthika auch diverse Stall- und weidehygienische Maßnahmen (siehe auch 2.2.2 und 2.2.3). Letztere rücken auf Grund des intensiven Einsatzes der Anthelminthika in den letzten Jahrzehnten und der sich daraus entwickelten Resistenzproblematik immer mehr in den Vordergrund (Geurden et al., 2014; Molento et al., 2012; von Samson-Himmelstjerna, 2012; Brady and Nichols, 2009; Lyons et al., 1999; Sangster, 1999; Waller, 1987). Durch die fortschreitenden Resistenzproblematik der auf Bestandesebene ubiquitär vorkommenden kleinen Strongylyden, nicht nur gegen Benzimidazole und Pyrantel, sondern in einigen Fällen auch gegen die ML, gekennzeichnet durch eine verkürzte „egg reappearance time“ nach der Entwurmung, werden zusätzliche Maßnahmen bei der Parasitenbekämpfung immer wichtiger (Peregrine et al., 2014; Relf et al., 2013; von Samson-Himmelstjerna et al., 2007b; Gawor, 2000; Lyons et al., 1999).

Beim Einsatz der Antiparasitika gibt es ebenfalls neue Strategien, wie z.B. die selektive Entwurmung, die versucht den Einsatz von Anthelminthika, durch regelmäßige Kotuntersuchungen, auf ein Minimum zu reduzieren ist (Hertzberg et al., 2014; Larsen et al., 2011).

Die Wechselbeweidung von Pferden mit artfremden Tieren, wie Rindern oder Schafen, ist ein Ansatz den Infektionsdruck auf der Weide zu senken (Eysker et al., 1986, 1983). Die Parasiten werden von diesen Fehlwirten aufgenommen, können sich aber nicht weiterentwickeln. Der Vorteil ist eine Dezimierung der Weideparasiten ohne Einsatz von Chemikalien im Pferd oder auf der Wiese, welche jedoch nicht vollständig und abhängig von der Besatzdichte und dem Verschmutzungsgrad der Weide ist (siehe auch 2.2.3). Das vermehrte Auftreten von *T. axei* beim Pferd bei Beweidung von Wiederkäuerweiden muss beachtet werden (Eysker et al., 1986). Eine weitere Alternative ist die biologische Bekämpfung der Nematoden durch Fraßfeinde. Hier scheint der nematophage Mikropilz *Duddingtonia flagrans* geeignet zu sein. Die Sporen können zugefüttert werden und überstehen die Magen-Darm-Passage. In den Kothaufen keimt der Pilz und ernährt sich von den sich dort entwickelnden Nematodenlarven. Für Pferde gibt es einige vielversprechende Studien, die eine signifikante Reduktion infektiöser L3 kleiner Strongylyden in angelegten Kotkulturen bzw. auf der Weide nachweisen konnten (Hernandez et al., 2016; Buzatti et al., 2015; Braga et al., 2013; Tavela Ade et al., 2013; Braga et al., 2009; Larsen et al., 1996).. Neben vieler Studien, die die Wirksamkeit des Pilzes belegen, gibt es jedoch auch Untersuchungen, die keinen Erfolg zeigten (Eysker et al., 2006; Dimander et al., 2003; Waller 2006, Maingi 2006, Holst 2005). In Australien ist ein Produkt auf Basis von *D. flagrans* für verschiedenste Tierarten zugelassen (www.bioworma.com).

Eine an sich simple Methode, die Larvenbelastung der Weide zu reduzieren, ist das Absammeln des Pferdekots. Hierfür wird, bis auf geeignetes Werkzeug und Arbeitskraft, nichts weiter benötigt. Vorteilhaft ist auch, dass Pferd und Umwelt unbelastet bleiben, einzig der Arbeitsaufwand ist sehr hoch. Diese Art der Weidehygiene wird immer wieder empfohlen und auch von Experten als wirksam angesehen (ESCCAP Guideline 08, 2019; Corbett et al., 2014; Herd, 1990; Herd, 1986; Archer, 1980).

Ein weiterer Ansatz, welcher in dieser Arbeit speziell für die Magen-Darm-Strongylyden der Pferde genauer untersucht wurde, ist die Kalkstickstoffdüngung zur Bekämpfung externer

Stadien von Weideparasiten. Seit Anfang des 19. Jahrhunderts wird Kalkstickstoff industriell hergestellt und als Dünger eingesetzt. Die Besonderheit des Kalkstickstoffdüngers ist die langsame Freisetzung des Ammoniums, welches den Pflanzen somit über einen längeren Zeitraum als Stickstoffquelle zur Verfügung steht. Außerdem wird die Kalkbilanz des Bodens verbessert und somit der Versauerung entgegengewirkt. Das als Zwischenstufe entstehende Cyanamid scheint weitere positive Effekte zu haben. Im Hinblick auf die Nutzung für Weideflächen sind hier vor allem die Verdrängung von Unkräutern und eine mögliche Dezimierung der externen Stadien von Weideparasiten hervorzuheben (Podstatzky, 2015, 2013, 2012; Bauer, 2006; Pouplard and Pecheur, 1977; Brozeit and Wieners, 1976; Pecheur, 1962; Cabaret an Mangeon, 1994, Gevrey and Euzeby, 1965; Leiper, 1937).

Kalkstickstoffdünger entfaltet seine Wirkung auf die infektiösen Larven auf der Weide und greift somit in den externen Entwicklungszyklus der Parasiten ein. Die Pferde sind hierdurch nicht unmittelbar betroffen. Die Karenzzeit von 14 Tagen nach der Düngung sollte jedoch eingehalten werden, bevor die Pferde wieder auf die Weide gelassen werden dürfen. Zu beachten ist ebenfalls, dass die Eliminierung der Parasiten nicht der Haupteinsatzzweck des Kalkstickstoffs ist. Die Düngewirkung steht im Vordergrund, somit muss die Menge des Düngers immer an den Nährstoffbedarf der Weide angepasst werden und darf nicht in beliebiger Menge aufgebracht werden.

Einige frühere Untersuchungen haben Anhaltspunkte für eine Wirkung des Kalkstickstoffdüngers gegen Parasitenlarven ergeben. Die meisten Studien wurden mit Wiederkäuern und deren Parasiten durchgeführt (Podstatzky, 2015, 2013, 2012; Bauer, 2006; Pouplard and Pecheur, 1977; Brozeit and Wieners, 1976; Cabaret and Mangeon, 1994; Pecheur, 1962), nur in einer wurde die Wirkung auf Weideparasiten von Pferden untersucht (Leiper 1937). Die Aussagekraft und Vergleichbarkeit der Studien ist eingeschränkt, da verschiedene Arten von Parasitenlarven eingesetzt und Versuche mit unterschiedlichem Studiendesign im Labor und auf dem Feld durchgeführt wurden. Die in Laborversuchen eingesetzte Kalkstickstoffmenge bzw. die daraus resultierenden Anwendungskonzentrationen waren meist deutlich höher, als für Grünflächen empfohlen. Außerdem fehlt durchweg die statistische Auswertung der Ergebnisse.

In der vorliegenden Arbeit wurden neben einem Feldversuch auf Pferdeweiden, ein in-vitro Versuch im Labor mit Grastöpfchen durchgeführt, sowie ein LMIA mit reiner Cyanamidlösung. Hierfür wurden etablierte Untersuchungsmethoden wie bei den Kotprobenuntersuchungen z.B. das Mini-FLOTAC eingesetzt, als auch neuere, wie die Methode zur Gewinnung von Larven aus Grasproben nach DEMELER (Demeler et al. 2012). Auch hinsichtlich des LMIA handelt es sich um ein bereits häufig benutztes Format, allerdings ist der Assay bisher nicht für kleine Strongyliden standardisiert.

5.2. Feldversuch

Der Feldversuch auf einem großen Gestüt in Mecklenburg-Vorpommern bot den Vorteil zwei identisch gehaltene, genügend große Pferdeherden zur Verfügung zu haben. Die Herden bestanden aus jeweils 32 weiblichen, einjährigen Pferden. Da die Pferde ab diesem Alter auf dem Gestüt getrennt gehalten wurden, konnte nicht mit gemischtgeschlechtlichen Gruppen gearbeitet werden. HINNEY konnte eine erhöhte Prävalenz für die Eiausscheidung bei Stuten und Hengsten im Vergleich zu Wallachen, sowie bei Jährlingen im Vergleich zu Adulten feststellen (Hinney et al., 2011). In einer Studie in den USA hatten weibliche Pferde eine signifikant höhere MDS-Eiausscheidung als männliche, das Alter war signifikant negativ verknüpft mit MDS-Infektionen (Nielsen et al., 2018). Auch RELF fand bei 1-4-jährigen Pferden ein erhöhtes Risiko für Strongyloiden als bei älteren Pferden (Relf et al., 2013). Bei 127 Pferden von fünf verschiedenen Gestüten in Bayern wurde ein hohes Vorkommen von Strongyloiden unabhängig vom Alter nachgewiesen (Beelitz and Gothe, 1997). Bei Jährlingen überwiegen die L4 und Adulten der kleinen Strongyloiden. Enzystierte L3 in der Darmwand kommen dagegen im Vergleich zu 2-5 Jahre alten Ponys in geringerem Ausmaß vor (Chapman et al., 2003). Bei den für die Studie zur Verfügung stehenden Stutjährlingen ist also mit einer gleich hohen bis höheren Parasitenbelastung als bei älteren Pferden bzw. gemischtgeschlechtlichen Pferdeherden zu rechnen.

Für jede Gruppe stand eine Fläche von sechs Hektar zur Verfügung, was einer Besatzdichte von 5,3 GVE / ha (Großvieheinheiten / ha) entspricht. Das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen gibt als Richtwert für die Besatzdichte auf Standweiden bei Nutzung ohne Zufütterung 0,5 GVE / ha an. Bei stärkerem Aufwuchs ist ein Besatz von bis zu 2 GVE / ha möglich (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz).

Die Besatzdichte im Feldversuch ist mit >5 GVE / ha also als hoch einzustufen. Je intensiver der Besatz, umso höher die Verschmutzung mit Kot und umso größer die Wahrscheinlichkeit, dass die Pferde nahe der Kothaufen grasen, wo die meisten infektiösen Larvenstadien zu finden sind (Thamsborg et al., 1999).

Weitere Maßnahmen, die der Betrieb durchführte, auf die wir keinen Einfluss hatten, sind die Mahd der Weide im Mai, die Entwurmung der Pferde mit Fenbendazol und Moxidectin im April, der späte Weideaustrieb im Juni, Zufütterung auf der Weide mit einer Silagemischung und das Verfahren der Rotationsweide. Diese Maßnahmen können zu einer Minimierung des Parasitendruckes und des Infektionsrisikos führen. Für die Zufütterung konnte dies bisher nicht nachgewiesen werden (Larsson et al., 2007). Die Zeit, die die Pferde auf der dicht besetzten Weide grasten, schien trotz angebotenen zusätzlichem Futter für parasitäre Neuinfektionen auszureichen. Eine Weiderotation scheint, im Vergleich mit Standweiden, ein geringeres Infektionsrisiko für Parasiten bedingen zu können, wie Studien mit Pferden und Rindern zeigten (Smith et al., 2009; Larsson et al., 2007; Larsen et al., 2002). Allerdings sollten die Tiere auf frische, jeweils im laufenden Jahr unbenutzte Stücke, umgestellt werden. Eine intensive Rotation, bei der die Pferde mehrmals im Jahr die gleichen Weidestücke begrasen, hat keinen positiven Effekt (Smith et al., 2009).

Die Weide am Mittelweg wurde seit mehreren Jahren als Pferdeweide genutzt. Bei der Grasprobenahme im April 2014 vor der Kalkstickstoffdüngung konnte nur eine sehr geringe Larvenbelastung nachgewiesen werden (Fläche A: 0 L/kg TM Gras, Fläche B: 84 L/kg TM Gras). Bei solch geringer Larvenbelastung stellte sich die Frage, wie genau die angewandte Graswasch-Methode zur Larvengewinnung die Situation auf der Weide darstellt und ob die Probenmenge ausreichend war. Bei einer geringen Anzahl von Larven war die Wahrscheinlichkeit, diese in den nur einen kleinen Teil der Weide ausmachenden Proben zu finden, geringer. Trotzdem wurden einige Larven gefunden, jedoch nur auf Fläche B. Die Erdproben, welche im Mai 2014 entnommen und untersucht worden sind, waren auch negativ. Zusätzlich wurde die komplette Weide im Mai gemäht, um diesen Schnitt zur Futtergewinnung zu nutzen. Auch eine solche wechselnde Nutzung kann zu einer

Reduzierung der Larvenbelastung der Weide führen (KTBL, 2012; Larsson et al., 2007). Die Wirkung der Kalkstickstoffdüngung der Fläche B Ende Mai, ist durch die vorher festgestellte niedrige Larvenbelastung nur schwer bewertbar. So waren die Befunde der folgenden drei Grasprobenahmen auf beiden Weiden negativ bis sehr gering positiv und es ergab sich kein Unterschied zwischen der Vergleichsfläche und der Kalkstickstoff-gedüngten Fläche. Erschwerend kommt hinzu, dass das Prinzip der Rotationsweide für beide Tiergruppen angewendet wurde. Beide Flächen (A und B) waren in drei je 2 ha große Teilstücke aufgeteilt, ca. alle 10 Tage wurden Grasproben genommen und die Pferde auf ein neues Stück umgestellt. Nach einem Monat, nachdem alle drei Stücke beweidet waren, wurden die Litzen geöffnet, sodass jede Gruppe auf der kompletten, 6 ha großen Fläche stand, welche in den folgenden zwei Monaten als Standweide genutzt wurden. Erst jetzt stieg die Anzahl der positiven Nachweise von Weideparasiten in den Kotproben, sowie die mittels Grasprobenuntersuchung erfassten Larvenbelastung der Weide an. Diese erreicht Ende August ihr Maximum auf den Weiden am Mittelweg. Mit ca. 350 L/kg TM Gras auf der unbehandelten Fläche A ist sie noch niedriger als mit ca. 650 L/kg TM Gras auf der Kalkstickstoff-gedüngten Fläche B. Beide Werte sind insgesamt jedoch eher im unteren Bereich anzusiedeln, vergleicht man mit anderen Werten, die auf Pferdeweiden ermittelt werden konnten. So wurden in Florida Höchstwerte von 120.000 L/kg TM Gras gefunden (Courtney and Asquith, 1985), in Süd Loisiaana bis zu 40.000 L/kg TM Gras im September (Baudena et al., 2000) und in Newmarket wurde ebenfalls ein Maximalwert im September mit 18.468 L/kg TM Gras zwei Wochen nach raschem Anstieg der EpG-Werte ermittelt (Herd, 1986). In der Ukraine wurde als höchster Wert, Ende des Sommers, eine Larvenbelastung von 970 L/kg gefunden. Dieser Wert lag im gleichen Bereich wie die Ergebnisse der Weide am Mittelweg (Kuzmina, 2012). Die angewendeten Methoden, zur Larvengewinnung aus den Grasproben, unterschieden sich in den verschiedenen Studien, jedoch wurden immer verschiedene Sedimentations und Zentrifugationsschritte kombiniert. BAUDENA et al. (2000) nahmen abschließend zur Aufreinigung der gewonnenen Larvensuspension eine Zuckerzentrifugation vor, ähnlich wie in der Methode von DEMELER et al. (2012), die in dieser Arbeit verwendet wurde. COURTNEY und ASQUITH (1985) verwendeten ebenfalls ein Protokoll mit Sedimentations- und Zentrifugationsschritt zur Larvengewinnung, welches 1980 beschrieben wurde (Young and Trajstman, 1980). Desweiteren wurden die Grasproben mit Hilfe des Baermann-Trichters bearbeitet (Kuzmina, 2012). Für eine optimale Vergleichbarkeit wäre ein einheitliches Protokoll zur Bearbeitung von Grasproben hilfreich, jedoch ähneln sich die Methoden in ihrer Durchführung, sodass man die Ergebnisse anderer Studien durchaus zum Vergleich heranziehen kann.

Die, im Rahmen der hier durchgeführten Studie, beobachtete geringe Kontamination der Weideflächen, können neben dem Weidemanagement, auch durch die vor Weideaustrieb durchgeführte Entwurmung der Pferde erklärt werden. Bei dem unter anderen verwendeten Moxidectin beträgt die „egg reappearance period“ für kleine Strongylyden zum Beispiel zwölf Wochen. Moxidectin ist auch wirksam gegen einen Teil der larvalen Darmwandstadien, kann diese jedoch nicht vollständig eliminieren (Cobb and Boeckh, 2009). Die frisch entwurmtten Pferde scheiden für einige Wochen keine MDS-Eier aus. Erst als die Eiausscheidung begann, stiegen auch die Larvenzahlen auf der Weide an. Der sich im Inneren der Pferde befindende Teil der Gesamtwurmpopulation, sowie die wenigen Larven auf der Weide, welche den Winter überstanden haben, reichten aus, die Infektionsrate mit MDS zum Ende des Sommers wieder ansteigen zu lassen.

Jedoch war auf der Fläche B mit Kalkstickstoffdüngung laut der hier gewonnenen Ergebnisse kein geringeres Risiko für die dort weidenden Pferde vorhanden. Die Wahrscheinlichkeit für eine positive Kotprobe stieg bei allen in die Studie einbezogenen Pferden im Laufe der Weidesaison, die Gruppe hatte keinen signifikanten Einfluss.

Eine interessante Beobachtung war, dass trotz Entwurmung mit Moxidectin und Fenbendazol, einige Tiere weiterhin Parascaris-Eier ausschieden. Auf dem Gestüt ist also von einer Resistenz der Spulwürmer gegen Avermectine und Benzimidazole auszugehen.

Die Weide am Eichendamm wurde, nach Auffälligkeit mit besonders vielen MDS-positiven Kotproben in der routinemäßigen Bestandskontrolle, ebenfalls auf die Larvenbelastung überprüft und in den Feldversuch miteinbezogen. Der Schwerpunkt lag hier nur auf der kurzfristigen Wirkung des Düngers gegen die infektiösen Larvenstadien auf der Weide. Die Pferde (3-jährige Hengste) wurden entwurmt und auf eine frische Weide umgestellt. Die Larvenbelastung Anfang August war mit ca. 50.000 L/kg TM Gras auf beiden für den Versuch genutzten Flächen am Eichendamm deutlich höher, als auf den Flächen am Mittelweg. Dies lag möglicherweise an der weiter zurückliegenden Entwurmung der Tiere und weniger Rotationsintervallen. Auf dem Betrieb wurde, hauptsächlich bei den Fohlen und Jungtieren, auf adäquate Entwurmung geachtet. Bei älteren Pferdegruppen wurden Entwurmungen bei Bedarf, nach positiven Kotproben oder klinisch schlechtem Erscheinungsbild (Abmagerung, struppiges Fell, etc.) durchgeführt.

Zwei Wochen nach der Düngung war die Larvenbelastung auf beiden Weideflächen am Eichendamm stark reduziert, jedoch mit einer Reduktion von 94 % auf der unbehandelten Fläche noch stärker als auf der Kalkstickstoff-gedüngtem Fläche. Bei Letzterer betrug die Reduktion nur 64 %. Hauptursache für die geringere Larvenbelastung war vermutlich die fehlende fortwährende Wurmei-Kontamination durch die Pferde. Bei einem durchschnittlichen Wurmeiausscheidungswert der Pferde beider Weiden von 330 EpG, ca. 30 Pferden pro Herde und einer Ausscheidung von ca. 20 kg Kot pro Pferd und Tag ergibt sich eine Menge von knapp 200 Millionen Strongyliden-Eiern, die täglich pro Gruppe ausgeschieden werden (Pokorny, 2008). Desweiteren können auch die Wetterbedingungen die Larvenzahl auf dem Gras variieren lassen. Starker Regen wäscht die Larven vom Gras in den Boden und bei Trockenheit halten sich die Larven im feuchteren Boden oder Kothaufen auf. Ein Flüssigkeitsfilm wird benötigt, damit die Larven aus dem Kot auf die Grashalme wandern können (English, 1979a; English, 1979b). Die Grasproben wurden immer zur gleichen Tageszeit, gegen sechs Uhr morgens wenn noch Tau auf den Gräsern war, genommen. Vor den Grasprobenahmen gab es keine starken Regengüsse, welche die Larven vom Gras heruntergewaschen haben könnten.

Auch in den weiteren Grasprobenahmen lagen die Werte in ähnlichen Bereichen, jedoch lag die Larvenbelastung auf der kalkstickstoffgedüngten Fläche immer über der der Vergleichsfläche. Die Larven zeigten sich in den Proben beider Weidestücke mobil und vital. Eine Wirkung des Kalkstickstoffdüngers konnte also während des Feldversuches nicht gezeigt werden. Auf den Weiden am Mittelweg sowie am Eichendamm konnten durch die Kalkstickstoffdüngung keine Vorteile bezüglich der Larvenzahlen auf dem Gras und der Parasitenbelastung der Pferde ermittelt werden.

Ein Vergleich mit anderen Studien bezüglich der Wirkung von Kalkstickstoff auf Weideparasiten ist, aufgrund der vielfältigen Einflüsse (siehe Tabelle 19), welche die Wirkung des Düngers, das Vorhandensein/ Auffinden von Larven und die parasitäre Infektion bei den Wirtstieren beeinflussen, schwierig.

Tabelle 19: Faktoren, die einen Feldversuch bezüglich der Wirkung von Kalkstickstoff auf Parasiten und deren Infektiösität beeinflussen können

Weide	äußere Einflüsse	Weidemanagement	Tier
Bodenbeschaffenheit	Jahreszeit	Weidegröße	Tierart
Pflanzenbewuchs	Klima	Weidezeit	Alter
Larvenbelastung	Wetter (Niederschläge, Temperatur, ...)	Besatzdichte	Immunstatus

Düngezeitpunkt		Weideform (Standweide, Rotationsweide, ...)	Gesundheitsstatus
		Zufütterung	Parasitenart
		Weidehygienische und -pflegende Maßnahmen	
		Sonstige Nutzung (Heugewinnung, Pflanzenanbau,	

Trotzdem können zu einigen Studien Vergleiche angelegt werden, wenn auch nur unter Vorbehalt. Eine veröffentlichte Studie, die den Einfluss der Kalkstickstoffdüngung auf Pferdeparasiten im Feld untersuchte, führte LEIPER 1937 durch (Leiper, 1937). Neben in vitro Versuchen im Labor, auf die später noch eingegangen wird, wurde im Februar auf kleinen Parzellen (1 sq ft = 929 cm²) im Außenbereich die Wirkung auf Larven verschiedener Weideparasiten der Pferde getestet. Nach Auftragen von 250.000 L3 und einer Kalkstickstoffdüngung wurden nach acht und nach 18 Tagen Grasproben untersucht. Die Dosierung des Düngers entsprach umgerechnet 784 kg/ha und lag dabei etwa bei der doppelten Menge der maximalen empfohlenen Dosis. Nach anfänglicher Nutzung des Baermann-Filters zur Larvengewinnung aus den Gras- und Erdproben, wurde ein anderes Verfahren genutzt, bei dem eine größere Anzahl und weniger beschädigte Larven wiedergewonnen wurden. Dieses glich dem in dieser Arbeit verwendeten Verfahren. Nachdem die Proben mit warmem Wasser gemischt und gesiebt (90 µm Maschenweite) worden sind, folgte eine Sedimentation und drei Zentrifugationsschritte – unter anderem eine Zentrifugation in gesättigter Zuckerlösung. Die Vitalität der Larven wurde durch den Betrachter optisch ausgewertet - ähnlich wie bei BAUER (2006) - ein Larvenfitnesstest wie in dieser Arbeit verwendet, trennt dagegen vitale von toten Larven objektiver. Von den wiedergewonnenen Larven lag der Anteil der toten Larven nach Kalkstickstoffdüngung bei rund 50 %, bei der Kontrolle bei nur 2-3 %. Die Anzahl der wiedergewonnenen Larven lag zwischen 200 und 750 Larven (Leiper, 1937). Bei der Anwendung auf Grünland wird eine Menge von 300-400 kg/ha vom Hersteller empfohlen (Alzchem Group AG). Eine starke Düngung von Pferdeweiden sollte, im Gegensatz zu Rinderweiden vermieden werden. Eine zu hohe Düngerkonzentration kann den Grasbewuchs nachhaltig schädigen (Bender, 2013c). Bei der Dosierung von 784 kg/ha trat eine komplette Bräunung des Grasses auf, welches erst nach einiger Zeit wieder zu wachsen anfang. Schon bei einer Menge von 448 kg/ha beobachteten LEIPER et. al. eine Bräunung des Grasses. Das verstärkte Graswachstum durch die Düngung setzte erst sechs Wochen später ein (Leiper, 1937).

In Belgien wurden in einem 3-jährigen Versuch mit je sechs Jungrindern pro Weide, verschiedene Methoden der Kalkstickstoffdüngung getestet. Eine Düngung mit 400 kg/ha im April, eine Düngung mit 300 kg/ha im Februar und eine Düngung mit 300 kg/ha im November des Vorjahres wurden verglichen. Die Ergebnisse wurden deskriptiv ausgewertet. Es bestanden geringe Unterschiede hinsichtlich der EpG-Werte zu Gunsten der Tiere auf der Kalkstickstoffweide, im Mittel nahmen diese im ersten Jahr auch 12 kg mehr an Körpergewicht zu. Untersuchungen bezüglich der Larvenzahlen auf dem Gras wurden nicht durchgeführt. Negativ bewerteten die Autoren die frühe Düngung im Februar, welche zu einem Wachstumsschock des Grasses und einem ungenügendem Futterangebot auf dieser Fläche führte (Pouplard and Pecheur, 1977).

In einer ähnlichen Studie war der Feldversuch sehr realitätsnah gestaltet und in den Routineablauf eines Betriebes integriert. Es handelte sich ebenfalls um einen Rinderbetrieb. In dieser Untersuchung wurde die Anwendung von Kalkstickstoffdünger sogar über vier

Jahre jede Weidesaison wiederholt. Je Tiergruppe (ca. 8-9 Jungrinder) stand eine Fläche von 2 ha zur Verfügung, welche in vier Teile à 0,5 ha unterteilt war, auf denen die Tiere während der Weidesaison rotierten. Das Versuchsschema ähnelte dem in dieser Arbeit. Die Versuchsweide wurde mit 400 kg/ha Kalkstickstoff gedüngt, die Kontrollweide mit einem Mineraldünger, sodass die Stickstoff-Versorgung identisch war. Im Sommer wurde auf der Versuchsweide mit Kalkstickstoff nachgedüngt und auf der Kontrollweide mit Citarin entwurmt. Im Mittel fielen 60 %, also etwas mehr als die Hälfte, aller positiven Kotprobe auf die Kontrolltiere, nur 44 % auf die Versuchstiere. Der EpG-Mittelwert für MDS lag zu Beginn der Weidesaison bei ersteren 3x höher als bei den Tieren, die auf den mit Kalkstickstoff gedüngten Weiden standen. Nach der Entwurmung im Juli waren die EPG-Werte der Kontrolltiere jedoch niedriger als die der auf der mit Kalkstickstoff gedüngten Fläche gehaltenen Tiere. Erst zum Weideende stiegen die EpG-Werte der Kontrolltiere stärker, als die der Versuchstiere. Diese hatten im Mittel eine Mehrzunahme des Körpergewichts von 23,1 kg zu verzeichnen (Brozeit and Wieners, 1976). Bis auf die deskriptive Beschreibung der Ergebnisse gab es jedoch keine statistische Auswertung der gewonnenen Daten, somit kann keine Aussage getroffen werden, ob der Unterschied zwischen den beiden Gruppen maßgeblich war. Außerdem fehlte die Auswertung von Grasproben, um die Larvenbelastung auf der Weide bestimmen zu können. Die Gewichtsentwicklung junger Rinder und auch die Parasitenbelastung, kann von weiteren Faktoren wie (z.B. düngedingten) Unterschieden im Aufwuchs zwischen den Weideflächen, dem Auftreten von Krankheiten, dem Immunstatus der Tiere etc. beeinflusst werden, auf die nicht weiter eingegangen wurde.

Bei einem Weideversuch mit Schafen konnte unter Einsatz von 1000 kg/ha Scoramid, einer Mischung aus Kalkstickstoff und Schlacke, keine signifikante Wirkung auf die L3 von MDS beim Schaf festgestellt werden. Jedoch korrelierte die Behandlung der Weide mit 1000 kg/ha Scoramid negativ mit Infektionen vom Lungenwurm *M. capillaris* und von *Moniezia* spp.. Letzteres ist scheinbar auf die Wirkung von Kalkstickstoff auf die Sandheideschnecke (*Ceratomyxa virgata*), den Zwischenwirt dieser Bandwürmer, zurückzuführen. Bei in vitro-Tests lag die LD50 für *C. virgata* bei 1200 kg/ha Kalziumcyanamid. Der Weideversuch wurde 1984 und 1985 mit 10 bzw. 19 Weiden durchgeführt, von denen ein Teil ungedüngt verblieb und ein Teil im März mit 1000 kg/ha Scoramid gedüngt wurde. Grasproben wurden vor der Düngung im März und im April, Mai, Juni (1984) bzw. April, Juli und Oktober (1985). Im zweiten Versuchsjahr wurde zusätzlich von Februar bis Oktober eine Infektion der weidenden Schafe auf MDS, *M. capillaris* und *Moniezia* sp. Mithilfe von Kotproben (McMaster-Verfahren bzw. Baermann-Trichter für Untersuchung auf Lungenwurmlarven) untersucht (Cabaret and Mangeon, 1994).

PODSTATZKY führte einen 2-jährigen Weideversuch mit Lämmern durch, bei dem er eine einmalige Kalkstickstoffdüngung mit 1200 kg/ha im Mai mit einer regelmäßigen Behandlung der Weide mit effektiven Mikroorganismen verglich. Je 44 Lämmer waren auf vier Gruppen aufgeteilt. Körpergewicht und EpG aller Tiere wurden in Woche eins, vier und 14 nach der Düngung bestimmt und zusätzlich im Juni und August die Larvenbelastung der Weiden untersucht. Welche Methoden zur Probenuntersuchung gewählt worden sind, ist nicht genauer beschrieben. Trotz einer deutlich erhöhten Düngermenge, im Vergleich zur empfohlenen, war der EpG in der Kalkstickstoffgruppe, sowie die Larvenbelastung der Weide, im zweiten Jahr signifikant höher als in den restlichen Gruppen. Der Autor folgert, dass eine einmalige Kalkstickstoffdüngung zu Beginn der Weide bei intensiver Weidehaltung keinen Effekt auf Larvenbelastung der Weide und die Infektion mit Parasiten der Tiere hat. Jedoch weist er darauf hin, dass seine Datensätze klein und die Streuung der Werte hoch war.

Insgesamt konnte in keinem Feldversuch eine signifikante Wirkung einer Kalkstickstoffdüngung in empfohlener Dosierung bis 400 kg/ha auf die infektiösen Larvenstadien von MDS oder deren Infektionen bei Pferden oder Wiederkäuern nachgewiesen werden. Jedoch scheint sich eine Wirkung bei höherer Dosierung abzuzeichnen (Leiper, 1937). In den beiden oben beschriebenen Rinderstudien von

POUPLARD und PECHEUR (1977) bzw. von BROZEIT und WIENERS (1976) fehlt die Untersuchung der Grasproben der Weiden für eine umfassende Beurteilung der Kalkstickstoffwirkung.

Im Feldversuch dieser Arbeit war die Larvenbelastung auf den Weiden am Mittelweg zu Beginn der Weidesaison so gering bzw. negativ, dass, vermutlich bereits hier, die Düngung keine weitere Dezimierung erbringen konnte. Interessant wäre eine weitere Düngung nach Anstieg der EpG-Werte in den Kotproben gewesen. Allerdings konnte auf den Weiden am Eichendamm, trotz optimaler Ausgangsbedingungen, keine verstärkte Reduktion der Larvenbelastung durch die Kalkstickstoffdüngung im Vergleich zur ungedüngten Weide beobachtet werden.

5.3. Grastöpfchenversuch

Mit Hilfe des Grastöpfchenversuch wurde versucht, den Zustand auf der Weide möglichst realitätsgetreu für Versuche im Labor abzubilden. Mit diesem Modell lassen sich Anhaltspunkte für die Wirkung des Düngers auf dem Feld gewinnen, jedoch lassen sich die Ergebnisse nicht 1:1 übertragen. Bei Versuchen mit Kalkstickstoff oder Cyanamid in vitro kann immer nur die direkte Düngerwirkung auf die Larven untersucht werden, nicht deren Infektiösität auf die Wirtstiere. Letztere kann nur im Feldversuch ermittelt werden.

Der Laborversuch hatte jedoch einige entscheidende Vorteile, so konnten kontrollierte Temperatur- und Feuchtigkeitsbedingungen eingehalten werden. Auch andere Rahmenbedingungen wie z.B. die Anzahl der aufpipettierten Larven, Bewuchs, Bewässerung konnten nach Wunsch gesteuert werden. Das gesamte Probenmaterial aus den Töpfchen konnte untersucht werden. Ein großer Vorteil im Vergleich zum Feldversuch, bei dem die Gras- und Erdproben immer nur einen kleinen Teil der Versuchsfläche abdecken.

Die eingesetzten Töpfchen wurden mit Universal Blumenerde (aus dem OBI-Baumarkt) bis zu einer Höhe von 10 cm befüllt und mit Deutschem Weidelgras bepflanzt. Deutsches Weidelgras ist in Deutschland weit verbreitet und wird häufig als Weidegras und zur Futtergewinnung von Heu und Silage genutzt. Zu beachten ist jedoch, dass dieses oder ähnliche Gräser meist nicht alleine auf Pferdeweiden vorkommen, sondern Rasenmischungen aus verschiedenen Gräsern und Kräutern. In einer Arbeit von KNAPP-LAWITZKE et. al. (2014) wurden bei Weide-Zusammensetzungen mit höherem Leguminosen-Anteil mehr infektiöse L3 von *C. oncophora* auf dem Bewuchs gezählt (Knapp-Lawitzke et al., 2014a). Somit hat die Art des Grünlandes scheinbar Einfluss auf die Zahl der Larven auf dem Gras. In anderen in vitro Versuchen wurde jedoch vollständig auf die Anzucht von Gras verzichtet. Die Wirkung verschiedener Stoffe auf die Parasitenlarven wurde direkt in Petrischalen in Mischungen aus Torf, Spänen oder Kot getestet (Podstatzky, 2013; 2012; Gevrey 1965; Pecheur, 1962; Leiper, 1937). Nur PODSTATZKY führte einen ähnlichen Versuch mit Grastöpfchen durch. Welches Gras angezchtet wurde, wird in der Veröffentlichung jedoch nicht erwähnt (Podstatzky, 2013; 2012).

Universal Blumenerde wurde ausgewählt, da diese zuvor erfolgreich zur Standardisierung des Erd- und Graswasch-Verfahrens eingesetzt wurde (Knapp-Lawitzke et al., 2014b, Demeleret al., 2012). Jedoch unterscheidet sich die Blumenerde in einigen Punkten von Naturböden, die man auf Pferdeweiden findet. So wurde hier speziell in einem Versuch die Wasseraufnahmekapazität der eingesetzten Blumenerde und eines für Berlin/ Brandenburg typisch sandigen Bodens verglichen. Es stellt sich die Frage ob die höhere Wasseraufnahmefähigkeit der Blumenerde von 50 %, im Vergleich zu 19 % bei der Feldwegerde, einen Einfluss auf die Verfügbarkeit und Wirksamkeit des Cyanamids hat. Dieses ist wasserlöslich, liegt also in der wässrigen Phase des Bodens vor. Eine erste Vermutung war, dass in der Blumenerde, durch den höheren organischen Anteil und somit die erhöhte Wasseraufnahmekapazität, das Cyanamid verdünnt wird und die Wirkung somit vermindert ist. Jedoch ist auch zu bedenken, dass bei sandigeren Böden das Wasser schneller abfließt, da es nicht vom Boden gespeichert werden kann und so das Cyanamid vermutlich schneller ausgewaschen wird. Nach Aufpipettieren der Larven und Düngung eines Töpfchens wurde dieses nur noch mit einer Sprühflasche gewässert, sodass der Boden zwar feucht war und der Dünger reagieren konnte, jedoch kein Cyanamid ausgewaschen wurde.

Um den Einfluss des Bodens auf die Cyanamid-Verfügbarkeit besser einschätzen zu können, wurden mit Kalkstickstoff gedüngte Erdproben im Labor auf den Cyanamidgehalt untersucht. Hier zeigten sich in der Blumenerde höhere Werte an Cyanamid pro kg als in der Feldwegerde. Ungedüngt zeigten beide Böden ähnlich niedrige Werte. Zwei Tage nach der Düngung lagen die Werte bei der Blumenerde im Mittel bei 305 mg/kg, in der Feldwegerde dagegen nur bei 183 mg/kg. Auch bei den Messungen sieben und 14 Tage nach Düngung waren die Werte in der Blumenerde durchgängig höher als in der Feldwegerde. Zu den

Probezeitpunkten zwei Tage und sieben Tage nach der Düngung war der Cyanamidgehalt in der Blumenerde signifikant höher als in der Feldwegerde.

Zu beachten ist, dass die Proben aus nur halb-befüllten Erdtöpfchen ohne Grasbewuchs stammen, also die ermittelten Cyanamid-Werte tendenziell höher sind als in den im Versuch verwendeten Grastöpfchen oder draußen auf dem Feld. Nach Umrechnung des Cyanamidgehalts von Gewichtsprozent auf Volumenprozent, nähern sich die Werte deutlich an (s. 0), was am unterschiedlichen Gewicht der Böden liegt. Dies zeigt, dass, bei gleicher Düngermenge, der Cyanamidgehalt in beiden Böden ähnlich hoch ist, trotz unterschiedlichem Gewicht und Wasserbindungsvermögen.

Vor Befüllung der Töpfchen wurde die Erde 30 Stunden bei 100°C erhitzt, wie es auch KNAPP-LAWITZKE et.al. bei den Versuchen zur Standardisierung der Methode taten (Knapp-Lawitzke et al., 2014b). So konnten die dort benutzten Wiederkäuerlarven, ohne Beeinträchtigung anderer Bodenorganismen wiedergewonnen und ausgezählt werden. Durch einen technischen Defekt wurde die Erde in diesem Versuch jedoch nicht 30 Stunden bei voller Temperatur erhitzt, sodass noch immer lebende Erdnematoden vorhanden waren. Diese stellten bei der Auszählung kein Hindernis dar, weil L3 der kleinen Strongyloiden der Pferde durch ihren langen Scheidenschwanz einfach von Erdnematodenlarven differenziert werden können.

Trotz ungenügender Erhitzung ergaben sich, auch nach längeren Versuchszeiten, keine störende Schimmelpilzkontamination auf den Töpfchen, wie es PODSTATZKY (2012) bei seinem Versuch mit Grastöpfchen berichtete (Podstatzky, 2012). Diese wurden jedoch nicht im Inkubator bei kontrollierter Temperatur, sondern bei Raumtemperatur und hoher Sonneneinstrahlung auf der Fensterbank gelagert. Um möglichst realitätsnahe Verhältnisse zu schaffen, standen die Töpfchen hier im Klimaschrank mit Licht- und Temperaturprofil, welches sich am vom Hersteller empfohlenen Düngezeitpunkt – zur Forsythienblüte - für Kalkstickstoff für Grünflächen orientiert (AlzChem Group AG). Die Düngung zum Vegetationszeitpunkt im Frühjahr soll laut Hersteller, neben der normalen Düngerwirkung auch Unkräuter zurückdrängen und überwinterte Parasitenlarven auf der Weide dezimieren. Bei starker Parasitenbelastung wird von der Firma AlzChem eine Nachdüngung im Juli/August empfohlen. Für den Töpfchenversuch wurde im Inkubator ein Temperaturprofil eingestellt, welches sich an Frühjahrstemperaturen in Deutschland von den letzten Jahren orientierte (Deutscher Wetter Dienst). Laut einer Untersuchung von BAUER (2006) mit *H. contortus* Larven ist die Wirkung des Cyanamids bei höheren Temperaturen verstärkt. So benötigt man bei 4°C die 2,6- bis 4-fache Menge an Cyanamid um den gleichen Effekt wie bei 22°C zu erreichen (Bauer, 2006). Mit einer Temperatur von 17°C während der Tagperiode sollte im Inkubatorversuch eine ausreichende Wirkung des Düngers gewährleistet sein. Noch höhere Temperaturen zu wählen, würde die Situation in vivo auf dem Feld nicht darstellen. Um starke Temperaturschwankungen in den kleinen Töpfchen zwischen der Nacht- (5°C) und Tagzeit (17°C) zu vermeiden, standen die Grastöpfchen zur Isolierung in Styroporummüllungen.

Die auf die Töpfchen aufgebrachte Düngermenge entspricht einer Menge von 400 kg/ha, also der oberen, vom Hersteller empfohlenen Menge für Pferdeweiden (AlzChem Group AG).

Die im Feldversuch bzw. im Töpfchenversuch angewandten Methoden zur Gewinnung von L3 aus Gras- und Erdproben wurden vor kurzem am Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der FU Berlin entwickelt und auch in einer weiteren Studie eingesetzt (Knapp-Lawitzke et al., 2014a). Beide Methoden sind mit einfachen Hilfsmitteln umzusetzen, welche vor Ort am Institut verfügbar waren (Knapp-Lawitzke et al., 2014b; Demeler et al., 2012). Mit der von DEMELER et. al. beschriebenen Graswaschmethode können, im Vergleich zu anderen Methoden, gut reproduzierbare Ergebnisse und, bei vergleichsweise kurzer Arbeitszeit, hohe Wiedergewinnungsraten der Larven von 67-93 % erreicht werden. Auch bei Feldproben wurde die Methode erfolgreich angewandt (Demeler et

al., 2012). Sie ist durch die Zentrifugationsschritte genauer als verschiedene Modifikationen der Baermann-Filtermethode (Krecek and Maingi, 2004; Raundrup et al., 2003; Chiejina, 1982), jedoch nicht so aufwändig wie andere Methoden, bei denen halb-automatische Apparaturen aus Waschmaschinen oder Zementmischern gebaut wurden (Krecek and Maingi, 2004; Matthee et al., 2002; Raynaud and Gruner, 1982; Smeal and Hendy, 1972). Diese erwiesen sich, in der Zahl der wiedergewonnenen Larven, dem modifizierten Baermann-Filter als überlegen (Krecek and Maingi, 2004). Der Vorteil von Methoden, die nicht auf dem Baermann-Filter beruhen, ist, dass sie nicht auf die aktive Wanderung der Larven angewiesen sind, sondern auch weniger motile Larven aus den Proben gewinnen können.

Bei dem Töpfchenversuch dieser Arbeit wurde ergänzend zur Methode von DEMELER et al. (2012) die Zuckerzentrifugation angeschlossen, welche den Verschmutzungsgrad der konzentrierten Larvensuspension noch einmal reduziert. Ursprünglich durch CAVENESS und JENSEN (1955) eingesetzt, wird diese immer häufiger mit Erfolg angewandt (Knapp-Lawitzke et al., 2014b; Krecek and Maingi, 2004; Matthee et al., 2002) und hat den Vorteil, dass diese den Zentrifugationsschritt mit anderen Chemikalien, wie Magnesiumsulfat oder Kaliumiodid, ersetzen kann (Martin et al., 1990; Chiejina et al., 1982). Außerdem wurde stets die gesamte, aufgereinigte Larvenpopulation ausgezählt und nicht, wie zuvor beschrieben, die Larven aus mehreren Aliquots (Demeler et al., 2012).

Im durchgeführten Töpfchenversuch wurde mit einer Menge von 1000 aufgebrachten L3 gearbeitet. Die Wiedergewinnungsrate nach Aufreinigung der Gras- und Erdproben lag im Mittel bei 27,5 %, was deutlich unter den Werten von DEMELER et al. 2012 von 67-93 % lag. Diese Werte galten jedoch für reine Grasproben, die 24 Stunden mit den Larven in einzelnen geschlossenen Gefäßen inkubiert wurden. Als diese Methode bei angepflanzten Grastöpfchen angewandt wurde, bei denen die Larven die Möglichkeit hatten, vom Gras in die Erde zu wandern, wurden hier ebenfalls Wiedergewinnungsraten bis max. 35 % erreicht, jedoch dies allein durch Waschung des Grases (Demeler et al., 2012). Die L3-Wiedergewinnungsrate schwankte lediglich in einem kleinen Bereich ($27,5 \pm 8,2$), so dass von einer aussagekräftigen Ermittlung der vorhandenen Larven ausgegangen werden kann. Dabei ist ebenfalls zu beachten, dass die Larven in der vorliegenden Studie bis zu 14 Tage in den Töpfchen verblieben, bevor sie wiedergewonnen wurden, und somit wesentlich länger als in der Studie von Demeler et al. (2012).

Die Methode der Wiedergewinnung von Larven aus Erdproben wurde nach dem Protokoll von KNAPP-LAWITZKE (2014b) durchgeführt. Nur die Maschenweite der Siebe wurden den etwas kleineren Pferdestrongyliden-L3 mit einer mittleren Breite von 24,1 μm (s. 3.2.19.3) angepasst. So wurden zuoberst Siebe mit einer Maschenweite von 150 bzw. 200 μm genutzt, durch die die Larven auf jeden Fall durchgewaschen wurden. Zum Auffangen wurde ein Sieb mit der Maschenweite von 20 μm genutzt, statt der 25 μm , die bei den Wiederkäuerstrongylidenlarven eingesetzt wurden. Mit Wiederfindungsraten von 61-89 %, unabhängig von der Anzahl der in der Erde enthaltenen Larven und niedriger Variabilität, ist diese Methode, ähnlich der Graswaschmethode, anderen überlegen (Knapp-Lawitzke et al., 2014b). Zudem sind wiederum keine giftigen Chemikalien oder aufwändige Apparaturen im Einsatz wie bei anderen beschriebenen Vorgängen (Young and Trajstman, 1980; Verschoor and De Goede, 2000).

Bezogen auf die drei Erdschichten befanden sich über 90 % der Larven in der obersten Erdschicht. In den tieferen Schichten fanden sich nur vereinzelte Larven. Um den Arbeitsaufwand zu reduzieren, wäre es für zukünftige Versuche sicherlich ausreichend nur die oberste Erdschicht zu waschen und diese dabei vielleicht auf 3-4 cm auszudehnen.

Problematisch, hinsichtlich der Aufreinigung der L3 aus Erdproben war das allmähliche Verstopfen der Siebe mit kleinen Erdbestandteilen. Abhilfe konnte mit einer Zahnbürste geschaffen werden, mit der das obere Sieb zwischen den Proben gereinigt wurde.

Da die wiedergewonnenen Gesamtlarvenzahlen der gedüngten Töpfchen (302 ± 84) im Mittel höher lagen als die der ungedüngten Töpfchen (250 ± 74) wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet. Stattdessen wurden die Ergebnisse des Fitnessstestes miteinander verglichen. Hierdurch sollte geklärt werden, ob die Larven durch das Cyanamid hinsichtlich ihres Migrationsverhaltens beeinträchtigt wurden. Jedoch zeigte sich auch hier kein signifikanter Unterschied. Bei der Auszählung der Larven nach Durchführung des Fitnessstests zeigten sich bei gedüngten sowie ungedüngten Töpfchen gut bewegliche sowie immotile Larven. Zu berücksichtigen sind beim Fitnessstest, der den Proben beigemengte Schmutz und die ebenfalls vorhandenen Erdnematoden-Larven. Hierdurch kann es zu einer Verstopfung der Siebe (mit einer Maschenweite von $22 \mu\text{m}$) gekommen sein. Bei der Durchführung des auf dem identischen Prinzip beruhenden LMIA wurden, aufgrund der besseren Wanderungsrate, Siebe mit einer Maschenweite von $28 \mu\text{m}$ eingesetzt. Durch Verbesserung einiger Faktoren, wie der Maschengröße oder erfolgreicher Erhitzung und somit Abtötung der Erdnematoden, ließe sich im Fitnessstest sicher noch eine bessere Wanderungsrate der Parasitenlarven erreichen. In diesem Fall lagen bei allen Proben die gleichen Bedingungen vor, sodass ein Vergleich der gedüngten und ungedüngten Töpfchen dennoch möglich ist.

Betrachtet man dagegen den Aufenthaltsort der Larven, so zeigt sich ein deutlicher Unterschied. Bei den gedüngten Töpfchen befanden sich signifikant weniger Larven auf dem Gras als bei den ungedüngten Töpfchen. Dies könnte zur Schlussfolgerung führen, dass die Motilität der Larven durch den Kalkstickstoffdünger negativ beeinflusst wird und sich diese nicht mehr auf das Gras bewegen können. Jedoch hätte die verminderte Motilität auch im Fitnessstest durch eine verminderte Wanderungsrate auffallen müssen.

Bei den zusätzlichen Grastöpfchen wurden vier ungedüngte Töpfchen, vier Töpfchen mit der einfachen Düngermenge, vier Töpfchen mit der doppelten Menge (= 800 kg/ha) Dünger sowie vier Töpfchen mit der 10-fachen Menge (= 4000 kg/ha) Dünger angesetzt. Alle wurden nach 14 Tagen gewaschen und ausgewertet. Hier zeigte sich, ab der doppelten Düngermenge, ein signifikanter Abfall der Wanderungsrate der aus den Töpfchen gewonnenen Larven im Fitnessstest. Durch die Zugabe der doppelten Düngermenge verminderte sich die Wanderungsrate signifikant von ca. 40% auf 15% , bei der 10-fachen Menge auf nur noch 10% , was einer Reduktion um $62,5\%$ bzw. 75% entspricht.

PODSTATZKY (2012) verwendete in seiner Studie mit $1,2 \text{ g}$ Kalkstickstoff pro 200 cm^2 (entspricht 600 kg/ha) ebenfalls eine über der Empfehlung liegende Menge an Kalkstickstoffdünger. Er erreichte nach einer Woche eine Reduktion der wiedergewonnenen Larven um 67% , nach zwei Wochen um $>95\%$. Die mit $1300 H. contortus$ -Drittlarven besetzten Grastöpfchen wurden allerdings nicht im Klimaschrank, sondern bei Zimmertemperatur auf der sonnenbeschienenen Fensterbank aufgestellt. Zwischen den gedüngten und ungedüngten Töpfchen wurde die Anzahl der, mit Hilfe des Auswanderungsverfahrens nach Baermann-Wetzel wiedergewonnenen, Larven verglichen. Die Ergebnisse wurden wegen der geringen Wiederholungszahl (drei Wiederholungen pro Variante) nur deskriptiv tabellarisch aufgelistet und nicht statistisch ausgewertet, womit eine Aussage über die Signifikanz der Düngewirkung nicht machbar ist. Aufgrund der Unterschiede hinsichtlich der Versuchsdurchführung lassen sich die Untersuchungsergebnisse nicht direkt mit den hier gewonnenen Ergebnissen vergleichen, jedoch zeichnen sich Parallelen ab. So musste PODSTATZKY erst die empfohlene Menge an Dünger auf das Doppelte erhöhen, um eine Reduktion der Wiedergewinnungs- bzw. Wanderungsrate von $>60\%$ nachzuweisen. Auch die Entwicklung vom Ei zur L3 scheint durch die Menge von 600 kg/ha Kalkstickstoffdünger gehemmt zu werden. Dieser Effekt zeigt sich auf den Grastöpfchen sowie in Petrischalen, die mit einem Gemisch aus Holzspänen, Kot und Kalkstickstoff angesetzt waren (Podstatzky, 2012, 2013).

Eine weitere Studie mit Schafparasiten aus dem Jahr 1965 untersucht die Wirkung von Kalkstickstoff, ebenfalls in Petrischalen. In niedriger Dosierung gab es eine gute Wirkung

gegen unreife Larvenstadien, bei einer deutlich höheren Dosierung von 3 g pro Petrischale (entspricht 1000 kg/ha) konnten nach vier Tagen keine lebenden L3 mehr gefunden werden. Bei 1,5 g (500 kg/ha) lag die Mortalität der Drittlarven nach vier Tagen Inkubation in der Petrischale bei knapp 90 %. Eine statistische Auswertung der Ergebnisse fand nicht statt (Gevrey, 1965). Zu beachten ist jedoch, dass bei gleicher Grundfläche von Petrischale und Grastöpfchen, der Kalkstickstoff in der Petrischale aufgrund der geringeren Menge an Substrat deutlich konzentrierter vorliegt. PECHEUR (1962) konnte ebenfalls *in vitro* eine Wirksamkeit von Kalkstickstoff gegen die Eier und frühe Larvenstadien von *Trichostrongylus* spp. und *Strongyloides* spp. feststellen. Die Larven bzw. Eier wurden zusammen mit unterschiedlicher Menge an Kalkstickstoffdünger (75, 150, 300 kg/ha) in Petrischalen mit Substrat aus sterilisiertem Torf und Kot gegeben. Aus dem Probenmaterial wurden nach einer Inkubation bei 20-24°C nach sieben Tagen mithilfe des Baermann-Trichter-Verfahrens die Larven wiedergewonnen. Bei 300 kg/ha gab es eine Reduktion unreifer Larven zwischen 80 und 99 %, bei Drittlarven lag diese bei 25 % (Pecheur 1962).

In einer weiteren Studie wurden ebenfalls verschiedene Mengen Kalkstickstoff mit 110 g Erde und infektiösen *Sclerostomen*-Larven (v.a. *Trichonema*, aber auch *Triodontophorus serratus* und *S. vulgaris*) gemischt und in Petrischalen angesetzt. 2 g Kalkstickstoff tötete alle Larven innerhalb von 19 h ab, bei nur noch 0,25 g waren die Larven nach 48 h noch nicht abgetötet. Bei einem „indoor-experiment“ auf einer kleinen Grasfläche wurde mit umgerechnet 560 kg/ha bzw. 1120 kg/ha gedüngt und im Vergleich zur ungedüngten Fläche eine Abtötung der infektiösen Larven von 55 % bzw. 85 % erreicht. Zur Wiedergewinnung der Larven wurde hier die Baermann-Filter Methode eingesetzt und, um das Ergebnis zu verbessern, der Aufwuchs und die verschiedenen Erdschichten getrennt getrichtert (Leiper, 1937).

Wie auch die vorliegende Prüfung bei erhöhter Düngermenge gezeigt hat, wurde in bisherigen Studien meist ebenfalls nur eine gute Wirksamkeit von Kalkstickstoff gegen infektiöse Drittlarvenstadien verschiedener Parasitenarten erreicht, wenn die Düngermenge deutlich über der aktuell vom Hersteller empfohlenen Menge von 300-400 kg/ha lag. Bei der doppelten Menge war die Wanderungsrate im Fitnesstest signifikant reduziert. Bei allen älteren Studien wurde keine statistische Datenauswertung vorgenommen, es erfolgte lediglich eine deskriptive Auflistung. Es wurden unterschiedliche Methoden zur Larvenwiedergewinnung eingesetzt und meistens die Gesamtlarvenzahlen verglichen oder optisch, durch den Untersuchenden, die lebenden von den toten Larven unterschieden. Auch die verschiedenen, jeweils verwendeten Substrate machen einen Vergleich der Studien schwierig. Die gleiche Menge Kalkstickstoff pro Fläche ist in einer Petrischale aufgrund des geringen Substrat-Anteils deutlich stärker konzentriert als in einem Grastöpfchen. So werden *in vitro* bessere Ergebnisse erzielt, welche aber nicht notwendigerweise auf das Feld übertragen werden können, da hier die Ausgangsbedingungen anders sind. Einige Studien konnten jedoch eine gute ovizide sowie larvizide Wirkung gegen frühe Larvenstadien auch bei niedrigeren Kalkstickstoffmengen zeigen (Gevrey, 1965; Pecheur, 1962). Die infektiösen L3 sind gegen die empfohlene Menge Kalkstickstoff jedoch vermutlich deutlich widerstandsfähiger und dadurch scheinen im Feld sehr hohe Kalkstickstoffmengen nötig zu sein, um einen merklichen Effekt zu erzielen.

5.4. LMIA

Vielfältige Einflussfaktoren erschweren bei einem Feldversuch eine präzise Aussage über die anthelminthische Wirkung des Kalkstickstoffdüngers. Neben dem Töpfchenversuch, der die Verhältnisse auf der Pferdeweide nachzustellen versuchte, wurde auch ein in-vitro Test durchgeführt, bei dem die direkte Wirkung des Cyanamids auf L3 kleiner Strongyliden getestet wurde. Der LMIA wird zur Überprüfung der Resistenzlage von Parasiten gegenüber Anthelminthika eingesetzt, oder auch um die Wirksamkeit neuer anthelminthischer Stoffe zu testen. Neben dem LMIA werden auch der Egg-Hatch-Test (EHT) und der Larval-Development-Assay (LDA) für diese Zwecke eingesetzt. Beim EHT wird die Hemmung der Entwicklung vom Ei zur Larve getestet, hauptsächlich mit Benzimidazolen als Wirkstoff, da diese eine gute ovizide Wirkung haben (Demeler et al., 2010b; Samson-Himmelstjerna et al., 2009). Dagegen haben z.B. ML eine gute Wirksamkeit auf die somatische Muskulatur, beeinflussen also die Motilität der Larven, was sich gut im LMIA ausnutzen lässt (Demeler et al., 2010b). Beim LDA wird die Wirkung von Anthelminthika auf die Larvenentwicklung untersucht. Durch Hemmung der Pharynxmuskulatur und der daraus resultierenden Verhinderung der Nahrungsaufnahme wird die Entwicklung der Larven gehemmt. Da die Pharynxmuskulatur um das 100-fache sensibler reagiert als die somatische Muskulatur, ist der LDA genauer und benötigt niedrigere Wirkstoffkonzentrationen als der LMIA. Jedoch ist der LDA ein sehr fragiles System mit vielen Einflussfaktoren. Zudem wird immer frischer Kot, von Tieren, die mit den gewünschten Parasiten infiziert sind, benötigt. Der kommerzielle LDA „DrenchRite“ ist dagegen ein einfacherer Test, der in fast jedem Labor durchgeführt werden kann. Die für die Tests benötigten L3 können nach Gewinnung in Kulturflaschen gelagert werden (Demeler et al., 2010).

Der für die Wirksamkeitsstudie von Cyanamid durchgeführte LMIA, wird in der Literatur in verschiedensten Durchführungsvarianten beschrieben. In Vorläufern des eigentlichen Assays wird die Motilität der Larven subjektiv durch visuelle Prüfung beurteilt (Bauer, 2006; Boisvenue et al., 1983). Ebenfalls wurde ein Micromotility Meter entwickelt, welches die Helminthenbewegung quantitativ misst und darstellt. Dieses lässt sich mit den Larven oder Adulten verschiedenster Helminthenarten nutzen und zeigte sich dabei sensitiv und die Ergebnisse gut reproduzierbar (Folz et al., 1987).

Die in der Literatur zu findenden Beschreibungen der Durchführung des LMIA sind nicht einheitlich. Nach einigen Ansätzen mit aufwendigerem Agar-Sieb-System (Douche 1993, Kotze et al., 2006), setzte sich die Methode mit Sieben, welche in Well-Platten eingesetzt werden, durch (McArthur et al., 2015; Demeler et al., 2012; Demeler et al., 2010a; Claerebout et al., 1999; Rabel et al., 1994). Überwiegend wurden die Larven-Assays mit MDS-Larven von Rindern oder Schafen durchgeführt: *H. contortus* (Demeler et al., 2010a; Kotze et al., 2006; Folz et al., 1987; Boisvenue et al., 1983) *T. colubriformes* (Rabel et al., 1994; Rothwell and Sangster, 1993; Douch 1993; Wagland et al., 1992), *O. ostertagii* (Demeler et al., 2010a; Demeler et al., 2010b; Claerebout et al., 1999), *C. oncophora* (Demeler et al., 2010a; Demeler et al., 2010b). Nur wenige Studien verwendeten kleine Strongylidenlarven vom Pferd (Mc Arthur et al., 2015; van Doorn et al., 2010; Tandon and Kaplan, 2004; Konigova et al., 2003). In einem Ringversuch mit verschiedenen Laboren wurde versucht, den LMIA für die Ermittlung des Resistenz-Status von Rinder- und Schaf-Nematoden gegen Ivermectin zu standardisieren. Das Protokoll für die Durchführung des Assays wurde für den Versuch in dieser Arbeit übernommen und nur leicht angepasst (Demeler et al., 2010a). Als Siebgrößen wurden im Ringversuch für die Rinder-Parasiten Siebe mit einer Maschengröße von 28 µm gewählt, für die Schaf-Parasiten 25 µm. Die Maschenweite sollte abhängig von der Größe der im Assay eingesetzten Larven, der Wanderungszeit und der allgemeinen Aktivität der Larven gewählt werden. Bei entscheideten Larven, wie sie in einigen Versuchen eingesetzt wurden, sind Siebe mit geringerer Maschenweite notwendig, z.B. für entscheidete *Trichostrongylus*-Larven 20 µm (Rabel et al., 1994; Wagland et al., 1992). In einer Studie wurden für die Wanderung von entscheideten

Pferde-Strongylidenlarven Siebe mit einer Maschenweite von 40 µm gewählt, hier betrug die Wanderungszeit jedoch auch nur eine Stunde anstatt 24 Stunden (van Doorn et al., 2010).

Ein Aspekt, der die Durchführung des LMIA unter Verwendung von kleinen Strongylidenlarven kompliziert macht, ist die Tatsache, dass diese aus einer Gruppe 50 verschiedenen Arten besteht. Wichtig für die Migration ist eine einheitliche Größe der Larven. Hier bestand die Befürchtung, dass die L3 verschiedener kleiner Strongyliden unterschiedlich groß sind und die kleineren Larven einfacher und schneller durch die Siebe wandern als die größeren. Dies bestätigte sich nach Messung von über 200 der für den Versuch eingesetzten, kleinen Strongylidenlarven jedoch nicht. Bei Messung der bescheideten, hitzegetöteten Larven hatten diese eine mittlere Breite von 24,9 µm mit nur einer geringen Abweichung von 2,1 µm. Vor Durchführung der Prüfung des Effekts von Cyanamid im LMIA wurde ein Vortest mit Sieben der Maschenweite 20 µm, 22 µm, 25 µm und 28 µm durchgeführt. Mit der höchsten Wanderungsrate bei einer Maschenweite von 28 µm und noch akzeptabler Durchfallquote von <10 %, wurden diese Sieben für den folgenden Larven-Assay verwendet. Trotz Filterung der Larven mit Hilfe des Baermann-Trichters, schienen Larven, die länger gelagert wurden und nicht kurz nach Gewinnung aus den Larvenkulturen eingesetzt worden sind, eine schlechtere Wanderungsrate aufzuweisen. Für den Versuch wurden daher ausschließlich Larven verwendet, die maximal eine Woche gelagert wurden. Die Inkubations- und Wanderungszeit mit je 24 Stunden und die Temperatur von 27°C wurde entsprechend vorheriger Erfahrung gewählt (Demeler et al., 2010a). In anderen Durchführungen des Assays wurden Inkubationszeiten von 2 Stunden, meist bei entscheideten und somit empfindlicheren Larven (Mc Arthur et al., 2015; Matthews et al., 2012; van Doorn et al., 2010; Claerebout et al., 1999; Rabel et al., 1994; Douch 1993; Wagland et al., 1992) bis 24 Stunden (Demeler et al., 2010a, 2010b; Kotze et al., 2006; Folz et al., 1987) verwendet. Bei der Prüfung der Wirkung von Cyanamid auf *H. contortus*-Larven wurden Einwirkzeiten von 24 Stunden, 48 Stunden und 8 Tagen gewählt (Bauer, 2006). Auch die Wanderungszeit variiert in den verschiedenen Studien von 1 Stunde (van Doorn et al., 2010), 16 Stunden (Claerebout et al., 1999; Rabel et al., 1994; Douch and Morum, 1994; Wagland et al., 1992), 24 Stunden (Demeler et al., 2012, 2010a, 2010b) bis 48h (Kotze et al., 2006). Hinsichtlich der angewendeten Temperaturen bestehen ebenfalls erhebliche Unterschiede, diese liegen zwischen 4°C (Bauer, 2006) und 37°C (van Doorn et al., 2010; Claerebout et al., 1999; Rabel et al., 1994; Douch and Morum, 1994).

Wichtig bei der Wahl der Parameter ist, dass diese aufeinander, auf die eingesetzten Larven und auf den zu testenden Wirkstoff abgestimmt sind. Nach positiven Erfahrungen mit dem von DEMELER et.al. für Rinder- und Schafnematoden standardisiertem Protokoll (Demeler et al., 2010a), wurde dieses in der vorliegenden Arbeit erstmals für kleine Strongylidenlarven vom Pferd verwendet. Nach verschiedenen Probedurchgängen und Anpassung der Cyanamid-Konzentrationen war der Assay reproduzierbar und die Ergebnisse gut auswertbar. Alle Durchgänge mit einer Wanderungsrate über 75 % in der Negativkontrolle und unter 10 % in der Positivkontrolle wurden in die statistische Auswertung miteinbezogen. Die mittleren Wanderungsraten mit 84% in der Negativ- und 4% in der Positivkontrolle waren zufriedenstellend, jedoch nicht ganz so günstig wie DEMELER et. al. sie mit 96-100 % bzw. 0-1,2 % angeben hat (Demeler et al., 2010b).

Mit einer 0,09 %-igen Cyanamid-Lösung ließ sich die Wanderung von 50 % der kleinen Strongylidenlarven hemmen, eine 95%-ige Inhibition wird durch eine 0,17 %-ige Cyanamid-Lösung erreicht. Eine Wirksamkeitsstudie von Cyanamid auf *H. contortus*-Larven wurde bereits 2006 am Institut für Parasitologie der Justus-Liebig-Universität in Giessen durchgeführt, jedoch nach anderer Methodik (Bauer, 2006). In dieser wurde jedoch kein Larvenassay durchgeführt, sondern es erfolgte nur eine visuelle Beurteilung der Larven. Für die L3 von *H. contortus* wurde bei vergleichbaren Inkubationsbedingungen ein IC50 von 1,3 % Cyanamid und ein IC95 von 2,7 % Cyanamid angegeben (Bauer, 2006). Andere Studien mit vergleichbaren Werten für kleine Strongyliden liegen derzeit nicht vor.

Durch den Larvenassay ließ sich zeigen, dass Cyanamid eine hemmende Wirkung auf die infektiösen Larvenstadien kleiner Strongyliden besitzt. Das Ergebnis gab einen Anhaltspunkt für die im Boden nötige Cyanamidkonzentration, um die Parasitenlarven zu beeinflussen. Eine 0,17 %-ige Cyanamid-Lösung hemmte im Larvenassay die Wanderung von 95 % der Larven, was einer Menge von 1700 mg Cyanamid/Liter entspricht. In einem Kilogramm Boden wurden zwei Tage nach der Düngung Werte von 305 mg/kg gemessen, was weniger als 1/5 der Cyanamidmenge in der oben genannten Cyanamidlösung (0,17%) entspricht und im Bereich einer Hemmung von unter 5% der Larven liegt. Bei Düngung mit der doppelten Düngermenge lagen die Cyanamidwerte an Tag zwei nach der Düngung vermutlich im Bereich einer Hemmung von rund 50% der L3 (berechneter Wert, da für die doppelte Düngermenge nur Werte an Tag sieben und 14 im Labor untersucht wurden). Dies ließ e sich jedoch mit dem Versuch mit den Zusatzgrastöpfchen in Verbindung bringen. Bei der Düngung mit der doppelten der empfohlenen Düngermenge konnte eine signifikante Hemmung der Wanderung der Larven festgestellt werden. So kann man darauf schließen, dass eine Düngung mit einer Menge von 400kg/ ha Kalkstickstoff keinen nennenswerten Effekt auf die infektiösen L3 kleiner Strongyliden hat. Genauer in Augenschein zu nehmen wäre eventuell die Wirkung auf die Eier und frühen Larvenstadien, die meist sensibler reagieren (Pecheur, 1962).

5.5. Ausblick

Die Versuche dieser Arbeit und ältere Studien zusammenfassend hat eine Düngung von 300-400 kg Kalkstickstoff/ha auf Weideflächen keinen signifikanten Effekt auf infektiöse Larvenstadien. Erst in höherer Dosierung lässt sich eine Dezimierung der L3 kleiner Strongyliden erreichen (s. 4.3). Laborversuche verschiedener Studien zeigen eine bessere Wirksamkeit von Cyanamid gegenüber früheren externen Entwicklungsstadien von Weideparasiten, also den Eiern, L1 und L2 (Gevrey, 1965; Pecheur, 1962). Durch diesen Effekt könnte auch eine Wirksamkeit von Kalkstickstoff in anderen Studien erklärt werden (Pouplard and Pecheur, 1977; Brozeit and Wieners, 1976; Pecheur, 1962; Leiper, 1937). Durch die erneute Ausscheidung von Eiern durch den Wirt müsste man in diesem Falle jedoch eine mehrmalige Kalkstickstoffdüngung während der Weidesaison in Betracht ziehen oder eine Kombination aus Entwurmung, Düngung und Weiderotation durchführen. Dies erfordert jedoch größeren Aufwand und Flächen, da die Pferde während und nach der Düngung nicht auf die Weiden dürfen. Nach dem jetzigen Stand der Kenntnisse und den Ergebnissen dieser Arbeit ist es nicht empfehlenswert, sich bei der Bekämpfung der Weideparasiten beim Pferd nur auf die Kalkstickstoffdüngung zu verlassen. Der Einsatz von Anthelminthika scheint weiterhin unverzichtbar für die Aufrechterhaltung der Gesundheit der Pferde zu sein. Sie sollten aber sinnvoll und nach Plan eingesetzt werden, um die Entwicklung von Resistenzen nicht zu fördern. Ob und falls ja in welchem Umfang der Einsatz von Kalkstickstoffdüngung zu einer signifikanten Verminderung der Kontamination von Weideflächen mit L3 kleiner Strongyliden führen kann, sollte, genauso wie andere mögliche alternative Verfahren zur Parasitenbekämpfung, weiter untersucht werden.

6. Zusammenfassung

Kleine Strongyliden gehören heute beim Pferd zu den bedeutsamsten Parasiten (Peregrin et al., 2014). Sie sind auf Bestandsebene ubiquitär vorkommend und, u.a. durch ihren kurzen Entwicklungszyklus nicht aus dem Bestand zu tilgen. Aus den mit dem Kot ausgeschiedenen Eiern entwickeln sich in der Umwelt, bzw. auf der Weide, bei günstigen klimatischen Bedingungen, in kurzer Zeit infektiöse Drittlarven. Aufgrund ihrer Bescheidenheit sind sie sehr widerstandsfähig gegenüber Umwelteinflüssen und können lange auf Pferdeweiden überleben, auch der europäische Winter kann überdauert werden. Aufgrund des sich steigernden Vorkommens von kleinen Strongylidenpopulationen, die Resistenzen gegen die verfügbaren Anthelminthika entwickelt haben, sind alternative Bekämpfungsmaßnahmen von zunehmender Bedeutung. Hierzu zählen u.a. weidehygienische Maßnahmen, wie z.B. das Abäppeln der Weide. In dieser Hinsicht wurde während eines zweijährigen Projektes die Wirkung einer Kalkstickstoffdüngung von Pferdeweiden auf das Überleben, die Infektiösität und die Motilität von dritten Larven (L3) kleiner Strongyliden untersucht.

Kalkstickstoff reagiert bei Kontakt mit Bodenfeuchtigkeit über mehrere Schritte zu pflanzenverfügbarem Ammonium und Nitrat. Unter anderem entsteht bei dieser Reaktion Cyanamid, welches für die meisten Organismen toxisch ist. Für Wiederkäuerlarven wurden in der Vergangenheit einige Untersuchungen, mit unterschiedlichen Ergebnissen über den Einsatz von Kalkstickstoffdüngung in der Parasitenbekämpfung veröffentlicht. Auch bei Pferden könnte, durch das Unschädlichmachen der infektiösen Drittlarve, der Infektionszyklus unterbrochen und so das Risiko für eine erneute Infektion auf der Weide vermindert werden.

In einem Feldprojekt, welches 2014 während der Weidesaison von Mai bis Oktober auf einem großen Gestüt in Mecklenburg-Vorpommern durchgeführt wurde, sollte die Wirkung des Düngers getestet werden. Von den Pferden der Kontrollherde und den Versuchstieren auf der mit Kalkstickstoff gedüngten Weide wurden monatlich koproskopisch die Strongylideneinzahl pro Gramm Kot (EpG) mittels Mini-FLOTAC Verfahren bestimmt, sowie alle zwei bis vier Wochen Grasproben beider Weiden hinsichtlich der vorhandenen Strongylidenlarvenzahl untersucht.

Die EpG-Werte waren zu Beginn der Weidesaison niedrig und stiegen erst im Herbst in beiden Gruppen gleichermaßen an. Die Larvenzählungen der Weidegrasproben blieben in den ersten Monaten negativ bzw. sehr gering (46 Larven/kg Trockenmasse Gras) und stiegen erst im August auf 354 L3/kg (Kontrollgruppe) bzw. 648 L3/kg (Kalkstickstoff-Gruppe) an.

Eine zusätzliche, stark mit Larven kontaminierte Fläche (Ausgangswerte: Kontrollfläche: 46.494 L3/kg, Kalkstickstofffläche: 50.954 L3/kg) wurde in den Versuch mit aufgenommen und ebenfalls mit Kalkstickstoff gedüngt, nachdem die Pferde auf frische Weiden umgestellt worden sind. Nach drei Wochen fanden sich im Vergleich zum Ausgangswert noch 6% Larven auf der Kontrollweide und 36% Larven auf der mit Kalkstickstoff gedüngten Weide. Nach fünf Wochen lag die Anzahl der gefundenen Larven bei 18% (Kontrolle) und 24% (Kalkstickstoff) vom Ausgangswert.

Des Weiteren wurde im Labor ein Versuch unter Verwendung von Grastöpfchen im Klimaschrank durchgeführt. Hier sollte die Situation auf der Weide unter standardisierten Umweltbedingungen nachgestellt werden. Rund 60 Grastöpfchen (Durchmesser: 8,5 cm) wurden angepflanzt und jeweils 1000 infektiöse L3 kleiner Strongyliden pro Topf auf das Gras pipettiert. Die Hälfte der Grastöpfchen wurde mit der empfohlenen Menge Kalkstickstoff gedüngt, die andere Hälfte blieb ungedüngt als Kontrolle. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Düngung wurden Erde und Gras getrennt untersucht und nach entsprechendem, hierfür entwickelten Protokollen gewaschen, um die enthaltenen Larven zu gewinnen. Anschließend wurde in einer 24-Well-Platte mit Sieben (22 µm Maschenweite), ein Larven-Migrations-Test (Fittestest) durchgeführt, um lebende von toten Larven zu unterscheiden.

Es zeigten sich, im Hinblick auf die ermittelten Gesamtlarvenzahlen für die Grastöpfchen der beiden Gruppen und hinsichtlich der Ergebnisse des Fitnesstests keine signifikanten Unterschiede. Erst beim Vergleich der Larvenzahlen in der Erde bzw. auf dem Gras konnte festgestellt werden, dass sich bei den mit Kalkstickstoff gedüngten Töpfchen signifikant weniger Larven auf dem Gras und dafür mehr in der Erde befanden. Diese Beobachtung konnte aber bei Analyse weiterer Grastöpfchen, auf denen die doppelte sowie zehnfache Kalkstickstoffmenge aufgebracht wurde, nicht bestätigt werden. Allerdings wurde, bezüglich der von diesen Grastöpfchen gewonnenen L3, schon hinsichtlich der doppelten Düngermenge eine signifikant erniedrigte Wanderung der Larven im Fitnesstest beobachtet und bei der 10-fachen Menge eine nahezu vollständige Verhinderung der Wanderung.

Im letzten Teil der Arbeit wurden „Larven-Migrations-Inhibitions-Assays“ (LMIA) mit Drittlarven kleiner Strongyliden und verschiedenen konzentrierten Cyanamid-Lösungen durchgeführt. Da es noch keine Standardisierung dieses Assays für kleine Strongyliden gibt, wurde nach mehreren Vorversuchen eine Inkubation für 24 Stunden bei 27°C, sowie nachfolgend eine Wanderung durch Siebe mit einer Maschenweite von 28 µm für 24 Stunden bei gleicher Temperatur gewählt.

Nach Auswertung von 33 Durchgängen der Larven-Migrations-Inhibitions-Assays konnte gezeigt werden, dass eine 0,09%-ige Cyanamid-Lösung (922 mg/l) die Wanderung von 50% der Larven verhindert. Um 95% der Larven zu hemmen, ist eine 0,17%-ige Lösung (1742 mg/l) notwendig. In den analysierten Bodenproben konnten zwei Tage nach der Düngung maximal Werte von 183 mg/kg (Feldwegerde) bzw. 305 mg/kg (Blumenerde aus dem Töpfchenversuch) gemessen werden. Eine Wirkung des Cyanamids auf die Drittlarven kleiner Strongyliden konnte somit *in vitro* gezeigt werden. Jedoch scheint die benötigte Konzentration höher zu sein, als in praxi mit der empfohlenen Menge von 400kg/ha auf der Weide erreicht werden konnte.

7. Summary

The Effects of fertilization with calcium-cyanamide to the survival and infectivity of larvae from small strongyles of the horse:

In this thesis, the effect of calcium-cyanamide fertilizer on infectious larvae from small strongyles on horse pastures as well as in the laboratory was investigated.

Small strongyles rank among the most significant parasites of horses (Peregrin et al., 2014). Surveying farm level their appearance reach 100% and it's not possible to eliminate them completely from grazing horses. Worm eggs are excreted from the host via faeces. The development from the egg to the infective third larvae (L3) on the pasture can be very fast in favourable climatic conditions. The infectious larvae with its sheath is very resistant to environmental influences and can survive even winter in Europe on pastures .

On moist grounds calcium-cyanamide is reacting in several steps to the plant nutrients ammonium and nitrate. While this reaction takes place, toxic cyanamide is generated. Measurements taken to improve the pasture hygiene status would be very helpful on horse pastures too. Interruption of the development cycle by eliminating the infectious larvae on the field could help to reduce the necessity of anthelmintic treatments and therefore decelerate the development of resistances against them.

The calcium cyanamid fertilizer was tested in field 2014 from May till October during pasture season. Once per month faecal examinations were performed for every horse from the control group as well as the horses from the calcium-cyanamide fertilized pasture by using the Mini-FLOTAC method. Additionally the recovery of third stage larvae from grass samples were performed in 14 days intervals from both pastures (control and calcium-cyanamide fertilized)).

Furthermore an in vitro test with grass pots in the laboratory was performed to simulate the situation on the pasture under fixed conditions. About 60 grass pots were grown (diameter: 8,5 cm) and 1000 L3 were added. Half of the pots were fertilized with 0,23 g calcium-cyanamide per pot (400 kg/ha), the other half stayed without fertilizer as control.

At different points of time (2, 5, 8, 11,14 days after fertilization) grass and soil were analysed separately and washed following special protocols. A larval migration test (fitness-test) employing sieves with 22 µm mesh size in a 24-well-plate, was performed with the recovered larvae to separate the dead and alive ones.

The laboratory of "AlzChem" analysed several fertilized and non-fertilized soil samples from different grounds for their cyanamide content.

The last part of this study was the "larval migration inhibition assay" (LMIA) with small strongyle L3 and different cyanamide concentrations. Because of non existing standardized protocols, after some test runs, an 24 h incubation period at 27°C and a migration period (same time and temperature) through sieves with 28 µm mesh size was chosen.

In the field trial the number of eggs found in the faecal samples were negative or low in the beginning of pasture season. In autumn they increased in both groups comparably. The pasture larval counts were also negativ or very low in the first months (46 larvae per kilo dry mass grass) but increased in August to 354 larvae per kilo dry mass grass (control group) and 648 larvae per kilo dry mass grass (calcium cyanamide group).

Another pasture that was highly contaminated with small strongyle L3 (control pasture: 46.494 larvae per kilo dry mass grass, pasture later fertilized with calcium cyanamide: 50.954 larvae per kilo dry mass grass) was additionally included in the field test and one part was also fertilized with calcium cyanamide (400 kg/ha). Three weeks later at the control pasture only 6 % and at the calcium cyanamide pasture 36 % larvae , compared with the pre-fertilization time point were found. Five weeks after fertilization 18 % (control) respectively 24 % (calcium cyanamide) larvae were found, relating to the initial count on the pasture.

In the trial using grass pots no significant difference according calcium-cyanamide fertilization was seen, regarding the total amount of recovered larvae and the migration of the larvae in the fitness test. Comparing the amount of larvae on the grass and in the soil, there were significantly less larvae on the grass in the fertilized pots. However, this observation was not confirmed in an additional test with more grass pots. Here the double and tenfold amount of calcium cyanamide was used. Noteworthy this resulted in a significantly decreased migration of the recovered larvae in the fitness test.

Evaluating 33 cycles of the "larval-migration-inhibition-assay", it was shown that a 0,09%-cyanamide solution (0,9 g calcium cyanamide/l) inhibit the migration of the small strongyle L3 by 50 %. To achieve a 95 % inhibition of the larvae a 0,17% cyanamide solution (1700mg/l) is needed. In the analysed soil samples only 183 mg/kg (soil from the field) and 305 mg/kg (potting soil used in the tests) calcium cyanamide was found (2 days after fertilization). An effect of cyanamide on the L3 could be shown in vitro but the required concentrations seemed to be higher than those reached under field conditions.

8. Literaturverzeichnis

- Alanazi, A. D., Mukbel, R. M., Alyousif, M. S., AlShehri, Z. S., Alanazi, I. O. and Al-Mohammed, H. I. (2017) 'A field study on the anthelmintic resistance of *Parascaris* spp. in Arab foals in the Riyadh region, Saudi Arabia', *Vet Q*, 37(1), pp. 200-205.
- Almeria, S., Llorente, M. M. and Uriarte, J. (1996) 'Monthly fluctuations of worm burdens and hypobiosis of gastrointestinal nematodes of calves in extensive management systems in the Pyrenees (Spain)', *Vet Parasitol*, 67(3-4), pp. 225-36.
- AlzChem Group AG, Kalkstickstoff Perlka. Available at: <https://www.alzchem.com/de/landwirtschaft/kalkstickstoff-perlka/produkt> (Accessed: 20.12.2018).
- Amberger, A. (1961) 'Wirkung von Cyanamid auf Katalase und Peroxydase in Pflanzen', *Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung, Bodenkunde*, 95(2), pp. 123-130.
- Anderson, R., Chabaud, A. and Willmot, S. (2009) *Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates*. CABI Publishing.
- Archer, M. (1980) 'Grassland management for horses', *Vet Rec*, 107(8), pp. 171-4.
- Armstrong, S. K., Woodgate, R. G., Gough, S., Heller, J., Sangster, N. C. and Hughes, K. J. (2014) 'The efficacy of ivermectin, pyrantel and fenbendazole against *Parascaris equorum* infection in foals on farms in Australia', *Vet Parasitol*, 205(3-4), pp. 575-80.
- Atchison, W. D., Geary, T. G., Manning, B., VandeWaa, E. A. and Thompson, D. P. (1992) 'Comparative neuromuscular blocking actions of levamisole and pyrantel-type anthelmintics on rat and gastrointestinal nematode somatic muscle', *Toxicol Appl Pharmacol*, 112(1), pp. 133-43.
- Aubry, M. L., Cowell, P., Davey, M. J. and Shevde, S. (1970) 'Aspects of the pharmacology of a new anthelmintic: pyrantel', *Br J Pharmacol*, 38(2), pp. 332-44.
- Desinfektion in der Veterinärmedizin, A. d. D. V. G. e. V. (Stand: 06.01.2019) 'DVG-Desinfektionsmittelliste für Tierhaltung'. Available at: <http://www.desinfektion-dvg.de/index.php?id=2150>.
- Baermann (1917) 'Eine Einfache Methode zur Auffindung Von Ankylostomum (Nematoden) —Larven in Erdproben. Welteureden. Batavia: Genesk Lab Feestbundel. pp. 41–47.
- Bailey, M., Martin, S. C. and Lloyd, S. (1989) 'Immunologic and hematologic responses in ponies with experimentally induced *Strongylus vulgaris* infection', *Am J Vet Res*, 50(8), pp. 1386-91.
- Barda, B., Cajal, P., Villagran, E., Cimino, R., Juarez, M., Krolewiecki, A., Rinaldi, L., Cringoli, G., Burioni, R. and Albonico, M. (2014a) 'Mini-FLOTAC, Kato-Katz and McMaster: three methods, one goal; highlights from north Argentina', *Parasit Vectors*, 7(1), pp. 271.
- Barda, B., Ianniello, D., Zepherine, H., Rinaldi, L., Cringoli, G., Burioni, R. and Albonico, M. (2014b) 'Parasitic infections on the shore of Lake Victoria (East Africa) detected by Mini-FLOTAC and standard techniques', *Acta Trop*, 137, pp. 140-6.
- Barda, B., Zepherine, H., Rinaldi, L., Cringoli, G., Burioni, R., Clementi, M. and Albonico, M. (2013a) 'Mini-FLOTAC and Kato-Katz: helminth eggs watching on the shore of Lake Victoria', *Parasit Vectors*, 6(1), pp. 220.
- Barda, B. D., Rinaldi, L., Ianniello, D., Zepherine, H., Salvo, F., Sadutshang, T., Cringoli, G., Clementi, M. and Albonico, M. (2013b) 'Mini-FLOTAC, an innovative direct diagnostic technique for intestinal parasitic infections: experience from the field', *PLoS Negl Trop Dis*, 7(8), pp. e2344.
- Barrowman, M. M., Marriner, S. E. and Bogan, J. A. (1984) 'The binding and subsequent inhibition of tubulin polymerization in *Ascaris suum* (in vitro) by benzimidazole anthelmintics', *Biochem Pharmacol*, 33(19), pp. 3037-40.
- Baudena, M. A., Chapman, M. R., French, D. D. and Klei, T. R. (2000) 'Seasonal development and survival of equine cyathostome larvae on pasture in south Louisiana', *Vet Parasitol*, 88(1-2), pp. 51-60.

- Bauer, C. (2006) *Bericht über die vergleichende Prüfung der larviziden Wirkung von Kalkstickstoff (gemahlen) und Cyanamid L 500 auf Infektionslarven von Haemonchus contortus in vitro*, Gießen: Institut für Parasitologie.
- Beasley, A., Coleman, G. and Kotze, A. C. (2015) 'Suspected ivermectin resistance in a south-east Queensland *Parascaris equorum* population', *Aust Vet J*, 93(9), pp. 305-7.
- Becher, A. M. and Pfister, K. (2010) '[The efficacy of anthelmintic drugs against horse strongyles in the area of Salzburg and preliminary results of selective anthelmintic treatment]', *Wien Klin Wochenschr*, 122 Suppl 3, pp. 71-5.
- Beelitz, P. and Gothe, R. (1997) '[Endoparasitic fauna and incidence of species in yearling and adult horses in Upper Bavarian breeding farms with regular anthelmintic prophylaxis lasting for many years]', *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere*, 25(5), pp. 445-50.
- Bender, I. (2013a) *Praxishandbuch Pferdeweide*. Franckh Kosmos Verlag, S. 76-97.
- Bender, I. (2013b) *Praxishandbuch Pferdeweide*. Franckh Kosmos Verlag, S. 101f.
- Bender, I. (2013c) *Praxishandbuch Pferdeweide*. Franckh Kosmos Verlag, S. 125ff.
- Bender, I. (2013d) *Praxishandbuch Pferdeweide*. Franckh Kosmos Verlag, 146f.
- Bishop, R. M., Scott, I., Gee, E. K., Rogers, C. W., Pomroy, W. E. and Mayhew, I. G. (2014) 'Sub-optimal efficacy of ivermectin against *Parascaris equorum* in foals on three Thoroughbred stud farms in the Manawatu region of New Zealand', *NZ Vet J*, 62(2), pp. 91-5.
- Blackhall, W. J., Drogemuller, M., Schnieder, T. and von Samson-Himmelstjerna, G. (2006) 'Expression of recombinant beta-tubulin alleles from *Cylicocyclus nassatus* (Cyathostominae)', *Parasitol Res*, 99(6), pp. 687-93.
- Blackwell, N. J. (1973) 'Colitis in equines associated with strongyle larvae', *Vet Rec*, 93(14), pp. 401-2.
- Boersema, J. H., Eysker, M. and Nas, J. W. (2002) 'Apparent resistance of *Parascaris equorum* to macrocyclic lactones', *Vet Rec*, 150(9), pp. 279-81.
- Boisvenue, R. J., Brandt, M. C., Galloway, R. B. and Hendrix, J. C. (1983) 'In vitro activity of various anthelmintic compounds against *Haemonchus contortus* larvae', *Vet Parasitol*, 13(4), pp. 341-7.
- Borgsteede, F. H., Boersma, J. H., Gaasenbeek, C. P. and van der Burg, W. P. (1993) 'The reappearance of eggs in faeces of horses after treatment with ivermectin', *Vet Q*, 15(1), pp. 24-6.
- Brady, H. A. and Nichols, W. T. (2009) 'Drug Resistance in Equine Parasites: An Emerging Global Problem', *Journal of Equine Veterinary Science*, 29(5), pp. 285-295.
- Braga, F. R., Araujo, J. V., Silva, A. R., Araujo, J. M., Carvalho, R. O., Tavela, A. O., Campos, A. K. and Carvalho, G. R. (2009) 'Biological control of horse cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) using the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in tropical southeastern Brazil', *Vet Parasitol*, 163(4), pp. 335-40.
- Braga, F. R., Araujo, J. V., Soares, F. E., Araujo, J. M., Ferreira, S. R., Tavela Ade, O., Silveira, W. F. and Queiroz, J. H. (2013) 'Proteolytic action of the crude extract of *Duddingtonia flagrans* on cyathostomins (Nematoda: Cyathostominae) in coprocultures', *Rev Bras Parasitol Vet*, 22(1), pp. 143-6.
- Brazik, E. L., Luquire, J. T. and Little, D. (2006) 'Pyrantel pamoate resistance in horses receiving daily administration of pyrantel tartrate', *J Am Vet Med Assoc*, 228(1), pp. 101-3.
- Britt, D. P. and Clarkson, M. J. (1988) 'Experimental chemotherapy in horses infected with benzimidazole-resistant small strongyles', *Vet Rec*, 123(9), pp. 219-21.
- Brown, P. J. and Clayton, H. M. (1979) 'Hepatic pathology of experimental *Parascaris equorum* infection in worm-free foals', *J Comp Pathol*, 89(1), pp. 115-23.
- Brozeit, H. E. and Wieners, K. A. (1976) 'Use of calcium cyanamide on the pasture-grounds for control of gastrointestinal worms in cattle - results of a 4-year field experiment', *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 83(7), pp. 327-30.

- Bürger, H.-J., Eckert, J., Kutzer, E., Körting, W. and Rommel, M. (2006a) *Veterinärmedizinische Parasitologie*. Parey, S. 314-319.
- Bürger, H.-J., Eckert, J., Kutzer, E., Körting, W. and Rommel, M. (2006b) *Veterinärmedizinische Parasitologie*. Parey, S. 325.
- Bürger, H.-J., Eckert, J., Kutzer, E., Körting, W. and Rommel, M. (2006c) *Veterinärmedizinische Parasitologie*. Parey, S. 334f.
- Buzatti, A., de Paula Santos, C., Fernandes, M. A., Yoshitani, U. Y., Sprenger, L. K., dos Santos, C. D. and Molento, M. B. (2015) 'Duddingtonia flagrans in the control of gastrointestinal nematodes of horses', *Exp Parasitol*, 159, pp. 1-4.
- Bygarski, E. E., Prichard, R. K. and Ardelli, B. F. (2014) 'Resistance to the macrocyclic lactone moxidectin is mediated in part by membrane transporter P-glycoproteins: Implications for control of drug resistant parasitic nematodes', *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 4(3), pp. 143-51.
- Cabaret, J. and Mangeon, N. (1994) 'Fertilizers on pastures in relation to infestation of goats with strongyles, small lungworms and Moniezia', *Small Ruminant Research*, 13(3), pp. 269-276.
- Campbell, A. J., Gasser, R. B. and Chilton, N. B. (1995) 'Differences in a ribosomal DNA sequence of Strongylus species allows identification of single eggs', *Int J Parasitol*, 25(3), pp. 359-65.
- Celaya, R., Ferreira, L. M., Garcia, U., Rosa Garcia, R. and Osoro, K. (2011) 'Diet selection and performance of cattle and horses grazing in heathlands', *Animal*, 5(9), pp. 1467-73.
- Chapman, M. R., French, D. D. and Klei, T. R. (2001) 'Seasonal transmission of gastrointestinal parasites of equids in southern Louisiana', *J Parasitol*, 87(6), pp. 1371-8.
- Chapman, M. R., French, D. D. and Klei, T. R. (2003) 'Prevalence of strongyle nematodes in naturally infected ponies of different ages and during different seasons of the year in Louisiana', *J Parasitol*, 89(2), pp. 309-14.
- Chapman, M. R., Kearney, M. T. and Klei, T. R. (1999) 'An experimental evaluation of methods used to enumerate mucosal cyathostome larvae in ponies', *Vet Parasitol*, 86(3), pp. 191-202.
- Chiejina, S. N. (1982) 'Evaluation of modified Baermann apparatus for the recovery of infective trichostrongylid larvae from herbage samples', *J Helminthol*, 56(2), pp. 105-9.
- Cirak, V. Y., Gulegen, E. and Bauer, C. (2004) 'Benzimidazole resistance in cyathostomin populations on horse farms in western Anatolia, Turkey', *Parasitol Res*, 93(5), pp. 392-5.
- Cirak, V. Y., Hermosilla, C. and Bauer, C. (1996) 'Study on the gastrointestinal parasite fauna of ponies in northern Germany', *Appl Parasitol*, 37(4), pp. 239-44.
- Claerebout, E., Agneessens, Shaw, D. J. and Vercruyssen, J. (1999) 'Larval migration inhibition activity in abomasal mucus and serum from calves infected with *Ostertagia ostertagi*', *Res Vet Sci*, 66(3), pp. 253-7.
- Clayton, H. M. (1978) 'Ascariasis in foals', *Vet Rec*, 102(25), pp. 553-6.
- Clayton, H. M. (1986) 'Ascarids. Recent advances', *Vet Clin North Am Equine Pract*, 2(2), pp. 313-28.
- Clayton, H. M. and Duncan, J. L. (1978) 'Clinical signs associated with *Parascaris equorum* infection in worm-free pony foals and yearlings', *Veterinary Parasitology*, 4(1), pp. 69-78.
- Clayton, H. M. and Duncan, J. L. (1979) 'The development of immunity to *Parascaris equorum* infection in the foal', *Res Vet Sci*, 26(3), pp. 383-4.
- Clayton, H. M., Duncan, J. L. and Dargie, J. D. (1980) 'Pathophysiological changes associated with *Parascaris equorum* infection in the foal', *Equine Vet J*, 12(1), pp. 23-5.

- Cobb, R. and Boeckh, A. (2009) 'Moxidectin: a review of chemistry, pharmacokinetics and use in horses', *Parasit Vectors*, 2 Suppl 2, pp. S5.
- Collobert-Laugier, C., Hoste, H., Sevin, C. and Dorchies, P. (2002) 'Prevalence, abundance and site distribution of equine small strongyles in Normandy, France', *Vet Parasitol*, 110(1-2), pp. 77-83.
- Conway, D. P., DeGoosh, C. and Chalquest, R. R. (1970) 'Clinical studies of the anthelmintic pyrantel tartrate in horses', *Vet Med Small Anim Clin*, 65(9), pp. 899 passim.
- Corbett, C. J., Love, S., Moore, A., Burden, F. A., Matthews, J. B. and Denwood, M. J. (2014) 'The effectiveness of faecal removal methods of pasture management to control the cyathostomin burden of donkeys', *Parasit Vectors*, 7, pp. 48.
- Cornwell, R. L. and Jones, R. M. (1969) 'Activity of pyrantel against *Parascaris equorum*', *Vet Rec*, 85(7), pp. 196-7.
- Courtney, C. H. and Asquith, R. L. (1985) 'Seasonal changes in pasture infectivity by equine cyathostomes in north central Florida', *Equine Vet J*, 17(3), pp. 240-2.
- Couto, M. C. M., Quinelato, S., Santos, C. N., Souza, L. S., Sampaio, I. B. M. and Rodrigues, M. L. A. (2008) 'Environmental influence in cyathostominae ecology', *Veterinari Medicina*, 53(5), pp. 243-249.
- Craven, J., Bjorn, H., Henriksen, S. A., Nansen, P., Larsen, M. and Lendal, S. (1998) 'Survey of anthelmintic resistance on Danish horse farms, using 5 different methods of calculating faecal egg count reduction', *Equine Vet J*, 30(4), pp. 289-93.
- Cribb, N. C., Cote, N. M., Boure, L. P. and Peregrine, A. S. (2006) 'Acute small intestinal obstruction associated with *Parascaris equorum* infection in young horses: 25 cases (1985-2004)', *N Z Vet J*, 54(6), pp. 338-43.
- Crowell-Davis, S. L. and Houpt, K. A. (1985) 'Coprophagy by foals: effect of age and possible functions', *Equine Vet J*, 17(1), pp. 17-9.
- Daunderer (1984) 'Klinische Toxikologie', 52. Erg.-Lfg. 3/90. Available at: <https://toxcenter.org/stoff-infos/c/cyanamid.pdf> (Accessed: 29.01.2019)
- David, M., Lebrun, C., Duguet, T., Talmont, F., Beech, R., Orlowski, S., Andre, F., Prichard, R. K. and Lespine, A. (2018) 'Structural model, functional modulation by ivermectin and tissue localization of *Haemonchus contortus* P-glycoprotein-13', *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 8(1), pp. 145-157.
- DeLay, J., Peregrine, A. S. and Parsons, D. A. (2001) 'Verminous arteritis in a 3-month-old thoroughbred foal', *Can Vet J*, 42(4), pp. 289-91.
- Demeler, J., Knapp, F., Corte, G. M., Katzschke, O., Steininger, K. and Samson-Himmelstjerna, G. (2012) 'Recovery of strongylid third-stage larvae from herbage samples: standardisation of a laboratory method and its application in the field', *Parasitol Res*, 110(3), pp. 1159-64.
- Demeler, J., Kuttler, U., El-Abdellati, A., Stafford, K., Rydzik, A., Varady, M., Kenyon, F., Coles, G., Hoglund, J., Jackson, F., Vercruyssen, J. and von Samson-Himmelstjerna, G. (2010a) 'Standardization of the larval migration inhibition test for the detection of resistance to ivermectin in gastro intestinal nematodes of ruminants', *Vet Parasitol*, 174(1-2), pp. 58-64.
- Demeler, J., Kuttler, U. and von Samson-Himmelstjerna, G. (2010b) 'Adaptation and evaluation of three different in vitro tests for the detection of resistance to anthelmintics in gastro intestinal nematodes of cattle', *Vet Parasitol*, 170(1-2), pp. 61-70.
- Dennis, V. A., Klei, T. R., Miller, M. A., Chapman, M. R. and McClure, J. R. (1992) 'Immune responses of pony foals during repeated infections of *Strongylus vulgaris* and regular ivermectin treatments', *Vet Parasitol*, 42(1-2), pp. 83-99.
- Deplazes, P., Eckert, J., von Samson-Himmelstjerna, G. and Zahner, H. (2012a) *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin*. Enke, S.243-247.
- Deplazes, P., Eckert, J., von Samson-Himmelstjerna, G. and Zahner, H. (2012b) *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin*. Enke, S. 250-253.

- Deplazes, P., Eckert, J., von Samson-Himmelstjerna, G. and Zahner, H. (2012c) *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin*. Enke, S. 315f.
- Deplazes, P., Eckert, J., von Samson-Himmelstjerna, G. and Zahner, H. (2012d) *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin*. Enke, S. 545.
- Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e. V. (Stand: 06.01.2019) 'DVG-Desinfektionsmittelliste für Tierhaltung'. Available at: <http://www.desinfektion-dvg.de/index.php?id=2150>.
- Deutscher Wetterdienst - Climate Data Center. Available at: https://www.dwd.de/DE/klimaumwelt/cdc/cdc_node.html
- Dias, A. S., De Araujo, J. V., Campos, A. K., Braga, F. R. and Fonseca, T. A. (2007) 'The relationship between larvae recovered of pasture and counting eggs per grams of feces (epg) of the gastrointestinal nematodes of cattle in the Microrregion of Vicosa, State of Minas Gerais', *Rev Bras Parasitol Vet*, 16(1), pp. 33-6.
- Diepolder, M., Hartmann, S. (2013) 'Pferdeweiden - Nutzung, Pflege, Düngung', LfL (Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft), Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, 3. Auflage
- Dimander, S. O., Hoglund, J., Ugglå, A., Sporndly, E. and Waller, P. J. (2003) 'Evaluation of gastro-intestinal nematode parasite control strategies for first-season grazing cattle in Sweden', *Vet Parasitol*, 111(2-3), pp. 193-209.
- DiPietro, J. A., Ewert, K. E. and Todd, K. S. (1993) 'Ivermectin treatment of horses: effect on the distribution of lawns and roughs in horse pastures', *Vet Parasitol*, 48(1-4), pp. 241-6.
- DiPietro, J. A. and Todd, K. S., Jr. (1987) 'Anthelmintics used in treatment of parasitic infections of horses', *Vet Clin North Am Equine Pract*, 3(1), pp. 1-14.
- DiPietro, J. A., Todd, K. S., Jr., Lock, T. F. and Reuter-Dallman, V. (1985) 'Evaluation of febantel used concurrently with piperazine citrate in horses', *J Am Vet Med Assoc*, 186(3), pp. 262-4.
- Djokic, V., Blaga, R., Rinaldi, L., Le Roux, D., Ducry, T., Maurelli, M. P., Perret, C., Djurkovic Djakovic, O., Cringoli, G. and Boireau, P. (2014) 'Mini-FLOTAC for counting *Toxoplasma gondii* oocysts from cat feces--comparison with cell counting plates', *Exp Parasitol*, 147, pp. 67-71.
- Donoghue, E. M., Lyons, E. T., Bellow, J. L. and Nielsen, M. K. (2015) 'Biphasic appearance of corticated and decorticated ascarid egg shedding in untreated horse foals', *Vet Parasitol*, 214(1-2), pp. 114-7.
- Dopfer, D., Kerssens, C. M., Meijer, Y. G., Boersema, J. H. and Eysker, M. (2004) 'Shedding consistency of strongyle-type eggs in Dutch boarding horses', *Vet Parasitol*, 124(3-4), pp. 249-58.
- dos Santos, C. N., de Souza, L. S., Quinelato, S. B., do Couto, M. C. M., Pinheiro, J. and Rodrigues, M. L. D. (2011) 'Seasonal dynamics of cyathostomin (Nematoda - Cyathostominae) infective larvae in *Brachiaria humidicola* grass in tropical southeast Brazil', *Vet Parasitol*, 180(3-4), pp. 274-278.
- Douch, P. G. and Morum, P. E. (1994) 'The effects of anthelmintics on ovine larval nematode parasite migration in vitro', *Int J Parasitol*, 24(3), pp. 321-6.
- Dowdall, S. M. J., Proudman, C. J., Love, S., Klei, T. R. and Matthews, J. B. (2003) 'Purification and analyses of the specificity of two putative diagnostic antigens for larval cyathostomin infection in horses', *Res Vet Sci*, 75(3), pp. 223-229.
- Drogemüller, M., Schnieder, T. and von Samson-Himmelstjerna, G. (2004) 'Evidence of p-glycoprotein sequence diversity in cyathostomins', *J Parasitol*, 90(5), pp. 998-1003.
- Drudge, J. H. and Lyons, E. T. (1966) 'Control of internal parasites of the horse', *J Am Vet Med Assoc*, 148(4), pp. 378-83.
- Drudge, J. H., Lyons, E. T., Tolliver, S. C., Lowry, S. R. and Fallon, E. H. (1988) 'Piperazine resistance in population-B equine strongyles: a study of selection in Thoroughbreds in Kentucky from 1966 through 1983', *Am J Vet Res*, 49(7), pp. 986-94.
- Duncan, J. L. (1974) 'Strongylus vulgaris infection in the horse', *Vet Rec*, 95(2), pp. 34-7.

- Duncan, J. L., Bairden, K. and Abbott, E. M. (1998) 'Elimination of mucosal cyathostome larvae by five daily treatments with fenbendazole', *Vet Rec*, 142(11), pp. 268-71.
- Duncan, J. L. and Love, S. (1991) 'Preliminary observations on an alternative strategy for the control of horse strongyles', *Equine Vet J*, 23(3), pp. 226-8.
- Duncan, J. L. and Pirie, H. M. (1972) 'The life cycle of *Strongylus vulgaris* in the horse', *Res Vet Sci*, 13(4), pp. 374-9.
- Elard, L., Comes, A. M. and Humbert, J. F. (1996) 'Sequences of beta-tubulin cDNA from benzimidazole-susceptible and -resistant strains of *Teladorsagia circumcincta*, a nematode parasite of small ruminants', *Mol Biochem Parasitol*, 79(2), pp. 249-53.
- Elard, L. and Humbert, J. F. (1999) 'Importance of the mutation of amino acid 200 of the isotype 1 beta-tubulin gene in the benzimidazole resistance of the small-ruminant parasite *Teladorsagia circumcincta*', *Parasitol Res*, 85(6), pp. 452-6.
- Elsaesser, M. and Thumm, U. gruenland-online. Available at: <http://www.gruenland-online.de/html/weidehaltung/tiere/pferde/pferde.html> (Accessed: 18.08.2018).
- English, A. W. (1979a) 'The epidemiology of equine strongylosis in southern Queensland. 1. The bionomics of the free-living stages in faeces and on pasture', *Aust Vet J*, 55(7), pp. 299-305.
- English, A. W. (1979b) 'The epidemiology of equine strongylosis in southern Queensland. 2. The survival and migration of infective larvae on herbage', *Aust Vet J*, 55(7), pp. 306-9.
- Enigk, K., Hildebrandt, J. and Tietjen, C. (1965) '[Survival of Helminth Eggs and Larvae in Dung at Watering Places]', *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 78, pp. 102-5.
- ESCCAP Guideline 08 Second Edition - March 2019 (2019) 'A guide to the treatment and control of equine gastrointestinal parasite infections', ISBN: 978-1-907259-75-3
- Europäischer Kalkverband (2008) Praktischer Leitfaden für die Verwendung von Kalk zur Vorbeugung und Bekämpfung von Vogelgrippe, Maul- und Klauenseuche und anderen Tierseuchen. Available at: <http://www.lhoist-agriculture.de/sites/rheinkalk-kdi/files/Leitfaden%20fuer%20den%20Einsatz%20von%20Brantkalk%20zur%20Desinfektion.pdf>.
- Eysker, M. (1984) 'Inhibited Development of Cyathostominae in the Horse in the Early 3rd Stage', *Parasitology*, 89(Oct), pp. R62-R62.
- Eysker, M. (1997) 'The sensitivity of the Baermann method for the diagnosis of primary *Dictyocaulus viviparus* infections in calves', *Vet Parasitol*, 69(1-2), pp. 89-93.
- Eysker, M., Bakker, N., Kooyman, F. N., Olthuis, S. O. and Ploeger, H. W. (2006) 'Effect of biological control through the daily application of spores of *Duddingtonia flagrans* in lambs kept under an evasive grazing system in the Netherlands', *Vet Parasitol*, 140(3-4), pp. 312-20.
- Eysker, M., Boersema, J. H. and Kooyman, F. N. (1989a) 'Effect of repeated oxfendazole treatments on small strongyle infections in Shetland ponies', *Res Vet Sci*, 46(3), pp. 409-12.
- Eysker, M., Boersema, J. H. and Kooyman, F. N. (1989b) 'Emergence from inhibited development of cyathostome larvae in ponies following failure to remove them by repeated treatments with benzimidazole compounds', *Vet Parasitol*, 34(1-2), pp. 87-93.
- Eysker, M., Boersema, J. H. and Kooyman, F. N. (1990) 'Seasonally inhibited development of cyathostomine nematodes in Shetland ponies in The Netherlands', *Vet Parasitol*, 36(3-4), pp. 259-64.
- Eysker, M., Boersema, J. H. and Kooyman, F. N. (1991) 'Effect of early season ivermectin and pyrantel treatments on strongylid infections in young Shetland ponies in The Netherlands', *Vet Parasitol*, 38(1), pp. 33-9.
- Eysker, M., Boersema, J. H. and Kooyman, F. N. (1992) 'The effect of ivermectin treatment against inhibited early third stage, late third stage and fourth stage larvae and adult stages of the cyathostomes in Shetland ponies and spontaneous expulsion of these helminths', *Vet Parasitol*, 42(3-4), pp. 295-302.

- Eysker, M., Jansen, J. and Mirck, M. H. (1986) 'Control of strongylosis in horses by alternate grazing of horses and sheep and some other aspects of the epidemiology of Strongylidae infections', *Vet Parasitol*, 19(1-2), pp. 103-15.
- Eysker, M., Jansen, J., Wemmenhove, R. and Mirck, M. H. (1983) 'Alternate grazing of horses and sheep as control for gastro-intestinal helminthiasis in horses', *Vet Parasitol*, 13(3), pp. 273-80.
- Eysker, M. and Mirck, M. H. (1986) 'The Distribution of Inhibited Early 3rd Stage Cyathostominae Larvae in the Large-Intestine of the Horse', *Zeitschrift Fur Parasitenkunde-Parasitology Research*, 72(6), pp. 815-820.
- Folz, S. D., Pax, R. A., Thomas, E. M., Bennett, J. L., Lee, B. L. and Conder, G. A. (1987) 'Detecting in vitro anthelmintic effects with a micromotility meter', *Vet Parasitol*, 24(3-4), pp. 241-50.
- Frey, H. H. and Löscher, W. (2002a) *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. Enke, S. 488-495.
- Frey, H. H. and Löscher, W. (2002b) *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. Enke, S. 517-523.
- Frey, H. H. and Löscher, W. (2002c) *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. Enke, S. 537.
- Fritzen, B., Rohn, K., Schnieder, T. and von Samson-Himmelstjerna, G. (2010) 'Endoparasite control management on horse farms--lessons from worm prevalence and questionnaire data', *Equine Vet J*, 42(1), pp. 79-83.
- Gasbarre, L. C. and Douvres, F. W. (1987) 'Protection from parasite-induced weight loss by the vaccination of calves with excretory-secretory products of larval *Oesophagostomum radiatum*', *Vet Parasitol*, 26(1-2), pp. 95-105.
- Gawor, J. (2000) 'Occurrence of Strongylidae (Nematoda: Strongyloidea) in Polish horses "tarpan" from Popielne Reserve', *Wiad Parazytol*, 46(1), pp. 87-92.
- Gessa, G. L. (1990) '[Guidelines for the drug therapy of alcoholism]', *Recenti Prog Med*, 81(3), pp. 171-5.
- Gestüt Lewitz. Available at: www.gestuet-lewitz.de/gestuet-lewitz/die-lewitz.html (Accessed: 26.05.2016).
- Geurden, T., van Doorn, D., Claerebout, E., Kooyman, F., De Keersmaecker, S., Vercruysse, J., Besonet, B., Vanimisetti, B., di Regalbono, A. F., Beraldo, P., Di Cesare, A. and Traversa, D. (2014) 'Decreased strongyle egg re-appearance period after treatment with ivermectin and moxidectin in horses in Belgium, Italy and The Netherlands', *Vet Parasitol*, 204(3-4), pp. 291-296.
- Gevrey, J. and Euzéby, J. (1965) 'Étude de la sensibilité des formes libres des "strongles digestifs" à l'action d'agents chimiques', *Soc. sci. Vet. et de Med. comparée*, (67), pp. 55-67.
- Gibson, T. E. (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.', *J. Helminth.*, 27, pp. 29-40
- Giles, C. J., Urquhart, K. A. and Longstaffe, J. A. (1985) 'Larval cyathostomiasis (immature trichonema-induced enteropathy): a report of 15 clinical cases', *Equine Veterinary Journal*, 17(3), pp. 196-201.
- Goday, C. and Pimpinelli, S. (1984) 'Chromosome organization and heterochromatin elimination in *Parascaris*', *Science*, 224(4647), pp. 411-3.
- Godber, O. F., Phythian, C. J., Bosco, A., Ianniello, D., Coles, G., Rinaldi, L. and Cringoli, G. (2015) 'A comparison of the FECPAK and Mini-FLOTAC faecal egg counting techniques', *Vet Parasitol*, 207(3-4), pp. 342-5.
- Gould, J.C., Rossano, M.G., Lawrence, L.M., Burk, S.V., Ennis, R.B. and Lyons, E.T. (2013) 'The effects of windrow composting on the viability of *Parascaris equorum* eggs', *Vet Parasitol*, 191(1–2), pp. 73-80.
- Herd, R. P. (1986) 'Epidemiology and control of equine strongylosis at Newmarket', *Equine Vet J*, 18(6), pp. 447-52.

- Herd, R. P. (1990) 'Encourages new services to replace tube deworming', *J Am Vet Med Assoc*, 197(4), pp. 441-2.
- Herd, R. P. and Gabel, A. A. (1990) 'Reduced efficacy of anthelmintics in young compared with adult horses', *Equine Vet J*, 22(3), pp. 164-9.
- Herd, R. P., Stinner, B. R. and Purrington, F. F. (1993) 'Dung dispersal and grazing area following treatment of horses with a single dose of ivermectin', *Vet Parasitol*, 48(1-4), pp. 229-40.
- Hernandez, J. A., Arroyo, F. L., Suarez, J., Cazapal-Monteiro, C. F., Romasanta, A., Lopez-Arellano, M. E., Pedreira, J., de Carvalho, L. M., Sanchez-Andrade, R., Arias, M. S., de Gives, P. M. and Paz-Silva, A. (2016) 'Feeding horses with industrially manufactured pellets with fungal spores to promote nematode integrated control', *Vet Parasitol*, 229, pp. 37-44.
- Hertzberg, H., Schwarzwald, C. C., Grimm, F., Frey, C. F., Gottstein, B., and Gerber, V. (2014) 'Helminthenmanagement beim adulten Pferd: Notwendigkeit einer Neuorientierung', *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 156(2), pp. 61-70.
- Hinney, B., Wirtherle, N. C., Kyule, M., Miethe, N., Zessin, K. H. and Clausen, P. H. (2011) 'Prevalence of helminths in horses in the state of Brandenburg, Germany', *Parasitol Res*, 108(5), pp. 1083-91.
- Hodgkinson, J. E., Freeman, K. L., Lichtenfels, J. R., Palfreman, S., Love, S. and Matthews, J. B. (2005) 'Identification of strongyle eggs from anthelmintic-treated horses using a PCR-ELISA based on intergenic DNA sequences', *Parasitol Res*, 95(4), pp. 287-92.
- Hodgkinson, J. E., Lichtenfels, J. R., Mair, T. S., Cripps, P., Freeman, K. L., Ramsey, Y. H., Love, S. and Matthews, J. B. (2003) 'A PCR-ELISA for the identification of cyathostomin fourth-stage larvae from clinical cases of larval cyathostomiasis', *Int J Parasitol*, 33(12), pp. 1427-35.
- Hodgkinson, J. E., Love, S., Lichtenfels, J. R., Palfreman, S., Ramsey, Y. H. and Matthews, J. B. (2001) 'Evaluation of the specificity of five oligoprobes for identification of cyathostomin species from horses', *Int J Parasitol*, 31(2), pp. 197-204.
- Hung, G. C., Chilton, N. B., Beveridge, I. and Gasser, R. B. (1999a) 'Secondary structure model for the ITS-2 precursor rRNA of strongyloid nematodes of equids: implications for phylogenetic inference', *Int J Parasitol*, 29(12), pp. 1949-64.
- Hung, G. C., Chilton, N. B., Beveridge, I., McDonnell, A., Lichtenfels, J. R. and Gasser, R. B. (1997) 'Molecular delineation of *Cylicocyclus nassatus* and *C. ashworthi* (Nematoda:Strongylidae)', *Int J Parasitol*, 27(5), pp. 601-5.
- Hung, G. C., Gasser, R. B., Beveridge, I. and Chilton, N. B. (1999b) 'Species-specific amplification by PCR of ribosomal DNA from some equine strongyles', *Parasitology*, 119 (Pt 1), pp. 69-80.
- James, C. E. and Davey, M. W. (2009) 'Increased expression of ABC transport proteins is associated with ivermectin resistance in the model nematode *Caenorhabditis elegans*', *Int J Parasitol*, 39(2), pp. 213-20.
- Kamo, T., Endo, M., Sato, M., Kasahara, R., Yamaya, H., Hiradate, S., Fujii, Y., Hirai, N. and Hirota, M. (2008) 'Limited distribution of natural cyanamide in higher plants: occurrence in *Vicia villosa* subsp. *varia*, *V. cracca*, and *Robinia pseudo-acacia*', *Phytochemistry*, 69(5), pp. 1166-72.
- Kamo, T., Hiradate, S. and Fujii, Y. (2003) 'First isolation of natural cyanamide as a possible allelochemical from hairy vetch *Vicia villosa*', *J Chem Ecol*, 29(2), pp. 275-83.
- Kamo, T., Sakurai, S., Yamanashi, T. and Todoroki, Y. (2015) 'Cyanamide is biosynthesized from L-canavanine in plants', *Sci Rep*, 5, pp. 10527.
- Kaplan, R. M., Klei, T. R., Lyons, E. T., Lester, G., Courtney, C. H., French, D. D., Tolliver, S. C., Vidyashankar, A. N. and Zhao, Y. (2004) 'Prevalence of anthelmintic resistant cyathostomes on horse farms', *J Am Vet Med Assoc*, 225(6), pp. 903-10.
- Kerboeuf, D. and Guegnard, F. (2011) 'Anthelmintics are substrates and activators of nematode P glycoprotein', *Antimicrob Agents Chemother*, 55(5), pp. 2224-32.

- Klei, T. R. and Chapman, M. R. (1999) 'Immunity in equine cyathostome infections', *Vet Parasitol*, 85(2-3), pp. 123-33; discussion 133-6, 215-25.
- Knapp-Lawitzke, F., Küchenmeister, F., Küchenmeister, K., von Samson-Himmelstjerna, G. and Demeler, J. (2014a) 'Assessment of the impact of plant species composition and drought stress on survival of strongylid third-stage larvae in a greenhouse experiment', *Parasitol Res*, 113(11), pp. 4123-31.
- Knapp-Lawitzke, F., von Samson-Himmelstjerna, G. and Demeler, J. (2014b) 'Rapid method for recovery of strongylid third stage larvae of parasitic nematodes from small soil samples', *Exp Parasitol*, 142, pp. 91-4.
- Köhler, M. (2016) 'Epidemiologische, klinische und serologische Untersuchungen zum Verlauf von Parascaris spp.-Infektionen bei Fohlen', Diss., Freie Universität Berlin, Berlin.
- Kojima, T., Nagasawa, N., Yashiki, M., Iwasaki, Y., Kubo, H. and Kimura, N. (1997) 'A fatal case of drinking and cyanamide intake', *Nihon Hoigaku Zasshi*, 51(2), pp. 111-5.
- Konigova, A., Varady, M. and Corba, J. (2003) 'Comparison of in vitro methods and faecal egg count reduction test for the detection of benzimidazole resistance in small strongyles of horses', *Veterinary Research Communications*, 27(4), pp. 281-8.
- Kornas, S., Cabaret, J. and Nowosad, B. (2010a) 'Parascaris and cyathostome nematodes in foals: parasite in transit or real infection?', *Pol J Vet Sci*, 13(4), pp. 713-7.
- Kornas, S., Cabaret, J., Skalska, M. and Nowosad, B. (2010b) 'Horse infection with intestinal helminths in relation to age, sex, access to grass and farm system', *Vet Parasitol*, 174(3-4), pp. 285-91.
- Kornas, S., Gawor, J., Cabaret, J., Molenda, K., Skalska, M. and Nowosad, B. (2009a) 'Morphometric identification of equid cyathostome (Nematoda: Cyathostominae) infective larvae', *Vet Parasitol*, 162(3-4), pp. 290-4.
- Kornas, S., Salle, G., Skalska, M., David, I., Ricard, A. and Cabaret, J. (2015) 'Estimation of genetic parameters for resistance to gastro-intestinal nematodes in pure blood Arabian horses', *Int J Parasitol*, 45(4), pp. 237-42.
- Kornas, S., Skalska, M., Nowosad, B., Gawor, J., Kharchenko, V. and Cabaret, J. (2009b) 'Occurrence of strongyles (Strongylidae) in horses from small farms on the basis of necropsy', *Pol J Vet Sci*, 12(2), pp. 225-30.
- Kotze, A. C., Le Jambre, L. F. and O'Grady, J. (2006) 'A modified larval migration assay for detection of resistance to macrocyclic lactones in *Haemonchus contortus*, and drug screening with Trichostrongylidae parasites', *Vet Parasitol*, 137(3-4), pp. 294-305.
- Krecek, R. C. and Maingi, N. (2004) 'Comparison of two techniques used for the recovery of third-stage strongylid nematode larvae from herbage', *Vet Parasitol*, 122(3), pp. 233-44.
- Krecek, R. C., Murrell, K. D. and Douglass, L. W. (1990) 'Effects of microclimatic variables on the availability and movement of third-stage larvae of *Ostertagia ostertagi* on herbage', *Onderstepoort J Vet Res*, 57(2), pp. 133-5.
- KTBL (2012) *Pferdehaltung - Planen und kalkulieren - KTBL-Datensammlung*. KTBL e.V., S. 86-93
- 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(5), pp. 1665-74.
- Kuzmina, T. A., Kuzmin, Y. I. and Kharchenko, V. A. (2006) 'Field study on the survival, migration and overwintering of infective larvae of horse strongyles on pasture in central Ukraine', *Vet Parasitol*, 141(3-4), pp. 264-72.
- Kwa, M. S., Veenstra, J. G. and Roos, M. H. (1994) 'Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in beta-tubulin isotype 1', *Mol Biochem Parasitol*, 63(2), pp. 299-303.
- Kyvsgaard, N. C., Lindbom, J., Andreasen, L. L., Luna-Olivares, L. A., Nielsen, M. K. and Monrad, J. (2011) 'Prevalence of strongyles and efficacy of fenbendazole and

- ivermectin in working horses in El Sauce, Nicaragua', *Vet Parasitol*, 181(2-4), pp. 248-54.
- Lacey, E. (1988) 'The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles', *Int J Parasitol*, 18(7), pp. 885-936.
- Lage, A. v. d., Beckert, I., Niemann, F. (29.09.2010) DLG-Merkblatt 364: Hygienetechnik und Managementhinweise zur Reinigung und Desinfektion von Stallanlagen.
- Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen
'Naturschutzgerechte Bewirtschaftung spezifischer Grünlandbiotop / Pflege von kulturhistorischen Biotopen durch Beweidung oder Mahd'. Available at:
http://vns.naturschutzinformationen.nrw.de/vns/de/fachinfo/anwenderhandbuch/bewirtschaftung_sonst_biotope (Accessed: 15.03. 2017).
- Landratsamt Zollernalbkreis 'Merkblatt Pferdemit'. Available at:
<https://www.zollernalbkreis.de/site/LRA-ZAK-2017/search/14343678/Lde/index.html?viewSecurityToken=%24securityToken&quicksearch=true&query=merkblatt+pferdemist>.
- Langrova, I., Makovcova, K., Vadlejš, J., Jankovska, I., Petrtyl, M., Fechtner, J., Keil, P., Lytvynets, A. and Borkovcova, M. (2008) 'Arrested development of sheep strongyles: onset and resumption under field conditions of Central Europe', *Parasitol Res*, 103(2), pp. 387-92.
- Larsen, M., Nansen, P., Grondahl, C., Thamsborg, S. M., Gronvold, J., Wolstrup, J., Henriksen, S. A. and Monrad, J. (1996) 'The capacity of the fungus *Duddingtonia flagrans* to prevent strongyle infections in foals on pasture', *Parasitology*, 113 (Pt 1), pp. 1-6.
- Larsen, M. L., Ritz, C., Petersen, S. L. and Nielsen, M. K. (2011) 'Determination of ivermectin efficacy against cyathostomins and *Parascaris equorum* on horse farms using selective therapy', *Vet J*, 188(1), pp. 44-7.
- Larsen, M. M., Lendal, S., Chriel, M., Olsen, S. N. and Bjorn, H. (2002) 'Risk factors for high endoparasitic burden and the efficiency of a single anthelmintic treatment of Danish horses', *Acta Vet Scand*, 43(2), pp. 99-106.
- Larsson, A., Dimander, S. O., Rydzik, A., Uggla, A., Waller, P. J. and Hoglund, J. (2007) 'A 3-year field evaluation of pasture rotation and supplementary feeding to control parasite infection in first-season grazing cattle: dynamics of pasture infectivity', *Vet Parasitol*, 145(1-2), pp. 129-37.
- Lassen, B. and Peltola, S. M. (2015) 'Anthelmintic resistance of intestinal nematodes to ivermectin and pyrantel in Estonian horses', *J Helminthol*, 89(6), pp. 760-3.
- Laugier, C., Sevin, C., Menard, S. and Maillard, K. (2012) 'Prevalence of *Parascaris equorum* infection in foals on French stud farms and first report of ivermectin-resistant *P. equorum* populations in France', *Vet Parasitol*, 188(1-2), pp. 185-9.
- Leiper, J. W. G. (1937) 'On the value of various chemical substances as a means of destroying infective larvae of horse *Sclerostomes* in the field', *J Helminthol*, XV(3), pp. 153-166.
- Lester, H. E., Spanton, J., Stratford, C. H., Bartley, D. J., Morgan, E. R., Hodgkinson, J. E., Coumbe, K., Mair, T., Swan, B., Lemon, G., Cookson, R. and Matthews, J. B. (2013) 'Anthelmintic efficacy against cyathostomins in horses in Southern England', *Vet Parasitol*, 197(1-2), pp. 189-96.
- Lichtenfels, J. R., Gibbons, L. M. and Krecek, R. C. (2002) 'Recommended terminology and advances in the systematics of the Cyathostominea (Nematoda: Strongyloidea) of horses', *Vet Parasitol*, 107(4), pp. 337-42.
- Lichtenfels, J. R., Kharchenko, V. A. and Dvojnjos, G. M. (2008) 'Illustrated identification keys to strongylid parasites (strongylidae : Nematoda) of horses, zebras and asses (Equidae)', *Vet Parasitol*, 156(1-2), pp. 4-161.
- Lima, V. F., Cringoli, G., Rinaldi, L., Monteiro, M. F., Calado, A. M., Ramos, R. A., Meira-Santos, P. O. and Alves, L. C. (2015) 'A comparison of mini-FLOTAC and FLOTAC

- with classic methods to diagnosing intestinal parasites of dogs from Brazil', *Parasitol Res*, 114(9), pp. 3529-33.
- Lind, E. O. and Christensson, D. (2009) 'Anthelmintic efficacy on *Parascaris equorum* in foals on Swedish studs', *Acta Vet Scand*, 51, pp. 45.
- Lindgren, K., Ljungvall, O., Nilsson, O., Ljungstrom, B. L., Lindahl, C. and Hoglund, J. (2008) 'Parascaris equorum in foals and in their environment on a Swedish stud farm, with notes on treatment failure of ivermectin', *Vet Parasitol*, 151(2-4), pp. 337-43.
- Liu, L., Sun, C., Liu, X., He, X., Liu, M., Wu, H., Tang, C., Jin, C. and Zhang, Y. (2016) 'Effect of calcium cyanamide, ammonium bicarbonate and lime mixture, and ammonia water on survival of *Ralstonia solanacearum* and microbial community', *Sci Rep*, 6, pp. 19037.
- Love, S. and Duncan, J. L. (1991) 'Could the worms have turned?', *Equine Vet J*, 23(3), pp. 152-4.
- Love, S. and Duncan, J. L. (1992) 'The development of naturally acquired cyathostome infection in ponies', *Vet Parasitol*, 44(1-2), pp. 127-42.
- Love, S., Murphy, D. and Mellor, D. (1999) 'Pathogenicity of cyathostome infection', *Vet Parasitol*, 85(2-3), pp. 113-21; discussion 121-2, 215-25.
- Lucius, R. L.-F., B. (1997) *Parasitologie: Grundlagen für Biologen, Mediziner und Veterinärmediziner*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Lyons, E. T., Drudge, J. H. and Tolliver, S. C. (1976) 'Studies on the development and chemotherapy of larvae of *Parascaris equorum* (Nematoda: Ascaridoidea) in experimentally and naturally infected foals', *J Parasitol*, 62(3), pp. 453-9.
- Lyons, E. T., Drudge, J. H., Tolliver, S. C. and Breukink, H. J. (1974) 'Critical test of three salts of pyrantel against internal parasites of the horse', *Am J Vet Res*, 35(12), pp. 1515-22.
- Lyons, E. T., Swerczek, T. W., Tolliver, S. C., Bair, H. D., Drudge, J. H. and Ennis, L. E. (2000) 'Prevalence of selected species of internal parasites in equids at necropsy in central Kentucky (1995-1999)', *Vet Parasitol*, 92(1), pp. 51-62.
- Lyons, E. T. and Tolliver, S. C. (2004) 'Prevalence of parasite eggs (*Strongyloides westeri*, *Parascaris equorum*, and strongyles) and oocysts (*Eimeria leuckarti*) in the feces of Thoroughbred foals on 14 farms in central Kentucky in 2003', *Parasitol Res*, 92(5), pp. 400-4.
- Lyons, E. T., Tolliver, S. C. and Collins, S. S. (2006) 'Field studies on endoparasites of Thoroughbred foals on seven farms in central Kentucky in 2004', *Parasitol Res*, 98(5), pp. 496-500.
- Lyons, E. T., Tolliver, S. C. and Drudge, J. H. (1999) 'Historical perspective of cyathostomes: prevalence, treatment and control programs', *Vet Parasitol*, 85(2-3), pp. 97-111; discussion 111-2, 215-25.
- Lyons, E. T., Tolliver, S. C., Ionita, M. and Collins, S. S. (2008) 'Evaluation of parasiticide activity of fenbendazole, ivermectin, oxbendazole, and pyrantel pamoate in horse foals with emphasis on ascarids (*Parascaris equorum*) in field studies on five farms in Central Kentucky in 2007', *Parasitol Res*, 103(2), pp. 287-91.
- Mair, T. S. (1993) 'Recurrent diarrhoea in aged ponies associated with larval cyathostomiasis', *Equine Vet J*, 25(2), pp. 161-3.
- Mair, T. S. (1994) 'Outbreak of larval cyathostomiasis among a group of yearling and two-year-old horses', *Vet Rec*, 135(25), pp. 598-600.
- Maninang, J. S., Okazaki, S. and Fujii, Y. (2015) 'Cyanamide phytotoxicity in soybean (*Glycine max*) seedlings involves aldehyde dehydrogenase inhibition and oxidative stress', *Nat Prod Commun*, 10(5), pp. 743-6.
- Marchner, H. and Tottmar, O. (1978) 'A comparative study on the effects of disulfiram, cyanamide and 1-aminocyclopropanol on the acetaldehyde metabolism in rats', *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, 43(3), pp. 219-32.
- Martin, R. J. (1982) 'Electrophysiological effects of piperazine and diethylcarbamazine on *Ascaris suum* somatic muscle', *Br J Pharmacol*, 77(2), pp. 255-65.

- Martin, R. J. (1985) 'gamma-Aminobutyric acid- and piperazine-activated single-channel currents from *Ascaris suum* body muscle', *Br J Pharmacol*, 84(2), pp. 445-61.
- Martin, R. J., Pennington, A. J., Duittoz, A. H., Robertson, S. and Kusel, J. R. (1991) 'The physiology and pharmacology of neuromuscular transmission in the nematode parasite, *Ascaris suum*', *Parasitology*, 102 Suppl, pp. S41-58.
- Martin, R. R., Beveridge, I., Pullman, A. L. and Brown, T. H. (1990) 'A modified technique for the estimation of the number of infective nematode larvae present on pasture, and its application in the field under South Australian conditions', *Vet Parasitol*, 37(2), pp. 133-43.
- Matthee, S., Krecek, R. C., Milne, S. A., Boshoff, M. and Guthrie, A. J. (2002) 'Impact of management interventions on helminth levels, and body and blood measurements in working donkeys in South Africa', *Vet Parasitol*, 107(1-2), pp. 103-13.
- Matthews, J. B., McArthur, C., Robinson, A. and Jackson, F. (2012) 'The in vitro diagnosis of anthelmintic resistance in cyathostomins', *Vet Parasitol*, 185(1), pp. 25-31.
- Maurelli, M. P., Rinaldi, L., Alfano, S., Pepe, P., Coles, G. C. and Cringoli, G. (2014) 'Mini-FLOTAC, a new tool for copromicroscopic diagnosis of common intestinal nematodes in dogs', *Parasit Vectors*, 7, pp. 356.
- McArthur, C. L., Handel, I. G., Robinson, A., Hodgkinson, J. E., Bronsvoort, B. M., Burden, F., Kaplan, R. M. and Matthews, J. B. (2015) 'Development of the larval migration inhibition test for comparative analysis of ivermectin sensitivity in cyathostomin populations', *Vet Parasitol*, 212(3-4), pp. 292-8.
- McCraw, B. M. and Slocombe, J. O. (1974) 'Early development of and pathology associated with *Strongylus edentatus*', *Can J Comp Med*, 38(2), pp. 124-38.
- McCraw, B. M. and Slocombe, J. O. (1985) '*Strongylus equinus*: development and pathological effects in the equine host', *Can J Comp Med*, 49(4), pp. 372-83.
- Mfitlodze, M. W. and Hutchinson, G. W. (1987) 'Development and survival of free-living stages of equine strongyles under laboratory conditions', *Vet Parasitol*, 23(1-2), pp. 121-33.
- Mirck, M. H. (1981) 'An Investigation into the Epidemiology of Strongylidae Infections in the Horse in the Netherlands', *Veterinary Quarterly*, 3(2), pp. 98-100.
- Molento, M. B., Antunes, J., Bentes, R. N. and Coles, G. C. (2008) 'Anthelmintic resistant nematodes in Brazilian horses', *Vet Rec*, 162(12), pp. 384-5.
- Molento, M. B., Nielsen, M. K. and Kaplan, R. M. (2012) 'Resistance to avermectin/milbemycin anthelmintics in equine cyathostomins - current situation', *Vet Parasitol*, 185(1), pp. 16-24.
- Monahan, C. M., Chapman, M. R., Taylor, H. W., French, D. D. and Klei, T. R. (1995) 'Dose titration of moxidectin oral gel against migrating *Strongylus vulgaris* and *Parascaris equorum* larvae in pony foals', *Vet Parasitol*, 60(1-2), pp. 103-10.
- Monahan, C. M., Chapman, M. R., Taylor, H. W., French, D. D. and Klei, T. R. (1998) 'Experimental cyathostome challenge of ponies maintained with or without benefit of daily pyrantel tartrate feed additive: comparison of parasite burdens, immunity and colonic pathology', *Vet Parasitol*, 74(2-4), pp. 229-41.
- Müller, H. (1955) 'Untersuchungen über die Wirkung des Cyanamids im Kalkstickstoff auf pathogene und nichtpathogene Mikroorganismen des Bodens', *Archiv für Mikrobiologie*, 22(3), pp. 285-306.
- Neumann, B. (1939) *Lehrbuch der Chemischen Technologie und Metallurgie*. Springer-Verlag.
- Nicholls, J. M., Clayton, H. M., Pirie, H. M. and Duncan, J. L. (1978) 'A pathological study of the lungs of foals infected experimentally with *Parascaris equorum*', *J Comp Pathol*, 88(2), pp. 261-74.
- Nielsen, M. K., Kaplan, R. M., Thamsborg, S. M., Monrad, J. and Olsen, S. N. (2007) 'Climatic influences on development and survival of free-living stages of equine strongyles: implications for worm control strategies and managing anthelmintic resistance', *Vet J*, 174(1), pp. 23-32.

- Nielsen, M. K., Baptiste, K. E., Tolliver, S. C., Collins, S. S. and 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(1-2), pp. 77-84.
- Nielsen, M. K. (2012) 'Sustainable equine parasite control: Perspectives and research needs', *Veterinary Parasitology*, 185(1), pp. 32-44.
- Nielsen, M. K., Donoghue, E. M., Stephens, M. L., Stowe, C. J., Donecker, J. M. and Fenger, C. K. (2016) 'An ultrasonographic scoring method for transabdominal monitoring of ascarid burdens in foals', *Equine Vet J*, 48(3), pp. 380-6.
- Nielsen, M. K., Branan, M. A., Wiedenheft, A. M., Digianantonio, R., Scare, J. A., Bellaw, J. L., Garber, L. P., Koprak, C. A., Phillippi-Taylor, A. M. and Traub-Dargatz, J. L. (2018) 'Risk factors associated with strongylid egg count prevalence and abundance in the United States equine population', *Vet Parasitol*, 257, pp. 58-68.
- Nielsen, M. K., Olsen, S. N., Lyons, E. T., Monrad, J. and Thamsborg, S. M. (2012) 'Real-time PCR evaluation of *Strongylus vulgaris* in horses on farms in Denmark and Central Kentucky', *Vet Parasitol*, 190(3-4), pp. 461-6.
- Nielsen, M. K., Pfister, K. and von Samson-Himmelstjerna, G. (2014a) 'Selective therapy in equine parasite control--application and limitations', *Vet Parasitol*, 202(3-4), pp. 95-103.
- Nielsen, M. K., Wang, J., Davis, R., Bellaw, J. L., Lyons, E. T., Lear, T. L. and Goday, C. (2014b) 'Parascaris univalens--a victim of large-scale misidentification?', *Parasitol Res*, 113(12), pp. 4485-90.
- Odriozola, E., Paloma, E., Lopez, T. and Campero, C. (1991) 'An outbreak of *Vicia villosa* (hairy vetch) poisoning in grazing Aberdeen Angus bulls in Argentina', *Vet Hum Toxicol*, 33(3), pp. 278-80.
- Ogbourne, C. P. (1972) 'Observations on the free-living stages of strongylid nematodes of the horse', *Parasitology*, 64(3), pp. 461-77.
- Onda, K., Yagisawa, T., Matsui, T., Tanaka, H., Yako, J., Une, Y. and Wada, Y. (2008) 'Contact dermatitis in dairy cattle caused by calcium cyanamide', *Vet Rec*, 163(14), pp. 418-22.
- Pancieria, R. J., Johnson, L. and Osburn, B. I. (1966) 'A disease of cattle grazing hairy vetch pasture', *J Am Vet Med Assoc*, 148(7), pp. 804-8.
- Pape, M., Schneider, T. and von Samson-Himmelstjerna, G. (2002) 'Investigation of diversity and isotypes of the beta-tubulin cDNA in several small strongyle (Cyathostominae) species', *Journal of Parasitology*, 88(4), pp. 673-677.
- Pape, M., von Samson-Himmelstjerna, G. and Schnieder, T. (1999) 'Characterisation of the beta-tubulin gene of *Cylicocyclus nassatus*', *Int J Parasitol*, 29(12), pp. 1941-1947.
- Peachey, L. E., Pinchbeck, G. L., Matthews, J. B., Burden, F. A., Lespine, A., von Samson-Himmelstjerna, G., Krucken, J. and Hodgkinson, J. E. (2017) 'P-glycoproteins play a role in ivermectin resistance in cyathostomins', *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 7(3), pp. 388-398.
- Pecheur, M. (1962) 'Etude de l'influence du pH et de l'action de la Cyanamide calcique sur les oeufs et les larves de Trichostrongyles et de Strongyloides (Influence of pH and calcium cyanamide on eggs and larvae of Trichostrongyles and Strongyloides)', *Med. Vet.*, 106, pp. 18-41.
- Peet, R. L. and Gardner, J. J. (1986) 'Poisoning of cattle by hairy or woolly-pod vetch, *Vicia villosa* subspecies *dasycarpa*', *Aust Vet J*, 63(11), pp. 381-2.
- Peregrine, A. S., Molento, M. B., Kaplan, R. M. and Nielsen, M. K. (2014) 'Anthelmintic resistance in important parasites of horses: does it really matter?', *Vet Parasitol*, 201(1-2), pp. 1-8.
- Pinnock, R. D., Sattelle, D. B., Gration, K. A. and Harrow, I. D. (1988) 'Actions of potent cholinergic anthelmintics (morantel, pyrantel and levamisole) on an identified insect

- neurone reveal pharmacological differences between nematode and insect acetylcholine receptors', *Neuropharmacology*, 27(8), pp. 843-8.
- Pirani, M., Groß, R., Tama, M., Schneider, R., Singer, F., Pauling, H. and Keinath, G. (1930) *Elektrothermie*. Julius Springer Verlag.
- Podstatzky, L. 'Einsatz von Düngemitteln und ihre Wirkung auf Parasitenstadien'. *Parasitologische Fachtagung für Biologische Landwirtschaft*, A-Irdning, 22.11.2012.
- Podstatzky, L. G., M. 'Einfluss von Düngemittel auf die Wiederfindungsraten von Parasitenlarven', 12. *Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau*, Bonn, 05.-08.03.2013: Verlag Dr. Köster.
- Podstatzky, L. 'Auswirkungen einer einmaligen Kalkdüngung bzw. regelmäßigen Weidebehandlung mit EM/MK5 bei intensiver Beweidung mit Lämmern'. *Wissenschaftstagung Eberswalde*, 2015.
- Polley, L. (1986) 'Strongylid parasites of horses: experimental ecology of the free-living stages on the Canadian prairie', *Am J Vet Res*, 47(8), pp. 1686-93.
- Pokorny, T. (2008) 'Entsorgungsmöglichkeiten von Pferdemist: Moderne Wege zur Mistbehandlung', Verlag Dr. Müller
- Pouplard, L. and Pecheur, M. (1977) 'Bekämpfung der Wurmkrankheiten von Weidevieh', *Hohenheimer Arbeiten*, Reihe: Tierische Produktion, Herausgeber: Prof. Dr. S. Scholtyssek, Heft 87, Verlag Eugen Ulmer Stuttgart, ISBN 3-8001-8139-8, S. 28-41.
- Quinelato, S., Couto, M. C. M., Ribeiro, B. C., Santos, C. N., de Souza, L. S., dos Anjos, D. H. S., Sampaio, I. B. M. and Rodrigues, L. M. A. (2008) 'The ecology of horse cyathostomin infective larvae (Nematoda-Cyathostominae) in tropical southeast Brazil', *Vet Parasitol*, 153(1-2), pp. 100-107.
- Rabel, B., McGregor, R. and Douch, P. G. (1994) 'Improved bioassay for estimation of inhibitory effects of ovine gastrointestinal mucus and anthelmintics on nematode larval migration', *Int J Parasitol*, 24(5), pp. 671-6.
- Rampelmann & Spliethoff GmbH & Co. KG. Paddock Cleaner. Beelen. Available at: <https://www.rasplie.de/paddock-cleaner.html>.
- Raundrup, K., Clemmensen, S., Forchhammer, M. C. and Kapel, C. M. (2003) 'Field method for isolation of trichostrongyle larvae from vegetation of natural pastures of Arctic ruminants', *J Parasitol*, 89(2), pp. 422-3.
- Raynaud, J. P. and Gruner, L. (1982) 'Feasibility of herbage sampling in large extensive pastures and availability of cattle nematode infective larvae in mountain pastures', *Vet Parasitol*, 10(1), pp. 57-64.
- Rehbein, S., Visser, M. and Winter, R. (2013) 'Prevalence, intensity and seasonality of gastrointestinal parasites in abattoir horses in Germany', *Parasitol Res*, 112(1), pp. 407-13.
- Reinemeyer, C. R. (2009) 'Diagnosis and control of anthelmintic-resistant *Parascaris equorum*', *Parasit Vectors*, 2 Suppl 2, pp. S8.
- Reinemeyer, C. R. (2012) 'Anthelmintic resistance in non-strongylid parasites of horses', *Vet Parasitol*, 185(1), pp. 9-15.
- Reinemeyer, C. R., Prado, J. C., Nichols, E. C. and Marchiondo, A. A. (2010) 'Efficacy of pyrantel pamoate against a macrocyclic lactone-resistant isolate of *Parascaris equorum* in horses', *Vet Parasitol*, 171(1-2), pp. 111-5.
- Reinemeyer, C. R., Smith, S. A., Gabel, A. A. and Herd, R. P. (1986) 'Observations on the population dynamics of five cyathostome nematode species of horses in northern USA', *Equine Vet J*, 18(2), pp. 121-4.
- Relf, V. E., Morgan, E. R., Hodgkinson, J. E. and Matthews, J. B. (2013) 'Helminth egg excretion with regard to age, gender and management practices on UK Thoroughbred studs', *Parasitology*, 140(5), pp. 641-52.
- Ribbeck, R., Schusser, G. F. and Haupt, W. (1997) 'Occurrence of larval cyathostomiasis in horses', *Tierärztliche Umschau*, 52(5), pp. 254-&.

- Rieder, N., Beelitz, P. and Gothe, R. (1995) '[Incidence of *Parascaris equorum* in foals and their mares after strategic use of wide-spectrum anthelmintics for several years]', *Tierarztl Prax*, 23(1), pp. 53-8.
- Rinaldi, L., Mihalca, A. D., Cirillo, R., Maurelli, M. P., Montesano, M., Capasso, M. and Cringoli, G. (2012) 'FLOTAC can detect parasitic and pseudoparasitic elements in reptiles', *Exp Parasitol*, 130(3), pp. 282-4.
- Robinson, M. W., McFerran, N., Trudgett, A., Hoey, L. and Fairweather, I. (2004) 'A possible model of benzimidazole binding to beta-tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement', *J Mol Graph Model*, 23(3), pp. 275-84.
- Rothwell, J. T. and Sangster, N. C. (1993) 'An in vitro assay utilising parasitic larval *Haemonchus contortus* to detect resistance to closantel and other anthelmintics', *Int J Parasitol*, 23(5), pp. 573-8.
- Rubio, S., Donoso, A. and Perez, F. J. (2014) 'The dormancy-breaking stimuli "chilling, hypoxia and cyanamide exposure" up-regulate the expression of alpha-amylase genes in grapevine buds', *J Plant Physiol*, 171(6), pp. 373-81.
- Russell, A. F. (1948) 'The development of helminthiasis in thoroughbred foals', *J Comp Pathol Ther*, 58(2), pp. 107-27.
- Saes, I. L., Vera, J. H. S., Fachioli, D. F., Yamada, P. H., Dellaqua, J. V. T., Saes, R. L., Amarante, A. F. T. and Soutello, R. V. G. (2016) 'Time required by different anthelmintics to reach expected efficacy levels in horses infected by strongyles', *Vet Parasitol*, 229, pp. 90-92.
- Sangster, N. C. (1999) 'Anthelmintic resistance: past, present and future', *Int J Parasitol*, 29(1), pp. 115-24; discussion 137-8.
- Schiele, R., Soll, F., Weltle, D. and Valentin, H. (1981) 'Field study of workers with longterm exposure to calcium cyanamide (author's transl)', *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B*, 173(1-2), pp. 13-28.
- Schneider, S., Pfister, K., Becher, A. M. and Scheuerle, M. C. (2014) 'Strongyle infections and parasitic control strategies in German horses - a risk assessment', *BMC Vet Res*, 10, pp. 262.
- Schnieder, T. (2006) *Veterinärmedizinische Parasitologie*. Parey, S. 320-324.
- Schougaard, H. and Nielsen, M. K. (2007) 'Apparent ivermectin resistance of *Parascaris equorum* in foals in Denmark', *Vet Rec*, 160(13), pp. 439-40.
- Schusser, G., Kopf, N. and Prosl, H. (1988) 'Impaction (Obturatorio intestini jejuni) of the small-intestine by *Parascaris equorum* caused by the Administration of Pyrantel pamoate in a 5-months-old foal', *Wien. Tierarzt. Monat.*, 75(4), pp. 152-55.
- Shi, K., Wang, L., Zhou, Y. H., Yu, Y. L. and Yu, J. Q. (2009) 'Effects of calcium cyanamide on soil microbial communities and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumberinum*', *Chemosphere*, 75(7), pp. 872-7.
- Slocombe, J. O. (1979) 'Prevalence and treatment of tapeworms in horses', *Can Vet J*, 20(5), pp. 136-40.
- Slocombe, J. O. and McCraw, B. M. (1980) 'Evaluation of pyrantel pamoate, nitramisole and avermectin B1a against migrating *Strongylus vulgaris* larvae', *Can J Comp Med*, 44(1), pp. 93-100.
- Slocombe, J. O. and McCraw, B. M. (1982) 'Controlled tests of fenbendazole against migrating *Strongylus vulgaris* in ponies', *Am J Vet Res*, 43(3), pp. 541-2.
- Slocombe, J. O., McCraw, B. M., Pennock, P. W. and Baird, J. D. (1983) 'Effectiveness of fenbendazole against later 4th-stage *Strongylus vulgaris* in ponies', *Am J Vet Res*, 44(12), pp. 2285-9.
- Slocombe, J. O., McCraw, B. M., Pennock, P. W. and Vasey, J. (1982) 'Effectiveness of ivermectin against later 4th-stage *Strongylus vulgaris* in ponies', *Am J Vet Res*, 43(9), pp. 1525-9.
- Slocombe, J. O. D., de Gannes, R. V. G. and Lake, M. C. (2007) 'Macrocyclic lactone-resistant *Parascaris equorum* on stud farms in Canada and effectiveness of fenbendazole and pyrantel pamoate', *Veterinary Parasitology*, 145(3-4), pp. 371-376.

- Smeal, M. G. and Hendy, G. A. (1972) 'A technique for the recovery of strongyloid infective larvae from pasture', *J Helminthol*, 46(3), pp. 201-11.
- Smith, C. F. (1973) 'Some aspects of the pharmacology of pyrantel', *NZ Vet J*, 21(3), pp. 52-3.
- Smith, L. A., Marion, G., Swain, D. L., White, P. C. and Hutchings, M. R. (2009) 'The effect of grazing management on livestock exposure to parasites via the faecal-oral route', *Prev Vet Med*, 91(2-4), pp. 95-106.
- Smith, M. A., Nolan, T. J., Rieger, R., Aceto, H., Levine, D. G., Nolen-Walston, R. and Smith, B. I. (2015) 'Efficacy of major anthelmintics for reduction of fecal shedding of strongyle-type eggs in horses in the Mid-Atlantic region of the United States', *Vet Parasitol*, 214(1-2), pp. 139-43.
- Soltys, D., Gniadzowska, A. and Bogatek, R. (2013) 'Inhibition of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) root growth by cyanamide is not always accompanied with enhancement of ROS production', *Plant Signal Behav*, 8(5), pp. e23994.
- Soltys, D., Rudzinska-Langwald, A., Gniadzowska, A., Wisniewska, A. and Bogatek, R. (2012) 'Inhibition of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) root growth by cyanamide is due to altered cell division, phytohormone balance and expansin gene expression', *Planta*, 236(5), pp. 1629-38.
- Soltys, D., Rudzinska-Langwald, A., Kurek, W., Gniadzowska, A., Sliwinska, E. and Bogatek, R. (2011) 'Cyanamide mode of action during inhibition of onion (*Allium cepa* L.) root growth involves disturbances in cell division and cytoskeleton formation', *Planta*, 234(3), pp. 609-21.
- Soltys, D., Rudzinska-Langwald, A., Kurek, W., Szajko, K., Sliwinska, E., Bogatek, R. and Gniadzowska, A. (2014) 'Phytotoxic cyanamide affects maize (*Zea mays*) root growth and root tip function: from structure to gene expression', *J Plant Physiol*, 171(8), pp. 565-75.
- Stromberg, B. E. (1997) 'Environmental factors influencing transmission', *Vet Parasitol*, 72(3-4), pp. 247-56; discussion 257-64.
- Stromberg, B. E. and Averbeck, G. A. (1999) 'The role of parasite epidemiology in the management of grazing cattle', *Int J Parasitol*, 29(1), pp. 33-9; discussion 49-50.
- Stromberg, B. E., Gasbarre, L. C., Waite, A., Bechtol, D. T., Brown, M. S., Robinson, N. A., Olson, E. J. and Newcomb, H. (2012) 'Cooperia punctata: effect on cattle productivity?', *Vet Parasitol*, 183(3-4), pp. 284-91.
- Super Scooter, Pakenham, Victoria, Australia. Available at: <http://superscooper.co/>.
- Tandon, R. and Kaplan, R. M. (2004) 'Evaluation of a larval development assay (DrenchRite) for the detection of anthelmintic resistance in cyathostomin nematodes of horses', *Vet Parasitol*, 121(1-2), pp. 125-42.
- Taylor, E.L. (1939) 'Technique for the estimation of pasture infestation by Strongyloid larvae', *Parasitology*, 13, pp. 473-8
- Tavela Ade, O., de Araujo, J. V., Braga, F. R., da Silveira, W. F., Dornelas e Silva, V. H., Carretta Junior, M., Borges, L. A., Araujo, J. M., Benjamin Ldos, A., Carvalho, G. R. and de Paula, A. T. (2013) 'Coadministration of sodium alginate pellets containing the fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* on cyathostomin infective larvae after passing through the gastrointestinal tract of horses', *Res Vet Sci*, 94(3), pp. 568-72.
- Terada, M., Ishii, A. I., Kino, H. and Sano, M. (1982) 'Studies on chemotherapy of parasitic helminths (VIII). Effects of some possible neurotransmitters on the motility of *Angiostrongylus cantonensis*', *Jpn J Pharmacol*, 32(4), pp. 643-53.
- Thamsborg, S. M., Jorgensen, R. J., Waller, P. J. and Nansen, P. (1996) 'The influence of stocking rate on gastrointestinal nematode infections of sheep over a 2-year grazing period', *Vet Parasitol*, 67(3-4), pp. 207-24.
- Thamsborg, S. M., Roepstorff, A. and Larsen, M. (1999) 'Integrated and biological control of parasites in organic and conventional production systems', *Vet Parasitol*, 84(3-4), pp. 169-86.

- Traversa, D., Castagna, G., von Samson-Himmelstjerna, G., Meloni, S., Bartolini, R., Geurden, T., Pearce, M. C., Woring, E., Besognet, B., Milillo, P. and D'Espois, M. (2012) 'Efficacy of major anthelmintics against horse cyathostomins in France', *Vet Parasitol*, 188(3-4), pp. 294-300.
- 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. and Cobb, R. (2009) 'Anthelmintic resistance in cyathostomin populations from horse yards in Italy, United Kingdom and Germany', *Parasit Vectors*, 2 Suppl 2, pp. S2.
- Upjohn, M. M., Shipton, K., Lereth, T., Attwood, G. and Verheyen, K. L. (2010) 'Coprological prevalence and intensity of helminth infection in working horses in Lesotho', *Trop Anim Health Prod*, 42(8), pp. 1655-61.
- van Doorn, D. C., Kooyman, F. N., Eysker, M., Hodgkinson, J. E., Wagenaar, J. A. and Ploeger, H. W. (2010) 'In vitro selection and differentiation of ivermectin resistant cyathostomin larvae', *Vet Parasitol*, 174(3-4), pp. 292-9.
- Vercruysse, J. (1983) 'A survey of seasonal changes in nematode faecal egg count levels of sheep and goats in Senegal', *Vet Parasitol*, 13(3), pp. 239-44.
- Vercruysse, J. and Rew, R. S. (2002) *Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy*. CABI Publishing.
- Veronesi, F., Fioretti, D. P. and Genchi, C. (2010) 'Are macrocyclic lactones useful drugs for the treatment of *Parascaris equorum* infections in foals?', *Vet Parasitol*, 172(1-2), pp. 164-7.
- Veronesi, F., Moretta, I., Moretti, A., Fioretti, D. P. and Genchi, C. (2009) 'Field effectiveness of pyrantel and failure of *Parascaris equorum* egg count reduction following ivermectin treatment in Italian horse farms', *Vet Parasitol*, 161(1-2), pp. 138-41.
- Verschoor, B.C. and de Goede, R.G.M. (2000) 'The nematode extraction efficiency of the Oostenbrink elutriator-cottonwool filter method with special reference to nematode body size and life strategy', *Nematology*, 2(3)
- Vetidata Veterinärmedizinischer Informationsdienst für Arzneimittelanwendung. Leipzig. Available at: <https://www.vetidata.de/> (Accessed: 05.03. 2017).
- von Samson-Himmelstjerna, G. (2012) 'Anthelmintic resistance in equine parasites - detection, potential clinical relevance and implications for control', *Vet Parasitol*, 185(1), pp. 2-8.
- von Samson-Himmelstjerna, G., Blackhall, W. J., McCarthy, J. S. and Skuce, P. J. (2007a) 'Single nucleotide polymorphism (SNP) markers for benzimidazole resistance in veterinary nematodes', *Parasitology*, 134(Pt 8), pp. 1077-86.
- 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., Hoglund, J., Kaminsky, R., Kerboeuf, D., Kuttler, U., Papadopoulos, E., Posedi, J., Small, J., Varady, M., Vercruysse, J. and Wirtherle, N. (2009) 'Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes', *Parasitol Res*, 105(3), pp. 825-34.
- von Samson-Himmelstjerna, G., Fritzen, B., Demeler, J., Schurmann, S., Rohn, K., Schnieder, T. and Epe, C. (2007b) 'Cases of reduced cyathostomin egg-reappearance period and failure of *Parascaris equorum* egg count reduction following ivermectin treatment as well as survey on pyrantel efficacy on German horse farms', *Vet Parasitol*, 144(1-2), pp. 74-80.
- Wagland, B. M., Jones, W. O., Hribar, L., Bendixsen, T. and Emery, D. L. (1992) 'A new simplified assay for larval migration inhibition', *Int J Parasitol*, 22(8), pp. 1183-5.
- Waller, P. J. (1987) 'Anthelmintic resistance and the future for roundworm control', *Vet Parasitol*, 25(2), pp. 177-91.
- Waller, P. J., Schwan, O., Ljungstrom, B. L., Rydzik, A. and Yeates, G. W. (2004) 'Evaluation of biological control of sheep parasites using *Duddingtonia flagrans* under commercial farming conditions on the island of Gotland, Sweden', *Vet Parasitol*, 126(3), pp. 299-315.

- Warnick, L. D. (1992) 'Daily variability of equine fecal strongyle egg counts', *Cornell Vet*, 82(4), pp. 453-63.
- Wehrstedt, K. D., Wildner, W., Guthner, T., Holzrichter, K., Mertschenk, B. and Ulrich, A. (2009) 'Safe transport of cyanamide', *J Hazard Mater*, 170(2-3), pp. 829-35.
- Wilkes, E., McConaghy, F. F., Thompson, R. L., Dawson, K., Sangster, N. C. and Hughes, K. J. (2017) 'Efficacy of a morantel-abamectin combination for the treatment of resistant ascarids in foals', *Aust Vet J*, 95(3), pp. 85-88.
- Wolstenholme, A. J. and Rogers, A. T. (2005) 'Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemyacin anthelmintics', *Parasitology*, 131 Suppl, pp. S85-95.
- Xiao, L., Herd, R. P. and Majewski, G. A. (1994) 'Comparative efficacy of moxidectin and ivermectin against hypobiotic and encysted cyathostomes and other equine parasites', *Vet Parasitol*, 53(1-2), pp. 83-90.
- Young, R. R. and Trajstman, A. C. (1980) 'A rapid technique for the recovery of strongyloid infective larvae from pasture and soil samples', *Parasitology*, 80(3), pp. 425-31.

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Georg von Samson-Himmelstjerna für die Überlassung und Betreuung meiner Dissertation. Während meiner Arbeit im Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin und im Gestüt Lewitz habe ich auch viel für meine praktische Tätigkeit als Pferde-Tierärztin gelernt.

Ebenso danke ich meinen Zweitkorrektorinnen Prof. Dr. Heidrun Gehlen und PD Dr. Roswitha Merle für Ihre Zeit und weitere Anregungen.

Vielen Dank an meine liebe Kollegin Dr. Friederike Knapp-Lawitzke, die mich in Ihre Gras- und Erdwaschmethoden eingearbeitet hat, sowie an Prof. Janina Demeler, die mir bei der Planung der Laborversuche wertvolle Tips gegeben hat. Danke auch allen weiteren Labormitarbeitern für die Beantwortung von Fragen bzw. für die Hilfe und Einarbeitung im Labor und natürlich vielen Dank an Frau Louise Le Bel für die schnelle Hilfe bei jeglichen administrativen Fragen und Anträgen.

Auch allen Mitdoktoranden und Post-Docs, danke ich für die Zusammenarbeit und denke gerne an die gemeinsame Labor- und Bürozeit zurück.

Bei der Firma AlzChem, speziell Herrn Dr. Hans-Jürgen Klasse und Herrn Dr. Karl-Heinz Fritzsche, bedanke ich mich für die Bereitstellung des Kalkstickstoffdüngers, sowie der Cyanamid-Lösung und für den vielen Input und das Knowhow rund um den Dünger.

Des Weiteren gilt mein Dank Michael Krieger und allen weiteren Mitarbeitern des Gestüts Lewitz, die mich beim Management meiner „Studienherden“ und der Düngung der Versuchsflächen unterstützt haben und auch dem gesamten Fohlenrunden Team, sowie Dr. Monica Venner, für die Unterstützung auch von mir als externem Doktoranden.

Großer Dank gilt auch meiner Familie und meinem Freund, die mir immerwährend Rückhalt geben und regelmäßig zum Korrekturlesen bereit waren oder mich bei technischen Problemen unterstützt haben.

Zuletzt möchte ich noch Studienpony Otto erwähnen, den ich ohne meine Arbeit am Institut für Parasitologie der FU Berlin nie kennengelernt hätte, der aber jetzt bei mir ein zu Hause gefunden hat und meine Freizeit bereichert.

Finanzielle Unterstützung/Interessenskonflikt

Der Kalkstickstoffdünger (Perlka), sowie die Cyanamidlösung (Alzogur) wurden von der Firma AlzChem Group AG zur Verfügung gestellt, hierdurch besteht kein Interessenskonflikt.

Selbstständigkeitserklärung

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

Berlin, den 09.06.2020

Florina D. Jung