

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

Vergleichende Untersuchungen zur natürlichen Infektion mit *Haemonchus contortus* und
Teladorsagia circumcincta sowie zu ausgewählten immunologischen und klinischen
Parametern zwischen einer Hochleistungsschafrasse (Texel Schafe) und einer
ursprünglichen, alten Haustierschafrasse (Soay Schafe)

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

vorgelegt von
Anja Brunken
Tierärztin aus Rendsburg

Berlin 2016
Journal-Nr.: 3852

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Prof. Dr. med. vet. Janina Demeler, PhD
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Salah Amasheh
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Dr. Matthias Gauly

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Texel, lambs, sheep breeds, resistance, *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta*, helminths, comparisons, faecal egg count, Schleswig-Holstein, parasites, parasitoses, *Trichostrongylus*, *Eimeria*, *Strongyloides papillosus*, *Moniezia*, hematokrit, ELISA, polymerase chain reaction, gastrointestinal diseases

Tag der Promotion: 28.07.2016

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-750-7

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2016

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2016

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	X
Abbildungsverzeichnis	XIII
I. EINLEITUNG	1
II. LITERATURÜBERSICHT	2
1. Ursprüngliche und Hochleistungsschafressen	2
1.1 Soay Schafe	2
1.2 Texel Schafe	4
2. Magen-Darm-Strongyliden (MDS) allgemein	5
2.1 Morphologie	5
2.2 Epidemiologie	5
2.3 Entwicklungszyklus	6
3. <i>Haemonchus contortus</i>	6
3.1 Morphologie	6
3.2 Epidemiologie	7
3.3 Pathogenese und Klinik	7
4. <i>Teladorsagia circumcincta</i>	8
4.1 Morphologie	8
4.2 Epidemiologie	8
4.3 Pathogenese und Klinik	9
5. <i>Trichostrongylus</i> subspezies	10
5.1 Morphologie	10
5.2 Epidemiologie	10

Inhaltsverzeichnis

5.3	Pathogenese und Klinik	10
6.	Immunität von Schafen gegenüber MDS-Infektionen	11
7.	Diagnostik von MDS-Infektionen	14
7.1	Koproskopische Diagnostikverfahren	14
7.2	Immunologische Diagnostikverfahren	17
7.3	Molekulare Diagnostikverfahren	19
8.	Therapie von MDS-Infektionen	20
8.1	Anthelminthika-Einsatz	20
8.2	Anthelminthika-Resistenz	21
8.3	Vakzination	22
8.4	Alternative Therapien	24
9.	Management	24
10.	Genetische Parasitenresistenz und -züchtung	26
10.1	Einflußfaktoren für die Resilienz/Resistenz bei Schafen	27
10.2	Unterschiede zwischen Rassen	28
10.3	Unterschiede zwischen Einzeltieren	29
10.4	Indikatormerkmale für Resistenz gegenüber Parasiten	29
10.4.1	Eizahl pro Gramm Kot	30
10.4.2	Hämatokritwert	31
10.4.3	FAMACHA® Anaemia guide	32
10.4.4	Antikörpernachweis	32
10.5	Marker assoziierte Selektion	33
III.	MATERIAL UND METHODEN	34
1.	Material	34
1.1	Chemikalien	34
1.2	Puffer und Lösungen	36
1.3	Medien und Nährböden	38
1.4	Enzyme	39

1.5	Bakterienstämme	40
1.6	Vektoren	40
1.7	Antikörper	40
1.8	Sera	41
1.9	Antigene	41
1.10	Reaktionskits	41
1.11	Geräte und Zubehör	42
1.12	Software	44
1.13	Ein- und Mehrwegartikel	45
2.	Methoden	47
2.1	Versuchstiere	47
2.2	Versuchsaufbau- und Versuchsdurchführung	48
2.3	Klinische Untersuchungsverfahren	51
	2.3.1 Ermittlung des Körpergewichtes	52
	2.3.2 FAMACHA® Anaemia guide	52
2.4	Parasitologische Untersuchungsverfahren	52
	2.4.1 Modifiziertes McMaster-Zählverfahren	52
	2.4.2 Larvenauswanderungsverfahren nach Baermann-Wetzel	53
	2.4.3 Larvenkultur zur Gewinnung von Drittlarven von Magen-Darm-Strongyliden	53
2.5	Hämatologische Untersuchungsverfahren	54
	2.5.1 Hämatokritwert-Bestimmung	54
2.6	ELISA	54
	2.6.1 Verfahren zur Detektion von spezifischen Antikörpern gegen <i>T. circumcincta</i>	55
	2.6.2 Verfahren zur Detektion von spezifischen Antikörpern gegen das 24 kDa exkretorisch-sekretorische Protein von <i>H. contortus</i>	56
2.7	Sektion des Magen-Darm-Traktes	57

Inhaltsverzeichnis

2.7.1	Labmagen	57
2.7.2	Dünndarm	58
2.8	Molekularbiologische Verfahren	58
2.8.1	Herstellung des 24 kDa exkretorisch-sekretorischen Proteins von <i>H. contortus</i> für den Einsatz als Antigen im ELISA	58
2.8.2	Qualitative Speziesbestimmung von Drittlarven	68
2.9	Statistische Auswertung	69
IV.	ERGEBNISSE	70
1.	Deskriptive Statistik	70
1.1	Anzahl der Versuchstiere	70
1.2	Behandlungen	71
1.3	Mittlerer Geburtszeitpunkt	72
1.4	Klinische Parameter	72
1.4.1	Körpergewicht	72
1.4.2	Gewichtsveränderung	73
1.4.3	FAMACHA® Anaemia guide	76
1.4.4	Rektale Körpertemperatur	76
1.5	Hämatologische Parameter	77
1.5.1	Hämatokritwert	77
1.5.2	Hämatokritwertabweichung	78
1.6	Parasitologische Parameter	78
1.6.1	Magen-Darm-Strongyliden Eizahl pro Gramm Kot	78
1.6.2	<i>Strongyloides papillosus</i> Eizahl pro Gramm Kot	82
1.6.3	Kokzidien-Oozysten Anzahl pro Gramm Kot	84
1.6.4	<i>Nematodirus</i> spp.	86
1.6.5	Korrelationen	86
1.6.6	Larvenauswanderungsverfahren nach Baermann Wetzel	88

1.7	Sektion	88
1.8	Gattungsspezifische PCR	92
2.	Analytische Statistik	93
2.1	Gewichtsveränderung, LMM (1)	94
2.2.	FAMACHA [®] Anaemia guide Kategorie, LMM (2)	96
2.3	Hämatokritwertabweichung, LMM (3)	97
2.4	Magen-Darm-Strongyliden-Eiausscheidung pro Gramm Kot, LMM (4a)	99
2.5	Magen Darm-Strongyliden-Eiausscheidung pro Gramm Kot, GLMM (4b)	101
2.6	<i>S. papillosus</i> -Eiausscheidung pro Gramm Kot, LMM (5a)	103
2.7	<i>S. papillosus</i> -Eiausscheidung pro Gramm Kot, GLMM (5b)	104
2.8	Kokzidien-Oozystenausscheidung pro Gramm Kot, LMM (6a)	106
2.9	Kokzidien-Oozystenausscheidung pro Gramm Kot, GLMM (6b)	107
2.10	Zusammenfassung der Modellergebnisse, Untersuchung der Varianzhomogenität und Verteilung der Daten	108
3.	Ergebnisse der Molekularbiologischen Verfahren	116
3.1	Ergebnisse des Verfahrens zur Herstellung des 24 kDa exkretorisch- sekretorischen Proteins von <i>H. contortus</i>	116
4.	Ergebnisse der ELISA	120
4.1	Einsatz des 24 kDa exkretorisch-sekretorischen Proteins von <i>H. contortus</i> (HcES24) im ELISA	120
4.2	Ergebnisse zum Versuch der Etablierung eines ELISA zum Nachweis von spezifischem <i>T. circumcincta</i> IgG in Schafserum	121
V.	DISKUSSION	122
VI.	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	134
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	136
VIII.	SUMMARY	139
IX.	LITERATURVERZEICHNIS	142

Inhaltsverzeichnis

ANHANG	XV
PUBLIKATIONSLISTE	XXI
DANKSAGUNG	XXI
SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	XXIII

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bidest. H ₂ O	bidestilliertes Wasser
bp	Basenpaare
CD4	(engl.: cluster of differentiation 4)
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<i>C. curdicei</i>	<i>Cooperia curdicei</i>
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EHA	(engl.: Egg Hatch Assay)
ELISA	(engl.: Enzyme-linked immunosorbent assay)
EpG	Eizahl pro Gramm Kot
EpG1(log)	<i>S. papillosus</i> Eizahl pro Gramm Kot (logarithmiert)
EpG2(log)	Magen-Darm-Strongyloiden Eizahl pro Gramm Kot (logarithmiert)
ES	exkretorisch-sekretorisch
FAMACHA	FAMACHA [®] Anaemia guide
FAO	(engl.: Food and Agriculture Organization)
FEC	(engl.: Faecal Egg Count)
FECRT	(engl.: Faecal Egg Count Reduction Test)
<i>F. hepatica</i>	<i>Fasciola hepatica</i>
× g	Erdbeschleunigung
GIN	Gastrointestinale Nematoden
GLMM	(engl.: Generalized Linear Mixed Model)
HcES24	24 kDa exkretorisch-sekretorisches Protein von <i>H. contortus</i>
<i>H. contortus</i>	<i>Haemonchus contortus</i>
hwertd	Hämatokritwertabweichung
IFN _γ	Interferon γ

Abkürzungsverzeichnis

Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INRA 401	französische Schafrasse
ITS1/2	(engl.: Internal transcribed spacers 1/2)
kDa	KiloDalton
KGW	Körpergewicht
L1-L4	erste bis vierte Larve
LDA	(engl.: Larval Development Assay)
LMA	(engl.: Larval Motility Assay)
LMIA	(engl.: Larval Migration Inhibition Assay)
LMM	(engl.: Linear Mixed Model)
LF(I)A	(engl.: Larval Feeding (Inhibition) Assay)
MDS	Magen-Darm-Strongyliden
<i>N. battus</i>	<i>Nematodirus battus</i>
NCBI	(engl.: National Centre for Biotechnology Information)
OD	Optische Dichte
OpG	Kokzidien-Oozysten pro Gramm Kot
<i>O. leptospicularis</i>	<i>Ostertagia leptospicularis</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	lat.: potentia hydrogenii
QTL	(engl.: Quantitative trait loci)
RT	Raumtemperatur
S	Soay Schafe
SNP	(engl.: single nucleotide polymorphisms)
spp.	subspezies
<i>S. papillosus</i>	<i>Strongyloides papillosus</i>
syn.	synonym[isch]
T	Texel Schafe

Tab.	Tabelle
<i>T. circumcincta</i>	<i>Teladorsagia circumcincta</i>
<i>T. trifurcata</i>	<i>Teladorsagia trifurcata</i>
<i>Tr. axei</i>	<i>Trichostrongylus axei</i>
<i>Tr. colubriformis</i>	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>
<i>Tr. vitrinus</i>	<i>Trichostrongylus vitrinus</i>
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TT	(engl.: Targeted Treatment)
TST	(engl.: Targeted Selective Treatment)
U	Einheit (engl.: unit)
UNESCO	(engl.: United Nations Educational Scientific and Cultural Organization) Organisation der Vereinten Nationen für Erziehung, Wissenschaft und Kultur

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Chemikalien	34
Tabelle 2:	Puffer und Lösungen	36
Tabelle 3:	Medien und Nährböden	38
Tabelle 4:	Enzyme	39
Tabelle 5:	Bakterienstämme (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland)	40
Tabelle 6:	Vektoren (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland)	40
Tabelle 7:	Antikörper	40
Tabelle 8:	Sera	41
Tabelle 9:	Antigene	41
Tabelle 10:	Reaktionskits	41
Tabelle 11:	Geräte und Zubehör	42
Tabelle 12:	Software	44
Tabelle 13:	Ein- und Mehrwegartikel	45
Tabelle 14:	Versuchsdurchführung 2009	50
Tabelle 15:	Versuchsdurchführung 2010	50
Tabelle 16:	Ergebnisse der Betrachtung der Variablen (transformierten Daten) mit der Korrelation nach Pearson	87
Tabelle 17:	Ergebnisse der Betrachtung der Variablen (transformierten Daten) mit Spearman's Rang Korrelation	87
Tabelle 18:	Anzahl der adulten <i>H. contortus</i> in der Labmagen-Sektion 2009	88
Tabelle 19:	Anzahl der adulten Helminthen in der Labmagen-Sektion 2010	89
Tabelle 20:	Anzahl der adulten Helminthen in der Dünndarm-Sektion 2010	90
Tabelle 21:	Ergebnisse der gattungsspezifischen PCR	92
Tabelle 22:	Ergebnisse des LMM (1) für die Gewichtsveränderung	94
Tabelle 23:	Ergebnisse des reduzierten LMM (1red) für Gewichtsveränderung	95

Tabelle 24:	Vergleich des vollen (1) und reduzierten (1red) LMM für die Gewichtsveränderung mittels ANOVA und Chi-Quadrat-Test	95
Tabelle 25:	Ergebnisse des LMM (2) für die FAMACHA [®] Anaemia guide Kategorie	96
Tabelle 26:	Ergebnisse des reduzierten LMM (2red) für die FAMACHA [®] Anaemia guide Kategorie	97
Tabelle 27:	Vergleich des vollen (2) und reduzierten (2red) LMM für die FAMACHA [®] Anaemia guide Kategorie mittels ANOVA und Chi-Quadrat-Test	97
Tabelle 28:	Ergebnisse des LMM (3) für die Hämatokritwertabweichung	98
Tabelle 29:	Ergebnisse des reduzierten LMM (3red) für die Hämatokritwertabweichung	98
Tabelle 30:	Vergleich des vollen (3) und reduzierten (3red) LMM für die Hämatokritwertabweichung mittels ANOVA und Chi-Quadrat-Test	98
Tabelle 31:	Ergebnisse des LMM (4a) für die MDS-EpG (EpG2log)	99
Tabelle 32:	Ergebnisse des reduzierten LMM (4a red) für die MDS-EpG (EpG2log)	100
Tabelle 33:	Vergleich des vollen (4a) und reduzierten (4a red) LMM für die MDS-EpG (EpG2log) mittels ANOVA und Chi-Quadrat-Test	100
Tabelle 34:	Ergebnisse des GLMM (4b) für die MDS-EpG (EpG2log)	101
Tabelle 35:	Ergebnisse des reduzierten GLMM (4b red) für die MDS-EpG (EpG2log)	101
Tabelle 36:	Vergleich des vollen (4b) und reduzierten (4b red) GLMM für die MDS-EpG (EpG2log) mittels ANOVA und Chi-Quadrat-Test	102
Tabelle 37:	Ergebnisse des LMM (5a) für die <i>S. papillosus</i> -EpG (EpG1log)	103
Tabelle 38:	Ergebnis des reduzierten LMM (5a red) für die <i>S. papillosus</i> -EpG (EpG1log)	103
Tabelle 39:	Vergleich des vollen (5a) und reduzierten (5a red) LMM für die <i>S. papillosus</i> -EpG (EpG1log) mittels ANOVA und Chi-Quadrat-Test	104
Tabelle 40:	Ergebnisse des GLMM (5b) für die <i>S. papillosus</i> -EpG (EpG1log)	104
Tabelle 41:	Ergebnisse des reduzierten GLMM (5b red) für die <i>S. papillosus</i> -EpG (EpG1log)	105
Tabelle 42:	Vergleich des vollen (5b) und reduzierten (5b red) GLMM für die <i>S. papillosus</i> -EpG (EpG1log) mittels ANOVA und Chi-Quadrat-Test	105

Tabellenverzeichnis

Tabelle 43:	Ergebnisse des LMM (6a) für die Kokzidien-OpG (OpGlog)	106
Tabelle 44:	Ergebnisse des reduzierten LMM (6a) für die Kokzidien-OpG (OpGlog)	106
Tabelle 45:	Vergleich des vollen (6a) und reduzierten (6a red) LMM für die Kokzidien-OpG (OpGlog) mittels ANOVA und Chi-Quadrat-Test	107
Tabelle 46:	Ergebnisse des GLMM (6b) für die Kokzidien-OpG (OpGlog)	107
Tabelle 47:	Ergebnisse des reduzierten GLMM (6b red) für die Kokzidien-OpG (OpGlog)	108
Tabelle 48:	Vergleich des vollen (6b) und reduzierten (6b red) GLMM für die Kokzidien-OpG (OpGlog) mittels ANOVA und Chi-Quadrat-Test	108
Tabelle 49:	Auflistung der eingesetzten Sera im ELISA	XVI
Tabelle 50:	Liste der Versuchstiere 2009	XVIII
Tabelle 51:	Liste der Versuchstiere 2010	XIX

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Absolutgewicht der Schafrassen in Kilogramm Körpergewicht (Lebendmasse) im Untersuchungsjahr 2009	74
Abbildung 2: Absolutgewicht der Schafrassen in Kilogramm Körpergewicht (Lebendmasse) im Untersuchungsjahr 2010	75
Abbildung 3: Relative Häufigkeiten der FAMACHA [®] Anaemia guide Kategorien getrennt nach Schafrasse und Untersuchungsjahr	76
Abbildung 4: Mittlere Hämatokritwerte (in %) beider Untersuchungsjahre getrennt nach Schafrasse	77
Abbildung 5: Verlauf der arithmetischen Mittelwerte der logarithmierten MDS-EpG-Daten getrennt nach Schaf und Jahr	81
Abbildung 6: Verlauf der arithmetischen Mittelwerte der logarithmierten <i>S. papillosus</i> -EpG-Daten getrennt nach Schafrasse und Jahr	83
Abbildung 7: Verlauf der arithmetischen Mittelwerte der logarithmierten OpG-Daten getrennt nach Schafrasse und Jahr	85
Abbildung 8: Gesamtanzahl der bei der Sektion 2010 nachgewiesenen adulten Helminthen im Labmagen und Dünndarm beider Schafrassen	91
Abbildung 9: Beispiel für das Ergebnis einer qualitativen gattungsspezifischen PCR für <i>Tr. colubriformis</i> (die nachgewiesenen Banden liegen bei 100bp)	93
Abbildung 10: Verteilung der Residuen für die Gewichtsveränderung	110
Abbildung 11: Verteilung der Residuen für die MDS-EpGlog	110
Abbildung 12: Verteilung der Residuen für die OpGlog	111
Abbildung 13: Verteilung der Residuen für die <i>S. papillosus</i> -Epglog	111
Abbildung 14: Verteilung der Residuen für die Hämatokritwertabweichung	112
Abbildung 15: Verteilung der Residuen für die FAMACHA [®] Anaemia guide Kategorie	112
Abbildung 16: QQ-Plot der Residuen der Gewichtsveränderung	113
Abbildung 17: QQ-Plot der Residuen der MDS-EpGlog	113
Abbildung 18: QQ-Plot der Residuen der OpGlog	114

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 19: QQ-Plot der Residuen der <i>S. papillosus</i> -Epglog	114
Abbildung 20: QQ-Plot der Residuen der Hämatokritwertabweichung	115
Abbildung 21: QQ-Plot der Residuen der FAMACHA [®] Anaemia guide Kategorie	115
Abbildung 22: RT-PCR Amplifikation des offenen Leserasters von HcES24 für den Einsatz im pET151/D-TOPO [®] -Vektor	116
Abbildung 23: LMG194/HcES24 im SDS-Page	117
Abbildung 24: Aufgereinigtes HcES24-Protein mit schwachen Banden bei 32 und 45 kDa im SDS-Page	119
Abbildung 25: Darstellung des aufgereinigten 24 kDa ES-Proteins von <i>H. contortus</i> im Western Blot	120
Abbildung 26: Vektorkarte von pBAD/D-TOPO [®] (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)	XV
Abbildung 27: Vektorkarte von pET151/D-TOPO [®] (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)	XVI

I Einleitung

Magen-Darm-Strongyloiden-Infektionen bei landwirtschaftlichen Nutztieren führen weltweit zu starken wirtschaftlichen Einbußen in der landwirtschaftlichen Produktion (Sackett et al., 2006; Jackson et al., 2009). Im jahrzehntelangen großflächigen, teils ungezielten Einsatz von Anthelminthika und dem hohen Selektionsdruck auf die Parasiten durch ungünstiges Weidemanagement wird die Ursache der heute immer größer werdenden Resistenzproblematik vermutet. Die Frage nach dem richtigen Umgang mit Magen-Darm-Strongyloiden (MDS)-Infektionen ist in den Fokus von Landwirten, Tierärzten und Forschern gerückt. Die Züchtung auf Parasitenresistenz/-resilienz stellt eine vielversprechende, ergänzende Strategie bei der Suche nach Alternativen zum Anthelminthika-Einsatz dar. Einheimische bzw. ursprüngliche Schafrassen scheinen im Vergleich zu Hochleistungsschafrassen eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber Infektionen mit MDS aufzuweisen (Baker und Gray, 2004; Benavides et al., 2015). Vergleichende Studien zwischen Rassen hinsichtlich ihrer Resistenz gegenüber MDS-Infektionen sind in den gemäßigten Gebieten der Erde nur in geringem Maße, im Gegensatz dazu in den subtropischen und tropischen Gebieten der Erde in einer Vielzahl durchgeführt worden. Der Vergleich von bestimmten parasitologischen, klinischen und immunologischen Parametern, wie z. B. der Eizahl pro Gramm Kot (EpG) zwischen verschiedenen Rassen, dient derzeit zur Identifikation von resistenten Rassen oder resistenten/resilienten Tieren innerhalb einer Rasse (Bishop und Morris, 2007). Mit QTL-Analysen (engl.: Quantitative trait loci) wird z.B. versucht, diesen phänotypischen Merkmalen Bereiche auf Chromosomen zuzuordnen (Charon, 2004). Derzeit gibt es noch keinen Vergleich zwischen Soay- und Texel Schafen, wobei zu beiden Schafrassen schon Untersuchungen hinsichtlich der Resistenz gegenüber MDS durchgeführt wurden. Zum Beispiel wird bei beiden Rassen eine Assoziation der genetischen Variation ihres Intron 1 des Interferon γ Gens mit der Variation der Eizahl pro Gramm Kot vermutet (Coltman et al., 2001b; Sayers et al., 2005b).

Ziel der vorliegenden Studie war es, anhand der Parameter: Körpergewicht, FAMACHA[®] Anaemia guide, EpG, Speziesbestimmung von Drittlarven nach Larvenkultur, Bestimmung von speziesspezifischen Antikörpern im Serum gegen *T. circumcincta* und *H. contortus* und der Wurmanzahl in der Sektion, die Widerstandsfähigkeit beider Schafrassen gegenüber Infektionen mit MDS bei einer natürlichen Infektion unter den gleichen Haltungsbedingungen zu vergleichen, und die Prävalenz der im Tierpark Arche Warder e.V. in Schleswig-Holstein vorkommenden MDS zu bestimmen.

II Literaturübersicht

1 Ursprüngliche und Hochleistungsschafassen

Von vielen Paläontologen und Zoologen wird vermutet, dass der Ursprung des taurinen Viehs, der Ziegen und Schafe in der neolithischen Kernzone Anatoliens und des Nahen Ostens liegt. Durch neue genetische Analysen wird angenommen, dass die Domestikation des Viehs nicht an einem, sondern parallel an multiplen Ursprungsorten wie z. B. auch in Süd West Asien begonnen hat (Conolly et al., 2011; Larson und Burger, 2013) und sich Schafe in separierten Migrationsepisoden über Europa, Asien und Afrika ausgebreitet haben (Chessa et al., 2009). Die erste Migration brachte Wildschafe wie das Mufflon und Schafe, die aufgrund ihrer ähnlichen morphologischen Merkmale (wie unter anderem dunklere, gröbere Vliesstruktur, Vliesabwurf und Behornung beider Geschlechter) unter dem Begriff der „ursprünglichen Schafrasse“ zusammengefasst wurden, nach Europa. Schon Ryder (1981) zählt Schafrassen, die einen kurzen Schwanz, eine ähnliche Vliesstruktur und Statur wie das Soay Schaf haben und vermutlich Nachkommen einer vor dem Auftreten von verbesserten Produktmerkmalen vorherrschenden Schafrasse sind, zu einer „ursprünglichen Schafrasse“. Die Züchtung und Ausbreitung von Schafen mit verbesserten Produktmerkmalen (Wolle, Fleisch, Milch) erfolgte zu späterer Zeit (Ryder, 1983). Schafrassen mit verbesserten Produktmerkmalen verdrängten die ursprünglichen Schafrassen und sind heutzutage weltweit dominierend. Diese stark auf ein bestimmtes Produktionsziel selektierten Rassen werden heute auch umgangssprachlich als „Hochleistungsschafassen“ bezeichnet. Dieser Entwicklung zum Trotz konnten wenige ursprüngliche Schafrassen, teilweise auch nur aufgrund ihrer isolierten Lage wie das Soay Schaf, bis heute überleben. Der Erhalt dieser ursprünglichen Rassen ist wichtig für den Erhalt der genetischen Vielfalt. Die „Food and Agriculture Organization“ der Vereinten Nationen (FAO) fordert weltweit zum Erhalt dieser alten und gefährdeten Rassen auf (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013). In Deutschland ist die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) für die Umsetzung der Leitlinien der FAO zuständig (Informationssystem genetische Ressourcen (GENRES), 2014; TGRDEU, 2014).

1.1 Soay Schafe

Alle heutigen Soay Schafe (*Ovis aries*) stammen von einer über Jahrhunderte isolierten

Schafpopulation auf der Inselgruppe St. Kilda vor der schottischen Küste ab. Das St. Kilda Archipel (zentraler Punkt bei 57°50'N, 08°34'W) gehört zum National Trust for Scotland und wurde 1986 von der UNESCO zur schottischen Weltnaturerbebestätte ernannt (UNESCO, 1992-2014). Archäologische Funde lassen eine Besiedlung des St. Kilda Archipels schon während des Neolithikums vermuten. Soay Schafe wurden wahrscheinlich vor ca. 3000-4000 Jahren auf das Archipel verbracht und auf der kleineren Insel Soay („Schafinsel“) gehalten (Clutton-Brock und Pemberton, 2004). 1930 wurden die Bewohner der Inseln evakuiert und in den folgenden Jahren Schafe von der Insel Soay auf die Nachbarinsel Hirta verbracht. Seit 1952 wurden Schafzählungen auf der Insel Hirta durchgeführt, die aufgrund der natürlichen Populationsdynamik der Soay Schafherde das Interesse der Wissenschaft auf sich lenkten und dazu führten, dass diese nach 1985 Teil intensiver wissenschaftlicher Studien wurden (St. Kilda Soay Sheep Project, 2014). Wahrscheinlich schon ab Mitte des 19. Jahrhunderts wurden Soay Schafe von den Inseln auf das Festland verbracht. Diese auf dem Festland weiter gezüchteten Soays sind heute unter dem Namen „Park Soay“ bekannt. Die in dieser Studie eingesetzten Soay Schafe sind vermutlich Nachfahren der unter diesem Namen eingeordneten Schafe. Heute ist das Soay Schaf im Informationsservice für die Vielfalt von Haustieren der FAO als seltene Rasse registriert (Domestic Animal Diversity Information Service (FAO), 2014). Im Vereinigten Königreich wird in der Stiftung für seltene Rassen (Rare Breeds Survival Trust, RBST) das Soay Schaf als gefährdet eingestuft. Der Status „gefährdet“ beinhaltet 900 – 1500 registrierte weibliche Soay Schafe (Rare Breeds Survival Trust, 2011). In Deutschland hat sich der Bestand von gemeldeten Soay Schafen von 9 weiblichen und einem männlichen Tier im Jahr 1997 hin zu 101 weiblichen und 22 männlichen Tieren im Jahr 2013 vergrößert (TGRDEU, 2014).

Soay Schafe sind von kleiner Statur und besitzen einen kurzen Schwanz. Die adulten weiblichen Soay Schafe erreichen ein durchschnittliches Körpergewicht von ca. 25 kg und können behornt sowie unbehornt vorkommen. Die adulten männlichen Tiere haben ein durchschnittliches Körpergewicht von ca. 36 kg und sind behornt. Die Vliesfarbe ist einheitlich dunkel bis hellbraun oder Mufflon-ähnlich: dunkelbraun mit einer hellen Zeichnung unter dem Bauch, unter dem Steiß, über den Augen und unter dem Kiefer. Das Vlies wird jährlich abgeworfen, wenn die Tiere nicht geschoren werden. Soay Schafe haben einen saisonalen Brunstzyklus mit der Brunst im November. Die Geburten erfolgen im Frühjahr (April), wobei Soay Schafe überwiegend nur ein Lamm gebären. Auf der Insel Hirta wurden bei den Lämmern tägliche Zunahmen von ca. 100 g Körpergewicht beobachtet (Rare Breeds Survival Trust, 2011; St. Kilda Soay Sheep Project, 2014). Das Absetzen der Lämmer erfolgt am Ende des Sommers (Catchpole et al., 2000). Hinweise für eine Immunreaktion gegenüber Parasiten konnte eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigen, in

der bei adulten weiblichen Schafen eine positive Assoziation zwischen der Höhe des anti-*T. circumcincta* IgE-Spiegels im Serum und dem EpG der Schafe im Monat August nachgewiesen wurde (Nussey et al., 2014), während in einer älteren Studie bereits eine negative Korrelation zwischen anti-*T. circumcincta* IgA und EpG bei 4 Monate alten Lämmern festgestellt werden konnte (Coltman et al., 2001b).

1.2 Texel Schafe

Der Ursprung des Texel Schafes ist die Insel Texel vor der niederländischen Küste. Das Texel Schaf um 1900 glich in seiner Erscheinung dem Friesischen Milchschaaf. Seither hat sich das Erscheinungsbild durch verschiedene Einkreuzungen englischer Schafrassen und die Selektion innerhalb der Rasse zu einer reinen Fleischnutzungsrasse verändert. Die Vliesfarbe des Texel Schafes ist weiß. Kopf, Ohren und Beine sind unbewollt. Beide Geschlechter sind unbehornt, die Ohren stehen vom Kopf ab. Das Texel Schaf wird heute zur Fleischproduktion und zum Einsatz als Vatertiere in der Produktion von Schlachtlämmern genutzt (Texelschafe Deutschland e.V., 2015). Texel Schafe zeichnen sich durch ihre gute Konstitution/Bemuskelung, gute Fleischqualität, hohe Fruchtbarkeit der Mutterschafe (Ablammergebnis: ca. 150 % - 200 %) und das schnelle Wachstum der Lämmer (tägliche Zunahmen von ca. 350 g – 400 g) aus. Der Brunstzyklus ist saisonal (TGRDEU, 2014). Das adulte männliche Texel Schaf hat ein durchschnittliches Körpergewicht von 115 – 145 kg, das adulte Mutterschaf wiegt ca. 70 – 100 kg. Die erste Brunst der weiblichen Tiere erfolgt im Alter von 7 - 9 Monaten. Der Fleischertrag je Schlachtkörper liegt bei ca. 48 – 52 % (Landesverband Schleswig-Holsteinischer Schaf- und Ziegenzüchter e.V., 2015). Die Bestandentwicklung der Texel Schafe in Deutschland hat eine rückläufige Tendenz: 1997 wurden 7588 weibliche und 2238 männliche Texel Schafe gemeldet, 2013 wurden 3214 weibliche und 255 männliche Tiere gemeldet. Der regionale Schwerpunkt des Texel Schaf-Vorkommens liegt in Nord- und Westdeutschland (TGRDEU, 2014; Landesverband Schleswig-Holsteinischer Schaf- und Ziegenzüchter e.V., 2015). Bei 8 Monate alten Texel Schafen konnten bei Untersuchungen zur Isotypen-spezifischen Immunantwort gegen Larven und adulte Würmer von *H. contortus*, bei den infizierten Schafen dominante IgG₁-Immunantworten und weniger dominante IgM- und IgA-Immunantworten nachgewiesen werden (Schallig et al., 1995b).

2 Magen-Darm-Strongyliden

Die Magen-Darm-Strongyliden (MDS) der kleinen Wiederkäuer gehören zum Stamm Nematzoa (Fadenwürmer), Unterstamm Nematoda (Rundwürmer) und der Ordnung Strongylida. Die in dieser Studie näher betrachteten Gattungen gehören hauptsächlich zur Superfamilie der Trichostrongyloidea und zur Familie der Trichostrongylidae wie: *Haemonchus*, *Teladorsagia* (syn.: *Ostertagia*), *Trichostrongylus* und *Cooperia*, während die Gattung *Nematodirus* der Familie der Molineidae zugeordnet wird (Deplazes et al., 2012).

2.1 Morphologie

Nematoden sind langgestreckte, bilateral symmetrische Tiere, deren Körper äußerlich von der Kutikula umschlossen wird und deren innere Organe in der primären flüssigkeitsgefüllten Leibeshöhle liegen (Deplazes et al., 2012). Den Trichostrongylidae gemeinsam ist eine gering ausgeprägte Mundkapsel und eine art- und gattungsspezifisch unterschiedliche Bemusterung der Kutikula (Lichtenfels et al., 1988). Bei den weiblichen Adulten stellen die Lage der Vulvaöffnung im letzten Drittel der Körperlänge, sowie paarig angelegte Ovarien und Uteri, bei den männlichen Adulten die drei-lappige Bursa copulatrix mit den paarig angelegten Spikula gemeinsame Geschlechtsmerkmale dar (Deplazes et al., 2012). Morphologisch oder morphometrisch ist eine Unterscheidung der Eier der Trichostrongyliden, mit der Ausnahme der Gattung *Nematodirus*, die auf Genusebene bzw. *Nematodirus battus* bis auf die Speziesebene identifiziert werden kann, nicht auf Gattungsebene möglich (Lichtenfels et al., 1988).

2.2 Epidemiologie

MDS-Infektionen kommen bei kleinen Wiederkäuern vor allem als Mischinfektion vor. Zu den beim Schaf am häufigsten in Deutschland bei einer MDS-Infektion beteiligten Genera gehören *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Teladorsagia*, *Nematodirus* und *Cooperia* (Benesch, 1993; Rehbein et al., 1996). Verschiedene Untersuchungen wurden zur Befallsintensität von Schafen mit MDS in Deutschland durchgeführt (Weber-Werringhen, 1987; Rehbein et al., 1996; Rehbein et al., 1998). Bei einer Untersuchung von Schafen in Niedersachsen in den Jahren 2000 - 2003 konnten MDS-Eier in Kotproben bei 72 % (bzw. 80 % in 2003) der untersuchten adulten Schafe nachgewiesen werden (Moritz, 2005). Im Tierpark Arche Warder e.V. konnte bei einer Untersuchung verschiedener Schaf- und Rinderrassen im Jahr 1995 ein Trichostrongylidenbefall bei allen untersuchten Schaf- und Rinderrassen nachgewiesen werden (Rudolph und Wichelmann, 1995).

2.3 Entwicklungszyklus

Der Entwicklungszyklus der oben genannten Gattungen verläuft nahezu gleich und ist monoxen. Durch die Fortpflanzung der adulten Nematoden im Magen-Darm-Trakt der Schafe entstehen im Uterus des Weibchens Eier, die mit den Fäzes ausgeschieden werden. Die Embryonierung zur Larve 1 (L1) und die weiteren Häutungen der geschlüpften L1 über das Larvenstadium 2 (L2) zur Larve 3 (L3) finden in der Umwelt statt. Larve 1 und 2 ernähren sich v. a. von den Bakterien der Fäzes, während die L3 nicht zur oralen Nahrungsaufnahme befähigt ist. Bei günstigen Temperatur- und Feuchtigkeitsbedingungen verläßt die L3 die Fäzes und bewegt sich in den umgebenden Boden und auf Weidepflanzen (Translokation). Der Wirt infiziert sich bei der Nahrungsaufnahme oral mit der bescheideten L3. Während der Passage des Magens kommt es zum Bruch der Scheide und der Ecdysis der L3. Speziesabhängig kann die L3 vor ihrer Entwicklung zur Larve 4 (L4) und zum präadulten Stadium eine histotrope Phase durchmachen. Larven sind bei ungünstigen Umweltbedingungen dazu fähig, in ein Hypobiose-Stadium (Ruhe-Stadium) überzugehen. Vor allem für die Gattungen *Haemonchus* und *Teladorsagia* ist diese Fähigkeit bekannt. Aus dem präadulten Stadium entwickelt sich schließlich der adulte geschlechtsreife Wurm (Deplazes et al., 2012).

3 *Haemonchus contortus*

3.1 Morphologie

Die adulten männlichen Tiere von *H. contortus* haben eine Länge von ca. 18 – 21 mm, die adulten weiblichen Tiere eine Länge von 20 – 30 mm (Lucius und Loss-Frank, 2008). Die Mundhöhle liegt apikal und trägt bei den weiblichen Tieren eine kleine Lanzette. Im Bereich des Ösophagus liegt ein Paar kaudal gerichteter Zervikalpapillen. Die männlichen Tiere besitzen eine asymmetrische Bursa copulatrix mit seitlich liegendem Dorsallappen, distal sich verjüngende, ca. 490 – 540 µm lange Spikula mit Endhaken und ein kahnförmiges Gubernaculum. Die weiblichen Tiere fallen makroskopisch durch ihre rot-weiße Färbung auf. Der weiße Uterus umrundet den mit Blut gefüllten Darm. Im englischen Sprachraum ist *H. contortus* aufgrund dieser Färbung auch unter dem Namen „Barbers Pole Worm“ oder bei uns als „roter gedrehter Magenwurm“ bekannt. Die Vulva liegt im kaudalen Körperende und kann durch eine Vulvaklappe verdeckt sein (Lucius und Loss-Frank, 2008; Deplazes et al., 2012).

3.2 Epidemiologie

H. contortus ist fähig, verschiedene Wiederkäuerspezies wie vor allem Schaf, Ziege, Rind und Reh sowie kamelartige Spezies zu infizieren (Spellmeyer, 1996; Taylor et al., 2007; Hamel, 2008). *Haemonchus placei* und *Haemonchus similis* befallen vorzugsweise den Labmagen von Rindern, seltener Schafe (Supperer et al., 2006). Die epidemiologische Verbreitung des Parasiten reicht von seinem Hauptvorkommen in feucht-warmen Gebieten bis hin zu den klimatischen Extremen der Tropen und des Polarkreises (Lindqvist et al., 2001; Mandonnet et al., 2001; Eysker et al., 2005; Peter und Chandrawathani, 2005). Im gemäßigten Klima Deutschlands tritt *Haemonchus*-Befall bei Schaf und Ziege vorzugsweise als Mischinfektion mit anderen Trichostrongyliden auf. Das Auftreten der Haemonchose ist stark saisonal geprägt. Die Überwinterung von *H. contortus* erfolgt in gemäßigten Klimazonen hauptsächlich in Form hypobiotischer L4 im Wirtsgewebe (Waller et al., 2004). Ab Juli und zunehmend mit der Abkühlung der Außentemperatur gen Herbst verbleiben L4 in der histotropen Phase. Die adulten Nematoden sterben größtenteils ab. Die Überlebensfähigkeit der L3 von *H. contortus* in den Wintern der gemäßigten Gebiete ist relativ gering. Im Frühjahr wird die Weiterentwicklung der hypobiotischen L4 zu adulten *H. contortus* durch die ansteigende Temperatur (Lucius und Loss-Frank, 2008) und bei Mutterschafen durch die um den Partus und während der Laktation auftretende Immunsuppression induziert (Woolaston, 1992). Es resultiert eine starke Weidekontamination mit den von den Mutterschafen ausgeschiedenen *H. contortus*-Eiern ca. 4 - 6 Wochen nach dem Ablammen. Weibliche *H. contortus* scheiden ca. 5000 – 10000 Eier/Wurm/Tag aus. Temperatur und Feuchtigkeit haben einen dominanten Einfluss auf die Entwicklung zur L3 in der Umwelt. Auf Kälte und Austrocknung bei der Entwicklung vom Ei zur L3 reagiert *H. contortus* am empfindlichsten unter den im Schaf dominierenden Trichostrongyliden (O'Connor et al., 2006). Als optimal gilt ein warmes, feuchtes Klima (O'Connor et al., 2006). Wird durch warme Temperaturen zu Beginn des Sommers die Entwicklung der ausgeschiedenen Eier zur L3 gefördert, kann dies zu einer starken Infektion der Lämmer mit L3 und zur Autoinfektion der Mutterschafe führen (Waller et al., 2004). Die Präpatenzzeit beträgt ca. 12 – 24 Tage. Die (teils erneute) Ausscheidung von MDS-Eiern erfolgt in den gemäßigten Klimazonen der Erde im August, wo dann entsprechend die klinischen Erscheinungen der Haemonchose auftreten (Lucius und Loss-Frank, 2008; Deplazes et al., 2012).

3.3 Pathogenese und Klinik

Als „Haemonchose“ wird die durch eine *H. contortus*-Infektion auftretende klinische

Symptomatik bezeichnet. Die Haemonchose ist vor allem durch Anämien und Ödeme gekennzeichnet. Die hämatophagen L4 und adulten Würmer können, abhängig von der Befallstärke, bereits innerhalb von wenigen Stunden zu einem erheblichen Blutverlust und einem entsprechenden Abfall des Hämatokritwertes führen. Die adulten *H. contortus* saugen durchschnittlich ca. 50 µl Blut/Wurm/Tag (Clark et al., 1962; Dargie und Allonby, 1975). In der Labmagenschleimhaut von *H. contortus*-infizierten Tieren entwickelt sich eine generalisierte Hyperplasie, charakterisiert durch eine ansteigende Anzahl an Mukopetpidzellen, eine Reduktion der Parietalzellen (Belegzellen) und der Pepsinogen enthaltenden Zymogen-Granula (Hauptzellen) (Scott et al., 1998; Scott et al., 1999). Durch die Abnahme der Salzsäure produzierenden Belegzellen kann ein Anstieg des pH-Wertes, eine geringere Aktivierung von Pepsinogen und ein damit verbundener verminderter Proteinaufschluss der Nahrung entstehen. Die ansteigende Permeabilität der Labmagenmukosa erhöht den Verlust an endogenen Proteinen. Die Gastrinsekretion steigt an, die Motilität des Vormagens verringert sich, Bakterien können sich im Labmagen ansiedeln und verursachen bei befallenen Tieren Inappetenz. Die Ausscheidung adulter Wurmstadien kann in seltenen Fällen mit Durchfällen vergesellschaftet sein. Der durch die hämatophagen Parasiten und durch Sickerblutungen bei Abgang von adulten *H. contortus* resultierende länger anhaltende Blut- und Plasmaproteinverlust führt zu Anämie, Ödemen, Schwäche und Abmagerung und kann in ungünstigen Fällen bei jungen Lämmern zum Tod der Tiere führen (Deplazes et al., 2012). Subklinische Haemonchosen führen zu geringeren Lebendgewichtzunahmen, schlechterer Futterverwertung und insgesamt zu hohen wirtschaftlichen Produktionsverlusten (Fleisch, Milch, Wolle) (McLeod, 1995).

4 *Teladorsagia circumcincta*

4.1 Morphologie

Die adulten weiblichen *T. circumcincta* haben eine Länge von ca. 9 – 12 mm und besitzen eine Vulvaklappe in der Nähe des Hinterendes, die adulten männlichen Nematoden haben eine Länge von ca. 7 – 10 mm. Bei den männlichen Adulten sind die stabförmigen Spikula ca. 450 µm lang. Die braunen Magenwürmer ernähren sich vom mukosalen Gewebe und den zellulären Sekretionen des Labmagens (Craig, 2007; Venturina et al., 2013).

4.2 Epidemiologie

Teladorsagia (T.) circumcincta und *T. trifurcata* sind die häufigsten beim Schaf in

Mitteleuropa nachgewiesenen *Teladorsagia* spp.-Infektionen (Deplazes et al., 2012). Die Spezies *T. circumcincta* tritt häufiger beim Schaf, seltener bei Rind und Ziege auf. *T. circumcincta* gehört neben *H. contortus* und den *Trichostrongylus* spp. in den kalten gemäßigten Gebieten der Erde jenseits des 40. Breitengrades (Nordeuropa inklusive Skandinavien, Nordamerika, Nordasien und Neuseeland) zu den wichtigsten gastrointestinalen Parasitosen bei kleinen Wiederkäuern (O'Connor et al., 2006; Venturina et al., 2013) mit Spitzen des Wurmbefalls im Sommer und Herbst. Die Eier von *T. circumcincta* entwickeln sich wie die meisten MDS am besten bei Temperaturen zwischen 16 – 30 °C (O'Connor et al., 2006). Ein Larvenschlupf aus dem Ei wurde bis zum Temperatur-Minimum von 4 °C beobachtet (Crofton, 1965). Die ausgeschiedenen Eier und die Entwicklung der Larven im Ei sind relativ tolerant gegenüber Kälte und Austrocknung. Infektiöse L3 haben im kalten, feuchten Klima und in milden Wintern gute Überlebenschancen, während warme, trockene Klimaverhältnisse zu einer geringen Überlebenszeit der L3 führen (O'Connor et al., 2006).

4.3 Pathogenese und Klinik

Die Pathogenese der verschiedenen Trichostrongyliden-Arten unterscheidet sich voneinander, dennoch ähneln sich die pathologischen Effekte z. B. die des Labmagens (Stear et al., 2003). Die größten pathologischen Effekte einer *T. circumcincta*-Infektion werden durch die larvalen Stadien der *Teladorsagia* spp. verursacht. Im Gegensatz zu *H. contortus* sind *Teladorsagia* spp. nicht hämatophag. Die entscheideten L3 siedeln sich in den Labmagendrüsen innerhalb von 24 Stunden *post infectionem* an und machen dort ihre weitere Entwicklung (Häutung) zum Adultstadium in einem Zeitraum von ca. 10 Tagen durch. Die adulten Nematoden siedeln sich auf der abomasalen Oberfläche an. Die Drüsen dilatieren während dieser Entwicklungszeit und verändern dadurch die abomasale Mukosa knotenartig, das Epithel wird hyperplastisch. Durch die larvale Entwicklung in den Labmagendrüsen werden die Parietalzellen stark beschädigt, die Salzsäureproduktion sinkt und es resultiert ein erhöhter Labmagen-pH-Wert. Das veränderte Milieu des Labmagens wirkt auf die Zymogengranula enthaltenden Hauptzellen. Letztendlich treten erhöhte Gastrin- und Pepsinogen-Plasmakonzentrationen, Hypalbuminämie und erniedrigte Fruktosaminkonzentrationen auf (McKellar, 1993). Folgen für den Wirt sind eine verminderte Proteinverdauung, Inappetenz und damit eine verminderte Immunabwehr (Coop et al., 1995; Stear et al., 2000; Stear et al., 2003). Häufig treten als klinische Symptome Durchfall, Dehydratation, geringe Lebendgewichtzunahmen oder gar Gewichtsverlust und verminderte Wollqualität der Schafe auf (Zajac, 2006; Roeber et al., 2013). Bei starken Infektionen kann

es auch zum Tod der Tiere kommen.

5 *Trichostrongylus* subspezies

Die für das Schaf am häufigsten nachgewiesenen *Trichostrongylus* spp. in Mitteleuropa sind *Trichostrongylus (Tr.) colubriformis* und *Tr. vitrinus*, während *Tr. axei*, *Tr. capricola* und *Tr. longispicularis* nur sporadisch vorkommen (Deplazes et al., 2012). Der folgende Text konzentriert sich auf die Beschreibung der Subspezies *Tr. colubriformis* und *Tr. vitrinus*.

5.1 Morphologie

Die adulten *Tr. colubriformis* sind 4,5 – 7 mm (männlich) bzw. 5 – 8 mm lang (weiblich). Die Bursa copulatrix des männlichen *Tr. colubriformis* enthält ein Boot-ähnliches Gubernaculum, die Spikula sind ca. 125 – 165 µm lang und haben spatelartige Schenkel. *Tr. vitrinus* gleicht *Tr. colubriformis* mit Ausnahme des bei männlichen *Tr. vitrinus* spitz zulaufenden Hinterendes der Spikula (Craig und Baker, 2008).

5.2 Epidemiologie

Die adulten Nematoden von *Tr. colubriformis*, *Tr. vitrinus*, *Tr. capricola* und *Tr. longispicularis* sind im Dünndarm zu finden, während sich *T. axei* im Labmagen ansiedelt (Deplazes et al., 2012). *Trichostrongylus* spp. sind vor allem in den klimatisch gemäßigten Gebieten der Erde eine bei kleinen Wiederkäuern dominierende gastrointestinale Spezies. Gleichzeitig treten *Trichostrongylus* spp.-Infektionen aber auch in subtropischen (Johnstone, 1998) und tropischen Gebieten auf (Walkden-Brown und Banks, 1986). Bei der Untersuchung der Entwicklung von nicht-embryonierten Eiern der *Trichostrongylus* spp. zur L3 bei verschiedenen Temperaturen, konnte bei 25 – 28 °C der größte prozentuale Anteil an L3 gemessen werden, während bei einer Temperatur unter 5 °C sich nur 5 % der Eier zur L3 entwickelten (Rossangio und Gruner, 1995). Als Minimum-Temperatur für den Larvenschlupf wurden in einer Studie von Crofton (1965) für *Tr. axei* und *Tr. vitrinus* 9 °C ermittelt (Crofton, 1965).

5.3 Pathogenese und Klinik

Für *Tr. colubriformis* ist der vordere Dünndarm-Bereich das primäre Habitat bei Schaf und Ziege. Nach der experimentellen Infektion von Schafen mit *Tr. colubriformis* und *Tr. vitrinus*

konnte bei der patho-histologischen Untersuchung im vorderen Duodenum eine starke Atrophie der Villi und Hypertrophie der Krypten festgestellt werden (Roy et al., 2004). Die größte Schädigung des Gewebes wird durch die Wanderung der immaturren Parasitenstadien aus der Mukosa in das Lumen hervorgerufen. Klinisch werden Gewichtsverlust, dunkle Durchfälle, Dehydratation, Lethargie und abdominale Schmerzen bei den befallenen Tieren beobachtet. *Tr. vitrinus* kann schwerwiegendere Erosionen des Dünndarms als *Tr. colubriformis* hervorrufen (Craig und Baker, 2008).

6 Immunität von Schafen gegenüber MDS-Infektionen

Man unterscheidet die angeborene und erworbene Immunantwort, wobei die erworbene Immunantwort sich in die zelluläre und humorale Immunantwort unterteilt. Durch die angeborene Immunantwort wird die Infektion mit Helminthen initial limitiert. Welche Mechanismen dabei ablaufen und welche Immunkomponenten daran beteiligt sind, ist insgesamt noch relativ schlecht erforscht (Miller und Horohov, 2006).

Zellen der angeborenen unspezifischen Abwehr sind Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), $\gamma\delta^+$ -T-Zellen, phagozytierende Zellen (wie z. B. Granulozyten und Makrophagen) und Chemokine. Allgemein haben Helminthen eine dicke extrazelluläre Kutikula. Diese übernimmt eine generelle Schutzfunktion, da sie über den Membranangriffskomplex des Komplementsystems oder durch Perforin aus zytotoxischen T-Zellen allein nicht zerstört werden kann. Die Parasiten werden im Labmagen von Wirtsenzymen, IgA und Muzin umgeben. Über den Magen-Darm-Trakt und das Blut kommen sie mit Effektorzellen, Antikörpern, Zytokinen und Komplement-Anteilen des Wirtes in Kontakt (Tizard, 2008).

Durch Studien in murinen Modellen konnte die dominierende Bedeutung der Th₂-Immunantwort bei der Bekämpfung von gastrointestinalen Parasiten (Maizels et al., 2009) festgestellt werden. Diese Ergebnisse konnten durch Untersuchungen von mit *H. contortus* (Lacroux et al., 2006), *T. circumcincta* (Craig et al., 2007) und *Tr. colubriformis* (Pernthaner et al., 2005; Hein et al., 2010) infizierten Schafen, auch für das Schaf bestätigt werden. Bei der adaptiven/erworbenen (spezifischen) Immunreaktion wird ein parasitäres Antigen durch Antigen-präsentierende Zellen (wie z. B. dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen und B-Lymphozyten) erkannt und über MHC-II-Komplexe gegenüber T-Helferzellen (Th-Zellen/CD4⁺-T-Zellen) präsentiert. Gleichzeitig wird über die Sekretion von Chemokinen und Zytokinen aus Antigen-präsentierenden Zellen die T-Zell-Differenzierung beeinflusst. Als wichtigstes Zytokin der Th₂-Immunantwort bei der Kontrolle der gastrointestinalen Parasiten wird Interleukin 4 (IL-4) angesehen (Reynolds et al., 2012). IL-4 unterstützt die Reifung der naiven CD4⁺-T-Zellen zum Th₂-Phänotyp, stimuliert die Proliferation und Differenzierung

Literaturübersicht

von B-Zellen zu IgE und IgA produzierenden Plasmazellen und stimuliert die Mastzellenreifung und -proliferation. Interleukin-13 (IL-13) unterstützt IL-4 bei der Antikörperumwandlung zu IgE, während Interleukin 5 (IL-5) die Reifung der Eosinophilen Granulozyten unterstützt. Nach *Tr. colubriformis*-Infektionen konnten erhöhte Werte für IgE, IgA, IgG₁ und IgG₂ festgestellt werden (Pernthaler et al., 2006). Erhöhte Serum-IgE- (Kooyman et al., 1997), -IgA-, -IgG-Werte (Duncan et al., 1978; Gill, 1991) und eine steigende Anzahl der mukosalen Mastzellen (Schallig et al., 1997a) wurden nach *H. contortus*-Infektionen beobachtet. Einerseits wurde Eosinophilen Granulozyten bei der Abwehr von Drittlarven (*H. contortus*) eine dominierende Rolle zugewiesen (Rainbird et al., 1998; Balic et al., 2006), andererseits wiesen nicht erhöhte Eosinophile Granulozyten im Serum und Gewebe nach *H. contortus*-Infektion auf eine weniger intensive Beteiligung dieser Zellen an der Immunantwort hin (Schallig et al., 1997a). Die Ausbildung einer IgA vermittelten Immunantwort gegenüber *T. circumcincta*-Infektionen im Alter von 7 Monaten steht in Verdacht, mit der Hemmung von Wachstum, Entwicklung und Fertilität der Nematoden in Zusammenhang zu stehen (Stear et al., 1995). Die zelluläre Zusammensetzung der abomasalen Mukosa wurde auf ihren Einfluss, eine Immunität gegenüber MDS zu vermitteln, untersucht, wobei eine erhöhte T-Zell- und Eosinophilen-Anzahl in der Mukosa, angeregt durch L3, dominierten (Balic et al., 2003). In einer Studie von Smith et al. (2009) konnte eine negative Korrelation zwischen dem antilarvalen exkretorisch-sekretorisch-spezifischem IgA-Spiegel und der Wurmbürde von adulten *T. circumcincta* nach L3-Ansiedlungserfolg von wiederholt infizierten Schafen nachgewiesen werden. Mastzell-Protease aus aktivierten Mastzellen war in Studien negativ korreliert mit der Wurmbürde von *T. circumcincta* (Stevenson et al., 1994). Vermutlich stehen hohe Immunitätslevel auch mit einer Entwicklungshemmung der L4 in Zusammenhang (McNeilly et al., 2009).

Die Ergebnisse aus Zytokin-Studien mit *H. contortus*-Infektionen geben Hinweise auf eine Beteiligung der Th₁- (hohe Level von IL-2 und IFN- γ) und anderer T-Zell-Immunantworten neben der dominierenden Th₂-Zell-Immunantwort (Schallig, 2000). Gegenüber *Tr. colubriformis*-Infektionen resistente und empfängliche Schaflinien wurden auf Unterschiede in der Zytokin-Genexpression der afferenten und efferenten intestinalen Lymphzellen für eine Th₂-Immunantwort (IL-4, IL-5, IL-13), für eine Th₁-Immunantwort (Interferon γ (IFN γ)), für eine regulatorische (IL-10) und proinflammatorische (Tumor Nekrose Faktor α (TNF α)) Immunantwort untersucht (Pernthaler et al., 2005). Bei beiden Schaflinien konnten IL-5, IL-13 und TNF α in höheren Konzentrationen nachgewiesen werden als IL-4, IL-10 und IFN γ . Diese Ergebnisse weisen auf eine dominierende Th₂-Immunantwort, mit einer moderaten Beteiligung der anderen T-Zell-Antworten hin. Die

Aktivität von T-regulatorischen Zellen wurde bei der Immunantwort auf *Tr. colubriformis*-Infektionen nachgewiesen (Ingham et al., 2008). Inwieweit die verschiedenen T-Zell-Antworten in der Abwehr von *Tr. colubriformis*-Infektionen zusammenwirken, wird derzeit noch erforscht.

Der Nachweis von erhöhten Th₂-typischen Transkripten von Zytokinen wie z. B. IL-4, IL-5, IL-13 in abomasalen Lymphknotenzellen nach L3-Ansiedlung (*T. circumcincta*) und derer Zytokine (IL-10 und TGF- β), die an der regulatorischen T-Zell-Immunantwort von Menschen beteiligt sind, lassen ein Zusammenspiel der verschiedenen T-Zellen in der Labmagenwand vermuten (Craig et al., 2007; Askenasy et al., 2008). Regulatorische T-Zellen produzieren IL-10 und TGF- β , inhibieren die Zytokinproduktion von zytotoxischen Zellen und vernichten zytotoxische Zellen durch Zell-zu-Zell-Kontakt. Sie vermindern die Immunantwort und können dadurch den Parasiten bei seinem Überleben im Wirt unterstützen (Maizels et al., 2004). Bei Untersuchungen zur Korrelation zwischen T-Zell-Zytokin-Expression und Resistenz von Lämmern gegenüber einer *T. circumcincta*-Infektion konnte nachgewiesen werden, dass in den empfänglichen Tieren die Expression von IL-6, IL-21, IL-23A im Gegensatz zu den resistenten Tieren erhöht war. Die Zytokin-Expression war signifikant positiv korreliert mit der Anzahl der adulten Würmer und dem EpG, während die Expression des Zytokins IL-23A negativ korreliert war mit dem IgA-Level der Tiere (Gossner et al., 2012). Die Empfänglichkeit bzw. die Unfähigkeit des Wirtsorganismus, eine Parasitenkolonisierung/Eiproduktion einer Infektion mit *T. circumcincta* zu kontrollieren, sei daher wahrscheinlich assoziiert mit den erhöhten Spiegeln der inflammatorischen Th17-T-Zell-Teilmenge (Gossner et al., 2012; Venturina et al., 2013).

Schaf- und Ziegenlämmer bilden erst in einem Alter von ca. 5 – 9 Monaten eine ausreichende Immunkompetenz aus, um einen MDS-Befall abzuwehren. Die Immunität äußert sich in einer Verminderung der Larvenansiedlung, der Abwehr und Ausscheidung von Adultstadien und führt zu einer verminderten Eiausscheidung mit den Fäzes (Deplazes et al., 2012). Die Ausbildung einer Immunkompetenz entwickelt sich allgemein normalerweise nicht vor dem 4. Lebensmonat (Barger, 1988), wobei dies abhängig ist von der Schafrasse und der an der Infektion beteiligten Parasitenspezies.

Bei wiederholten Infektionen mit *H. contortus* wird ein sogenanntes Selbstreinigungs-Phänomen beobachtet. Es wird vermutet, dass stimuliert durch exkretorisch-sekretorische larvale Antigene eine Hypersensitivitätsreaktion (Typ 1) der Labmagenschleimhaut ausgelöst wird, die zur Ausscheidung der adulten Stadien führt (Soulsby und Stewart, 1960; Dargie und Allonby, 1975; Tizard, 2008; Deplazes et al., 2012). Wird zusätzlich die Ansiedlung neuer Larven verhindert, wird dieses Phänomen als Selbstreinigungs- und Schutz-Mechanismus bezeichnet. Auch bei der erneuten Infektion mit L3 (*T. circumcincta*)

von immunen Schafen wird für den Ausschluss und die Ausscheidung der L3 eine Hypersensitivitätsreaktion vom Soforttyp (Typ 1) verantwortlich gemacht (Smith et al., 2009).

7 Diagnostik von MDS-Infektionen

Die Diagnosestellung von MDS-Infektionen allein anhand der klinischen Symptomatik festzulegen, gilt heute als ungenau und hinsichtlich der zunehmenden Resistenzproblematik als unzureichend. Im Zuge der Entwicklung von Anthelminthika-Resistenzen hat die Bedeutung von sensitiven und spezifischen Diagnostikverfahren zugenommen. Neben diesen neu entwickelten Diagnostikverfahren kommen weiterhin die traditionell angewandten koproskopischen Verfahren wie die Bestimmung der Eizahl pro Gramm Kot (EpG) und die weniger intensiv genutzte Larvenkultur zur Differenzierung von Drittlarven zum Einsatz. Grundsätzlich unterscheidet man den direkten Nachweis einer MDS-Infektion direkt aus der Probe oder über eine Erregeranzucht und den indirekten Nachweis über die durch die Immunantwort des Wirtes produzierten Antikörper. *Intra vitam* ist es möglich, die Parasitenspezies anhand des Eies oder der Larvenstadien (mittels koproskopischer oder molekularer Diagnostikmethoden, wie der PCR) zu identifizieren, *post mortem* ist eine Analyse der Adultstadien nach der Sektion möglich.

7.1 Koproskopische Diagnostikmethoden

Zur Bestimmung der Eizahl pro Gramm Kot (EpG) sind die verschiedensten Techniken wie die McMaster-Technik (Gordon und Whitlock, 1939; Whitlock, 1948), Wisconsin-Flotations-Technik (Egwang und Slocombe, 1982), FECPAK^{G2} (Technion Group, 2015) und FLOTAC[®] (Cringoli et al., 2010) publiziert. Diese wurden in verschiedenen Studien ausführlich hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität untersucht und teilweise mehrfach modifiziert. Als Standardtechnik für die quantitative Bestimmung der EpG ist die McMaster-Methode mit ihren verschiedensten Modifikationen weltweit verbreitet (Taylor, 2010). Um die Ergebnisse von verschiedenen Laboren vergleichen zu können, wird eine Standardisierung der Technik propagiert. Die FLOTAC[®]-Technik ist den anderen EpG-Techniken hinsichtlich der Sensitivität überlegen und wird daher vor allem für den Nachweis des Erfolges einer Anthelminthika-Behandlung oder zum Nachweis einer Anthelminthika-Resistenz eingesetzt (Rinaldi et al., 2011). Die morphologische bzw. morphometrische Bestimmung der Spezies anhand des Eies ist für *Strongyloides* spp., *Trichuris* spp., *Capillaria* spp. und unter den Trichostrongyliden nur für die *Nematodirus* spp. möglich. Für die Spezies *H. contortus* ist eine Identifikation des Eies im Fluoreszenz-Mikroskop durch dessen spezifische Lectin-

bindende Eigenschaft möglich (Colditz et al., 2002). Unter anderem wurde für den hämatophagen Parasiten ein Test zum Nachweis von okkultem Blut in den Fäzes der *H. contortus* befallenen Schafe entwickelt (Colditz und Le Jambre, 2008; Demeler et al., 2012). Die Bestimmung der Trichostrongylidenart über die Anzucht einer Larvenkultur bis zur L3 über 7 – 10 Tage und deren Differenzierung gilt als unzureichend, da in Abhängigkeit von der Spezies, Temperatur und Feuchtigkeit der Kultur die Larven zu unterschiedlichen Zeitpunkten schlüpfen können (Van Wyk und Mayhew, 2013). Die Interpretation der Drittlarvenauszählung ist daher grundsätzlich nur hinsichtlich der beteiligten Parasitenspezies möglich, nicht aber hinsichtlich des prozentualen Anteils an der Wurmbürde. Die Erfassung der Wurmbürde in der Sektion stellt die aufwendigste und invasivste Diagnosetechnik dar. Der Einsatz dieser Technik wird heutzutage in Studien zur Verifizierung von anderen diagnostischen Parametern hinzugezogen, um einen genauen Überblick der an der Wurmbürde beteiligten Parasitenspezies zu bekommen. Der kontrollierte Test vergleicht die Wurmbürde der Tiere zweier Gruppen (anthelminthisch behandelte Tiere und nicht behandelte Kontrolltiere) *post mortem* und kalkuliert anhand der Reduktion bzw. Elimination von adulten Parasiten aus dem Magen-Darm-Trakt die Effektivität der anthelminthischen Behandlung. Im Gegensatz zu diesem stark invasiven Verfahren wird der Eizahl-Reduktions-Test (FECRT) aufgrund seiner nicht invasiven, kostengünstigeren und einfacheren Anwendung häufiger für die Kontrolle der Anthelminthika-Wirksamkeit eingesetzt. Verglichen wird der EpG vor und nach anthelminthischer Behandlung zwischen einer Kontroll- und Behandlungsgruppe (Demeler et al., 2012). Eine Anthelminthika-Resistenz einer Strongylidenpopulation beim Schaf wird nach internationalen Richtlinien der „World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology“ (WAAVP) vermutet, wenn die prozentuale Reduktion der Eiausscheidung 10 – 14 Tage nach der anthelminthischen Behandlung unter 95 % (und das untere 95 %-Konfidenzintervall unter 90 %) liegt (Coles et al., 1992). Um eine bessere Vergleichbarkeit und Exaktheit des Tests zu gewährleisten, wurden Leitlinien und verschiedene Empfehlungen zur Verbesserung des Tests veröffentlicht (Coles et al., 1992; Coles et al., 2006; Levecke et al., 2012; Calvete und Uriarte, 2013). Die Sensitivität des Tests wird stark beeinflusst durch die EpG-Technik. Derzeit wird der Einsatz der sensitiveren FLOTAC[®]-Technik im FECRT empfohlen (Rinaldi et al., 2011).

Die zur Verfügung stehenden *in vitro* Methoden zur Detektion einer Anthelminthika-Resistenz sind Labor-gebunden und kostengünstig, aber auch sensitiver als der FECRT. Die hauptsächlich genutzten Methoden sind der Egg Hatch Assay (EHA), der Larval Development Assay (LDA), Larval Motility Assay (LMA), Larval Migration Inhibition Assay (LIMA) und der Larval Feeding Inhibition Assay (LFIA). Allen Assays gemeinsam ist die

Literaturübersicht

Inkubation von freilebenden parasitären Stadien in verschiedenen Anthelminthika-Konzentrationen, die Messung von Vitalität in Form von Entwicklung, Futteraufnahme, Bewegung oder Migration. Aus den gemessenen Werten werden konzentrationsabhängige Wirkungs-Kurven erstellt und die EC_{50} - und EC_{95} -Werte errechnet (Demeler et al., 2012).

Der EHA wurde 1976 zuerst publiziert (Le Jambre, 1976), in verschiedenen Studien modifiziert und 2009 durch ein Standardisierungsprotokoll vereinheitlicht (von Samson-Himmelstjerna et al., 2009a). Der EHA kann ausschließlich zum Nachweis von Benzimidazol-Resistenzen eingesetzt werden und zeigte eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus FECRT Studien (Diez-Baños et al., 2008). Beim EHA werden die Eier durch Sieb-, Zentrifugations-, Flotations- und Waschtechniken aus den Fäzes extrahiert und vor Einsatz im Assay auf ihren Entwicklungsstand geprüft. Die Ei-Suspension wird mit verschiedenen Anthelminthika-Konzentrationen versetzt, 48 Stunden inkubiert und Lugol'sche Lösung zur Anfärbung und Differenzierung zwischen vitalen und avitalen Larven in den Eiern hinzupipettiert. Je Mikrotiterplatten-Well werden 100 Eier und Larven ausgezählt. Die mittlere effektive Konzentration EC_{50} wird ermittelt (von Samson-Himmelstjerna et al., 2009a).

Im LDA wird die Entwicklung vom Ei bis zur L3 gemessen. Man unterscheidet den Flüssigkeits-basierten Test (Hubert und Kerboeuf, 1992) vom Agar-basierten Test (Gill et al., 1995) und Microagar-basierten Test (Coles et al., 2006). Beim LDA können verschiedene Anthelminthika aus den Wirkstoffgruppen der Benzimidazole (BZ), Makrozyklischen Laktone (ML) und Imidazothiazole mit dem Hauptvertreter Levamisol getestet werden, die Embryonierung der Eier ist von untergeordneter Bedeutung (Matthews et al., 2012).

Anthelminthika der Gruppe der ML und Imidazothiazole sind zur Paralyse der somatischen Muskulatur und Pharynxpumpe der MDS befähigt. Die sensiblen MDS-Larven sind nach der anthelminthischen Behandlung unfähig, Nahrung aufzunehmen und sich fortzubewegen. Dieser Umstand wird im LMA/LMIA sowie im LFA/LFIA genutzt. Im LMA/LMIA wird die Motilität bzw. Migrationsfähigkeit der L3, die verschiedenen Anthelminthika-Konzentrationen ausgesetzt sind, beurteilt. 2010 wurde der LMIA innerhalb des PARASOL-Projektes durch Ringtestung standardisiert (Demeler et al., 2010). Vorteile des LMIA sind unter anderem die mögliche längere Lagerung von L3 vor Testeinsatz und die einfachere Feststellung von anthelminthischer Resistenz gegen Wirkstoffe aus der Gruppe der ML (Demeler et al., 2013a).

Das Grundprinzip des LFA/LFIA beruht auf der Fütterung von MDS mit Fluoreszein-5-Isothiocyanate vermischten lyophilisierten *E. coli* und der Bewertung der intestinalen postprandialen Fluoreszenz unter dem Mikroskop (Álvarez-Sánchez et al., 2005). Diskutiert

wird die Beeinflussung der LFIA-Ergebnisse durch die gegebenenfalls nicht einheitliche Labellierung von *E. coli* mit Fluoreszein-5-Isothiocyanate und durch eine temperaturabhängige bzw. vom Alter der Wirtsspezies abhängige *E. coli*-Aufnahme der L1 (Jørgensen et al., 1998; Sargison et al., 2011).

7.2 Immunologische Diagnostikmethoden

Neben den koproskopischen und *in vitro* Verfahren ist der indirekte Nachweis eines Parasitenbefalls – der Nachweis von im Wirt gebildeten Parasitenstadien-spezifischen Antikörpern von Bedeutung. Hierbei konzentriert sich die Forschung einerseits auf die Identifikation und Charakterisierung von Parasitenantigenen für den Einsatz in der Immundiagnostik, andererseits wird das Potenzial von Antigenen für den Einsatz in der Vakzination getestet. Grundsätzlich ist die Unterscheidung des Status der Infektion (präpatent, patent oder postpatent) und der beteiligten Spezies bei den vorherrschenden Mischinfektionen von entscheidender Bedeutung für die der Diagnostik folgenden Therapie. Gerade an diesen Punkten liegen die Schwierigkeiten der Interpretation bei Antikörpermessungen. Kreuzreaktivitäten vermindern die Spezifität der Tests (Johnson et al., 2004; Arunkumar und Sangaran, 2009), und die Interpretation der serologischen Testergebnisse läßt eine Unterscheidung zwischen gerade beginnenden oder einer erst kürzlich überstandenen MDS-Infektionen nicht wirklich zu (Gasser et al., 2008).

Die Immunologische Diagnostik von MDS-Infektionen ist hauptsächlich ELISA-basiert. Grundsätzlich ist es möglich, Antikörper in den verschiedenen Körperflüssigkeiten/Ausscheidungen des Wirtes nachzuweisen (z. B. Blut, Kot, Speichel, Liquor cerebrospinalis).

Für die MDS des Schafes sind vor allem Untersuchungen zu Serum-ELISA erfolgt. Kürzlich ist ein Test zur Detektion von IgA im Speichel von Schafen gegen CARbohydrat-Larval-antigen (CARLA[®]) in Neuseeland entwickelt worden (Harrison et al., 2003; Shaw et al., 2012). Unter den MDS des Schafes sind die meisten ELISA-Studien für *H. contortus* und *T. circumcincta* beschrieben (Demeler et al., 2012). Für *H. contortus* sind mehrfach Serum-ELISA, die spezifische ovine Immunglobuline gegen die verschiedensten larvalen und adulten Antigene von *H. contortus* detektieren, entwickelt worden. Vielversprechende ELISA-Ergebnisse wurden vor allem mit exkretorisch-sekretorischen (ES) Proteinen aus adulten *H. contortus* gewonnen. Für Texel Schafe konnte eine durch ES-Produkt induzierte Immunantwort mit erhöhten spezifischen IgG₁-Leveln und einer signifikant positiven Lymphozytenproliferation nachgewiesen werden. Durch die Kreuzreaktivität konnte *H. contortus* im ES-ELISA nicht von anderen Trichostrongyliden unterschieden werden

Literaturübersicht

(Schallig et al., 1994a). Im Immunoblot reagierten Sera von *H. contortus* infizierten Schafen vornehmlich mit 15 und 24 kDa ES-Antigenen, während die ES-Antigene anderer Molekulargewichte sowohl mit Serum von *H. contortus*-infizierten Schafen sowie auch mit Sera von mit anderen Trichostrongyliden infizierten Schafen reagierten. Bei dem Vergleich verschiedener ELISA zur Detektion von *H. contortus*-Infektionen in experimentell infizierten Texel Schafen konnte dem ES-ELISA eine höhere Sensitivität von 97,7 % und Spezifität von 87,2 % (Sera von monoinfizierten Tieren mit *Trichostrongylus* spp., *T. circumcincta*, *N. battus*, *C. curticei*, *Fasciola hepatica*, *Taenia ovis* und *Eimeria* spp. wurden gegen *H. contortus* getestet) im Gegensatz zum Ganzwurm-ELISA (89,2 %/82,7 %) nachgewiesen werden (Antigen-Gewinnung aus jeweils adulten *H. contortus*) (Schallig et al., 1995a). In einer Vakzinationsstudie wurden Texel Schafe mit ES-Antigen und einer Fraktion von 15 und 24 kDa ES-Antigenen von *H. contortus* dreifach geimpft. In der Gruppe der ES-Antigen vakzinierten Schafe konnte eine 99,9 %ige Reduktion der EpG und eine 97 %ige Reduktion der Wurmbürde nachgewiesen werden, wobei die mit 15 und 24 kDa ES-Antigenen vakzinierten Schafe eine 32,2 %ige Reduktion der EpG und eine 63,7 %ige Reduktion der Wurmbürde verzeichneten. Keine Unterschiede wurden im IgG₁-Level der vakzinierten und nicht vakzinierten Tiere festgestellt (Schallig et al., 1997a). Die N-terminalen Aminosäuresequenzen der 15 und 24 kDa ES-Antigene konnten bestimmt (Schallig et al., 1997b) und die Proteine rekombinant hergestellt werden (Vervelde et al., 2002). Die Proteine wurden im Immunoblot von Sera von *H. contortus* hyperimmunisierten Schafen erkannt. Beim Einsatz des rekombinant hergestellten 24 kDa ES-Proteins im ELISA konnte zwischen Seren aus *H. contortus*-infizierten, *F. hepatica*-infizierten und nicht infizierten Schafen unterschieden werden (Li et al., 2007).

Für *T. circumcincta* wurden neben einem Kopro-Antigen-ELISA (Johnson et al., 2004) verschiedene Serum-ELISA z. B. zum Nachweis von IgE-Immuntantworten in *T. circumcincta* infizierten Lämmern und adulten Schafen (Huntley et al., 1998; Huntley et al., 2001; Nussey et al., 2014), zum Nachweis mucosaler IgA-Level gegen rekombinant hergestellte ES-Proteine aus L4 von *T. circumcincta* (Nisbet et al., 2010) und zum Nachweis von IgG-Immuntantworten in Serum- und Milchproben von *T. circumcincta* infizierten laktierenden Mutterschafen und laktierenden Ziegen entwickelt (Huntley et al., 1998; Cruz-Rojo et al., 2012b; Malama et al., 2014). Der Erfolg bei der Entwicklung eines Sammelmilchproben-ELISA für die Detektion von *Ostertagia ostertagi* Infektionen in Milchkühen (Sanchez et al., 2002) führte zu weiteren Studien an Milchziegen, in denen eine signifikante Korrelation zwischen spezifischem anti-*T. circumcincta*-IgG in Serum- und Frischmilchproben 4 Wochen nach Infektion und eine Korrelation zwischen spezifischem anti-*T. circumcincta*-IgG in Frischmilchproben und Sammelmilchproben 2 Wochen nach Infektion im ELISA

nachgewiesen werden konnten (Molina et al., 2009). Bei dem Vergleich zwischen laktierenden Schafen, die mit einer niedrigen bzw. hohen *T. circumcincta*-Anzahl infiziert wurden, konnte Erstgenannten eine bessere Körperkondition, eine höhere Milchproduktion mit einem höheren Protein-Anteil in der Milch zugewiesen werden (Cruz-Rojo et al., 2012a). Der anti-*T. circumcincta*-spezifische IgG-Spiegel in der Milch wird wahrscheinlich durch den Laktationsstatus und die Milchleistung der Schafe beeinflusst (Cruz-Rojo et al., 2012b). Bei der Untersuchung von Serum- und Milchproben aus Ziegen konnte im *T. circumcincta*-Ganzwurm-Antigen-ELISA eine Spezifität von 100 % und Sensitivität von 95 % bei negativen Cut-Off-Werten für Serum von 0,294 und Milch von 0,228 und eine Sensitivität von 90 % bei positiven Cut-Off-Werten für Serum von 0,606 und Milch von 0,419 nachgewiesen werden. Kreuzreaktivitäten konnten für *H. contortus* und *Fasciola hepatica* nicht vollkommen ausgeschlossen werden, wobei für *Tr. colubriformis* und *Cooperia oncophora* keine Kreuzreaktivität im ELISA nachgewiesen werden konnten (Malama et al., 2014). Die Ergebnisse dieser Studie sprechen für das Potenzial dieses ELISAs zum Einsatz als Indikator neben der EpG im „Targeted Selective Treatment“ (TST) bzw. „Targeted Treatment“ (TT).

Auch für andere MDS konnten Serum-ELISA etabliert und in Studien erfolgreich eingesetzt werden. So konnten z. B. *Tr. colubriformis*-spezifische-IgE-Immunantworten gegenüber adulten und L3 ES-Antigenen von Schafen (Shaw et al., 1998; Bendixsen et al., 2004) nachgewiesen werden.

Die Grundproblematik bei der Interpretation der bisherigen ELISA-Studienergebnisse liegt in der nicht ausreichenden Spezifität der ELISA, der mangelnden Untersuchung auf Kreuzreaktivitäten gegen andere MDS-Spezies und der fehlenden Untersuchung von Parasiten-naiven Tieren.

7.3 Molekulare Diagnostikmethoden

PCR-basierende Techniken sind den anderen diagnostischen Methoden wie z. B. der Mikroskopie und Immundetektion in ihrer Sensitivität und Spezifität oft überlegen (Demeler et al., 2012). Viele unterschiedliche PCR-basierte Techniken werden zur Bestimmung von genetischen Markern in genomischer DNA eingesetzt und wurden von Gasser et al. (2008) aufgelistet: z. B. Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP), Mutationen scannende Methoden wie der Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus (SSCP) und die denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE), zufällige Amplifikation von polymorpher DNA (RAPD), Amplifizierter Fragmentlängenpolymorphismus (AFLP), direkte DNA Sequenzierung, die genus- oder speziesspezifische PCR und die Real-Time PCR. Bei

den PCR-basierten Tests, die der Differenzierung von Strongylideneiern und –larven dienen, werden verschiedene genetische Marker wie z. B. „first and second internal transcribed spacers“ (ITS1, ITS2), „external transcribed spacers“ der nukleären ribosomalen DNA und die ribosomale DNA selbst (18S, 28S) eingesetzt (Demeler et al., 2012). Intensive Studien der ITS1 und ITS2 Region der nukleären ribosomalen DNA konnten belegen, dass diese genetischen Marker verlässlich sind bei der spezifischen Identifikation von verschiedenen Strongyliden-Nematoden wie z. B. der Gattung *Haemonchus*, *Teladorsagia* und *Ostertagia*, *Trichostrongylus*, *Nematodirus* u. a. (Wimmer et al., 2004; Gasser et al., 2008). Derzeit ist es mit molekulardiagnostischen Methoden möglich, BZ-Resistenzen in MDS wie z. B. *H. contortus* (Tiwari et al., 2006; Höglund et al., 2009; Rufener et al., 2009; von Samson-Himmelstjerna et al., 2009b; Barrère et al., 2013) und *T. circumcincta* (Shayan et al., 2007; Martínez-Valladares et al., 2012) zu analysieren. Die Analyse von Resistenzen gegenüber der Anthelminthika-Klassen der ML, Imidazothiazole und Tetrahydropyrimidine ist zum Teil noch nicht möglich. Hinsichtlich der Amino-Acetonitril-Derivat-Klasse wurde bei der Einführung des Wirkstoffes Monepantel das Angriffsziel des Wirkstoffes in den MDS und eine Reihe von Mutationen, die mit einer verminderten Sensitivität der Anthelminthika-Klasse gegenüber *H. contortus* assoziiert sein könnten, veröffentlicht (Kaminsky et al., 2008a; Demeler et al., 2012; Rufener et al., 2013).

8 Therapie von MDS-Infektionen

8.1 Anthelminthika-Einsatz

Die für Schafe in Deutschland zugelassenen Anthelminthika gegen MDS umfassen in der Gruppe der BZ die Wirkstoffe Albendazol, Febantel, Fenbendazol, Mebendazol und Oxfendazol, wobei alle im Handel erhältlichen Produkte oral applizierbar sind (Vetidata, 2014). Die Wartezeit für essbare Gewebe und Milch sind je erhältlichem Produkt unterschiedlich, die kürzeste Wartezeit auf Milch beträgt 10 Tage, wobei Mebendazol nicht zur Behandlung von Milch-liefernden Tieren bestimmt ist. Durch die teilweise bestehenden teratogenen und embryotoxischen Wirkungen der BZ, sollte der Einsatz während der Trächtigkeit bei Schafen vermieden werden. Der primäre Wirkmechanismus der BZ ist die Hemmung der Polymerisation von Tubulin zu Mikrotubuli, und damit die Hemmung der Glukoseaufnahme bzw. des intrazellulären Glukosetransportes und der Blockade der Spindelbildung bei der Mitose. BZ können daher vermizide, larvizide und ovizide Wirkung entfalten. Sie wirken gegen die meisten Nematoden und teilweise auch Zestoden und Trematoden. Doramectin, Ivermectin und Moxidectin sind die in Deutschland für Schafe zugelassenen Wirkstoffe der Gruppe der ML. Nur das Produkt Cydectin® ist oral applizierbar,

alle anderen subkutan oder intramuskulär. Als Wirkmechanismus wird eine selektive Bindung an GABA- und Glutamatgesteuerte Chloridkanäle vermutet, mit dem darauffolgenden Chloridioneneinstrom, der Hemmung der Reizleitung, Paralyse und Tod der Parasiten. Das Wirkungsspektrum umfasst *in vivo* adulte und nur teilweise die larvalen Stadien der MDS. Levamisol ist der einzige zugelassene Wirkstoff in der Gruppe der Imidazothiazole mit mäßiger Verträglichkeit (nicht einsetzbar bei Milchschaafen). Er reagiert mit nikotinergeren Acetylcholin-Rezeptoren und führt über eine Depolarisation zur spastischen Paralyse der Magen-Darm- und Lungennematoden (Frey und Löscher, 2002). Monepantel (Zolvix[®], Novartis Tiergesundheit GmbH) ist ein Breitspektrum-Anthelminthikum der Gruppe der Amino-Acetonitril-Derivate, welches seit April 2013 auch für Milchschaafe eingesetzt werden darf (Frey und Löscher, 2002; Vetidata, 2014). Es wirkt auf nikotinergeren Acetylcholinrezeptoren von adulten und L4-Stadien der MDS und führt über Paralyse und spasmoide Kontraktionen des Pharynx zum Tod der Parasiten (Kaminsky et al., 2008b).

8.2 Anthelminthika-Resistenz

In der landwirtschaftlichen Produktion von kleinen Wiederkäuern zählen heute Anthelminthika-Resistenzen zu den wesentlichen Problemen bei der Behandlung und dem Management von MDS-Infektionen (Kaplan, 2004). Während der erste Bericht über eine Anthelminthika-Resistenz von *H. contortus* in Schafen gegenüber Phenothiazin in die 50/60er Jahre zurückgeht (Drudge et al., 1957), folgten bald darauf Berichte über Anthelminthika-Resistenzen anderer Parasitenspezies (*T. circumcincta* und *Tr. colubriformis*) gegenüber BZ. Heutzutage sind weltweit Mehrfach-Anthelminthika-Resistenzen für *H. contortus*, *T. circumcincta* und *Tr. colubriformis* nachgewiesen. Dazu zählen Resistenzen der Anthelminthika-Klasse der BZ, der Imidazothiazole und Tetrahydropyrimidine und der ML (Avermectine und Milbemycine) (Nari et al., 1995; Chandrawathani et al., 2003; Borgsteede et al., 2007; Almeida et al., 2010; Voigt et al., 2012; Geurden et al., 2014).

Der Einsatz von kombinierten Anthelminthika-Formulierungen (zweifach und dreifach Formulierungen) ermöglicht in Australien, Neuseeland, Südafrika und Lateinamerika seitdem eine bessere Kontrolle von einfach bis hin zu mehrfach-anthelminthika-resistenten MDS-Populationen (Bartram et al., 2012). In Deutschland sind (Stand 2014) keine Mehrfach-Anthelminthika-Formulierungen zugelassen (Vetidata, 2014). Dem Einsatz von Mehrfach-Formulierungen wird bei synergistischer Wirkung unter anderem der Vorteil der Verlangsamung der Entwicklung von Resistenzen zugesprochen (Bennet et al., 1980; Leathwick et al., 2009). Bei langwirkenden Präparaten wie z. B. Cydectin[®] (2 % w/v LA

Injektion für Schafe; Zoetis, Deutschland) zur subkutanen Applikation am Ohrgrund beim Schaf ist es hingegen umstritten, ob sie den Selektionsdruck hin zu einer Anthelminthika-Resistenz erhöhen, oder im Vergleich zu ihren kürzer wirkenden oralen Formulierungen eher einen Vorteil bieten (Sargison et al., 2012).

Drei neue Anthelminthika-Klassen sind gegen MDS der Schafe wirksam. Das zur Gruppe der Amino-Azetonitril-Derivate gehörende Anthelminthikum Monepantel (Zolvix[®], Novartis Tiergesundheit GmbH, Deutschland) ist wirksam gegen resistente Stämme von *H. contortus*, *T. circumcincta* und *Tr. colubriformis* in Schafen und wurde im Jahr 2010 in Deutschland eingeführt (Kaminsky et al., 2008a; Baker et al., 2012). Während im Jahr 2013 noch keine Resistenzen gegenüber diesem Anthelminthikum registriert (Epe und Kaminsky, 2013) wurden, sind derzeit (Stand August 2015) Hinweise auf Resistenzen gegenüber Monepantel von *Tr. colubriformis*, *T. circumcincta* und *H. contortus* gegeben (Rufener et al., 2013; Scott et al., 2013; Bartley et al., 2015; Van den Brom et al., 2015). Derquantel (zur Spiroindol-Klasse gehörig) ist seit 2010 in Neuseeland und seit 2012 im Vereinigten Königreich in der Kombination mit Abamectin als Produkt Startect[®] (Zoetis) für Schafe registriert und wirksam gegen präadulte L4 Stadien und Adulte der hauptsächlich vorkommenden MDS der Schafe, mit Ausnahme der larvalen Stadien ML-resistenter *H. contortus* (Kaminsky et al., 2011; Little et al., 2011). Für Emodepsid, ein Cyclooctadepsipeptid, wurde die Wirksamkeit gegen MDS der Schafe und gegen Benzimidazol-, Levamisol- und Ivermectin-resistente Stämme von *H. contortus* nachgewiesen (von Samson-Himmelstjerna et al., 2005). Jedoch ist derzeit kein Produkt für kleine Wiederkäuer auf dem Markt erhältlich.

Trotz der Entwicklung von neuen Anthelminthika ist das Auftreten von Anthelminthika-Resistenzen gegen diese Wirkstoffe und die Abschwächung der Wirkung von Mehrfach-Anthelminthika-Kombinationen wahrscheinlich nur eine Frage der Zeit und des Umgangs mit den Anthelminthika in der Praxis. Die Erfahrung aus der Vergangenheit, die schnelle Entwicklung einer Anthelminthika-Resistenz kurz nach Einführung des Anthelminthikums auf den Markt, haben schon früh die Frage nach anderen Lösungen für ein Management des Endoparasitenbefalls von kleinen Wiederkäuern aufgeworfen.

8.3 Vakzination

Die Forschung um die Entwicklung von Vakzinen gegen die MDS der kleinen Wiederkäuer befassen sich zum einen grundlegend mit der Suche nach potenziellen Antigenen, die sicher und effizient eine ausreichende Immunantwort des Wirtes hervorrufen, und zum anderen mit der Weiterentwicklung dieser hin zu rekombinant hergestellten Antigenen, die leicht und kostengünstig zu produzieren sind. Vorherrschend sind bei der Evaluation von Antigenen

zwei verschiedene Gruppen, die als „natürliche“ Antigene und „versteckte“ Antigene bezeichnet werden. Die Einteilung wird normalerweise in die Gruppen somatische (Oberflächen- und interne Antigene) und ES-Antigene vorgenommen. Da bei Helminthen die internen Antigene mit dem Wirt normalerweise nicht in Kontakt kommen, da die Parasiten nicht im Wirt abgebaut, sondern ausgeschieden werden, werden diese als „versteckte“ Antigene bezeichnet (Deplazes et al., 2012). Vielversprechende Forschungsergebnisse konnten in der Gruppe der „natürlichen“ Antigene mit Oberflächenantigenen von entscheidenden L3 (*H. contortus*) gewonnen werden, die bei 5 Monate alten Lämmern einen Schutz hervorriefen (Jacobs et al., 1999) und in einer späteren Studie Vakzinationsdosis-abhängig die Eiausscheidung im Kot der vakzinierten Schafe signifikant erniedrigten (Piedrafita et al., 2012; Piedrafita et al., 2013). Mit 15 und 24 kDa exkretorisch-sekretorischen Produkten (*H. contortus*) konnte ein signifikanter Schutz bei älteren Lämmern und adulten Schafen hervorgerufen werden (Schallig et al., 1994a). Die bekanntesten für eine *H. contortus*-Immunisierung eingesetzten Moleküle der „versteckten“ Antigene sind Contortin, H11, P1, H-gal-GP, Cysteinproteasen (35 kDa/70 kDa), p52/p46 (Newton und Munn, 1999). Für den Parasiten *H. contortus* sind vielversprechende Glykoprotein-Komplexe H11 und H-gal-GP, die aus den intestinalen Zellen von L4 und adulten *H. contortus* gewonnen wurden (Smith und Zarlenga, 2006). Bei mit einer Mischvakzine aus H11 und H-gal-GP vakzinierten Merinoschafen konnten deutlich erhöhte IgG₁- und IgG₂-Spiegel im Blut, eine erniedrigte Eiausscheidung in den Fäzes und geringere Häufigkeiten von Anämien im Vergleich zu einer Kontrollgruppe festgestellt werden (Le Jambre et al., 2008). Das H11 Glycoprotein, eine Aminopeptidase, aus *H. contortus* konnte in *C. elegans* rekombinant hergestellt werden, führte aber in Vakzinationsversuchen nicht zu einer Absenkung der Wurmbürde und der EpG von Schafen (Roberts et al., 2013). In Australien wird aktuell eine Vakzine (registriert in der „Australian Pesticide & Veterinary Medicines Authority“ (APVMA) mit dem Namen „Barbervax“ (Australian Pesticides & Veterinary Medicines Authority, 2013), deren aktive Komponente integrale Membran-Glykoproteine von *H. contortus* sind, zur subkutanen Impfung von Schafen eingesetzt (Smith, 2013). Beim Einsatz einer Multi-Komponenten-Vakzine mit 8 verschiedenen rekombinant hergestellten Antigenen von *T. circumcincta* konnte bei 172 – 178 (204 - 206) Tage alten Lämmern die Wurmbürde um 56 % (75 %) und die EpG um 73 % (92 %) im Vergleich zur Kontrollgruppe gesenkt werden (Nisbet et al., 2013). Insgesamt sind die Versuche zu Vakzinationen vielversprechend und lassen auf eine Unterstützung beim Management der MDS-Infektionen der kleinen Wiederkäuer hoffen.

8.4 Alternative Therapien

Alternative Behandlungsmöglichkeiten von MDS befassen sich unter anderem mit der Nahrungsergänzung (Knox et al., 2006), wie z. B. der Protein-Supplementation, die in verschiedenen Studien die nachteiligen Auswirkungen von Infektionen mit MDS wie *H. contortus* (Datta et al., 1998; Rocha et al., 2011), *Tr. colubriformis* (Kyriazakis et al., 1996) und *N. battus* (Israf et al., 1996) vermindern konnte. Auch die Harnstoff-Supplementation konnte die Resistenz/Resilienz von kleinen Wiederkäuern gegenüber *H. contortus*- (Wallace et al., 1999), *Tr. colubriformis*- (Knox und Steel, 1999) und *T. circumcincta*-Infektionen (Stear et al., 2000) erhöhen, bzw. den Proteinverlust durch die Parasiteninfektion abschwächen. Einer Kupferoxid-Supplementation wird eine anthelminthische Aktivität gegen abomasale Nematoden zugesprochen (Burke et al., 2004b). Die Fütterung kondensierter Tannin-haltiger Pflanzen (z. B. der Leguminose *Lespedeza cuneata*) führte in Studien zur Reduktion der EpG von Schafen (Burke et al., 2012). Pilzen (wie z. B. *Duddingtonia flagrans*) wird das biologische Potenzial zugesprochen, im Kot der Schafe zur Verringerung der Anzahl von infektiösen Larven (*H. contortus*) beizutragen (Peña et al., 2002; Buske et al., 2013).

9 Management

Als ein zentraler Ansatzpunkt im Umgang mit der Anthelminthika-Resistenz gilt heute das Herdenmanagement und hierbei vor allem „der Erhalt eines effektiven Refugiums für einen Anteil der Wurmpopulation“ (Kenyon et al., 2009). Mit dem Begriff ‚Refugium‘ ist der Teil einer Parasitenpopulation im Tierbestand bzw. auf den Weiden gemeint, in der die „genotypische und phänotypische Empfänglichkeit“ (Van Wyk, 2001; Soulsby, 2007; Kenyon et al., 2009) für Anthelminthika bestehen bleiben (Van Wyk, 2001; Soulsby, 2007). Man unterscheidet hierbei die im Wirt befindlichen Parasitenstadien (Intrapopulation), in der vor allem die histiotropen Larven ein Refugium darstellen (Fleming et al., 2006), und die in der Umwelt befindlichen freilebenden parasitären Stadien (Suprapopulation), die im gemäßigten Klima der Erde eine lange Überlebenszeit haben und hier den größten Anteil des Refugiums darstellen (Barnes et al., 1988; Kenyon et al., 2009). Grundvoraussetzung ist, dass ein großer Genpool von für Anthelminthika-Empfindlichkeit codierenden Allelen erhalten bleibt und diese somit an die nächste Generation von Parasiten weitergegeben werden können. Die Größe des Refugiums ist wahrscheinlich von entscheidender Bedeutung für den Erhalt der Anthelminthika-empfindlichen Allele (Van Wyk, 2001). Das Refugium wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst: wie u. a. der Höhe des Selektionsdruckes zur Anthelminthika-Resistenz z. B. durch Behandlungsfrequenz und Unterdosierung mit

Anthelminthika, von Umwelt- und Managementfaktoren wie z. B. Klima, Populationsdichte des Wirtes, Nahrung und Umweide-Strategien, sowie von den Eigenschaften der an der Infektion beteiligten Parasitenspezies (wie z. B. deren Fertilität) selbst.

Der Umtrieb der Tiere nach Anthelminthika-Behandlung auf eine Parasiten-unbelastete Weide ist ein häufiger Fehler innerhalb des Weidemanagements. Als neue Weideparasitenpopulation treten nach Behandlung bei möglicher Anthelminthika-Resistenz fast ausschließlich Anthelminthika-resistente Parasiten auf (Abbott et al., 2004). Gleiches gilt für Anthelminthika-Behandlungen in Zeiten, in denen nur wenige Parasiten in der Umwelt überleben können oder den Eintrag von für Anthelminthika-Resistenz codierender Allele durch zugekaufte und nicht in Quarantäne gehaltener Tiere.

Im Bewusstsein dieser Management-Problematik wurden verschiedene Refugium-basierende Behandlungs-Regime untersucht. Unterschieden wird hier zwischen der gezielten Behandlung der gesamten Herde mit Anthelminthika im Bewusstsein des Refugiums (TT) (Cringoli et al., 2008) und der selektiven Behandlung von Einzeltieren der Herde mit Anthelminthika im Bewusstsein des Refugiums, die aus der Behandlung den größten Nutzen ziehen (TST). Hintergrund letzter Theorie ist die Tatsache, dass in Studien nachgewiesen wurde, dass meist nur ein kleiner Teil der Herdentiere für die Mehrzahl der ausgeschiedenen MDS-Eier zuständig ist (Sréter et al., 1994). Die Teilnehmer des EU-unterstützten PARASite SOLutions Projects beschäftigten sich intensiv mit der Entwicklung von auf dem Prinzip der Nachhaltigkeit beruhenden, möglichst mit geringem Kosten- und Arbeitsaufwand verbundenen Vorgehensweisen, zur Bekämpfung von MDS-Infektionen, die auf diesen Refugium-basierenden Strategien beruhen (Kenyon und Jackson, 2012). Parasitologische, pathophysiologische und immunologische Indikatoren wurden auf ihre Akzeptanz und Anwendbarkeit durch Landwirte und auf ihre Fähigkeit, MDS-Infektionen zu detektieren, ohne größere Produktionseinbußen einzugehen, getestet. Durch den Einsatz der EpG als Indikator für TT konnten anthelminthische Behandlungen in landwirtschaftlichen Betrieben im Vereinigten Königreich reduziert werden. EpG, FAMACHA[®] Anaemia guide, Body Condition Score (BCS), Diarrhoe Score (DISCO), Lebendgewichtszunahme und Produktionseffizienz wurden als Indikatoren im TST getestet. Die Behandlung der nach den Indikatoren ausgewählten Einzeltiere führte bei nahezu allen Untersuchungsgruppen zu einer Verminderung des Anthelminthika-Einsatzes (Gallidis et al., 2009; Greer et al., 2009; Riley und van Wyk, 2009; Stafford et al., 2009; Gaba et al., 2010; Ouzir et al., 2011). Mittels dieser Studien konnte der TST-Strategie das Potenzial zur Verminderung des Anthelminthika-Einsatzes und damit zur Verlangsamung der Entwicklung von Anthelminthika-Resistenz zugesprochen werden.

Dennoch ist bislang noch nicht bekannt, wie sich eine solche Strategie langfristig auswirken wird, welche Refugien-Größen nötig sind, wie man resistente von empfänglichen Allelen der Parasiten in molekularen Tests unterscheiden kann (derzeit nur möglich für mit BZ-Resistenz-korrelierende Einzelnukleotidaustausche im β -Tubulin-Gen, detektierbar mittels Pyrosequenzierung) und wie evtl. bessere Indikatoren für die TST-Strategie aussehen. Die Ausnutzung der TST-Daten z. B. für neue Züchtungsstrategien, die sich gezielt mit der Selektion von Tieren befassen, die widerstandsfähiger gegenüber Parasiteninfektionen sind, wäre denkbar (Kenyon und Jackson, 2012).

10 Genetische Parasitenresistenz und Züchtung

Die Züchtung von Schafen auf Parasitenresistenz/-resilienz stellt eine vielversprechende, ergänzende Strategie bei der Suche nach Alternativen zum strategischen Anthelminthika-Einsatz dar.

Wirtsorganismen haben verschiedene Möglichkeiten, auf einen Parasiten zu reagieren (z. B. können sie den Parasiten abwehren, ihn tolerieren oder an ihm erkranken). Diese Möglichkeiten werden unter anderen von den Fähigkeiten des Wirtsorganismus zur Resistenz oder Resilienz beeinflusst. Beides wird als biologisches Konzept des Wirtsorganismus betrachtet, um auf einen Parasiten reagieren zu können (Herrmann, 2010).

„Resistenz ist die Fähigkeit eines Wirtes, Antworten zur Unterdrückung der Parasitenansiedlung zu initiieren und zu erhalten und/oder den Parasitenbefall zu eliminieren“ (Woolaston und Baker, 1996). Die Wirtsantwort kann vor einer Parasiteninfektion schützen, diese reduzieren oder diese auflösen (Hooda et al., 1999; Bricarello et al., 2004; Alba-Hurtado und Munoz-Guzmán, 2013). Die Immunreaktion kann die Parasitenpopulation durch die verminderte Ansiedlung von larvalen Parasitenstadien, durch die Erhöhung der gehemmten Parasitenstadien im Verhältnis zur Gesamtpopulation, durch die Wachstumsreduktion von Nematoden, durch die verminderte Fruchtbarkeit der Nematoden, die in verminderter Eiausscheidung resultiert und durch die Elimination der adulten Parasitenstadien oder eine Persistenz einer Teilpopulation von adulten Nematoden, beeinflussen (Deplazes et al., 2012).

„Resilienz ist die Fähigkeit des Wirtes, einen Parasitenbefall zu tolerieren, ohne starke Produktionsverluste zu erleiden“ (Woolaston und Baker, 1996). Die negativen Effekte der Parasiteninfektion werden vom Wirtsorganismus kompensiert und verhindern eine Verminderung der produktiven Parameter wie z. B. des Körpergewichts (Paolini et al., 2005; Alba-Hurtado und Munoz-Guzmán, 2013).

10.1 Einflussfaktoren für die Resistenz/Resilienz bei Schafen

Verschiedene Faktoren beeinflussen die Resistenz und Resilienz. In Studien konnte der Einfluß von Alter, Geschlecht, Reproduktionsstatus, Geburtstyp und Ernährungszustand bzw. Proteinversorgung der Tiere auf die Parasitenresistenz/-resilienz nachgewiesen werden.

Lämmer und junge Schafe gelten als anfälliger gegenüber Infektionen mit MDS als adulte Schafe (Schallig, 2000; Craig et al., 2006; Miller und Horohov, 2006). Bei der Untersuchung von Soay Schafen verschiedenen Alters konnte eine erhöhte Prävalenz von *Tr. vitrinus* und *Tr. axei* bei Lämmern im Vergleich zu adulten Soay Schafen nachgewiesen werden, wobei die höchste Prävalenz den männlichen Lämmern zugewiesen wurde (Craig et al., 2006). Eine Studie an Suffolk- und Texel Schafen wies erhöhte EpG-Werte bei den jüngeren im Vergleich zu den älteren Schafen auf (Good et al., 2006). Männliche Schafe scheinen empfindlicher gegenüber Infektionen mit MDS zu sein als weibliche Schafe (Windon und Dineen, 1981; Barger, 1993; Díaz-Rivera et al., 2000; Wilson et al., 2004; Craig et al., 2006). In einer Studie von Gauly et al. (2006) konnten bei experimentell mit *H. contortus* infizierten Merinoland- und Rhön Lämmern signifikant erhöhte EpG-Werte und Wurmbürden bei den männlichen im Vergleich zu den weiblichen Schafen festgestellt werden. In verschiedenen Studien konnte weiblichen Schafen um die Zeit des Partus und während der Laktation eine Immunsuppression, die sich in erhöhter MDS-Eiausscheidung äußert, zugeschrieben werden (Barger, 1993). Bei der Untersuchung von Florida Native Schafen im Vergleich zu Dorset × Rambouillet Schafen konnte im Gegensatz zu den Dorset x Rambouillet Schafen bei den Florida Native Schafen kein peripartaler Anstieg der MDS-Eiausscheidung im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Zajac et al., 1988). Bei der Untersuchung von maternalen Effekten auf die Parasitenresistenz von Soay Schafen konnte eine positive Assoziation der Wurfgröße mit dem EpG nachgewiesen werden: Zwillinge wiesen in ihrem ersten Sommer einen höheren EpG auf als Einlinge. Lämmer von mittelalten Soay Mutterschafen hatten im Vergleich zu denen jüngerer und älterer Mutterschafe den kleinsten gemessenen EpG (Hayward et al., 2010). Zwillinge wurde in verschiedenen anderen Studien mit einer erniedrigten Lebenszeit-Fitness durch das geringere Geburtsgewicht (Wilson et al., 2005), mit einer erhöhten Sterblichkeit im ersten Winter (Clutton-Brock et al., 1992) und geringeren Serum-Immunglobulin-Werten durch das verminderte Geburtsgewicht verknüpft (Christley et al., 2003). Eine erhöhte Proteinversorgung der Tiere wird bei Infektionen mit MDS mit einer verbesserten Immunantwort und Produktionsleistung assoziiert (Coop und Kyriazakis, 1999; Strain und Stear, 2001; Houdijk et al., 2006).

10.2 Unterschiede zwischen Rassen

Unterschiede hinsichtlich der Resistenz und Resilienz gegenüber gastrointestinalen Parasiteninfektionen zwischen verschiedenen Schafrassen sind in einer Vielzahl von Untersuchungen dokumentiert. Insbesondere für die Infektion mit *H. contortus* gibt es zahlreiche Studien zu Schafrassen in tropischen und subtropischen Gebieten der Erde (Bishop und Morris, 2007; Alba-Hurtado und Munoz-Guzmán, 2013).

Die an die Umweltbedingungen der Region der Karibik und südlichen Staaten der USA adaptierten Schafrassen Barbados Blackbelly (Gruner et al., 2003; Terefe et al., 2007), St. Croix (Gamble und Zajac, 1992; Burke und Miller, 2004a; Rocha et al., 2011), Criolla Native (Alba-Hurtado et al., 2010), Florida Native (Bradley Sr et al., 1973; Zajac et al., 1990) und Gulf Coast Native Schafe (Bahirathan et al., 1996; Miller et al., 1998) gelten als relativ widerstandsfähig gegenüber MDS-Infektionen im Vergleich zu den nicht an diese Regionen adaptierten Rassen. In Afrika werden neben den Sabi Schafen (Matika et al., 2003) vor allem Red Massai Schafe intensiv untersucht (Mugambi et al., 1997; Marshall et al., 2013). In Südamerika konnten Santa Ines (Amarante et al., 2005) und Crioula Lanada of Brazil Schafe (Bricarello et al., 2004), in Pakistan die Schafrasse Lohi (Saddiqi et al., 2010), in Indien die Kreuzungen mit Garole Schafen (Nimbkar et al., 2003) als widerstandsfähiger gegenüber MDS-Infektionen identifiziert werden.

In Europa wurden unter anderem Texel Schafe mit Suffolk Schafen verglichen und bei den Texel Schafen aufgrund von EpG und Wurmbürde eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber *H. contortus*-Infektionen festgestellt (Good et al., 2006). In Deutschland sind Rhön- und Merinoland Schafe hinsichtlich ihrer Resistenz mit anderen Schafrassen verglichen worden. Nach der experimentellen Infektion von Rhön- und Merinoland Lämmern mit L3 von *H. contortus* konnte für die Rhön Schafe eine im Mittel höhere EpG und ein höherer Gehalt an für L3 von *H. contortus* spezifischem Ig(L) im Serum nachgewiesen werden. Kein signifikanter Unterschied konnte hinsichtlich der Wurmbürde, des Hämatokritwertes und der IgG-Antikörper im Serum zwischen den Schafrassen festgestellt werden (Gauly et al., 2002).

Der Nachteil der als resistent gegenüber MDS geltenden Schafrassen ist die im Vergleich mit Hochleistungsschafrassen verminderte Produktivität in Bezug auf die Produkte Fleisch, Milch und Wolle. Für die Tierzucht stellen Kreuzungsversuche zwischen den resistenten exotischen Rassen und den empfänglichen Hochleistungsrassen oder Substitutionen mit diesen, aufgrund des wahrscheinlich starken Verlustes von Produktivität, oft keine Alternative dar (Beh und Maddox, 1996; Woolaston und Baker, 1996). Dennoch wird der Einsatz von an die Regionen adaptierten Schafrassen vor allem im Bereich von klimatischen

Extremen empfohlen (Woolaston und Baker, 1996). Ganz im Gegensatz dazu gilt die Selektion von toleranten Tieren innerhalb der Rasse als vielversprechend und wurde vor allem auch bei Hochleistungsschafzuchten eingesetzt. In der Studie von Eady et al. (2003) konnte bei auf Resistenz gegenüber *H. contortus*-Infektionen genetisch selektierten Merino Schafen eine um 69 % reduzierte EpG im Vergleich zu den nicht selektierten Merino Schafen nachgewiesen werden.

10.3 Unterschiede zwischen Einzeltieren

Die Selektion von resistenten Einzeltieren gegenüber MDS-Infektionen innerhalb einer Rasse wurde über mehrere Jahrzehnte vor allem in Australien in Bezug auf Merino Schafe (Woolaston, 1990) und in Neuseeland in Bezug auf Romney Schafe (Bisset et al., 1997) durchgeführt. Erfolgreiche Selektionsergebnisse konnten bei der vergleichenden Untersuchung von über 15 Jahre auf eine reduzierte EpG selektierten Merino Schafen mit nicht selektierten Kontrollschafen dargelegt werden: Nach Infektion mit *Tr. colubriformis* und *T. circumcincta* war die EpG um 18 % und die Wurmbürde um 25 % reduziert in der selektierten Merino Schafgruppe im Vergleich zur nicht-selektierten Schafgruppe (Kemper et al., 2010). Nach Untersuchungen an INRA 401 Schafgruppen, die experimentell zunächst mit einer (z. B. *Tr. colubriformis*) und danach mit einer anderen Trichostrongylidenart (z. B. *H. contortus*) kreuzinfiziert wurden, wurde vermutet, dass Schafe, die für eine Trichostrongylidenart resistent sind, auch genetisch resistent gegenüber einer anderen Trichostrongylidenart sind (Gruner et al., 2004). Dementsprechend würde die Selektion für Resistenz gegenüber einer Spezies gleichzeitig zu einer erhöhten Resistenz gegenüber einer anderen Spezies führen. Bishop (2012) sieht den bisher größten Erfolg der Selektion von Schafen innerhalb einer Rasse in der durch die Selektion von Schafen mit niedriger EpG resultierende verminderten Weidekontamination, welche auch das Konzept des Refugiums besser umsetzbar erscheinen lässt.

10.4 Indikatormerkmale für Resistenz gegenüber Parasiten

Für die Züchtung auf Parasitenresistenz werden Indikatormerkmale (Parameter) benötigt, die zwischen Parasitenresistenten und -empfindlichen Tieren unterscheiden können. Einer der verlässlichsten Indikatormerkmale ist die Wurmbürde eines Tieres. Da diese aber für den Untersuchenden verborgen bleibt, muss auf andere Parameter zurückgegriffen werden, die möglichst eine hohe Korrelation mit der Wurmbürde und mit anderen Leistungsparametern, die für einen Wurmbefall sprechen, aufweisen. Wichtig ist, dass diese

Indikatormerkmale für Parasitenresistenz eine möglichst hohe Heritabilität besitzen, sowie gute Wiederholbarkeit, kostengünstige Durchführung und Einfachheit in der Anwendung gewährleisten (Herrmann, 2010). Beh und Maddox (1996), sowie Bishop (2012) unterteilen die Indikatormerkmale in Maße für die Resistenz (EpG, Wurmbürde, Wurmgröße, Wurmfruchtbarkeit), Maße für die Immunantwort (Eosinophilie, Antikörperspiegel wie z. B. von IgA, IgG und IgM), Maße für den Einfluss der Infektion (Anämie: FAMACHA[®] Anaemia guide und Hämatokritwert, Pepsinogenspiegel, Fruktosaminkonzentration, Dag Score) und die Maße für Resilienz (Wachstumsrate, Behandlungsfrequenz mit Anthelminthika). Nur die für die vorliegende Studie wichtigsten Indikatormerkmale werden im Folgenden genauer besprochen.

10.4.1 Eizahl pro Gramm Kot

Quantitative Ergebnisse der McMaster-Technik werden als Eizahl pro Gramm Kot ausgedrückt. Die EpG wird durch verschiedene Parameter beeinflusst: Die Entnahmetechnik und Lagerung des Kotes (Nielsen et al., 2010; Rinaldi et al., 2011), dessen Feuchtigkeitsgehalt (Le Jambre et al., 2007), die Sensitivität des Untersuchungsverfahrens (FLOTAC[®]- vs. McMaster-Technik (Rinaldi et al., 2011)), die Modifikationen innerhalb der Untersuchungsverfahren (verschiedene Flotationsflüssigkeiten, Zähltechniken u. a.), die Fruchtbarkeit der verschiedenen Nematodenspezies (Le Jambre et al., 1971; Stear und Bishop, 1999; Rowe et al., 2008), Alter und Geschlechtsverteilung innerhalb der Wurmbürde, die Anzahl der ausgeschiedenen Eier in Abhängigkeit von der Parasitenspezies, intermittierende Ausscheidung von Parasiteneiern und die wirtsspezifischen Faktoren. Ein Rückschluss von der Höhe der EpG auf die Zusammensetzung der Wurmbürde des Wirtsorganismus ist bei einer Mischinfektion gar nicht, bei einer Monoinfektion nur sehr eingeschränkt möglich. Präpatente Infektionen werden mit dieser Technik nicht erfasst. Dennoch wird das McMaster-Verfahren aufgrund der relativ einfachen und kostengünstigen Durchführung sehr geschätzt und bei Zuchtversuchen als Selektionskriterium intensiv genutzt. Der Vorteil der McMaster-Technik ist in der schnellen Anwendbarkeit ohne Zentrifugationsschritt zu sehen, während im Vergleich zur FLOTAC[®]-Technik die McMaster-Technik eine geringere Sensitivität aufweist. Für die Unterscheidung zwischen resistenten und empfänglichen Wirtstieren und die Entscheidung zu einer anthelminthischen Behandlung im TST-Modell ist die Exaktheit der EpG nicht von so hoher Bedeutung. Daher wird die Anwendung der McMaster-Technik für diese Bereiche von vielen Wissenschaftlern unterstützt (Kenyon et al., 2009). Im Gegensatz dazu wird zum Nachweis von anthelminthischen Resistenzen die genauere FLOTAC[®]-Technik propagiert (Rinaldi et al.,

2011). Die Selektion von resistenten Schafen innerhalb einer Rasse anhand der EpG ist möglich und wurde bereits in verschiedenen Studien durchgeführt (Woolaston, 1992; Eady et al., 2003; Kahn et al., 2003). Die EpG wurde für Lämmer (Bishop et al., 2004) und Mutterschafe zur Zeit um den Partus als mittelmäßig heritables Merkmal eingestuft (Bishop und Morris, 2007). Die meisten in Studien geschätzten Heritabilitäten (Maße für die Erbligkeiten von Eigenschaften) für die EpG in Schafen reichen von 0,2 bis 0,4 (Bishop, 2012). Bei Mischinfektionen können diese Heritabilitäten aber auch zu 0,5 (Bishop et al., 2004) oder höher tendieren (Bishop und Morris, 2007). Das ist vergleichbar mit den für das Körpergewicht ($h^2=0,4$), Vliesgewicht ($h^2=0,4$) und die Reproduktionsrate ($h^2=0,5$) geschätzten Heritabilitäten (Woolaston und Baker, 1996). Die EpG allein sollte nicht als „Goldstandard“ der Züchtung auf gastrointestinale Parasitenresistenz genutzt werden, da sie nicht in einem definierten biologischen Prozess entsteht, sondern durch die Kumulation mehrerer Parasiten- und Wirtsabgeleiteter Effekte beeinflusst wird (Hunt et al., 2013). Die Limitation der EpG, Nematoden zu quantifizieren und bis auf Speziesebene zu identifizieren, könnte z. B. durch DNA-basierte Untersuchungsmethoden (von Samson-Himmelstjerna et al., 2002; Roeber et al., 2012; Demeler et al., 2013a; Demeler et al., 2013b) und den Einsatz der sensitiveren FLOTAC[®]-Technik verbessert werden (Cringoli, 2006; Demeler et al., 2013b).

10.4.2 Hämatokritwert

Physiologische Hämatokritwerte von Mutterschafen liegen im Bereich von 0,27 - 0,41 l/l (Bickhardt und König, 1985). Bei *H. contortus* dominierten Infektionen kann der Hämatokritwert aufgrund des durch diesen Parasiten induzierten Blutverlustes des Wirtsorganismus als direktes Indikatormerkmal für die Befallsstärke mit hämatophagen MDS und damit als indirektes Indikatormerkmal für die Resistenz dienen. So war der Mittlere Hämatokritwert bei dem Vergleich zwischen der mit *H. contortus* experimentell infizierten Schafgruppe und Kontrollgruppe 45 bzw. 75 Tage *post infectionem* für die infizierte Schafgruppe signifikant erniedrigt (Da Silva et al., 2013). Der Hämatokritwert selbst wird vom Alter und Geschlecht (Woolaston und Piper, 1996) des Wirtsorganismus beeinflusst. EpG und Hämatokritwert waren in verschiedenen Studien negativ korreliert nach experimenteller *H. contortus*-Infektion (Vanimisetti et al., 2004; Castillo et al., 2011) und nach natürlicher Mischinfektion (Idika et al., 2012). Die für den Hämatokritwert geschätzten Heritabilitäten liegen in einem ähnlichen Bereich wie die der EpG (Albers et al., 1987; Gauly et al., 2002; Vanimisetti et al., 2004).

10.4.3 FAMACHA[®] Anaemia guide

Der FAMACHA[®] Anaemia guide wurde für die Klassifizierung von Infektionen mit *H. contortus* in Südafrika entwickelt (Malan et al., 2001). Der Guide klassifiziert unterschiedliche subkonjunktivale Schleimhautfarben je nach Anämiestatus (1 - 5) und ordnet diesen Farben eine Behandlungsempfehlung zu. Der Kategorie 1 wird ein optimaler Hämatokritwert (Hkt) von 35 (28) %, der Kategorie 2 ein akzeptierbarer Hkt von 25 (23 - 27) %, der Kategorie 3 ein grenzwertiger Hkt von 20 (18 - 22) %, der Kategorie 4 ein niedriger Hkt von 15 (17 - 13) % und der Kategorie 5 ein fataler Hkt von 10 (12) % zugeordnet (Bath und Wyk, 2001). Im Gegensatz zu den Verfahren der Hämatokrit- und EpG-Bestimmung bietet der FAMACHA[®] Anaemia guide bei *H. contortus* dominierten Infektionen eine einfache und kostengünstigere Alternative zur Durchführung des TST. Die Aussagekraft des Guides ist jedoch auf die Befallsstärke mit hämatophagen Parasiten beschränkt. Eine niedrige Wurmbürde kann den Einsatz des FAMACHA[®] Anaemia guides begrenzen und auch Rassenunterschiede sollten beim Einsatz des FAMACHA[®] Anaemia guides berücksichtigt werden (Moors und Gauly, 2009). Studien von Riley und van Wyk (2009) lassen vermuten, dass auch der FAMACHA[®] ein heritables Merkmal in Schafen ist.

10.4.4 Antikörpernachweis

Antikörper-Spiegel, die spezifisch für die Immunantwort gegenüber bestimmten Parasiten und deren Stadien sind, werden für den Einsatz als Indikatormerkmal in der Züchtung in Betracht gezogen (Bishop, 2012). Die Immunantwort des Wirtes auf den Parasiten ist ein dynamischer Prozess, der sich den Entwicklungsstadien des Parasiten und der Höhe des Parasitenbefalls anpasst. Für den Nachweis der Antikörper sind verschiedenste ELISA publiziert, jedoch ist derzeit noch keine Standardisierung erfolgt. Grundsätzlich ist die Vergleichbarkeit von Studien und Immunantworten durch diese Gegebenheiten erschwert. Dennoch konnte vielen untersuchten immunologischen Parametern eine mäßige bis hohe Heritabilität und strenge Korrelation mit anderen Merkmalen wie der EpG und der Wurmbürde zugeteilt werden (Bishop, 2012). Die Induktion einer für MDS typischen IgG₁-, IgE- und IgA-Immunantwort wurde mit genetischer Resistenz assoziiert (Gill et al., 1993; Bendixsen et al., 2004; Hunt et al., 2013). In der Studie von Bisset et al. (1996) konnten bei hinsichtlich der Höhe der EpG über mehrere Generationen selektierten LFEC- (low FEC) und HFEC- (high FEC) Romney Schafen signifikant höhere spezifische IgG₁- und IgM-Serum-Spiegel gegen adulte und larvale (L3) Antigene von *T. colubriformis* in den LFEC-selektierten Lämmern nachgewiesen werden. In Texel Lämmern mit einer natürlichen

gemischten MDS-Infektion war die IgE-Aktivität gegen Tropomyosin mäßig heritabel und assoziiert mit einer erniedrigten EpG und einem erniedrigten Lebendgewicht (Murphy et al., 2010). In der QTL-Studie von Gutiérrez-Gil et al. (2009) konnten die EpG und das gegen L4 von *T. circumcincta* gerichtete IgA-Level in spanischen Churra Schafen mit einer Region auf einem Chromosom verknüpft werden.

10.5 Marker assoziierte Selektion

Ein andere Möglichkeit ist die Identifikation und Selektion von Genen die für eine Resistenz gegenüber MDS-Infektionen zuständig sind (Sayers et al., 2005b). Die meisten veröffentlichten Studien mit genetischen Markern zur MDS-Resistenz sind Mikrosatelliten-basierte QTL-Analysen. Immer mehr Untersuchungen befassen sich derzeit hinsichtlich der MDS-Resistenz mit SNP (engl.: single nucleotide polymorphism)-Assoziationsstudien (Brown et al., 2013; Riggio et al., 2014; Benavides et al., 2015). In den unterschiedlichen QTL-Analysen konnten viele QTLs für die Resistenzen gegenüber MDS-Infektionen in Schafen identifiziert werden. Zwei Loci: Das *DRB*-Gen, welches zur Klasse II der Major-Histokompatibilitäts-Komplexe gehört (Schwaiger et al., 1995; Sayers et al., 2005a) und die chromosomale Region um das Interferon γ Gen (Coltman et al., 2001b; Sayers et al., 2005b), konnten mit der Resistenz gegenüber MDS-Infektionen in Schafen assoziiert werden (Charon, 2004). Für Soay Schafe scheinen 3 Loci mit der Parasitenresistenz assoziiert zu sein: Das Interferon γ Gen auf Chromosom 3 (Coltman et al., 2001b), der Major-Histokompatibilitäts-Komplex auf Chromosom 20 und das Adenosin-Deaminase Gen (ADA) auf Chromosom 13 (Gulland et al., 1993). Bei dem genomweiten Scan von Soay Schafen des St. Kilda Archipels konnten dem MDS-EpG und OpG von Lämmern nur moderate Heritabilitäten, von adulten Schafen nur niedrige bzw. fast unmessbare Heritabilitäten zugewiesen werden. Die in anderen Studien vermutete Assoziation der obengenannten Loci mit der Parasitenresistenz konnte mit dieser Studie nicht bestätigt werden (Beraldi et al., 2007).

III Material und Methoden

1 Material

1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Agarose NEEO Ultra-Qualität, Roti®agarose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland (D)
Ammoniumchlorid, ≥ 99 %, krist.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Ammoniumperoxodisulfat, ≥ 98 %, APS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Carbenicillindinatriumsalz	Sigma-Aldrich® Co., Steinheim, D
Di-Kaliumhydrogenphosphat, ≥ 99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
DNA Loading Dye (6x)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
Ethanol, reinst., ≥ 99,5 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
FLUKA CASO-Broth	Sigma-Aldrich® Co., Steinheim, D
FLUKA Urea	Sigma-Aldrich® Co., Steinheim, D
FLUKA HCl (2,5 M)	Sigma-Aldrich® Co., Steinheim, D
Formaldehydlösung, 37 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
GelCode® Blue Staining Reagent	Thermo Fisher Scientific Inc., IL, USA
GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
Glucose	Merck, Darmstadt, D
Glycerin, ≥ 98 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Glycin PUFFERAN®, ≥ 99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Glycogen, lyophilisiert	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
GRGreen (GRSafe) Nucleic Acid Gel Strain	LABGENE Scientific SA, Chatel-St-Denis,

	Schweiz (CH)
Harnstoff	Merck, Darmstadt, D
Hefeextrakt, pulv.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Imidazol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid IPTG-Lösung	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Kanamycinsulfat	Sigma-Aldrich® Co., Steinheim, D
LB-Medium (Luria/Miller)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Lysozym, 20.000 U/mg, 3×krist., lyophilisiert	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Methanol, ≥ 99,5 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Milchpulver, Blotting grade, pulv., fettarm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
NaCl , reinst.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Natriumazetat	Sigma-Aldrich® Co., Steinheim, D
Natriumazid (NaN ₃), ≥ 99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Natriumcarbonat, Na ₂ CO ₃	Merck, Darmstadt, D
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat, NaH ₂ PO ₄ × 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydrogenphosphat Monohydrat, NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydrogencarbonat, NaHCO ₃	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydroxid Plätzchen, NaOH	Merck, Darmstadt, D
O-Phenylendiamin, (OPD), 200 µmol je Tablette	Sigma-Aldrich® Co., Steinheim, D
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
2-Propanol, Rotisolv®, ≥ 99,95 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Roti®-Block, 250 ml	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D

Material und Methoden

Roti [®] -Load1, 4x Konz., 10 ml	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Rotiphorese [®] NF- Acrylamid/Bis-Lösung 30 % (29:1), 250 ml	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Salzsäure, HCl (37 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
SDS, ultra pure, ≥ 99,5 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Streptomycinsulfatsalz	Sigma-Aldrich [®] Co., Steinheim, D
TEMED 99 %, C ₆ H ₁₆ N ₂	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Tetracyclinhydrochlorid	Sigma-Aldrich [®] Co., Steinheim, D
Tris, PUFFERAN [®] , ≥ 99,9 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Tris-Hcl, PUFFERAN [®] , ≥ 99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Triton [™] X 100	Sigma-Aldrich [®] Co., Steinheim, D
Trypton/Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Tween [®] 20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Tween [®] 80	Sigma-Aldrich [®] Co., Steinheim, D
Wasserstoffperoxid, 30 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Zitronensäure	Merck, Darmstadt, D

1.2 Puffer und Lösungen

Der jeweils erwünschte pH-Wert wurde durch Titration mit 2,5 M HCl und 10 M NaOH eingestellt.

Tabelle 2: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Herstellung
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	10 % (w/v)
Antibiotika (Carbenicillin, Kanamycin, Streptomycin, Tetracyclin)	gebrauchsfertige Lösung jeweils 0,1 g/ml
Coating-Puffer (0,05 M Karbonat-Bikarbonat-Puffer, pH 9,6)	0,0123 M Na ₂ CO ₃ , 0,0377 M NaHCO ₃ , bidest. H ₂ O add 950 ml, 0,2 ml NaN ₃ hinzufügen, pH 9,6 einstellen, bidest. H ₂ O add 1 l.

Denaturierender Lösungspuffer (1×) (direkt vor dem Einsatz hergestellt, Herstellung siehe Anleitung Protino® Ni-IDA 1000 Packed Columns, Purification of His-tag proteins, Macherey-Nagel, Düren)	0,05 M NaH ₂ PO ₄ , 0,30 M NaCl, 8,00 M Harnstoff, pH 8,0 einstellen, bidest. H ₂ O add 1 l. Ansatz für 1 l Volumen: 7,8 g NaH ₂ PO ₄ × 2 H ₂ O, 17,5 g NaCl, 480,5 g Harnstoff, bidest. H ₂ O add 900 ml, pH 8 einstellen, bidest. H ₂ O add 1 l.
Denaturierender Elutionpuffer (1×) (direkt vor dem Einsatz hergestellt, Herstellung siehe Anleitung Protino® Ni-IDA 1000 Packed Columns, Purification of His-tag proteins, Macherey-Nagel, Düren)	0,05 M NaH ₂ PO ₄ , 0,30 M NaCl, 8,00 M Harnstoff, 0,25 M Imidazol, pH 8,0 einstellen, bidest. H ₂ O add 1 l. Ansatz für 1 l Volumen: 7,8 g NaH ₂ PO ₄ × 2 H ₂ O, 17,5 g NaCl, 480,5 g Harnstoff, 17,0 g Imidazol, add 900 ml mit bidest. H ₂ O, pH 8 einstellen, bidest. H ₂ O add 1 l.
Gesättigte Natriumchlorid-Lösung	Hinzugabe/Lösung von im Handel erhältlichen Kochsalz in H ₂ O (bei RT) unter Rühren, bis das NaCl aus der Lösung ausfällt.
Kälberserum-Blocking-Puffer (10 %)	1 ml fetales Kälberserum, PBS-Tween add 10 ml
Kaninchenserum-Blocking-Puffer (5 %)	5 ml Kaninchenserum, PBS-Tween add 100 ml
Lysispuffer (Herstellung siehe pBAD Directional TOPO® Expression Kit, Invitrogen GmbH, Karlsruhe)	0,05 M Kaliumphosphat (pH 7,8), 0,4 M NaCl, 0,1 M KCl, 10 % Glycerol, 0,5 % Triton X-100, 0,01 M Imidazol, Lagerung bei 4 °C.
Lysis-Äquilibrierungs-Wasch-Puffer (direkt vor dem Einsatz hergestellt, Herstellung siehe Anleitung Protino® Ni-IDA 1000 Packed Columns, Purification of His-tag proteins, Macherey-Nagel, Düren)	0,05 M NaH ₂ PO ₄ , 0,30 M NaCl, pH 8,0 einstellen. Ansatz für 1 l Volumen: 7,8 g NaH ₂ PO ₄ × 2 H ₂ O, 17,5 g NaCl, bidest. H ₂ O add 900 ml, pH 8 einstellen, bidest. H ₂ O add 1 l.
Milch-Blocking-Puffer (2 %)	2 g Milchpulver (fettarm), PBS-Tween add 100 ml
M9-Salze (10×)	60 g Na ₂ HPO ₄ , 30 g KH ₂ PO ₄ , 5 g NaC, 10 g NH ₄ Cl, bidest. H ₂ O 900 ml, pH 7,4 einstellen, bidest. H ₂ O add 1 l, autoklavieren, Lagerung bei RT.
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) (1×)	8,00 g NaCl, 0,20 g KCl, 1,00 g Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O, 0,15 g NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O, 0,20 g KH ₂ PO ₄ , pH 7,4 einstellen, bidest. H ₂ O add 1 l.
PBS-Tween (0,05 %)	500 µl Tween® 80, pH 7,4 einstellen, PBS

Material und Methoden

PBS-Tween (0,05 %)	500 µl Tween [®] 80, pH 7,4 einstellen, PBS add 100 ml.
Roti [®] -Block-Arbeitslösung:	Roti [®] -Block 1:10 in TST-Puffer gelöst
SDS-Laufpuffer	0,25 M Tris, 2 M Glycin, 1 % (w/v) SDS-Stammlösung, bidest. H ₂ O add 2,5 l.
SDS-Sammelgelpuffer (4×)	0,5 M Tris, 0,4 % (w/v) SDS, pH 8 einstellen
SDS-Trenngelpuffer (4×)	1,5 M Tris, 0,4 % (w/v) SDS, pH 8,8 einstellen.
Stopp- Lösung für den <i>T. cirumcincta</i> ELISA	2,5 M HCl
Stopp-Lösung für den <i>H. contortus</i> ELISA	2 M Schwefelsäure
Substrat-Lösung:	0,0002 M o-Phenylendiamin Tablette, Zitronensäure-Phosphat-Puffer, add 20 ml, unter Ausschluss von Licht auflösen, kurz vor Gebrauch 10 µl Wasserstoffperoxidase hinzufügen.
TAE-Puffer (1×)	0,04 M Tris-Hcl, 0,001 M EDTA, pH 8,0 einstellen, bidest. H ₂ O add 1 l.
Transferpuffer	0,192 M Glycin, 0,025 M Tris, 20 % (v/v) Methanol, pH 8,3 einstellen.
TS-Puffer (1×)	0,15 M NaCl, 0,01 M Tris-Hcl, pH 7,5
TST-Puffer	0,15 M NaCl, 0,01 M Tris-Hcl, 0,05 % (v/v) Tween [®] -20, pH 7,5 einstellen.
Zitronensäure-Phosphat-Puffer	7,3 g Zitronensäure, 14,87 g Na ₂ HPO ₄ × H ₂ O add 950 ml bidest. H ₂ O, pH 5,0 - 5,2

1.3 Medien und Nährböden

Tabelle 3: Medien und Nährböden

Bezeichnung	Herstellung
0,8 % (1 %/1,5 %) iges Agarosegel	0,8 g (1,0 g/1,5 g) Agarose in 100 ml TAE-Puffer aufkochen.
Luria-Bertani (LB) Medium	25 g LB-Medium, bidest. H ₂ O add 800 ml, pH 7 einstellen, bidest. H ₂ O add 1 l, autoklavieren, Lagerung bei RT.
Luria-Bertani (LB) Agar	25 g LB-Medium, 15 g Agar/l, bidest. H ₂ O add 800 ml, pH 7 einstellen, bidest. H ₂ O add 1 l,

	autoklavieren, Lagerung bei RT.
RM-Medium mit Glukose	20 g Casamino Säure und 890 ml bidest. H ₂ O mischen, autoklavieren, 100 ml M9-Salze (10x), 10 ml 20 % Glukose, 1 ml 1 M MgCl ₂ und Antibiotikum hinzugeben, vermischen, Lagerung bei +4 °C einen Monat.
RM-Medium mit Glycerol	für die Induktion der LMG194 Zellen mit Arabinose wird das RM-Medium anstatt mit Glukose (siehe RM-Medium mit Glukose) mit der gleichen Menge (10 ml) Glycerol versetzt.
RM-Agar	15 g Agarose, RM-Medium add 1 l
Super Optimal Broth (SOB) Medium	2,00 % Trypton, 0,50 % Hefe-Extrakt, 0,05 % NaCl, 0,0025 M KCl, 0,01 M MgCl ₂ , Lagerung bei +4 °C, 1-2 Wochen haltbar.
SOB-Agar	15 g Agarose, SOB-Medium add 1 l
SDS-PAGE Sammelgel (5 %)	3 ml bidest. H ₂ O, 1,25 ml Sammelgelpuffer (4x), 0,75 ml Acrylamid, 10 µl Tetramethylethylendiamin (TEMED), 20 µl Ammoniumperoxodisulfat (APS) (die APS kurz vor Gießen des Gels hinzugeben; Volumen ausreichend für 2 Gele).
SDS-PAGE Trenngel (10 %)	4,2 ml bidest. H ₂ O, 2,5 ml Trenngelpuffer (4x), 3,3 ml Acrylamid, 10 µl Tetramethylethylendiamin (TEMED), 100 µl Ammoniumperoxodisulfat (APS)(die APS kurz vor Gießen des Gels hinzugeben; Volumen ausreichend für 2 Gele).

1.4 Enzyme

Tabelle 4: Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
Benzonase [®] endonuclease, ≥ 25 U/µl	Merck KgaA, Life Science Products Processing, Darmstadt, D
Finnzymes [®] Phusion Hot Start II DNA Polymerase	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
Lysozym, 20 000 U/mg	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Wasserstoffperoxidase	Sigma-Aldrich [®] Co., Steinheim, D

Material und Methoden

1.5 Bakterienstämme

Tabelle 5: Bakterienstämme (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

Stamm	Genotyp	Verwendung
One Shot® TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i>	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG	Klonierung
LMG194 <i>E. coli</i>	F ⁻ ΔlacX74 galE thi rpsL ΔphoA (Pvu II) Δara 714 leu::Tn10.	Klonierung
BL21 Star™ (DE3) <i>E. coli</i>	F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131 (DE3)	Klonierung

1.6 Vektoren

Tabelle 6: Vektoren (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

Vektor	Größe	Resistenz
pBAD202/D-TOPO	4448 Nukleotide	Kanamycin
pBAD202/D/lacZ	7,520 Nukleotide	Kanamycin
pET151/D-TOPO	5760 bp	Ampicillin
pET151/D/lacZ	8832 bp	Kanamycin

Die Vektorkarten sind in Abbildung 26 und 27 im Anhang abgebildet.

1.7 Antikörper

Tabelle 7: Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
Anti-V5-Antikörper	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Meerrettichperoxidase konjugierter Ziege-Anti-Maus IgG (H+L)	Jackson Immuno Research Laboratories, INC., Großbritannien (GB)
Meerrettichperoxidase konjugierter AffiniPure Kaninchen-Anti-Schaf IgG (H+L)	Jackson Immuno Research Laboratories, INC., GB
Meerrettichperoxidase konjugierter AffiniPure Kaninchen-Anti-Ziege IgG (H+L)	Jackson Immuno Research Laboratories, INC., GB

1.8 Sera

Tabelle 8: Sera

Bezeichnung	Hersteller
Fetales Kälberserum	Biochrome Ag, Berlin, D
Normales Kaninchen-Serum	Jackson Immuno Research Laboratories, INC., GB

Die im ELISA eingesetzten Sera sind ergänzend im Anhang in Tabelle 49 aufgelistet.

1.9 Antigene

Tabelle 9: Antigene

Spezies	Antigen	Konzentration	Lagerung
<i>T. circumcincta</i>	Ganzwurmantigen	35 mg/ml	-80 °C
<i>H. contortus</i>	24 kDa exkretorisch-sekretorisches Protein	siehe Ergebnisteil	-80 °C

Beide Antigene wurden im Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der FU Berlin hergestellt.

1.10 Reaktionskits

Tabelle 10: Reaktionskits

Bezeichnung	Hersteller
CB-X™ Protein Assay	Geno Technology, Inc., St. Louis, MO USA
Champion™ pET151 Directional TOPO® Expression Kit with BL21 Star™ (DE3) One Shot®	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
FastDigest® NcoI Kit	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
Fermentas® Revert Aid Premium First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
Finnzymes® Phusion Hot Start II DNA Polymerase	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
NucleoSpin® RNA II, Total RNA Isolations Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Düren, D

Material und Methoden

Nucleo Spin® Plasmid/Plasmid (NoLid), Isolation of high-copy plasmid DNA from <i>E. coli</i>	Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Düren, D
pBAD Directional TOPO® Expression Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Protino® Ni-IDA 1000 Packed Columns, Purification of His-tag proteins	Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Düren, D
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific Inc., IL, USA

1.11 Geräte und Zubehör

Tabelle 11: Geräte und Zubehör

Bezeichnung	Hersteller/ Vertrieb
Beckmann Coulter DU 800 Spektrophotometer	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, D
Brandson Sonifier 250, Ultraschallgerät	Gerhard Heinemann, Schwäbisch Gmünd, D
CFX96™ Optics Module Real-Time System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
CFX 96™ Real Time System C1000 Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
ChemoCam Imager, HR16-3200	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, D
Compur Hämatokrit Mikrokapillaren 32 mm	Compur Electronics GmbH, München, D
Compur Minizentrifuge, M1100	Compur Electronics GmbH, München, D
Digital Graphic Printer UP-D897	Sony Deutschland, Berlin, D
Discovery Analysenwaage DV 215CDM	Ohaus GmbH, Giessen, D
Elektrische Präzisionswaage L610 D, 1213 MP	Sartorius Laboratory, Göttingen, D
Epoch Spektralphotometer	BIOTEK, Bad Friedrichshall, D
Eppendorf Multikanalpipetten, Research Pro, 8 fach und 12 fach (20 – 300 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Eppendorf Research Pipetten (5000 µl, 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 10 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Eppendorf Zentrifuge 5430R und 5415R	Eppendorf AG, Hamburg, D

G:Box, Transilluminator	Syngene, Division of Synoptics Ltd, GB
Gefrierschrank -80 °C, Forma 900 Series	Thermo Scientific, Bonn, D
Genius Mikrowelle	Panasonic, Wiesbaden, D
Glass Plates mini Protean II cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
IKA-COMBI MAG–RCT Typ RCT Nr. 74451, Magnetrührer	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D
IKA Vortex Genius 3	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D
Inkubator, Function Line, Heraeus Instruments	Thermo Scientific, Bonn, D
Inkubator Schüttelschrank 3033	GFL, Burgwedel, D
Jenway 6051 Colorimeter	Bibby Scientific Limited, Staffordshire, GB
KORONA Digitale Personenwaage 8010575	Korona Haushaltwaren GmbH & Co. KG, Langgöns, D
Kühlschrank	C. Bomann GmbH, Kempen, D
Mikroskop Axiostar plus	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, D
Mikroskopkamera AxioCam color	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, D
Mini Protean® Tetra Electrophoresis System, Vier-Gel-System für die Gelelektrophorese	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
pH-Meter HI991000	Hanna Instruments, Kehl am Rein, D
pH-Meter 761 Calimatic	Knick, Berlin, D
S1000™ Thermal Cycler (11/2009, Seriennummer: SC004454)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Schwenktisch, Stuart, gyro-rocker SSL3, Biocote (Geschwindigkeitsbereich: 5 – 70 rpm)	Bibby Scientific Limited, Staffordshire, GB
Semi-Dry Blotter 20 × 20 cm, V20 SDB	biostep GmbH, Jahnsdorf, D
Stereomikroskop SteMi 200C	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, D
Sub-Cell® GT Agarose Gel Electrophoresis System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Synergy 4	BIOTEK, Bad Friedrichshall, D
Thermomix, Tmix220	Analytik Jena AG, Jena, D

Material und Methoden

Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg, D
Thermo Shaker PSF-60HL-4	Kisker, Steinfurt, D
Tissue Ruptor	QIAGEN, Hilden, D
Wärmeschüttelschrank MAX Q 4000	Thermo Scientific, Bonn, D
Wärmeschüttelschrank MAX Q 6000	Thermo Scientific, Bonn, D
Wasserbad 1086 , Volumen ca. 20 l	GFL, Burgwedel, D
Wasserbad	Memmert, Schwabach, D
Zentrifuge Multifuge X3R, Omnifuge 2.ORS	Thermo Scientific, Bonn, D

1.12 Software

Tabelle 12: Software

Bezeichnung	Hersteller/ Vertrieb
Carl Zeiss, AxioVs40 V 4.6.3.0	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, D
Programm Gen5™ 1.10 (2005)	Bio Tek Instruments Inc. USA
Chemo Star Professional Programm	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, D
Clonemanager professional 9	Scientific & Educational Software, Cary, USA
EndNote X4 und X7	Thomson Reuters, San Francisco, USA
Gene Snap 7.09.06	Syngene, Cambridge, GB
Microsoft® Office für Mac Home & Student 2011	Microsoft, Redmond, USA
National Center for Biotechnology Information (NCBI), Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/BLst.cgi
R version 2.12.2 (2011-02-25), ISBN 3-900051-07-0	The R Foundation for Statistical Computing®, Wien, Österreich (A)

1.13 Ein- und Mehrwegartikel

Tabelle 13: Ein- und Mehrwegartikel

Bezeichnung	Hersteller/ Vertrieb
Bacilliol Tissues	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Bechergläser (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml)	DURAN Group GmbH, Wertheim/Main, D
C-Metallösen	Henry Schein Medical Austria GmbH, Wien, A
Deckel für Honiggläser	Deutscher Imkerbund e. V., Wachtberg, D
Drigalski Spatel	Henry Schein Medical Austria GmbH, Wien, A
Einmalküvetten PLASTIBRAND®, Polystyrol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Gleitcreme Bengen®, 500 g	Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG, WDT, Garbsen, D
Honiggläser, Volumen 500 g	Deutscher Imkerbund e.V., Wachtberg, D
HS-Deckgläser, 18 × 18 mm, 100 Stück	Henry Schein Medical Austria GmbH, Wien, A
HS-Objektträger, 76 × 26 mm mit Mattrand, 50 Stück	Henry Schein Medical Austria GmbH, Wien, A
Immersionsöl	Henry Schein Medical Austria GmbH, Wien, A
Kolle Halter	Henry Schein Medical Austria GmbH, Wien, A
Kühlakkus Freez'Pack M 30	Camping Gaz GmbH, Hungen-Inheiden, D
Kühlbox Icetime 26 l	Camping Gaz GmbH, Hungen-Inheiden, D
Latex-Handschuhe rotiprotect	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
McMaster-Zählkammern (2 Zählkammern, Kammerhöhe 1,5 mm, Zählfeldgröße 10 × 10 mm)	FiBL (Forschungsinstitut für biologischen Landbau), Frankfurt, D
Messzylinder (50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml)	Henry Schein Medical Austria GmbH, Wien, A
Monovetten® Luer Konus 9 ml Serum und Kalium/EDTA	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, D
Mullkompressen, 12-fach gelegt, 10 × 10 cm	Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG, WDT, Garbsen, D
Mundspatel	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D

Material und Methoden

Nalgene Filter 500 ml (0,2 Mikron Porengröße)	Nunc, Roskilde, Dänemark (DK)
Neolus, 18 G, 40 mm, Rosa Einmalkanülen (100 Stück)	Terumo Deutschland GmbH, Eschborn, D
Nunc MaxiSorp [®] flat-bottom 96 well plate	Nunc, Roskilde, DK
Parafilm [®] M Verschlussfolie	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, D
Pasteurpipetten (1,5 ml, 3,5 ml)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
PCR-Soft-Tubes 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, D
PCR-Rack	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Petrischalen aus Polystyrol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl, 5 ml, 10 ml)	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, D
Pipettenspitzen mit Filter (100 µl, 1000 µl)	BIOZYM, Hessisch-Oldendorf, D
Plastikspritzenflaschen (250 ml, 500 ml)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Plastiktrichter, Ø oben 120 mm	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, D
Protran [®] Nitrocellulose Transfer Membrane, Poresize: 0,2 µm, 300 mm × 3 m	Whatman GmbH, Dassel, D
Reaktionsgefäßständer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Rösle [®] Küchensieb, feinmaschig, 12 cm Durchmesser, 0,05 cm Maschenweite	RÖSLE GmbH & Co. KG, Marktoberdorf, D
Rotilabo [®] -Blottingpapier	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Rotilabo [®] -Fasstrichter (Ø 200 mm, 250 mm)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Rotilabo [®] -Plastiktrichter (Ø 80 mm, 100 mm, 140 mm)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Sägespäne	Altromin GmbH, Lage, D
„Safe Seal“ Gefäß 1,5 ml	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, D
„Safe Seal“ Reagiergefäße 2 ml	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, D
„Safe Seal“-Tips [®] Professional (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Biozym Scientific GmbH, D
Schlauch aus Silikon, Ø innen 10 mm	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, D

Schlauchklemme, 70 ml Quetschhähne nach Mohr	Landgraf Laborsysteme HLL GmbH, Langenhagen, D
Schott-Gefäße (1000 ml, 500 ml, 200 ml, 100 ml, 50 ml).	DURAN Group GmbH, Wertheim/Main, D
Serological Pipette (10 ml, 25 ml)	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, D
Siebe zum Einsatz in die Fasstrichter (Maschenweite 200 µm, 180 µm)	Für das Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin angefertigt.
Skalpellsklingen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Thin Seal, Adhesive Sealing Films for Microplates, Excel Scientific	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Tissue- Boxen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Transparent-Folie	Sigel® GmbH, Mertingen, D
Zellkulturflaschen (50 ml, 120 ml)	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, D
Zentrifugenröhrchen, konisch, (15 ml, 50 ml)	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, D

2 Methoden

2.1 Versuchstiere

Im Jahr 2009 stammten 10 Soay Mutterschafe aus dem Bestand des Tierparks Arche Warder e. V., 6 Soay Mutterschafe von dem Schafzüchter Dziomba in 22941 Bargtheide und 3 Soay Mutterschafe vom Schafzüchter Ahlers in 23867 Sülfeld. 2010 kamen die am Versuch beteiligten Soay Mutterschafe alle aus dem Bestand des Tierparks Arche Warder e.V. Die bereits trächtigen Texel Mutterschafe wurden 2009/2010 von der Schäferei Wolfgang Albertsen, 25885 Ahrenviöl zugekauft. In beiden Jahren wurden Texel- und Soay Mutterschafe zum Ablammen gemeinsam im Stall des Tierparks Arche Warder e.V. gehalten und die geborenen Lämmer beider Rassen in dieser Studie eingesetzt. 2009 wurden 14 Texel- (9 weiblich/5 männlich) und 11 Soay Lämmer (4 weiblich/7 männlich), 2010 12 Texel- (9 weiblich/3 männlich) und 17 Soay Lämmer (6 weiblich/11 männlich) für den Versuch bereitgestellt (Auflistung der Schafe mit Identifikationsnummer der Jahre 2009 und 2010 im Anhang in Tabelle 50/51). 2009 gingen 5 Zwillingsgeburten und 4 Einzelgeburten der Texel Schafe, eine Zwillingsgeburt und 9 Einzelgeburten der Soay Schafe in den Versuch ein.

2.2 Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung

Es wurde im Versuch angestrebt, alle Tiere der beiden Schafgruppen den gleichen Haltungsbedingungen auszusetzen. Der für den Versuch zur Verfügung gestellte Stall und die dazugehörige Weide waren dauerhaft vom Tierpark Arche Warder e.V. gepachtet.

Im Zeitraum von März bis Mai der Jahre 2009 und 2010 lammten Soay- und Texel Mutterschafe im Stall des Tierparks Arche Warder e.V. ab. Das Ablammen erfolgte innerhalb der Gruppe, wobei die Tiere zunächst nach den Rassen getrennt, auf der gemeinsamen Fläche gehalten wurden. Muttertier und Lamm wurden nach der Geburt kurzzeitig innerhalb der für die Gruppe vorgesehenen Fläche separiert und nach Bildung einer festen Bindung erneut der Schafgruppe zugeführt. Muttertiere und Lämmer wurden 2009 bis Anfang Juni und 2010 bis Anfang Juli gemeinsam in einem überdachten Kaltstall mit einer Fläche von ca. 150 m² Fläche für die Versuchstiere (von insgesamt 560 m² Stallfläche) auf dem Tiefmist der Versuchsschafgruppe gehalten. Die Gesamtgruppengröße (Mutterschafe und Lämmer) blieb in beiden Jahren unter 50 Tieren.

Auf einer in der Nähe des Stalls gelegenen, umzäunten, ca. 1,1 ha großen Versuchs-Weidefläche wurden die Tiere nach Weidegang des jeweiligen Jahres gemeinsam gehalten. Ein natürlicher Witterungsschutz stand den Schafen über zwei an die Weide angrenzende Wälle mit starkem Baum- und Strauchbewuchs zur Verfügung. Vor 2009 wurde die gleiche Versuchsfläche ausschließlich von Pferden beweidet. Der Weideaustrieb aller Tiere auf die Versuchsweide erfolgte Anfang Juni 2009 und am 07.07.2010. Das Absetzen der Muttertiere fand Ende Juli 2009 bzw. am 11.08.2010 statt, wobei nur die Lämmer auf der Versuchsweide verblieben.

Zur Einschätzung des Infektionsstatus wurden im Mai 2009 alle Tiere klinisch, sowie Sammelkotproben beider Schafrassen auf Helminthen und Kokzidien mittels modifizierter McMaster-Technik (Sensitivität von 100) und auf Lungenwurmlarven mittels Larvenauswanderungsverfahren nach Baermann-Wetzel parasitologisch untersucht. Im Mai 2010 wurden alle Tiere klinisch, sowie der Kot mittels modifizierter McMaster-Technik (Sensitivität von 50) und Larvenauswanderungsverfahren nach Baermann-Wetzel parasitologisch untersucht. Die ersten Probennahmen nach Weideaustrieb wurden im Jahr 2009 ca. 28 Tage nach Weideaustrieb (28.06.2009) und im Jahr 2010 sechs Tage nach Weideaustrieb (13.07.2010) genommen. Es wurde von einer natürlichen oralen Infektion der Tiere mit Trichostrongyliden- und *Nematodirus*-Arten ausgegangen. Die Probennahmen fanden zunächst im Abstand von drei Wochen statt. Wenn die Eizahl pro Gramm Kot > 300 anstieg, wurde der Probennahmeabstand auf zwei Wochen bis zum Versuchsende (Anfang November 2009/2010) verkürzt, um eine bessere Beobachtung des Infektionsverlaufs und

des Allgemeinzustandes der Schafe zu gewährleisten. Am Versuchsende wurden je Schafrasse drei Lämmer zufällig ausgewählt, euthanasiert und der Magen-Darm-Trakt dieser Tiere auf adulte Helminthen untersucht (Im Anhang wurden die euthanasierten Schafe in der Tabelle 50 und 51 mit * gekennzeichnet).

Die tägliche Betreuung und Pflege der Tiere erfolgte durch den Schäfer und die Tierpfleger, die tierärztliche Betreuung durch den Tierarzt des Tierparks Arche Warder e.V. Den Schafen stand frisches Trinkwasser über automatische Tränken (im Stall und auf der Weide) bzw. Heu (im Stall) in einer Raufe und auf dem Futtertisch (Raufenbreite je Muttertier und Lamm ca. 80 cm) *ad libitum* zur Verfügung. Eine Sonderfutteranmischung (Hauptgenossenschaft Nord AG, Kiel) für die Schafe des Tierparks Arche Warder e.V. (Pellets mit einem Proteingehalt von 14 % und einem Energiegehalt von 10,2 MJ/kg) wurde allen Tieren täglich während der Stall- und Weidesaison in einer Menge, abhängig vom geschätzten Lebendgewicht, gruppenweise zugefüttert (Pellet-Ration: Schafe unter 20 kg ca. 300 g/Tier/Tag, Schafe über 20 kg ca. 200 g/Tier/Tag). Die Tiere erhielten täglich eine neue Stroheinstreu (ca. 1 kg Stroh/Tier/Tag).

Alle Lämmer wurden ab einem Alter von 2 Wochen aktiv gegen Clostridieninfektionen immunisiert (Covexin[®]-Zehn, Pfizer Deutschland GmbH, Berlin) und erhielten ab einem Alter von 3 Monaten eine inaktive Immunisierung gegen die Blauzungenkrankheit (Bluevac[®]-8, CZ Veterinaria, S. A., Spanien). Alle Muttertiere wurden vor dem Ablammen ca. Ende Februar 2009/2010 mit 0,2 mg Moxidectin je kg Körpergewicht (Cydectin[®] 0,1 % orale Lösung, Pfizer Deutschland GmbH, Berlin) oral behandelt. Durch eine Verwechslung der Schafgruppen durch den Schäfer wurden am 10.05.2010 alle Muttertiere und Lämmer des Versuchs mit 0,2 mg Moxidectin je kg Körpergewicht (Cydectin[®] 0,1 % orale Lösung, Pfizer Deutschland GmbH, Berlin) oral behandelt. Die Entwurmung widersprach der eigentlichen Versuchsplanung. Bei Kokzidienbefall in Zusammenhang mit klinischen Symptomen wie z. B. Durchfall erfolgte eine Behandlung mit 20 mg/kg Körpergewicht Toltrazuril (Baycox[®], Bayer AG, Leverkusen), bei Monieziabefall mit 3,75 mg/kg Körpergewicht Praziquantel (Cestocur[®], Bayer AG, Leverkusen). Kranke Tiere wurden behandelt und abhängig vom Gesundheitszustand von der Gruppe separiert. Die durchgeführten Behandlungen wurden im Probennahme-Protokoll festgehalten. In den folgenden Tabellen 14 und 15 wird eine Übersicht der Versuchsdurchführung in den Jahren 2009 und 2010 dargestellt.

Material und Methoden

Tabelle 14: Versuchsdurchführung 2009

Jahr 2009	Haltung/ Probennahme
Februar	Entwurmung der Muttertiere (0,2 mg Moxidectin/kg KGW oral)
März-Mai	Ablammen der Muttertiere und gemeinsame Haltung im Stall
Mai	Basisuntersuchung (Untersuchung von Sammelkotproben)
Anfang Juni	Weideaustrieb aller Tiere auf die Versuchsweide
28.06.2009	1. Probennahme
19.07.2009	2. Probennahme
Ende Juli	Absetzen: die Lämmer verbleiben auf der Versuchsweide
09.08.2009	3. Probennahme
31.08.2009	4. Probennahme
21.09.2009	5. Probennahme
04.10.2009	6. Probennahme
20.10.2009	7. Probennahme
02.11.2009	8. Probennahme
Ende November	Euthanasie von je 3 Tieren pro Rasse, Sektion des Magen-Darm-Traktes der Schafe, Versuchsende.

Tabelle 15: Versuchsdurchführung 2010

Jahr 2010	Haltung/ Probennahme
Februar	Entwurmung der Muttertiere (0,2 mg Moxidectin/kg KGW oral)
März bis Mai	Ablammen der Muttertiere und gemeinsame Haltung im Stall
10.05.2010	Fehlerhafte Entwurmung der Lämmer und Muttertiere (0,2 mg Moxidectin/kg KGW oral)
31.05.2010	Basisuntersuchung
07.07.2010	Weideaustrieb aller Tiere auf die Versuchsweide
13.07.2010	1. Probennahme
31.07.2010	2. Probennahme

11.08.2010	Absetzen: die Lämmer verbleiben auf der Versuchsweide
21.08.2010	3. Probennahme
09.09.2010	4. Probennahme
23.09.2010	5. Probennahme
02.10.2010	6. Probennahme
16.10.2010	7. Probennahme
31.10.2010	8. Probennahme
13.11.2010	9. Probennahme
30.11.2010	Euthanasie von 3 Tieren je Rasse, Sektion des Magen-Darm-Traktes der Schafe, Versuchsende.

Zur Probennahme wurden die Schafe in einem „Heck“ auf der Versuchsweide zusammengetrieben. Die Tiere wurden anhand der Ohrmarke identifiziert, gewogen und allgemein klinisch untersucht. Anschließend wurden je Tier eine EDTA- und Serumprobe aus der *Vena jugularis externa* und rektal eine Kotprobe entnommen. Die Proben wurden nummeriert und die erhobenen Daten auf einem vorgefertigten Datenblatt festgehalten. Die Kotproben wurden bis zur weiteren Untersuchung in Rektalisierungshandschuhen (max. 2 Stunden) gelagert und zusammen mit den Blutproben vor hohen Temperaturen durch eine Kühlbox geschützt.

2.3 Klinische Untersuchungsverfahren

Bei der Adspektion der Tiere wurde die Haltung, das Verhalten, der Pflege- und Ernährungszustand der Tiere bewertet und die Körperoberfläche auf pathologische Veränderungen überprüft. Die Adspektion und Kategorisierung der subkonjunktivalen Schleimhautfarbe erfolgte mittels FAMACHA[®] Anaemia guide. Die Palpation des Abdomens und der Körperoberfläche, die Auskultation der Lunge und des Herzens und die Messung der rektalen Körpertemperatur mittels digitalem Fieberthermometer wurden genutzt, um den Allgemeinzustand des Tieres zu ermitteln.

2.3.1 Ermittlung des Körpergewichtes

Zur Feststellung des Körpergewichts der Schafe wurde die Personenwaage (KORONA, Langgöns) auf einem festen Untergrund aufgestellt. Das Körpergewicht einer Hilfsperson wurde durch zweimaliges Wiegen und Errechnung des arithmetischen Mittelwertes ermittelt. Die Schafe wurden einzeln durch die Hilfsperson auf die Waage getragen und das Gewicht von Schaf und Hilfsperson durch eine zweite Person abgelesen. Das vorher ermittelte Gewicht der Hilfsperson wurde vom abgelesenen Wert subtrahiert und das Körpergewicht des Schafes errechnet. Jedes Tier wurde zweimal gewogen, aus den Körpergewichten das arithmetische Mittel errechnet und dieses der Ohrmarkennummer des Tieres im Datenblatt zugeordnet.

2.3.2 FAMACHA[®] Anaemia guide

Die Anwendung des FAMACHA[®] Anaemia guides wurde vor Beginn der Studie an verschiedenen Schafen trainiert. Mit Hilfe des FAMACHA[®] Anaemia guides wurde die subkonjunktivale Schleimhautfarbe der Schafe den klassifizierten Farbbereichen (A-E bzw. 1-5) des Guides zugeordnet. Alle Hinweise für die Anwendung des FAMACHA[®] Anaemia guides wurden dem FAMACHA[®] Information guide entnommen.

2.4 Parasitologische Untersuchungsverfahren

2.4.1 Modifiziertes McMaster-Zählverfahren

Die Eizahl pro Gramm Kot (EpG) wurde mithilfe einer modifizierten McMaster-Technik (Gordon und Whitlock, 1939) ermittelt. Es wurden Magen-Darm-Strongyloiden-Eier (Eizahl pro Gramm Kot, EpG), *S. papillosus*-Eier (Eizahl pro Gramm Kot, EpG) und Kokzidien-Oozysten (Oozysten pro Gramm Kot, OpG) mit diesem Verfahren erfasst.

Dazu wurde eine gesättigte NaCl-Lösung hergestellt. 2 g Kot je Tier wurden mit jeweils 30 ml (im Jahr 2009) und 15 ml (im Jahr 2010) gesättigter NaCl-Lösung vermischt und über ein Sieb mit der Maschenweite von 500 µm gegeben. Die mechanisch gereinigte Kotlösung wurde in einen 100 ml Messzylinder überführt und auf 60 ml (im Jahr 2009) und 30 ml (im Jahr 2010) mit gesättigter NaCl-Lösung aufgefüllt und mittels Schwenken und Einblasen von Luft (sterile Pipette) durchmischt. Die zwei Zählfelder der McMaster-Kammer wurden mittels steriler Pipette mit Kotlösung gefüllt und 5 min zum Flotieren stehen gelassen. Die Zählfelder wurden mit einer Vergrößerung von 100 unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Berechnung des EpG/OpG erfolgte mit der Formel (Deplazes et al., 2012):

$$\text{EpG/OpG} = \frac{\text{Eizahl/Oozystenanzahl aus 2 Zählfeldern (n)} \times \text{Suspensionsvolumen (ml)}}{\text{Kotmenge (g)} \times \text{Zählfeldgröße (100 mm}^2\text{)} \times \text{Kammerhöhe (1,5 mm)} \times \text{Anzahl der Zählfelder (2)}}$$

Die Sensitivität (untere Erfassungsgrenze) des Untersuchungsverfahrens lag bei einer Auszählung von einem Ei in 2 Zählfeldern im Jahr 2009 bei 100, im Jahr 2010 bei 50. Die Auswertung der Kotproben mit der McMaster-Technik erfolgte jeweils direkt nach der Probenentnahme.

2.4.2 Larvenauswanderungsverfahren nach Baermann-Wetzel

Eine 10 g (2009: ca. 0,91 g Kot je Soay Schaf, 0,71 g Kot je Texel Schaf; 2010: ca. 0,59 g Kot je Soay Schaf, ca. 0,83 g Kot je Texel Schaf) schwere Sammelkotprobe je Rasse wurde mit dem Verfahren nach Baermann (1917) und Wetzel (1930) für den Nachweis von Lungenwurmlarven untersucht. Dazu wurde die Kotprobe in ein Gaze-Tuch gewickelt, in den Trichter einer vorbereiteten Trichterapparatur (Trichtergestell, Trichter mit angeschlossenen PVC-Schlauch und Schlauchklemme) gelegt und der Trichter der Kotprobe mit Leitungswasser angefüllt. Die Auswanderung der Larven erfolgte 12 – 24 Stunden bei Raumtemperatur in den Schlauch. Über die Schlauchklemme wurden einige Tropfen der Flüssigkeit in eine Petrischale abgelassen und unter dem Mikroskop bei einer Vergrößerung von 400 auf Larven untersucht.

2.4.3 Larvenkultur zur Gewinnung von Drittlarven von Magen-Darm-Strongyliden

Die Larvenkultur wurde in Annäherung an die Methode des „Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques“ (MAFF) (1986) und Roberts und O’Sullivan (1950) durchgeführt. Bei jeder Probennahme wurde eine Sammelkotprobe je Schafrasse von 20 g (2010: ca. 1,18 g Kot je Soay Schaf, ca. 1,67 g Kot je Texel Schaf) mit ungefähr der gleichen Menge Sägespäne zu einer feucht krümeligen Masse in einem 500 ml Schraubglas vermengt. Die Anzucht der Larven erfolgte im Inkubator bei 27 °C, 85 % Luftfeuchtigkeit, 7 Tage lang und leicht aufgelegtem Schraubdeckel. Das Schraubglas der Larvenkultur wurde mit Leitungswasser angefüllt, das Kulturglas in eine Petrischale gestülpt und der Bereich zwischen Kulturglas und Petrischale mit Leitungswasser aufgefüllt. Die ausgewanderten Larven konnten 6 - 12 Stunden später mittels Pasteurpipette aus der Petrischale entnommen werden und wurden mit dem modifizierten Larvenauswanderungsverfahren nach Baermann-Wetzel aufgereinigt. Hierzu wurde abweichend von der oben bereits beschriebenen Larvenauswanderung nach Baermann-Wetzel die Gaze in einen Rahmen gespannt und dieser auf dem Trichter gelagert. Die

Material und Methoden

Larvensuspension wurde auf die Gaze gegeben. Die L3 konnten über die Gaze in das untere Ende des Silikonschlauchs auswandern, wurden aus diesem in ventilierbare Zellkulturflaschen abgelassen und in Kühlschränken bei 10 °C gelagert.

Die Auszählung der in Wasser gelagerten Larven erfolgte in $3 \times 10 \mu\text{l}$ Tropfen auf dem Objektträger bei einer Vergrößerung von 250. Die Anzahl der Larven in $30 \mu\text{l}$ Flüssigkeit wurden auf die Anzahl der Larven in der Gesamtflüssigkeit umgerechnet.

2.5 Hämatologische Untersuchungsverfahren

2.5.1 Hämatokritwert-Bestimmung

Der Hämatokritwert wurde mittels Mikrohämatokritmethode ermittelt. Im Anschluss an die Probennahme wurde ein Aliquot der EDTA-Blutprobe in zwei Hämatokritkapillaren überführt, mit einer Minizentrifuge (Compur Electronics GmbH, München) 3 min 20 s bei $5396 \times g$ zentrifugiert und der Hämatokritwert mit Hilfe einer Hämatokritskala (II) bestimmt.

Serumgewinnung:

Das Vollblut wurde innerhalb von 8 Stunden nach Probennahme bei $2500 \times g$ 10 min zentrifugiert, das Serum mit steriler Einwegspitze und Kanüle entnommen, in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße mit Deckel überführt, etikettiert und dauerhaft bei -80 °C gelagert.

2.6 ELISA

Im folgenden wurde die ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)-Technik (Avrameas und Uriel, 1966; Nakane und Pierce, 1967; Avrameas, 1969; Engvall und Perlmann, 1971) eingesetzt, um die spezifische Immunreaktion der Schafe auf Ganzwurm-Antigen von *T. circumcincta* und 24 kDa exkretorisch-sekretorische-Proteine von *H. contortus* zu detektieren und zu quantifizieren. Die ELISA beruhen auf dem Prinzip des indirekten Assays. Als Methode für die Ermittlung der optimalen Konzentrationen für Antigen, Serum und Konjugat zueinander wurde die Schachbrett-Titrations-Technik eingesetzt. Die Optimierung der einzelnen ELISA-Schritte wurde unter anderem nach Empfehlungen des ELISA technical guides von ThermoScientific Fisher Inc. 2010 (Thermoscientific, 2010) durchgeführt. Für die ELISA-Etablierung sind eindeutig positive und negative Sera für den jeweiligen spezifischen Antikörper, anhand derer man sich nach Messung der Optischen Dichte orientiert und die Optimierung der einzelnen ELISA-Komponenten vornimmt, grundlegend.

2.6.1 Verfahren zur Detektion von spezifischen Antikörpern gegen *T. circumcincta*

Ein bereits im Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der FU Berlin etablierter ELISA zur Detektion von spezifischen Antikörpern gegen *T. circumcincta* Ganzwurmantigen in Ziegen wurde als Grundlage für die Etablierung eines ELISA zur Detektion von spezifischen Antikörpern gegen *T. circumcincta* Ganzwurmantigen in Schafen genutzt. Bei der Durchführung wurden zur Optimierung der einzelnen ELISA-Schritte die eingangs erwähnten Techniken angewandt. Als Antigen wurde das im Institut bereits vorhandene isolierte Ganzwurmantigen von *T. circumcincta* aus Ziegen genutzt. Als Negativproben wurden Serumproben von neugeborenen Lämmern, die noch nicht bei den Mutterschafen getrunken hatten und Serumproben der Lämmer des Versuchs im Tierpark Arche Warder e.V. vor Weideexposition eingesetzt. Als Positivproben dienten Serumproben aus mit *T. circumcincta* experimentell infizierten Stammhaltungsschafen des Instituts und aus in der Sektion nachgewiesenen *T. circumcincta* infizierten Schafen aus dem Versuch im Tierpark Arche Warder e.V. Unter anderem wurden auch im Institut bereits vorhandene negative und positive *T. circumcincta*-Antikörper Serumproben von Ziegen eingesetzt. Als Konjugat wurde ein Meerrettichperoxidase konjugierter AffiniPure Kaninchen-Anti-Schaf IgG (H+L) Sekundärantikörper genutzt. Das *T. circumcincta* Ganzwurm-Antigen (35 mg/ml) wurde 1:5000 verdünnt in 0,05 M Karbonat-Bikarbonat-Puffer (pH 9,6) und mittels Magnetrührer vermischt. 100 µl der Probe wurden je Well der NUNC Maxisorp-Mikrotiterplatte mit der Mehrkanalpipette pipettiert, verdeckt 1 h bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert und anschließend bei 4 °C über Nacht im Kühlschrank gelagert. Am nächsten Morgen wurde die Platte entleert und dreimal fünf Minuten lang mit 200 µl/Well 0,05 % PBS-Tween 20 (pH 7,2) gewaschen. Die Blockierung der unspezifischen Bindungen erfolgte 1 h bei 37 °C auf dem Schüttler mit einer 2 %igen Lösung aus Milchpulver und PBS Tween 20 (0,05 %), welche zuvor frisch angesetzt und auf dem Magnetrührer zu einer homogenen Flüssigkeit vermischt wurde. Nach erneutem Ausleeren und dreimaligen Waschen der Wells (s. o.) wurden auf einer Vorlegeplatte die Sera 1:100 mit Blockierungspuffer (s. o.) im doppelten Ansatz vorgemischt und anschließend mittels Mehrkanalpipette 100 µl/Well pipettiert. Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Währenddessen wurde der Sekundärantikörper (Konjugat) 1:50.000 in Blockierungspuffer (s. o.) verdünnt und auf dem Magnetrührer vermischt. Nach erneuter Entleerung und dreimaligem Waschen (s. o.) der Platte wurden je Well 100 µl Konjugatverdünnung mit der Mehrkanalpipette pipettiert und 1 h bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Zur Vorbereitung der Substratlösung wurde in einem mit Aluminiumfolie abgedunkelten 50 ml-Zentrifugenröhrchen eine o-Phenylendiamin-Tablette (200 µmol) in 0,05 M Zitronensäure-Phosphat-Puffer gelöst. Die Platte wurde

Material und Methoden

entleert und dreimalig gewaschen (s. o.). Der Substratlösung wurden 10 µl Wasserstoffperoxidase hinzupipettiert und die Lösung durch Schwenken vermischt. Anschließend wurden je Well 100 µl der Substratlösung mittels Mehrkanalpipette pipettiert und die Platte abgedeckt 30 min bei 37 °C auf dem Schüttler abgedunkelt inkubiert. Die Reaktion wurde mit 50 µl 2 M Schwefelsäure je Well abgestoppt. Die Messung der Optischen Dichte (OD) erfolgte bei 492 nm im Spektrophotometer mit dem Programm Gen5™-1.10.

Der Optische Dichte Quotient wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Optischer Dichte Quotient} = \frac{\text{OD} - \text{Negativkontrolle}}{\text{Positivkontrolle} - \text{Negativkontrolle}}$$

2.6.2 Verfahren zur Detektion von spezifischen Antikörpern gegen das 24 kDa exkretorisch-sekretorische Protein von *H. contortus*

Das 24 kDa exkretorisch-sekretorische Protein von *H. contortus* (HcES24) wurde für den Einsatz im ELISA rekombinant hergestellt. Beim molekularbiologischen sowie serologischen Vorgehen im Labor wurde sich an der Arbeit von Li et al. (2007) orientiert. Auch bei dieser Durchführung wurden bei der Optimierung der einzelnen ELISA-Schritte die eingangs erwähnten Techniken angewandt. Als Positivproben wurden Serumproben der experimentell mit *H. contortus* infizierten Stammhaltungsschafe der FU Berlin und Serumproben des Versuchs im Tierpark Arche Warder e.V. genutzt. Als Negativproben wurden Serumproben von neugeborenen Lämmern, die noch nicht bei den Mutterschafen getrunken hatten und Serumproben der Lämmer des Versuchs im Tierpark Arche Warder e.V. vor Weideexposition eingesetzt. Das rekombinant hergestellt exkretorisch-sekretorische 24 kDa Protein von *H. contortus* wurde in 0,05 M Karbonat-Bikarbonat-Puffer (pH: 9,6) zu einer Konzentration von 6 µg/ml verdünnt und mittels Magnetrührer vermischt. Je 100 µl der Antigenlösung wurden mit einer Mehrkanalpipette je Well pipettiert und die Mikrotiterplatte bei 4 °C über Nacht im Kühlschrank gelagert. Am nächsten Morgen wurde die Platte entleert und dreimal fünf Minuten lang mit 200 µl/Well 0,05 % PBS-Tween 20 (pH 7,2) gewaschen. Als Blockierungspuffer wurde PBS 10 %ig mit fetalem Kälberserum versetzt und auf dem Magnetrührer vermischt. Je Well wurden 100 µl Blockierlösung pipettiert und die Mikrotiterplatte 1 h bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Die eingesetzten Sera wurden 1:40 in 0,05 % PBS Tween 20 mit 10 %igem fetalem Kälberserum verdünnt und die Probenverdünnung auf dem Magnetrührer vermischt. Nach der Entleerung und dem erneuten Waschen der Mikrotiterplatte (siehe oben (s.o.)) wurden im doppelten Ansatz 100 µl der Probenverdünnung je Well pipettiert und die Mikrotiterplatte anschließend im

Kühlschrank bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Platte entleert und gewaschen (s.o.). Der Sekundärantikörper (Meerrettichperoxidase-konjugierter Kaninchen-anti-Ziege-IgG Antikörper (Sigma) bzw. Meerrettichperoxidase-konjugierter Kaninchen-anti-Schaf-IgG Antikörper (Sigma)) wurde 1:2000 in PBS mit 10 %igem fetalem Kälberserum verdünnt und auf dem Magnetrührer vermischt. Je Well wurden 100 µl der Sekundärantikörper-Verdünnung pipettiert und 2 h bei 37 °C inkubiert. Zur Vorbereitung der Substratlösung wurde in einem mit Aluminiumfolie abgedunkelten 50 ml-Zentrifugenröhrchen eine o-Phenylendiamin-Tablette (Sigma; 200 µmol) in 0,05 M Zitronensäure-Phosphat-Puffer gelöst. Danach wurde die Platte entleert und dreimal fünf Minuten lang mit 200 µl/Well 0,05 % PBS-Tween 20 (pH 7,2) gewaschen. Der Substratlösung wurden 10 µl Wasserstoffperoxidase hinzupipettiert und nach Vermischen 100 µl/Well mittels Mehrkanalpipette pipettiert. Nach einer Inkubation von 15 min bei 37 °C wurde die Reaktion mittels 2 M Schwefelsäure (50 µl/Well) abgestoppt. Die Optische Dichte wurde bei 492 nm im Spektrophotometer mit dem Programm Gen™ 5- 1.10 gemessen.

2.7 Sektion des Magen-Darm-Traktes

Die Sektion wurde in Anlehnung an die Richtlinien der WAAVP (Wood et al., 1995; Van Wyk und Groeneveld, 1997) durchgeführt und die Aufreinigung der Würmer modifiziert nach Demeler (2014).

Je Schaf wurde der Magen-Darm-Trakt entnommen. Zwischen Labmagen und Dünndarm wurde der Magen-Darm-Trakt doppelt abgebunden und durchtrennt. Der Dünndarm wurde vom restlichen Magen-Darm-Trakt im Bereich zwischen Ileum und Caecum doppelt abgebunden und getrennt. Magen und Dünndarm wurden voneinander getrennt in Tüten mit 37,5 °C warmer physiologischer Kochsalzlösung in einer Styropor-Box zum Labor transportiert und dort umgehend weiterbearbeitet.

2.7.1 Labmagen

Der Labmagen wurde an seiner großen Krümmung über die gesamte Länge eröffnet. Der Labmageninhalt wurde in einer auf 37,5 °C vorgewärmten Wanne aufgefangen, die Magenschleimhaut mit 37,5 °C warmer physiologischer Kochsalzlösung abgespült und die Ingesta unter dem Stereomikroskop auf adulte Helminthen untersucht. Die Helminthen wurden in 37,5 °C warmer physiologischer Kochsalzlösung gesammelt. Die Reinigung der Helminthen erfolgte durch wiederholtes Sedimentieren, Überstand Verwerfen und erneutes Angießen mit klarer physiologischer Kochsalzlösung.

Material und Methoden

Die Mukosaseite des Labmagens wurde in auf 40 °C erwärmten Inkubatoren auf Sieben mit 200 µm Maschenweite ausgelegt. Die Helminthen wurden mittels Auswanderungsverfahren über eine Trichterapparatur in den Inkubatoren gewonnen (Ablauf wie in folgender Beschreibung des Auswanderungsverfahrens für die Dünndarm-Helminthen).

2.7.2 Dünndarm

Die ersten zwei Meter des Dünndarms wurden in Längsrichtung mit einer Darmschere eröffnet, der Darminhalt mit 37,5 °C warmer physiologischer Kochsalzlösung abgespült und separat aufgefangen. Die Ingesta des Dünndarms wurde unter dem Stereomikroskop auf Helminthen untersucht. Die Reinigung der Helminthen erfolgte durch wiederholtes Sedimentieren, Überstand verwerfen und erneutes Angießen mit physiologischer Kochsalzlösung. Bei der Vorbereitung beider Organe (Labmagen und Dünndarm) für das Auswanderungsverfahren wurde darauf geachtet, dass möglichst wenig Fettgewebe und Mesenterium mit auf die Siebe gelangte. Helminthen sind lipophil, sie wandern bevorzugt in Fettgewebe ein. Der Darm wurde in auf 40 °C vorgewärmten Inkubatoren mit der Mukosaseite auf Sieben mit 180 µm Maschenweite gelagert. Die mit Labmagen und Dünndarm angefüllten Siebe wurden auf je einer Trichterapparatur (Trichtergestell, Fasstrichter (Ø 200 – 250 mm) mit angeschlossenen PVC-Schlauch und Schlauchklemme) in einem auf 40 °C vorgewärmten Inkubator gelagert und die Trichter mit 37,5 °C warmer physiologischer Kochsalzlösung angefüllt. Über mehrere Stunden lang wurden ca. alle 10 min, die in die Schläuche ausgewanderten Helminthen in 250 ml Gläser entlassen und die entlassene Flüssigkeit durch erneutes Angießen der Siebe mit 37,5 °C warmer physiologischer Kochsalzlösung ersetzt. Die abgelassene Flüssigkeit wurde zum Sedimentieren stehen gelassen, anschließend der Überstand verworfen und die Flüssigkeit durch warme, klare physiologische Kochsalzlösung ersetzt. Der Vorgang wurde bis zur Klärung der Probe wiederholt und die Proben desselben Organs und Tieres miteinander vermischt. Die Helminthen wurden bei verschiedenen Vergrößerungen unter dem Stereomikroskop und Mikroskop ausgezählt und nach Art und Geschlecht differenziert. Die Helminthen wurden in Formalin (10 % und 4 %) und Ethanol (70 %) gelagert.

2.8 Molekularbiologische Verfahren

2.8.1 Herstellung des 24 kDa exkretorisch-sekretorischen Proteins von *H. contortus* für den Einsatz als Antigen im ELISA

RNA-Isolation:

Zehn adulte weibliche *H. contortus* wurden mit dem Tissue Ruptor® (Qiagen, Schweiz) im Guanidinthiocyanat-haltigen Lysisbuffer des Total RNA Isolation, NucleoSpin® RNA II Kits (Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Düren, Deutschland) aufgeschlossen, mit β -Mercaptoethanol (zur Denaturierung der RNAsen) versetzt und weiter nach Herstellerangaben bearbeitet. Die RNA wurde isoliert, im 0,8 %igem Agarosegel, 30 min bei 90 V elektrophoretisch aufgetrennt und die RNA-Banden in der G:Box (Syngene, Großbritannien) visualisiert, um die RNA-Qualität zu dokumentieren. Die RNA-Konzentration wurde durch spektralphotometrische Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm im Synergy®4-Gerät (BioTek Instruments Inc., USA) mit dem Programm Gen5™ 1.10 (2005, BioTek Instruments Inc., USA) errechnet und die Reinheit der Probe anhand des OD₂₆₀/OD₂₈₀-Quotienten überprüft.

cDNA-Synthese:

Gesamt-RNA (1,5 μ l der Konzentration 334,76 ng/ μ l) wurde zur cDNA-Synthese (RevertAid® Premium First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas GmbH, St. Leon- Rot, Deutschland) eingesetzt. Der Reaktionsansatz (20 μ l) enthielt außerdem 4,0 μ l 5 \times RT Puffer, 1,0 μ l dNTP Mix (je 10 mM), 1,0 μ l Random Hexamer Primer (100 μ M, 0,2 μ g/ μ l), 1,0 μ l Revert Aid- Premium Enzyme Mix (200 U/ μ l) und 11,5 μ l H₂O (Ribonuclease-frei) und wurde eine Stunde lang bei 55 °C und 5 min bei 85 °C im Cyclor (BIORAD, München, Deutschland) inkubiert. Das Produkt der cDNA-Synthese (die komplementäre DNA) wurde direkt in der PCR eingesetzt.

Polymerasekettenreaktion (PCR):

In der PCR wurden der mit dem Programm Clonemanager® (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) designte Forward Primer 5' CAC CAT GTT TTC ACT TGC CAC TGT CGC CTT 3' für pBAD202/D-TOPO® und pET151/D-TOPO® und die designten Reverse Primer 5' TGG GGC AAT ACA GAG AGC TTC ATC TCT GCT 3' für pBAD202/D-TOPO® (erwartete Größe bei ca. 670 bp) und 5' TGA AGG TTT ATT GTC AGT GCT TGT TAT 3' für pET151/D-TOPO® (erwartete Größe von ca. 696 bp) eingesetzt.

Der PCR-Ansatz erfolgte mit 2 μ l cDNA, 0,2 μ l Phusion® Hot Start II DNA-Polymerase (2 U/ μ l, Finnzymes, Darmstadt, Deutschland), je 0,5 μ l Forward Primer und Reverse Primer (10 mM), 0,4 μ l dNTPs (10 mM), 4 μ l 5 \times Phusion® HF Puffer und wurde auf ein Volumen von 20 μ l mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem Wasser aufgefüllt. Die Negativprobe

Material und Methoden

wurde anstatt von cDNA mit dem gleichen Volumen (2 µl) DEPC behandeltem Wasser versetzt, um eine Kontamination in der PCR möglichst ausschließen.

Im C1000[®] Thermal Cycler (BIORAD, München, Deutschland) erfolgte die Denaturierung der cDNA bei 98 °C, 30 s lang. Die erneute Erhitzung bei 98 °C, 10 s lang, der Annealing-Gradient von 55 – 60 °C, 30 s lang und die Extension bei 72 °C, 30 s lang wurden 40 mal wiederholt. Die finale Extension erfolgte bei einer Inkubation von 10 min bei 72 °C.

Überprüfung des PCR-Produktes:

Das PCR-Produkt wurde in der Gelelektrophorese überprüft. 3 µl des jeweiligen PCR-Produktes, 2 µl DNA Loading-Dye (6×) (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) und 7 µl Ribonuclease-freies Wasser wurden vermischt und in die Banden eines 1 %igen Agarosegels geladen. Als Marker wurden 5 µl GeneRuler[®] 1kb DNA Ladder (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) eingesetzt. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 90 V ca. 45 min lang.

Gewinnung des PCR-Produktes:

4 × 10 µl des PCR-Produktes wurden mit je 2 µl DNA Loading-Dye (6×) auf Parafilm[®] vorbereitet und in die Banden eines 0,8 %igen Agarosegels geladen. Nach der Gelelektrophorese (45 min bei 90 V) wurden die Banden unter UV-Licht im Transilluminator (G:Box, Syngene, Großbritannien) mit dem Skalpell ausgeschnitten. Die ausgeschnittenen Banden wurden über Filterspitzen (100 µl) in 1,5-ml-Reaktionsgefäße bei 4656 × g 10 min zentrifugiert. Die gefilterten PCR-Produkte wurden miteinander vermengt und auf ein Volumen von 1000 µl mit bidest. H₂O angefüllt. Je 500 µl PCR-Produkt wurden mit 1 µl Glykogen, 50 µl Natriumacetat (3 M) und 500 µl eiskaltem Isopropanol (100 %) gefällt, eine Stunde bei -20 °C inkubiert und 1 Stunde bei 4 °C in der Eppendorf-Zentrifuge bei 13.000 × g zentrifugiert. Die Waschung des gefällten PCR-Produktes erfolgte mit 1000 µl Ethanol (75 %). Nach Zentrifugation (30 min bei 4 °C) wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 50 µl bidest. H₂O gelöst und bei -20 °C gelagert.

Klonieren des PCR-Produktes (TOPO[®] Vektoren):

4 µl des jeweiligen PCR-Produktes wurden zur Klonierung in den pBAD202/D-TOPO[®] Vektor (pBAD Directional TOPO[®] Expression Kit, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) bzw. in den pET151/D-TOPO[®] Vektor (Champion[™] pET Directional TOPO[®] Expressions Kit,

Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) eingesetzt. 4 µl des PCR-Produktes wurde mit 1 µl Salt Solution (Konzentration: 1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂), 1 µl TOPO[®] Vektor (15 – 20 ng/µl Plasmid DNA in 50 % Glycerol, 50 mM Tris-HCL (pH 7,4), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1 % Triton X-100, 100 µg/ml BSA, 30; Bromphenol Blau) vermischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Transformation in *E.coli* One Shot[®] Top 10 chemisch kompetente Zellen:

Je 3 µl des Klonierungs-Ansatzes (pBAD202/D-TOPO[®] Vektor bzw. pET151/D-TOPO[®] Vektor) wurden zu den *E.coli* One Shot[®] TOP 10 chemisch kompetenten Zellen hinzugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock-Bad (30 s bei 42 °C) wurden auf Eis 250 µl S.O.C.-Medium hinzupipettiert und 1 Stunde bei 37 °C im Schüttelschrank horizontal inkubiert. Die transformierten *E. coli* Zellen wurden auf vorgewärmten LB-Agar-Platten zu 10 % und 90 % ausgestrichen, die Kanamycin oder Carbenicillin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml enthielten. Über Nacht wurden diese bei 37 °C inkubiert (Durchführung nach Herstellerangaben).

Isolation der Plasmid DNA:

Zur Analyse der über Nacht gewachsenen Kolonien wurde zunächst Plasmid DNA isoliert, um diese für die Sequenzierung und Restriktionsanalyse einzusetzen. Die Plasmid DNA wurde mittels Plasmid DNA Purification Kit NucleoSpin[®] Plasmid (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) isoliert. Es wurden je 5 Kolonien gepickt und über Nacht in 50 µg/ml Kanamycin bzw. Carbenicillin-haltigem LB-Medium inkubiert. 5 ml der Übernachtskultur wurden 30 s bei 11000 × g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das gewonnene Zellpellet wurde nach Herstellerangaben bearbeitet. Das Prinzip des Aufreinigungskits beruht auf der Säulenchromatographie, bei der die Plasmid DNA vorübergehend an eine Silikat-Membran gebunden und schließlich mittels Puffer aus dieser eluiert wird. Die Plasmid DNA wurde bei -20 °C gelagert.

Sequenzierung:

Die aus drei verschiedenen Klonen isolierte Plasmid DNA und die im Kit mitgelieferten Sequenzierungsprimer (für pBAD202/D-TOPO[®]: TrxTusForward (5'TTCCTCGACGCTAACCTG3') und pBAD Reverse Primer (5'GATTTAATCTGTATCAGG3'), für pET151/D-TOPO[®]: T7 Primer

Material und Methoden

(5'TAATACGACTCACTATAGGG3') und T7 Reverse Primer (5'TAGTTATTGCTCAGCGGTGG3') wurden zur Sequenzierung zur GATC Biotech, Deutschland geschickt.

Restriktions-Analyse:

Das Restriktionsenzym *Nco*I schneidet DNA zwischen den Cytosinbasen der Basenabfolge 5'...C↓CATGG...3'. Der Schnitt erzeugt einen ungepaarten DNA-Basen-Überhang, der erneut mit seinem komplementären DNA-Basen-Überhang hybridisiert werden kann. Die Orientierung des Inserts (der in das Plasmid eingebauten DNA, welche für das HcES 24 kDa Protein kodiert) wurde mittels Restriktionsenzym-Verdau (Fast Digest® *Nco*I Kit, Fermentas, St. Leon-Rot) überprüft (Durchführung nach Herstellerangaben). Mit dem Programm Clone Manager® wurde die Restriktionsfragmentgröße der mit *Nco*I verdauten Plasmid DNA mit erwünschtem Insert in 5' – 3' Richtung und falsch orientiertem Insert in 3' - 5' Richtung berechnet. Die Restriktionsfragmentgröße mit dem erwünschten in 5' - 3' Richtung orientierten Insert des pBAD202/D-TOPO® Vektors lag bei 807 bp, die mit in 3' - 5' Richtung (falsch) orientierten Insert bei 619 bp. Die Restriktionsfragmentgröße des *Nco*I verdauten erwünschten in 5' - 3' Richtung orientierten Inserts im pET151/D-TOPO® Vektor lag bei 506 bp, 344 bp bei falsch orientiertem Insert. Das Produkt des Restriktionsverdaus wurde in einem 1 %igen Agarosegel mit einem 100 bp und 1 kb DNA-Marker überprüft.

Herstellung von Glycerolstocks:

Um erneute Transformationen zu vermeiden wurde ein Glycerolstock aus jeder Übernachtkultur der 3 sequenzierten Klone sowie der Plasmid DNA angelegt. Nach Isolation einer einzigen sequenzierten, auf LB-Agar gewachsenen Kolonie und Inokulation dieser in 2 ml Kanamycin-haltigem (50 µg/ml) (für pBAD202/D-TOPO®) bzw. Carbenicillin-haltigem (50 µg/ml) (für pET151/D-TOPO®) LB-Medium erfolgte eine Inkubation der Kultur über Nacht im Schüttelschrank bis zur optischen Dichte (OD)₆₀₀ = 1 – 2 (stationäre Phase). Das Volumen der Übernachtkultur wurde mit dem gleichen Volumen 99,9 %igen sterilen Glycerols vermischt, 2 h auf Eis inkubiert und anschließend bei -80 °C gelagert.

Transformation in LMG194 Zellen (Sambrook et al., 1989):

Die Transformation wurde nach dem Protokoll II „Fresh competent *E. coli* prepared using calcium chlorid“ durchgeführt.

Von einer mit LMG194-Kolonien über 12 – 16 h bewachsenen Streptomycin- und Tetracyclin-haltigen (Endkonzentration von je 50 µg/ml) selektiven Platte wurde eine einzelne Kolonie isoliert und in 100 ml S.O.B. Medium 3 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert bis zu einer $OD_{600} = 0,1 - 0,2$. Die Kultur wurde in zwei gekühlte 50-ml-Zentrifugenröhrchen aseptisch überführt und 10 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation ($5000 \times g$, 10 min bei 4 °C) wurden die Zellen gesammelt und der Überstand verworfen. Das Zellpellet in jedem Zentrifugenröhrchen wurde mit je 10 ml einer eiskalten 0,1 molaren $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und auf Eis gelagert. Dieser Vorgang wurde wiederholt, wobei die Resuspension nur in 2 ml eiskalter 0,1 molarer $CaCl_2$ -Lösung erfolgte. 200 µl dieser Suspension wurden in ein steriles 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 5 µl Plasmid DNA (pBAD202/D-TOPO[®]/HcES24) beziehungsweise 5 µl der Plasmid DNA des Expression Control Plasmids (pBAD202/D//acZ) versetzt, vorsichtig durch Invertieren des Reaktionsgefäßes vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgt 90 s bei 42 °C. Danach wurden die Reaktionen 2 min auf Eis gelagert. 800 µl S.O.C. Medium wurden zu jeder Reaktion hinzugegeben und bei 37 °C 45 min bei 225 Zyklen/ min schüttelnd inkubiert. Die transformierten Zellen wurden auf Kanamycin-haltigem (Endkonzentration von 50 µg/ml) S.O.B. Agar (20 mM $MgSO_4$) zu 10 % und 90 % ausgestrichen und 12 – 16 h bei 37 °C inkubiert.

Expression des PCR-Produktes in One Shot[®] TOP 10 (LMG194 Zellen):

Je ein Klon der Positivkontrolle: TOP10/pBAD202/D//acZ, LMG194/pBAD202/D//acZ, je ein Klon der Negativprobe: One Shot[®] TOP 10 Zellen und LMG194 Zellen jeweils ohne Vektor und je ein Klon der Transformanden (TOP10/pBAD202/D-TOPO/HcES24, LMG194/pBAD202/D-TOPO/HcES24) wurden über Nacht in 2 ml 50 µg/ml Kanamycin-haltigem LB-Medium (50 µg/ml Kanamycin-haltigem RM-Medium mit Glukose) bei 37 °C im Schüttler inkubiert bis zu einer OD_{600} von 1 - 2. Fünf Proben wurden mit je 10 ml LB-Medium (RM-Medium mit Glycerol), 50 µg/ml Kanamycin und 100 µl der Übernachtskultur versetzt und bis zur OD_{600} von ca. 0,5 bei 37 °C im Schüttelschrank inkubiert. Ein 1 ml Aliquot wurde aus jedem Reaktionsgefäß entnommen und 30 s bei maximaler Geschwindigkeit ($16060 \times g$) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet (Nullprobe/nicht induzierte Probe) bei -20 °C gelagert. Die restlichen 9 ml jeder Kultur wurden mit verschiedenen Arabinosekonzentrationen (Endkonzentrationen von 0,2, 0,02, 0,002, 0,0002, 0,00002 %) induziert und bei 37 °C schüttelnd 4 h lang inkubiert. Nach 4 h wurde ein 1 ml Aliquot jeder mit Arabinose induzierten Reaktion entnommen, 30 s bei maximaler

Material und Methoden

Geschwindigkeit (16060 × g) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet bei -20 °C eingefroren.

Transformation der BL21 Star™(DE) One Shot® Zellen:

Zwei Reaktionsgefäße mit BL21 Star™(DE) Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit jeweils 1 µl Plasmid DNA (pET151/D/HcES24) bzw. Plasmid DNA des Expression Control Plasmids (pET151/D//lacZ) versetzt und nach kurzem Vermischen 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 30 s bei 42 °C im Wasserbad. Auf Eis wurden die Reaktionsgefäße mit 250 µl S.O.C. Medium vermischt und 30 min bei 37 °C im Schüttelschrank inkubiert. Die gesamte Transformationsreaktion wurde in je 10 ml 50 µg/ml Carbenicillin-haltigem LB-Medium über Nacht schüttelnd inkubiert.

Expression des PCR Produktes in BL21 Star™(DE) One Shot® Zellen:

500 µl der Übernachtskultur wurden in 10 ml 50 µg/ml Carbenicillin-haltigem LB-Medium 2 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert bis zu einer optische Dichte von $OD_{600} = 0,5$. Die Kultur wurde in zwei 5 ml Kulturen aufgeteilt und eine dieser Kulturen mit Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert (IPTG-Endkonzentration von 0,5 mM). Jeweils 500 µl der induzierten bzw. nicht induzierten Probe wurden separiert und in einem Reaktionsgefäß bei maximaler Geschwindigkeit 30 s abzentrifugiert. Der Überstand der Aliquots (Nullproben) wurde verworfen und das Zellpellet bei -20 °C gelagert. Der Rest der Kulturen wurde 6 h lang bei 37 °C im Schüttler inkubiert, wobei stündlich 500 µl Aliquots (s.o.) entnommen und die Zellpellets bei -20 °C gelagert wurden.

Vorbereitung der Proben für die Analyse im SDS-PAGE:

Zur Analyse der gesammelten Zellpellets wurden diese auf Eis aufgetaut, mit je 80 µl 1× SDS-PAGE Probenpuffer versetzt und 5 min bei 100 °C unter Schütteln aufgeköcht (Tmix 220, Analytik Jena AG, Jena). Je 10 µl der Probe wurden in die Banden des SDS-PAGE Gels aufgetragen und der Probenrest bei -20 °C gelagert.

Zur separaten Analyse der im Zellpellet befindlichen löslichen und unlöslichen Proteine wurden die gesammelten 500 µl Aliquots auf Eis aufgetaut und in je 500 µl Lysis-Puffer resuspendiert. 100 % Ethanol wurde bei -80 °C vorgekühlt und die Proben im Ethanol eingefroren. Das Auftauen erfolgte bei 42 °C im Wasserbad. Insgesamt wurde das Einfrieren und Auftauen dreimal wiederholt, um die Zellmembran der *E. coli* Zellen zu zerstören. Zur

Sammlung der unlöslichen Proteine innerhalb eines Pellets wurden die Proben für eine Minute bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues steriles Reaktionsgefäß pipettiert und auf Eis gelagert. Zu gleichen Teilen wurde der Überstand mit 2× SDS-PAGE Probenpuffer vermischt und für 5 min bei 100 °C schüttelnd aufgeköcht. 500 µl SDS-PAGE-Probenpuffer wurden zu den Proteinpellets hinzugegeben und unter den gleichen Bedingungen aufgeköcht. Die Taschen des SDS-PAGE-Gels wurden mit 10 µl der Überstandsprobe und 5 µl der Pelletprobe beladen.

SDS-PAGE:

Bei der vertikalen, diskontinuierlichen Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) werden die Proteine der *E. coli* Zellen im elektrischen Feld nach ihrer relativen Molekularmasse getrennt.

Zur Analyse der Transformanden und bei einer zu erwartenden Proteingröße von ca. 40 kDa des pBAD202/D-TOPO[®]/HcES24 Proteins bzw. ca. 133 kDa des pBAD202/D/lacZ und einer erwartenden Proteingröße von ca. 27 – 30 kDa des pET151/D-TOPO[®]/HcES24 Proteins bzw. ca. 120 kDa des pET151/D/lac/Z wurde ein 10 %iges Polyacrylamid-Trenngel und ein 5 %iges Polyacrylamid-Sammelgel für eine Gelgröße von 8 × 8 cm und eine Geldicke von 1 mm vorbereitet. Als Marker wurde PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) mit einem Bereich von 10 – 170 kDa verwendet und davon 5 µl pro Gel-Bande eingesetzt. Je Probe wurde eine Menge von 10 µl pro Bande eingesetzt. Die beladenen Gele wurden im Mini Protean[®] Tetra System (BIORAD, München) während des Durchlaufens des Sammelgels bei 50 V, beim Durchlaufen des Trenngels bei 70 V ca. 1,5 h elektrophoretisch inkubiert. Nach Lösung aus der Apparatur wurde das SDS-PAGE Gel in bidest. H₂O gewaschen und mit Commassie-Färbung (GelCode[®] Blue Staining Reagent, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) auf dem Schwenktisch gefärbt. Der Rest der Commassie-Färbung wurde erneut mittels Waschen in bidest. H₂O auf dem Schwenktisch vom Gel entfernt. Die Commassie gefärbten Banden wurden in der G:Box mit dem Programm Gene Snap 7.09.06 (Syngene, Großbritannien) bei ca. 2 – 6 ms im Transilluminator visualisiert.

Western Blot:

Das Prinzip des Western Blots nach Burnette (1981) und Towbin (1992) beruht auf einer Übertragung der im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran

Material und Methoden

und der Darstellung spezifisch gebundener Proteinfractionen durch eine Chemilumineszenzreaktion (= Immunoblot).

Der 20 × 20 cm Semi Dry Blotter (V20SB, biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland) wurde mit einer dreifachen Schicht in Transferpuffer getränktem Filterpapier (Rotilabo®-Blottingpapier, Carl Roth, Karlsruhe), einer Schicht Protan® Nitrocellulose-Transfer-Membran (Whatman™, Dassel), dem SDS-PAGE Gel und erneut drei Blättern in Transferpuffer getränktem Filterpapier beschichtet. Bei ca. 64 mA wurde die Membran über 1,5 h geblottet. Bei Raumtemperatur (RT) wurde die geblottete Nitrocellulose-Membran in 1× Roti®-Block-Arbeitslösung 2 h oder über Nacht auf dem Schwenktisch inkubiert. Die Roti®-Block-Lösung unterdrückt die unspezifischen Wechselwirkungen der Proteine. Die Membran wurde dreimal 10 min auf dem Schwenktisch in TST-Puffer gewaschen. Für die Inkubation in Primär- und Sekundär-Antikörpern wurde eine Roti®-Block-Arbeitslösung (Roti®-Block Lösung 1:10 verdünnt in TST-Puffer) hergestellt. 2 µl Anti-V5-Antikörper (Invitrogen®) wurden mit 9,998 ml Roti®-Block-Arbeitslösung vermischt und die Nitrocellulose-Membran 2 h bei RT auf dem Schwenktisch inkubiert. Der Primär-Antikörper bindet an das V5-Epitop des Proteins. Erneut erfolgten drei Waschungen der Membran mit TST-Puffer (je 10 min). Als Sekundär-Antikörper wurde der Meerrettichperoxidase konjugierter Ziege-Anti-Maus IgG (H+L) (Jackson Immuno Research Laboratories, INC., Großbritannien) eingesetzt. Eine Stunde wurde die Membran in Sekundär-Antikörper vermischt mit Roti®-Block-Arbeitslösung (1:10) schwenkend inkubiert. Die Membran wurde zweimal in TST-Puffer geschwenkt und anschließend 10 min in TS-Puffer inkubiert. Mittels SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Pierce Biotechnology, USA) wurde Meerrettichperoxidase (HRP) im Immunoblot detektiert. Für die 64 cm² große Nitrocellulose-Membran wurden im Versuch 2 ml der Arbeitslösung des Kits eingesetzt (nach Herstellerangaben 6,4 ml der Arbeitslösung). Nach Inkubation (5 min bei RT) wurde die Membran zwischen zwei Overhead-Folien gebracht und im Chemolumineszenz-Gerät (ChemoCam Imager) mit dem Programm Chemo Star Professional (INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen) und einer Exposition von 60 s über einen Mess-Zeitraum von 20 min visualisiert.

Proteinaufreinigung:

Die für das HcES 24 kDa Protein codierende DNA wurde im pBAD202/D-Topo® Vektor C-terminal, im pET151/D-TOPO® Vektor N-terminal durch eine 6× His-tag-Region markiert. Das in den *E. coli*-Zellen nach Induktion produzierte Zielprotein wurde zunächst durch Lyse der Zellen freigelegt. Die Aufreinigung des 6× His-tag-Proteins erfolgte dann nach dem

Prinzip der Immobilisierten-Metall-Ionen-Affinitäts-Chromatographie mit dem Protino[®]Ni-IDA 1000 Packed Columns Kit (Machery-Nagel GmbH & Co KG, Düren). Das HcES 24 kDa – Protein lag in Inklusionskörpern vor (Li et al., 2007). Daher wurde die Polyhistidin-tag-Protein-Aufreinigung unter denaturierenden Konditionen vorgenommen. Der denaturierende Lösungspuffer und Elutionspuffer wurden nach Herstellerangaben vorbereitet. 1 g des gewonnenen Zellpellets wurden auf Eis aufgetaut, die Zellen in 5 ml Lysispuffer resuspendiert und mit 25 µl Lysozym-Lösung (200 mg/ml) versetzt (Inkubation 30 min auf Eis). Per Ultraschallgerät (Brandson Sonifier 250, G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd) wurde die Suspension 10 × 15 s einer Ultraschallbehandlung mit dazwischenliegenden Kühlungsperioden von 15 s (auf Eis) unterzogen. Die Sammlung der Inklusionskörper erfolgte über Zentrifugation (10.000 × g, 30 min, +4 °C). Die Resuspension in 10 ml Lysispuffer, Zentrifugation, erneute Resuspension in 2 ml denaturierendem Lösungspuffer und Zentrifugation (bei 20 °C) erfolgten bis zur Klärung des Überstandes. Dieser wurde auf die zuvor mit denaturierendem Lösungspuffer benetzte Chromatographie-Säule gegeben. Die Bindung des gewünschten Proteins erfolgte durch Interaktion zwischen Polyhistidin-Resten des rekombinantes Proteins und immobilisierten Nickel-Ionen des Protino[®] Ni-IDA Produktes. Durch Hinzugabe von denaturierendem Lösungspuffer wurden alle nicht gebundenen Proteine aus der Chromatographie-Säule entfernt. Die Elution des Proteins erfolgte in drei Fraktionen. Um die Proteinqualität zu verbessern wurde ein Zusatz von 0,1 % Triton X 100 vor der Bearbeitung mit dem Ultraschallgerät der Suspension hinzugegeben und eine 10-minütige Inkubation in 2,5 U/µl Benzonase (DNAse) nach der Ultraschallbehandlung durchgeführt. Der denaturierende Lösungspuffer wurde mit 1 mM Imidazol versetzt.

Überprüfung der Proteinqualität und -quantität:

Die Proteinqualität wurde mittels SDS-PAGE- und Western Blot-Verfahren überprüft. Im CB-X™ Protein Assay (G-Biosciences, MO, USA) wurde die Proteinmenge durch das Verfahren nach Bradford (1976) ermittelt. Um eine möglichst genaue Proteinmessung zu gewährleisten wurde im hier angewandten Protokoll 2 des Protino[®] Ni-IDA-Kits eine Aufreinigung der Probe eingeschlossen. Commassie-Brilliant-Blau bildet im sauren Milieu Komplexe mit Protein-Seitenketten. Die Absorption der Farb-Protein-Komplexe wird bei 595 nm gegen bidest. H₂O in einer 96 Well Platte (Nunc, Dänemark) mit dem automatischen Plattenleser (Synergy 4, BioTek Instruments Inc., USA) und dem Programm Gen5™ 1.10 (2005, Bio Tek Instruments Inc., USA) gemessen.

2.8.2 Qualitative Speziesbestimmung von Drittlarven

Zur Speziesbestimmung der aus der Larvenkultur gewonnenen Drittlarven wurde eine im Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der FU Berlin bereits etablierte gattungsspezifische qualitative PCR durchgeführt (Demeler et al., 2013b).

Die in Wasser bei 10 °C gelagerten Larven wurde in 15 ml Reaktionsgefäße überführt, 10 min bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand bis auf ca. 1,5 ml Volumen abgenommen und verworfen. Das restliche Flüssigkeitsvolumen mit den Larven wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, 10 min bei 4656 × g zentrifugiert und der Überstand bis auf ein Restvolumen von 50 µl abgenommen. Für den Einsatz der Larven-DNA in der PCR wurden die Larven physikalisch aufgeschlossen: 10 min bei -80 °C gelagert, anschließend 10 min bei +105 °C im Thermomix erhitzt und diese Durchführung insgesamt dreimal wiederholt. Vor jeder PCR wurde die Probe im Vortex erneut gemischt und kurz zentrifugiert. 20 µl Reaktionsansatz für die qualitative gattungsspezifische PCR erfolgten mit 4,0 µl 5× Phusion® HF Puffer, 0,4 µl 10 mM dNTP, 0,5 µl Primer A (Forward) 10 mM, 0,5 µl Primer B (Reverse) 10 mM, 2,0 µl DNA, 0,2 µl Phusion® Hot Start II DNA Polymerase (2 U/µl) add 20,0 µl mit H₂O (Ribonuclease-frei). Die in der PCR eingesetzten und bereits im Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der FU Berlin etablierten Primer wurden bei Invitrogen GmbH, Karlsruhe bestellt (*H. contortus*: Forward Primer (Hc-SH-for2) 5'CCATATACTACAATGTGGCTAATTTTC3', Reverse Primer (Hc-SH-rev) 5'TACAAATGATAAAAGAACATCGTCGC3', erwartete Größe 226 bp; *T. circumcincta*: Forward Primer (Telc-SH-For1) 5'AACATATGCAACATGACGTACGACGG3', Reverse Primer (Telc-SH-Rev1) 5'ATGATACATTGAACATATATTACCATACATGTCT3', erwartete Größe 147 bp; *Tr. colubriformis*: Forward Primer (Tricho-2Multi-83F) 5'CTTACGTCTGGTTCAGGGTTG3', Reverse Primer (Tricho-2Multi-187R) 5'ACTGAAATGGGAATCATCACAATATTT3', erwartete Größe 106 bp; *O. leptospicularis*: Forward Primer (Ol-SH-For) 5'TTCCCATTTTCAGTTCAAGAAAACAC3', Reverse Primer (Ol-SH-Rev) 5'TTCATTGAGTACATTCAAATAGTGATAATATATA3', erwartete Größe 106 bp; ITS2 (Internal Transcribed Spacer 2): Forward Primer (Nc1) 5'ACGTCTGGTTCAGGGTTGTT3', Reverse Primer (Nc2) 5'TTAGTTTCTTTTCTCCGCT3') (Demeler et al., 2013b). Die zu erwartenden Größen der PCR-Produkte wurden mit dem BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool) Programm der NCBI (National Centre for Biotechnology Information) Datenbank ermittelt. Als Positivkontrollen dienten jeweils 2 µl der aus den Larven 3 der verschiedenen Parasitenspezies isolierten DNA, von experimentell infizierten Tieren aus der Stammhaltung des Instituts für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der FU Berlin. Als Negativprobe wurden anstatt von DNA, jeweils 2 µl Ribonuclease-freies Wasser eingesetzt. Die PCR

erfolgte bei 98 °C, 10 min, einer vierzigmaligen Wiederholung der Erhitzung auf 98 °C, 10 s und einer Annealingtemperatur für *H. contortus* von 60 °C, für *Tr. colubriformis* von 53 °C für 30 s, für *O. leptospicularis* und *T. circumcincta* von 55 °C, sowie 72 °C für 30 s. Anschließend wurden die Proben bei 72 °C für 10 min erhitzt und auf endlos +4 °C geschaltet. Die PCR-Produkte wurden in einem großen 1,5 %igen Agarosegel, bei ca. 120 V über ca. 45 min überprüft und mittels G:Box mit dem Programm Gene Snap 7.09.06 (Syngene, Großbritannien) visualisiert. Als Marker diente der GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas GmbH).

2.9 Statistische Auswertung

Die Untersuchungsdaten wurden mit Hilfe des Programms Microsoft® Excel® 2008 for Mac Version 12.2.0 (090605) dokumentiert und verwaltet. Die statistischen Auswertungen wurden hauptsächlich mit dem Programm R, Version 2.12.2 ((2011-02-25), ©2011 The R Foundation for Statistical Computing) durchgeführt. Zur statistischen Analyse wurde das Linear Mixed Model (LMM) mit der Residual Maximum Likelihood-Schätzung (REML) und das Generalized Linear Mixed Model (GLMM) in Verbindung mit der Laplace Annäherung (Paket:lme4) angewendet. Im LMM und GLMM galten die Tier-Identifikationsnummer und das Untersuchungsdatum zu den zufälligen Effekten; Geschlecht, Rasse, Untersuchungsjahr und die Interaktion von Rasse:Jahr zu den fixen Effekten. In Abhängigkeit des Untersuchungsparameters variierten die fixen Effekte. In der Statistik wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit (p-Wert) $\leq 0,001^{***}$ als höchst signifikant, $\leq 0,01^{**}$ als hoch signifikant, $\leq 0,05^*$ als signifikant gewertet.

Allgemeine Formeln für die Modelle:

$$\text{LMM: } y_{ij} = \mu + \text{Geschlecht}_i + \text{Rasse}_i + \text{Jahr}_j + \text{Rasse:Jahr}_{ij} + \text{udatum}_j + \text{id}_i + E_{ij}$$

$$\text{GLMM: } y_{ij} = h(\mu + \text{Geschlecht}_i + \text{Rasse}_i + \text{Jahr}_j + \text{Rasse:Jahr}_{ij} + \text{udatum}_j + \text{id}_i)$$

Legende: y = Beobachtungswert (abhängige Variable); μ = Intercept; h = Responsfunktion (logit-link); Geschlecht_i = fixer Effekt des i -ten Geschlechts; Rasse_i = fixer Effekt der i -ten Rasse; Jahr_j = fixer Effekt des j -ten Jahres; Rasse:Jahr_{ij} = fixer Effekt, Interaktion von der i -ten Rasse und dem j -ten Jahr; udatum_j = zufälliger Untersuchungszeitpunkt-Effekt; id_i = zufälliger Tieridentifikationsnummer-Effekt; e_{ij} = zufälliger Restfehler; $i = 1 \dots n$ = alle Beobachtungen.

IV Ergebnisse

Die der Statistik zugrundeliegende Arbeitshypothese war: Soay Schafe sind widerstandsfähiger/resistenter gegenüber MDS-Infektionen als Texel Schafe. Die dazugehörige Nullhypothese war: Texel Schafe sind genauso widerstandsfähig bzw. widerstandsfähiger gegenüber MDS-Infektionen wie/als Soay Schafe. Die Parameter MDS-EpG(log) (EpG2log), *S. papillosus*-EpG(log) (EpG1log), Kokzidien-OpG(log) (OpGlog), Hämatokritwert (Hkt), die Hämatokritabweichung (hwertd), das Körpergewicht und die Gewichtsveränderung (gewichtsveränderung) waren kontinuierliche Daten, während der FAMACHA[®] Anaemia guide (sfarbe) zum kategorischen Datentyp zählte. Da das Körpergewicht und der Hämatokritwert rasseabhängig stark voneinander abweichen, wurden für diese Parameter neue Variablen errechnet. Die Gewichtsveränderung wurde errechnet, indem das zuvor gemessene individuelle Gewicht vom aktuellen Gewicht je Schaf und Untersuchungsdatum der folgenden Untersuchung subtrahiert wurde. Der Ab- oder Anstieg des Hämatokritwertes (Hämatokritabweichung) wurde errechnet, indem der Hämatokritwert je Schaf und Untersuchungsdatum der vorherigen Untersuchung vom aktuellen individuellen Hämatokritwert der folgenden Untersuchung subtrahiert wurde. Die Parameter MDS-EpG, *S. papillosus*-EpG und Kokzidien-OpG wurden logarithmisch transformiert, um ihre Verteilung symmetrischer zu machen und sie einer Normalverteilung anzupassen. Zunächst wurden die einzelnen Parameter nach Rasse und Untersuchungsjahr getrennt deskriptiv betrachtet. Zu der jeweiligen numerischen Zusammenfassung (Mittelwert, Standardabweichung, Median, Minimum, Maximum, 1. und 3. Quantile), den relativen und absoluten Häufigkeiten, wurde der Unterschied der Parameter zwischen den Rassen an einem bestimmten Untersuchungsdatum mit dem Zweistichproben-t-Test überprüft und die dazugehörigen p-Werte ermittelt. Die Interaktion der einzelnen Parameter miteinander wurde mittels Pearson- und Spearmans Rang-Korrelation betrachtet.

1 Deskriptive Statistik

1.1 Anzahl der Versuchstiere

Im Jahr 2009 wurden 4 weibliche und 7 männliche Soay Schafe untersucht. Alle Soay Schafe waren bei allen Untersuchungen anwesend. Im Jahr 2009 wurden 9 weibliche und 5 männliche Texel Schafe untersucht. Vor der Untersuchung vom 09.08.2009 verstarb das weibliche Texelschaf ID-Nr. 742. Der betreuende Schäfer hatte zuvor keine Schwächung

des Tieres festgestellt. Bei der Untersuchung am 21.09.2009 war das weibliche Texel Schaf ID-Nr. 741 nicht anwesend.

Im Jahr 2010 wurden 6 weibliche Soay Schafe untersucht, wobei vor der Untersuchung vom 21.08.2010 das weibliche Soay Schaf mit der ID-Nr. 962 verstarb. Das weibliche Soay Schaf mit der ID-Nr. 961 war bei der Untersuchung am 21.08.2010 nicht anwesend. Im Jahr 2010 wurden 11 männliche Soay Schafe untersucht, wobei 2 männliche Soay Schafe während des Versuchs verstarben (ID-Nr. 960, 916). Soay Schaf ID-Nr. 880, 960 und 915 waren nicht an allen Untersuchungsdaten anwesend. Im Jahr 2010 wurden 9 weibliche Texel Schafe und 3 männliche Texel Schafe untersucht. Die Texel Schafe ID-Nr. 957 und 958 waren nicht an allen Untersuchungsdaten anwesend. Das männliche Texel Schaf ID-Nr. 885 zeigte bei der Untersuchung am 21.08.2010 starke Anämie und Exsikkose, wurde symptomatisch behandelt und entwurmt, sowie von der Gruppe isoliert.

1.2 Behandlungen

Im Jahr 2009 mußte keines der untersuchten Schafe behandelt werden. Im Jahr 2010 hingegen wurden einige Behandlungen durchgeführt. Im Widerspruch zur Versuchsplanung wurden am 10.05.2010 durch den Schäfer alle Lämmer und Mutterschafe mit 0,2 mg Moxidectin je kg Körpergewicht (Cydectin® 0,1 % orale Lösung, Pfizer Deutschland GmbH, Berlin) oral behandelt. Am 21.08.2010 wurde das Schaf mit der ID-Nr. 885 aufgrund des Verdachts einer Anämie durch MDS-Befall erneut mit Cydectin® entwurmt. Am 25.06.2010 wurde das Schaflamm DE 010110106888 tot aufgefunden und der Tierkörper im Landeslabor Schleswig-Holstein untersucht. Das pathologisch-anatomische Bild sprach für ein hypoproteinämisches Ödem der Haut und Unterhaut, eventuell verursacht durch eine Endoparasitose (Kokzidien-Oozysten im Kot). Als Todesursache wurde Herz-Kreislauf-Versagen angegeben. Daraufhin wurden alle Tiere nach der Untersuchung am 13.07.2010 mit 20 mg/kg Körpergewicht Toltrazuril (Baycox®, Bayer AG, Leverkusen) behandelt. Im Jahr 2009 konnten bei einem Soay Schaf am 20.10.2009 *Moniezia* spp.-Eier in den Fäzes nachgewiesen werden. Im Jahr 2010 waren am 21.08.2010 7 Tiere (3 Soay/3 Texel), am 09.09.2010 8 Tiere (5 Soay/3 Texel) mit Bandwurmeiern befallen. Am 09.09.2010 wurden die befallenen Tiere (ID-Nr. 880, 881, 883, 889, 919, 955, 956, 959) mit 3,75 mg/kg Körpergewicht Praziquantel (Cestocur®, Bayer AG, Leverkusen) behandelt. Ab dem 16.10.2010 bis Versuchsende wurden keine *Moniezia* spp.-Eier mehr im Kot der Tiere nachgewiesen. Aufgrund von Fieber, Durchfall und/oder Husten wurden die Tiere mit Antibiotika behandelt (am 31.07.2010 ID-Nr. 960, am 21.08.2010 ID-Nr. 881, 882, 885, 895, 897, 915, 917, 954, 958, am 09.09.2010 ID-Nr. 955).

1.3 Mittlerer Geburtszeitpunkt

Da die genauen Geburtsdaten der Lämmer nicht erhoben wurden und nur der Beginn und das Ende des Geburtszeitraumes der Schafrassen bekannt war, wurde für die Schafrassen und Untersuchungsjahre ein mittlerer Geburtszeitpunkt errechnet (Soay Schafe: 10.04.2009 und 31.03.2010, Texel Schafe: 07.04.2009 und 03.04.2010).

1.4 Klinische Parameter

1.4.1 Körpergewicht

Im Jahr 2009 wurde bei den Soay Schafen ein mittleres Gewicht von 13,33 kg (SD: $\pm 3,63$), ein Minimalgewicht von 5,5 kg und ein Maximalgewicht von 21 kg festgestellt. Bei den Texel Schafen konnte im gleichen Jahr ein mittleres Körpergewicht von 35,98 kg (SD: $\pm 6,04$), ein Minimalgewicht von 15 kg und ein Maximalgewicht von 49 kg gemessen werden. Im Jahr 2010 wurde bei den Soay Schafen ein mittleres Körpergewicht von 14,29 kg (SD: $\pm 4,10$), ein Minimalgewicht von 4 kg und ein Maximalgewicht von 25 kg, bei den Texel Schafen ein mittleres Gewicht von 29,27 kg (SD: $\pm 8,46$), ein Minimalgewicht von 12 kg und ein Maximalgewicht von 50 kg gemessen werden.

In den folgenden Abbildungen Nr. 1 und 2 werden in Streudiagrammen die Körpergewichtszunahme der Schafe im Verlauf des Alters in Tagen, getrennt nach Rasse, Geschlecht und Untersuchungsjahr dargestellt. Zusätzlich wurde ein gleitendes Mittel erstellt. Die Glättungs-Splines wurden über die zu den Untersuchungszeitpunkten gemessenen Absolutzahlen des Gewichts gelegt, um das mittlere Gewicht im Zeitverlauf darzustellen. Da der mittlere Geburtszeitpunkt je Schafrasse sich geringfügig unterscheidet, sind die Untersuchungszeitpunkte aufgetragen anhand des Alters in Tagen, leicht horizontal verschoben.

Texel Schafe hatten in beiden Untersuchungsjahren ein Körpergewicht von im Mittel 32,47 kg und Soay Schafe ein Körpergewicht von im Mittel 13,93 kg. Dieser Unterschied ist höchst signifikant (t-Test, p-Wert: $\leq 0,001^{***}$). Texel Schafe waren über den Untersuchungszeitraum des Jahres 2009 ungefähr 20 kg konstant schwerer als Soay Schafe. Im Jahr 2010 betrug dieser Rasseunterschied im Körpergewicht nur ca. 10 kg. Während sich das Körpergewicht der Soay Schafe zwischen den Geschlechtern signifikant für beide Untersuchungsjahre unterschied (t-Test, p-Wert: 0,04*), wobei weibliche Tiere ein mittleres Körpergewicht von ca. 13,29 kg und männliche Tiere ein Körpergewicht von ca. 14,29 kg aufwiesen, konnte bei den Texel Schafen nahezu kein Unterschied im Körpergewicht zwischen den Geschlechtern festgestellt werden (weibliche Tiere im Mittel:

ca. 32,51 kg, männliche Tiere im Mittel: ca. 32,40 kg; t-Test, p-Wert: 0,9). Die Gewichtsveränderung scheint im Jahr 2009 ab der Untersuchung vom 20.09.2009 (ca. 160. Lebensstag) zu stagnieren. Das mittlere Gewicht stieg ab diesem Zeitpunkt bei beiden Rassen nicht mehr an. Im Jahr 2010 stieg das mittlere Gewicht kontinuierlich bis zum Untersuchungsende an.

1.4.2 Gewichtsveränderung

Die Gewichtsveränderung wurde errechnet, indem das zuvor gemessene Gewicht vom aktuellen Gewicht je Untersuchungsdatum und Individuum subtrahiert wurde (Differenz). Für Soay Schafe wurde im Jahr 2009 eine mittlere Gewichtsveränderung von 0,05 (SD: $\pm 0,11$; Min: -0,27; Max: 0,31) und im Jahr 2010 eine mittlere Gewichtsveränderung von 0,06 (SD: $\pm 0,14$; Min: -0,35; Max: 0,44), für Texel Schafe im Jahr 2009 eine mittlere Gewichtsveränderung von 0,03 (SD: $\pm 0,08$; Min: -0,14; Max: 0,36) und im Jahr 2010 eine mittlere Gewichtsveränderung von 0,06 (SD: $\pm 0,08$; Min: -0,24; Max: 0,29) festgestellt. Am 19.07.2009, 21.09.2009 und 31.07.2010 war die Gewichtsveränderung höchst signifikant positiv (t-Test, p-Wert: $\leq 0,001^{***}$), am 13.07.2010, 23.09.2010 und 02.10.2010 hoch signifikant positiv (t-Test, p-Wert: $\leq 0,01^{**}$) und am 09.08.2009 sowie 16.10.2010 signifikant positiv (t-Test, p-Wert: $\leq 0,05^*$) unterschiedlich für Soay Schafe, während am 31.10.2010 eine hoch signifikant negative (t-Test, p-Wert: $\leq 0,01^{**}$) und am 31.08.2009 und 20.10.2009 signifikant negative (t-Test, p-Wert: $\leq 0,05^*$) Gewichtsveränderung für Soay Schafe zu verzeichnen war. Am 19.07.2009, 21.09.2009 und 31.07.2010 war die Gewichtsveränderung höchst signifikant positiv (t-Test, p-Wert: $\leq 0,001^{***}$), am 09.08.2009, 13.07.2010 und 13.11.2010 hoch signifikant positiv (t-Test, p-Wert: $\leq 0,01^{**}$) sowie am 23.09.2010 und 02.10.2010 signifikant positiv (t-Test, p-Wert: $\leq 0,05^*$) unterschiedlich für Texel Schafe zum Untersuchungsdatum davor. Die Gewichtsveränderung unterschied sich für beide Schafrassen zusammen an den Untersuchungsdaten höchst signifikant am 19.07.2009, 09.08.2009, 21.09.2009, 13.07.2010, 31.07.2010, 23.09.2010 und 02.10.2010 (t-Test, p-Wert: $\leq 0,001^{***}$) und hoch signifikant (t-Test, p-Wert: $\leq 0,01^{**}$) an den Untersuchungsdaten 20.10.2009, 16.10.2010 und 13.11.2010.

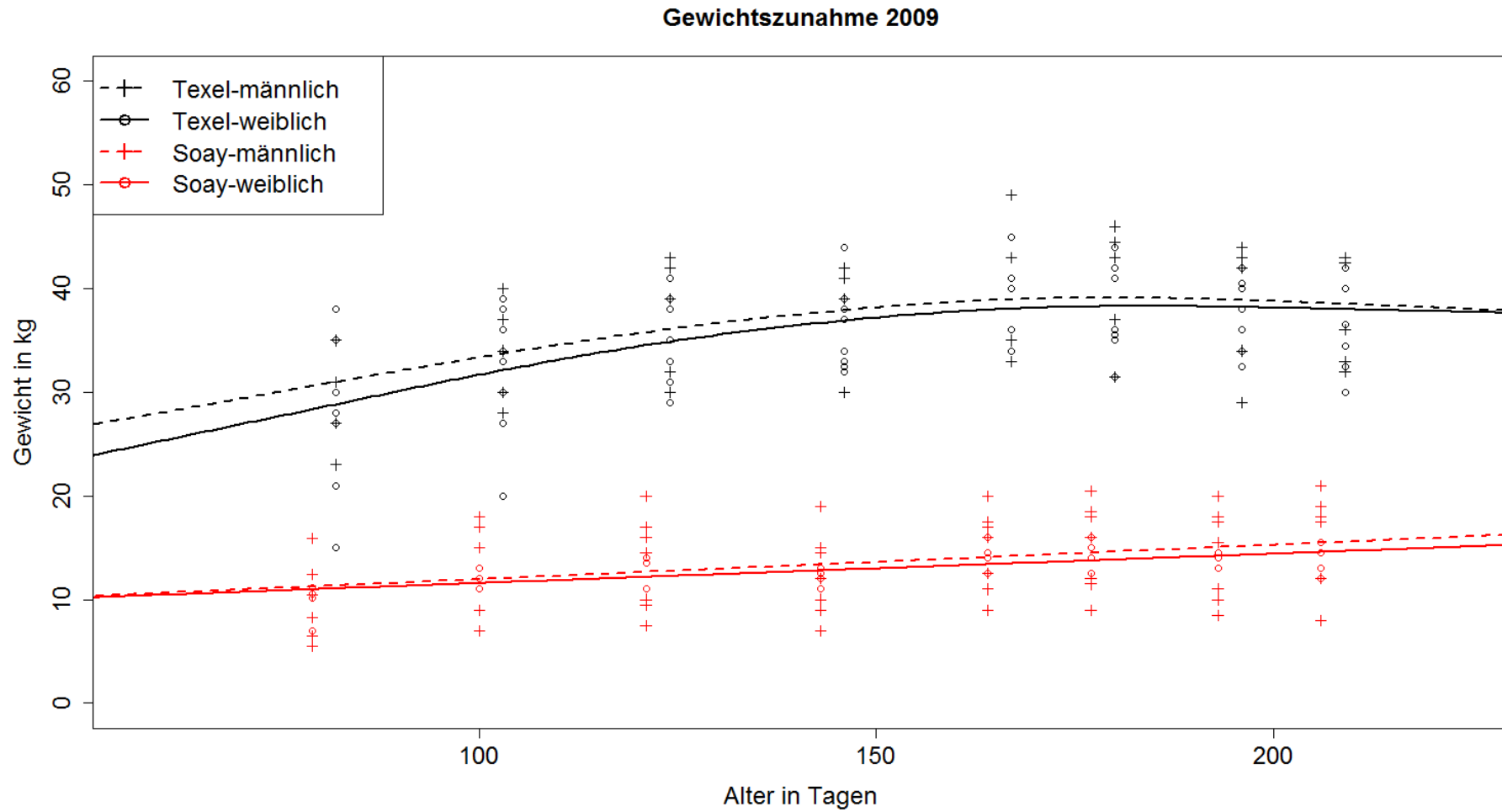


Abbildung 1: Absolutgewicht der Schafrassen in Kilogramm Körpergewicht (Lebendmasse) im Untersuchungsjahr 2009

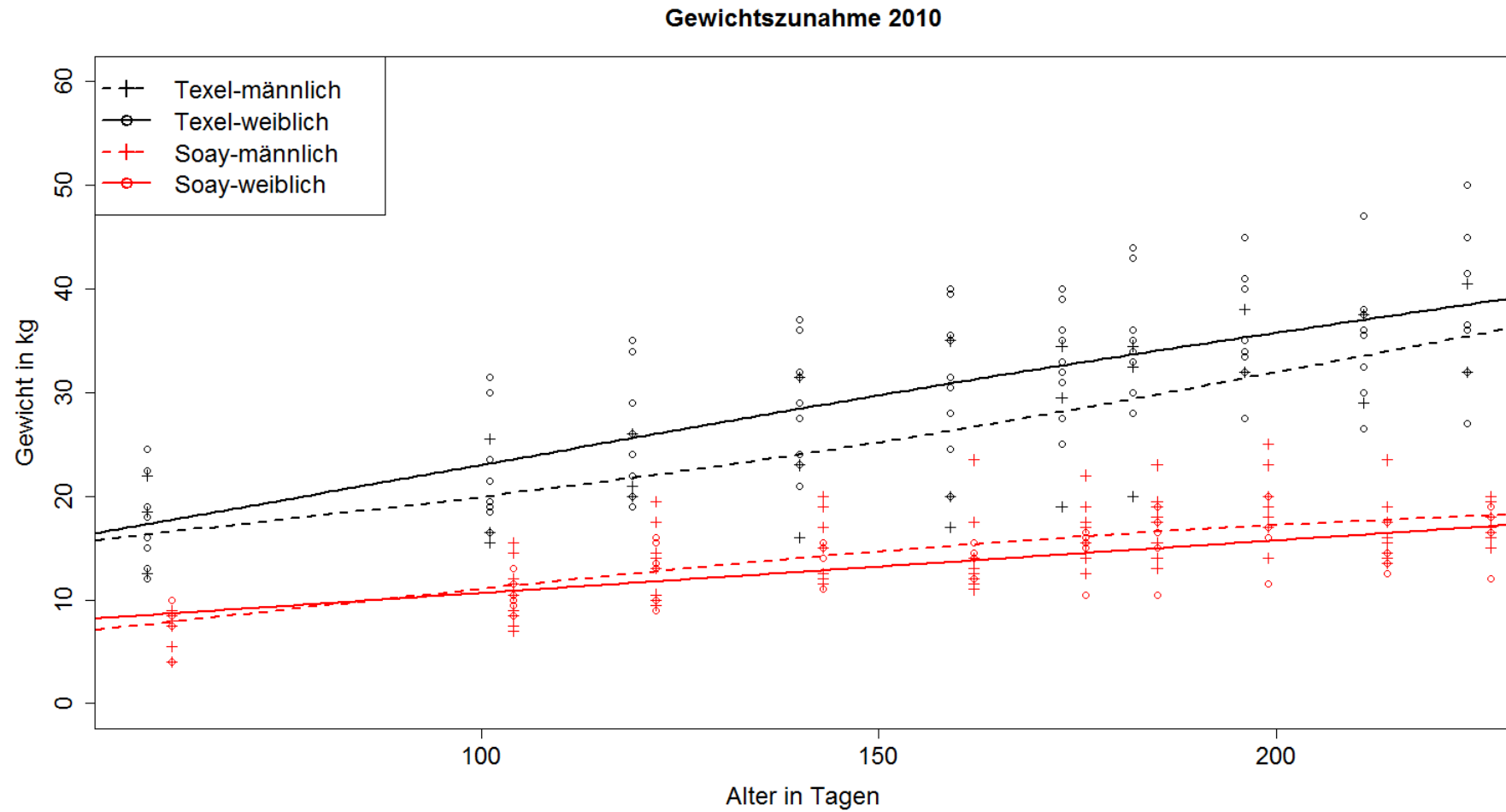


Abbildung 2: Absolutgewicht der Schafrassen in Kilogramm Körpergewicht (Lebendmasse) im Untersuchungsjahr 2010

1.4.3 FAMACHA[®] Anaemia guide

Der errechnete Mittelwert der FAMACHA[®] Anaemia guides tendiert in beiden Untersuchungsjahren zur Kategorie 2 (Soay Schafe 2009 Mittelwert: 2,00 (SD: $\pm 0,26$), Texel Schafe 2009 Mittelwert: 2,02 (SD: $\pm 0,37$). Die dem Text folgende Abbildung (Nr. 3) der Kategorien als relative Häufigkeit in einem Balkendiagramm läßt erkennen, dass die Kategorie 3 im Jahr 2010 deutlich häufiger festgestellt wurde als im Jahr 2009 (Soay Schafe 2010 Mittelwert: 2,23 (SD: $\pm 0,44$), Texel Schafe 2010 Mittelwert: 2,36 (SD: $\pm 0,55$). Bei den Untersuchungen im Jahr 2009 erhielt keines der Schafe beider Rassen über den gesamten Untersuchungszeitraum eine FAMACHA[®] Anaemia guide Kategorie von 4 oder 5 (Soay- und Texel Schafe 2009 Minimum: 1, Maximum 3). Im Jahr 2010 hingegen waren einige Texel Schafe leicht anämisch und hatten eine FAMACHA[®] Anaemia guide Kategorie von 4 (Soay Schafe 2010 Minimum: 1, Maximum 3, Texel Schafe 2010 Minimum: 2, Maximum: 4).

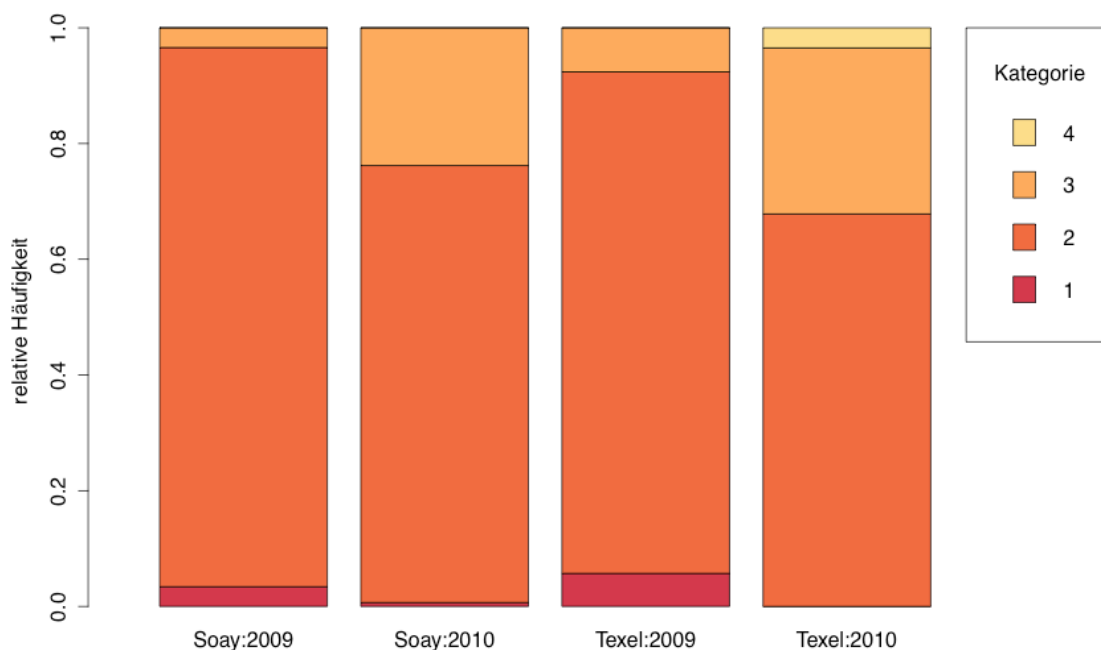


Abbildung 3: Relative Häufigkeiten der FAMACHA[®] Anaemia guide Kategorien getrennt nach Schafrasse und Untersuchungsjahr

1.4.4 Rektale Körpertemperatur

Im Jahr 2009 konnte bei der Untersuchung der Soay Schafe eine mittlere rektale Körpertemperatur von 38,82 °C (SD 2009: $\pm 0,95$; Min: 35,6; Max: 41,0) und 2010 von 38,83 °C (SD 2010: $\pm 0,67$; Min: 37,0; Max: 40,6) sowie bei den Texel Schafen im Jahr 2009

von 38,99 °C (SD: $\pm 0,69$; Min: 35,8; Max: 40,1) und im Jahr 2010 von 38,73 °C (SD: $\pm 0,68$, Min: 37,0; Max: 41,0) gemessen werden.

1.5 Hämatologische Parameter

1.5.1 Hämatokritwert

Der in der Literatur angegebene durchschnittliche Hämatokritwert für Schafe liegt zwischen 0,30 - 0,38 l/l (entspricht 30 – 38 %) (von Engelhardt, 2010) bzw. 0,28 - 0,41 l/l (Bostedt, 1996). Die Hämatokrit-Mittelwerte beider Schafrassen in 2009 und 2010 lagen im physiologischen Bereich (Soay Schafe 2009: 32,82 (SD: $\pm 4,18$, Min: 22,00; Max: 41,00), 2010: 34,10 (SD: $\pm 4,47$, Min: 20,00; Max: 45,00); Texel Schafe 2009: 29,90 (SD: $\pm 3,66$; Min: 21,00, Max: 38,00), 2010: 30,23 (SD: $\pm 3,54$, Min: 18,00; Max: 39,00). Im Jahr 2009 wurden für beide Rassen niedrigere Hämatokrit-Mittelwerte errechnet als im Jahr 2010. In beiden Untersuchungsjahren konnte bei den Soay Schafen ein höherer mittlerer Hämatokritwert von ca. 33,6 %, als bei den Texel Schafen von ca. 30,1 % nachgewiesen werden. Der Unterschied des mittleren Hämatokritwertes zwischen den beiden Schafrassen für die beiden Jahre ist signifikant (Welch-Two-Sample-t-Test, p-Wert: $\leq 0,001^{***}$; höchst signifikant) und wird in Abbildung Nr. 4 als Boxplot dargestellt.

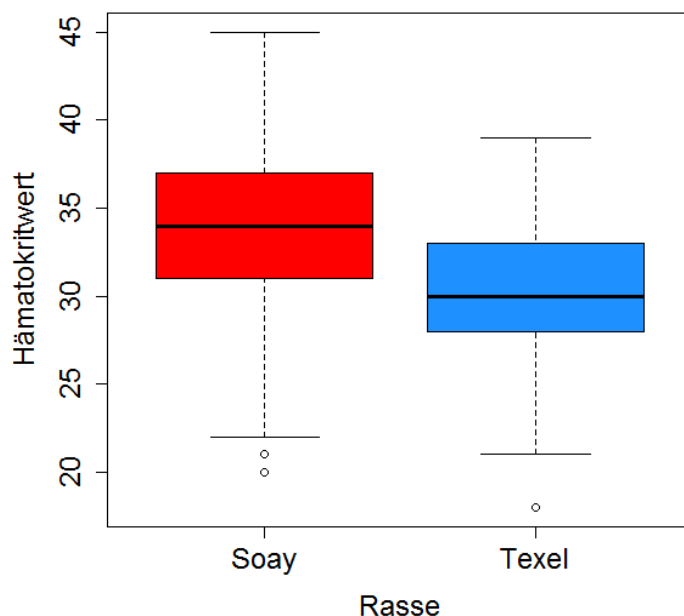


Abbildung 4: Mittlere Hämatokritwerte (in %) beider Untersuchungsjahre getrennt nach Schafrasse

1.5.2 Hämatokritwertabweichung

Der Ab- oder Anstieg des Hämatokritwertes (Hämatokritabweichung) wurde errechnet, indem der Hämatokritwert je Schaf und Untersuchungsdatum der vorherigen Untersuchung vom aktuellen individuellen Hämatokritwert der folgenden Untersuchung subtrahiert wurde. Für Soay Schafe wurde im Jahr 2009 eine mittlere Hämatokritwertabweichung von -0,21 (SD: $\pm 4,94$; Min: -12,00; Max: 11,00) und im Jahr 2010 eine mittlere Hämatokritwertabweichung von 0,30 (SD: $\pm 4,71$; Min: -16,00; Max: 17,00), für Texel Schafe im Jahr 2009 eine mittlere Hämatokritwertabweichung von -0,82 (SD: $\pm 4,60$; Min: -10,00; Max: 8,00) und im Jahr 2010 eine mittlere Hämatokritwertabweichung von -0,01 (SD: $\pm 4,00$; Min: -11,00; Max: 9,00) festgestellt. Am 09.08.2009 (t-Test, p-Wert: $\leq 0,001^{***}$ (Texel und Soay)) wurde eine jeweils negative, am 31.08.2009 (t-Test, p-Wert: $\leq 0,001^{***}$ (Texel), $0,004^{**}$ (Soay)) wurde eine jeweils positive, am 21.09.2009 (t-Test, p-Wert: $0,02^*$ (Texel), $0,007^{**}$ (Soay)) eine jeweils negative Hämatokritwertabweichung, am 20.10.2009 nur für Soay Schafe (t-Test, p-Wert: $0,01^*$) eine positive und am 02.11.2009 nur für Texel Schafe (t-Test, p-Wert: $\leq 0,001^{***}$) eine negative Hämatokritwertabweichung der Rassen signifikant unterschiedlich zum Untersuchungsdatum davor errechnet. Im Jahr 2010 wurde für beide Rassen am 02.10.2010 (t-Test, p-Wert: $0,005^{**}$ (Texel), $\leq 0,001^{***}$ (Soay)) eine positive und am 23.09.2010 für Soay Schafe (t-Test, p-Wert: $\leq 0,01^{**}$) eine negative Hämatokritwertabweichung je Rasse signifikant unterschiedlich zum Untersuchungsdatum davor gemessen. Die Hämatokritwertabweichung war für beide Rassen zusammen an den Untersuchungsdaten 09.08.2009, 31.08.2009, 21.09.2009, 02.10.2010 höchst signifikant, am 20.10.2009, 02.11.2009, 23.09.2010 hoch signifikant und am 31.10.2010 signifikant unterschiedlich.

1.6 Parasitologische Parameter

Um eine Aussage über die Häufigkeit (Prävalenz) der Ausscheidung von Oozysten bzw. Eiern pro Gramm Kot der Tiere machen zu können, wurden die Datensätze $EpG2/EpG1/OpG=0$, $EpG2/EpG1/OpG>0$ betrachtet und die Daten wie binäre Daten behandelt. Im Anschluß wurde versucht die Höhe der Ausscheidung von Oozysten bzw. Eiern pro Gramm Kot zu bestimmen. Dazu wurden die Datensätze $EpG2/EpG1/OpG>0$ betrachtet und die Daten wie kontinuierliche Daten behandelt.

1.6.1 Magen-Darm-Strongyliden Eizahl pro Gramm Kot

In beiden Untersuchungsjahren konnten vor Weideaustrieb keine Magen-Darm-Strongyliden (MDS)-Eier in den Kotproben der Schafrassen mittels modifiziertem McMaster Zählverfahren nachgewiesen werden. Bei den Untersuchungen nach Weideaustrieb wurden am 9.08.2009 und 31.07.2010 zum ersten Mal vereinzelt MDS-Eier im Kot der Tiere nachgewiesen. Bei allen folgenden Untersuchungen 2009 wurden bei der gesamten Texel Schafgruppe und intermittierend bei den Tieren der Soay Schafgruppe, MDS-Eier im Kot festgestellt. Bei jedem Tier der Studie konnte mindestens einmal innerhalb der Untersuchungen 2009 und 2010 eine MDS-Eiausscheidung nachgewiesen werden.

Im Jahr 2009 unterschieden sich die Prävalenzen für das Auftreten von MDS-EpG positiven Untersuchungen der Soay Schafgruppe deutlich von denen der Texel Schafgruppe. Die relative Häufigkeit für das Auftreten eines MDS-EpG positiven Tieres in 2009 lag bei der Soay Schafgruppe bei ca. 0,46, während sie bei der Texel Schafgruppe im selben Jahr bei ca. 0,7 lag. Im Jahr 2010 unterschieden sich die Prävalenzen nur gering: Die relative Häufigkeit für das Auftreten eines MDS-EpG positiven Tieres lag bei der Soay Schafgruppe bei 0,60, bei der Texel Schafgruppe bei ca. 0,58.

Unter Einbeziehung aller Kotuntersuchungen bei denen MDS-Eier im Kot nachgewiesen (MDS-EpG>0) und nicht nachgewiesen wurden (MDS-EpG=0), wurde für das Jahr 2009 ein Mittelwert von 173,90 (SD: $\pm 293,41$; Min: 0; Max: 1400) für die Soay Schafe und ein höherer Mittelwert von 461,00 (SD: $\pm 566,79$; Min: 0; Max: 2600) für die Texel Schafe festgestellt. Im Jahr 2010 konnte bei der Betrachtung aller negativen und positiven Untersuchungen (MDS-EpG) bei den Texel Schafen ein niedriger Mittelwert von 94,64 (SD: $\pm 136,12$; Min: 0; Max: 700) als bei den Soay Schafen mit einem Mittelwert von ca. 130,70 (SD: $\pm 193,94$; Min: 0; Max: 950) festgestellt werden.

Bei der Betrachtung aller ausschließlich MDS-EpG positiven Untersuchungsergebnisse (MDS-EpG>0) konnte im Jahr 2009 ein geringerer Mittelwert von 382,50 (SD: $\pm 331,96$; Min: 100; Max: 1400) für die Soay Schafe im Gegensatz zu den Texel Schafen mit einem Mittelwert von 663,00 (SD: $\pm 572,88$; Min: 100, Max: 2600), im Jahr 2010 ein höherer Mittelwert von 217,80 (SD: $\pm 209,23$; Min: 50; Max: 950) für Soay Schafe und ein niedrigerer Mittelwert für Texel Schafe von 163,10 (SD: $\pm 144,23$; Min: 50; Max: 700) nachgewiesen werden. Bei der Betrachtung der Minima aller MDS-EpG positiven Tiere sollte die untere Nachweisgrenze der McMaster Technik im Jahr 2009 von 100 und im Jahr 2010 von 50 berücksichtigt werden.

Die Mittelwerte für die logarithmierten MDS-EpG-Daten je Untersuchungsdatum werden unter Abb. Nr. 5 in den Streudiagrammen getrennt nach Schafrasse und Untersuchungsjahr

Ergebnisse

dargestellt. Zu den Untersuchungszeitpunkten: 09.08.2009 (p-Wert: 0,021*, signifikant), 21.09.2009 (p-Wert: 0,008**, hoch signifikant), 04.10.2009 (p-Wert: 0,008**, hoch signifikant) und 20.10.2009 (p-Wert: 0,004**, hoch signifikant) unterscheidet sich der Mittelwert der logarithmierten MDS-EpG-Daten zwischen den Schafrassen signifikant bzw. hoch signifikant. Im Jahr 2010 unterscheidet sich der Mittelwert der logarithmierten MDS-EpG-Daten zwischen beiden Schafrassen signifikant am 16.10.2010 (p-Wert: 0,039*, signifikant). Der mittlere logarithmierte MDS-EpG für das gesamte Untersuchungsjahr 2009 unterschied sich für die beiden Schafrassen signifikant (Welch-Two-Sample-t-Test, p-Wert: $\leq 0,001^{***}$), im Untersuchungsjahr 2010 hingegen nicht signifikant (p-wert: 0,47, n. s.).

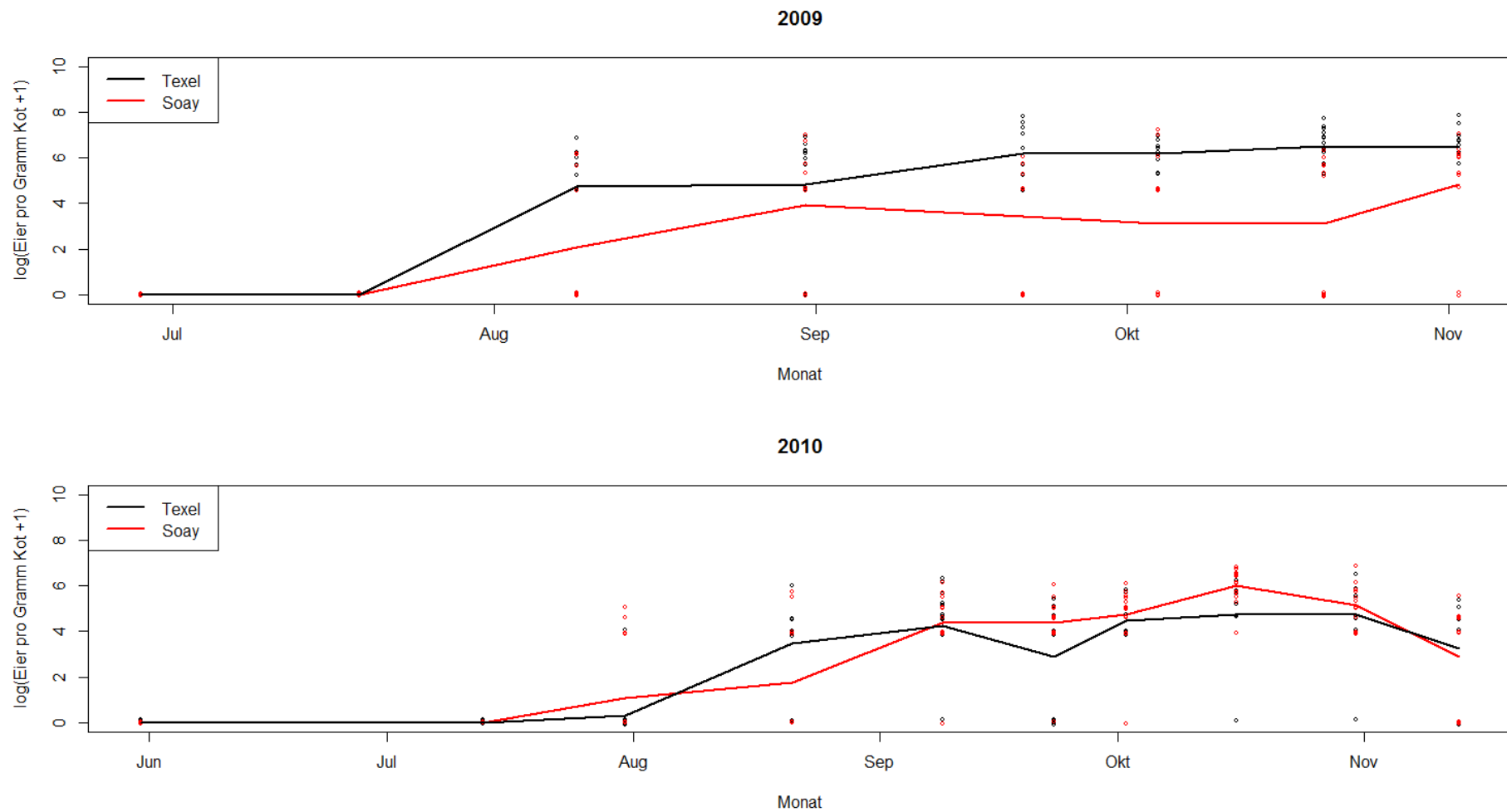


Abbildung 5: Verlauf der arithmetischen Mittelwerte der logarithmierten MDS-EpG-Daten getrennt nach Schafrasse und Jahr

1.6.2 *Strongyloides papillosus* Eizahl pro Gramm Kot

Die Prävalenz einer *Strongyloides (S.) papillosus*-Ei positiven Kotuntersuchung lag in beiden Untersuchungsjahren bei den Soay Schafen niedriger (2009: 0,32; 2010: 0,30) als bei den Texel Schafen (2009: 0,38; 2010: 0,48).

Bei der Betrachtung der Häufigkeit aller *S. papillosus*-Ei negativen (EpG1=0) und positiven (EpG1>0) Kotuntersuchungen konnte für das Jahr 2009 bei der Soay Schafgruppe ein Mittelwert von 60,23 (SD: ±128,24; Min: 0; Max: 700), bei der Texel Schafgruppe ein Mittelwert von 52,38 (SD: ±79,78; Min: 0; Max: 400), für das Jahr 2010 bei der Soay Schafgruppe ein Mittelwert von 30,34 (SD: ±63,55; Min: 0; Max: 400), bei der Texel Schafgruppe ein Mittelwert von 52,23 (SD: ±82,85; Min: 0; Max: 500) festgestellt werden.

Bei der Betrachtung der Höhe aller *S. papillosus*-Ei positiven Kotuntersuchungen (EPG1>0) im Jahr 2009 konnte bei den Texel Schafen ein geringerer Mittelwert von 137,5 (SD: ±70,48; Min: 100; Max: 400) als bei den Soay Schafen 189,3 (SD: ±166,31; Min: 100; Max: 700) festgestellt werden. Im Jahr 2010 war die *S. papillosus*-Eiausscheidung im Mittel bei beiden Schafrassen nahezu gleich (Mittelwert der Soay Schafe: 102,3 (SD: ±79,40; Min: 50; Max: 400); Mittelwert der Texel Schafe: 108,3 (SD: ±90,74; Min: 50; Max: 500)). Die Ergebnisse der statistisch erhobenen Werte sind abhängig von der unteren Nachweisgrenze der McMaster Technik.

Im Untersuchungsjahr 2009 unterschied sich an keinem der Untersuchungszeitpunkte der mittlere logarithmierte *S. papillosus*-EpG zwischen den Schafrassen signifikant. Im Untersuchungsjahr 2010 konnte am 31.07.2010 und 23.09.2010 ein signifikanter Unterschied des mittleren logarithmierten *S. papillosus*-EpG nachgewiesen werden (Welch-Two-Sample-t-Test, p-Wert: 31.07.2010: 0,04*, 23.09.2010: 0,05*). Der mittlere logarithmierte *S. papillosus*-EpG für das gesamte Jahr 2009 unterschied sich zwischen den Schafrassen nicht signifikant (p-wert: 0,46 n.s.), hingegen für das Jahr 2010 hoch signifikant (Welch-Two-Sample-t-Test, p-Wert: 0,003**). In den folgenden Streudiagrammen (Abb. Nr. 6) werden die Mittelwerte der logarithmierten *S. papillosus*-EpG-Daten nach Schafrasse und Untersuchungsjahr getrennt dargestellt.

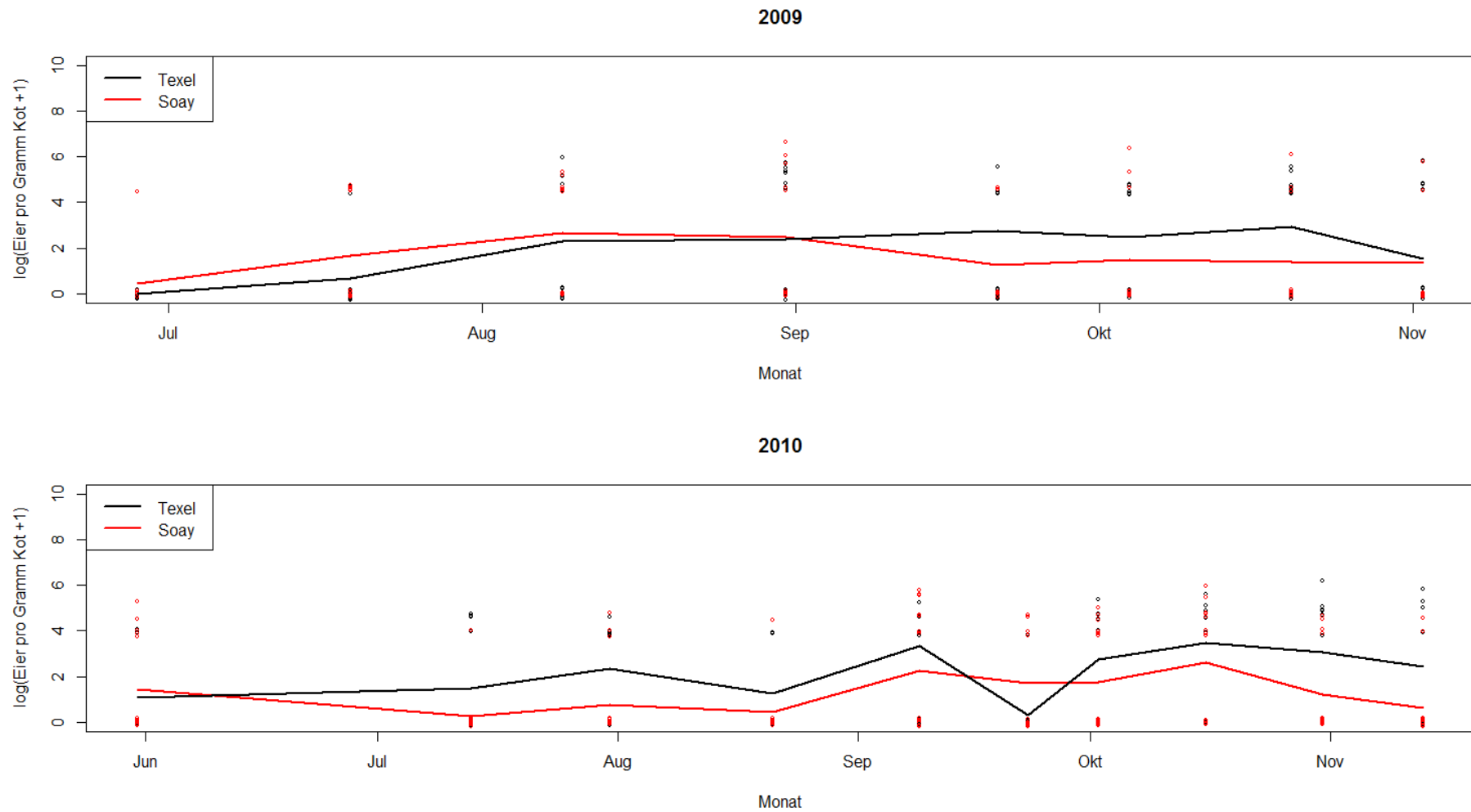


Abbildung 6: Verlauf der arithmetischen Mittelwerte der logarithmierten *S. papillosus*-EpG-Daten getrennt nach Schafrasse und Jahr

1.6.3 Kokzidien-Oozysten Anzahl pro Gramm Kot

Die Prävalenz (relative Häufigkeit) einer Kokzidien-Oozysten positiven Kotuntersuchung lag bei den Soay Schafen in 2009: 0,84 und 2010: 0,79 und bei den Texel Schafen 2009: 0,82 und 2010: 0,81.

Bei der Betrachtung aller Kokzidien-OpG positiven (OpG>0) und negativen (OpG=0) Untersuchungen im Jahr 2009 konnte für die Soay Schafe ein niedrigerer Mittelwert von 1660,00 (SD: $\pm 2715,16$; Min: 0; Max: 19700) und für die Texel Schafe ein höherer Mittelwert von 2372,00 (SD: $\pm 4963,49$; Min: 0; Max: 39000) ermittelt werden. Im Jahr 2010 lag der Mittelwert für Soay Schafe bei 2327,00 (SD: $\pm 11233,24$; Min: 0; Max: 132000) und für Texel Schafe bei 2153,00 (SD: $\pm 4840,56$; Min: 0; Max: 36000). Die Kokzidien-Oozysten-Maxima im Kot wurden im Jahr 2009 von den Texel Schafen, im Jahr 2010 von den Soay Schafen erreicht.

Bei der Betrachtung der Höhe aller Kokzidien-Oozysten positiven Kotuntersuchungen (OpG>0) konnte für die Soay Schafe im Jahr 2009 ein niedrigerer Mittelwert von 1974,00 (SD: $\pm 2856,10$; Min: 100; Max: 19700) als bei den Texel Schafen 2897,00 (SD: $\pm 5348,57$; Min: 100; Max: 39000), im Jahr 2010 aber ein höherer Mittelwert von 2934,00 (SD: $\pm 12553,72$; Min: 50; Max: 132000) bei den Soay- als bei den Texel Schafen 2650,00 (SD: $\pm 5250,42$; Min: 50; Max: 36000) ermittelt werden.

Im Streudiagramm (Abb. Nr. 7) werden die Mittelwerte des logarithmierten OpGs getrennt nach Schafrasse und Untersuchungsjahr dargestellt. Der am 31.07.2010 auffällige Einbruch des OpGlog's beider Schafrassen erfolgte nach der Behandlung aller Schafe mit Toltrazuril (Baycox[®], Bayer AG, Leverkusen) am 13.07.2010. Die Mittelwerte der logarithmierten OpG-Daten unterschieden sich zwischen den beiden Schafrassen im Jahr 2009 signifikant am 04.10.2009 (p-Wert: 0,017*, signifikant), im Jahr 2010 am 13.07.2010 (p-Wert: 0,002**, hoch signifikant) und 16.10.2010 (p-Wert: 0,041*, signifikant). In beiden Untersuchungsjahren unterschied sich der mittlere logarithmierte OpG zwischen den Schafrassen nicht signifikant (Welch-Two-Sample-t-Test, p-Wert: 2009: 0,68 und 2010: 0,27).

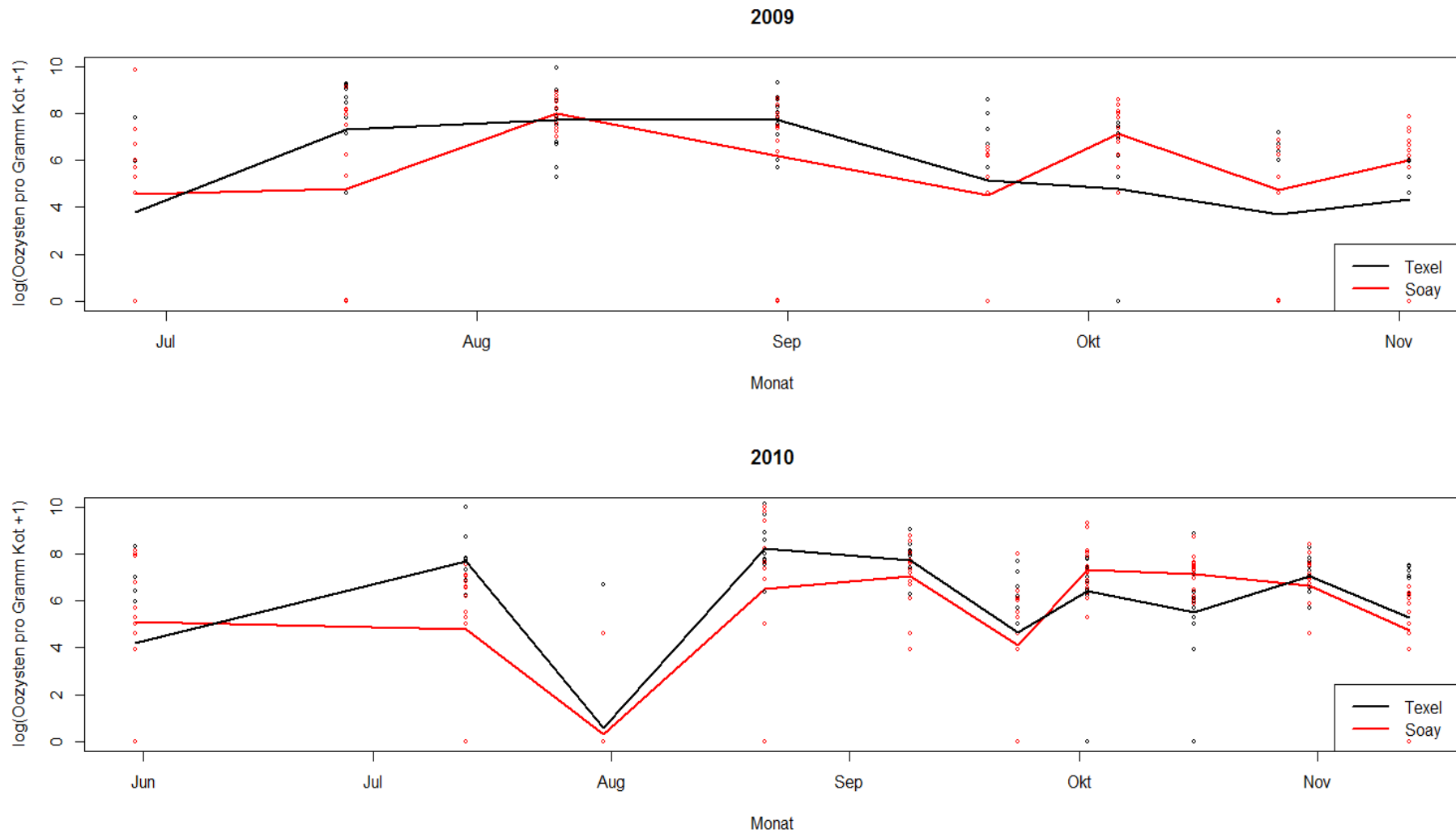


Abbildung 7: Verlauf der arithmetischen Mittelwerte der logarithmierten OpG-Daten getrennt nach Schafrasse und Jahr

1.6.4 *Nematodirus* spp.

Bei der Untersuchung am 01.11.2009 konnten *Nematodirus* spp.-Eier im Kot von 5 Tieren und an den Untersuchungsdaten 21.08.2010, 09.09.2010, 16.10.2010, 31.10.2010 und 13.11.2010 vereinzelt *Nematodirus* spp.-Eier im Kot der Tiere nachgewiesen werden. Aufgrund der geringen Prävalenz der *Nematodirus* spp.-Eier in der koproskopischen Untersuchung wurde auf eine Interpretation der *Nematodirus* spp.-EpG verzichtet.

1.6.5 Korrelationen

Im Anschluß an die Betrachtung der einzelnen Parameter, wurden die Variablen mit der Pearson- und Spearmans Rang-Korrelation auf Interaktionen untereinander untersucht. Die Ergebnisse der Betrachtung sind in den dem Text folgenden Tabellen Nr. 16 und 17 aufgelistet. Bei der Betrachtung der transformierten Variablen mit der Korrelation nach Pearson wird den Variablen eine starke Abhängigkeit zugesprochen, je mehr sie sich den Werten 1 bzw. -1 annähern. Voraussetzung für die Anwendung ist die Normalverteilung der Daten bzw. eine parametrische Korrelation. Werte $<0,2$ stehen für eine sehr schwache Abhängigkeit. Werte zwischen 0,2 - 0,4 stehen für eine schwache, Werte zwischen 0,4 - 0,6 für eine mittlere, Werte von 0,6 - 0,8 für eine starke und $>0,8$ für eine sehr starke Abhängigkeit der Variablen. Während die Daten bei der Korrelation nach Pearson in einem linearen Zusammenhang betrachtet werden, ist dieser Zusammenhang bei der Spearmans Rang-Korrelation monoton, d. h. der Rang verändert sich nicht mit der Transformation.

Für die Variablen MDS-EpGlog und die Gewichtsveränderung konnte mittels Pearson- und Spearmans Rang-Korrelation eine schwach negative Korrelation, für die Variablen MDS-EpGlog und *S. papillosus*-EpGlog eine schwach positive Korrelation ermittelt werden. Alle anderen aufgeführten Variablen waren nur sehr schwach miteinander korreliert.

Tabelle 16: Ergebnisse der Betrachtung der Variablen (transformierte Daten) mit der Korrelation nach Pearson

	Gewicht	EpG2log	OpGlog	EpG1log	sfarbe	hwertd
EpG2log	-0,31	1,00	0,16	0,29	0,07	0,01
OpGlog	-0,11	0,16	1,00	0,08	0,03	0,05
EpG1log	-0,06	0,29	0,08	1,00	0,09	-0,01
sfarbe	0,04	0,07	0,03	0,09	1,00	-0,05
hwertd	-0,05	0,01	0,05	-0,01	-0,05	1,00
Gewicht	1,00	-0,31	-0,11	-0,06	0,04	-0,05

(EpG2log: logarithmierter MDS-EpG, EpG1log: logarithmierter *S. papillosus*-EpG, OpGlog: logarithmierter OpG, sfarbe: FAMACHA[®] Anaemia guide Kategorie, hwertd: Hämatokritwertabweichung, Gewicht: Gewichtsveränderung)

Tabelle 17: Ergebnisse der Betrachtung der Variablen (transformierte Daten) mit der Spearmans Rang Korrelation

	Gewicht	EpG2log	OpGlog	EpG1log	sfarbe	hwertd
EpG2log	-0,32	1,00	0,08	0,31	0,05	-0,003
OpGlog	-0,07	0,08	1,00	0,08	0,03	0,08
EpG1log	-0,06	0,31	0,08	1,00	0,09	-0,00009
sfarbe	0,08	0,05	0,03	0,09	1,00	-0,05
hwertd	-0,07	-0,003	0,08	-0,00009	-0,05	1,00
Gewicht	1,00	-0,32	-0,07	-0,06	0,08	-0,07

(EpG2log: logarithmierter MDS-EpG, EpG1log: logarithmierter *S. papillosus*-EpG, OpGlog: logarithmierter OpG, sfarbe: FAMACHA[®] Anaemia guide Kategorie, hwertd: Hämatokritwertabweichung, Gewicht: Gewichtsveränderung)

1.6.6 Larvenauswanderungsverfahren nach Baermann Wetzel

Bei allen durchgeführten Larvenauswanderungsverfahren in den Jahren 2009 und 2010 konnten keine Lungenwurmlarven festgestellt werden.

1.7 Sektion

Im Jahr 2009 konnte die Sektion nicht wie bereits im Material- und Methodenteil beschrieben, durchgeführt werden. Die Labmägen und Dünndärme wurden nachdem sie aus den Tierkörpern entnommen wurden, kurzzeitig eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt hinsichtlich der adulten Helminthen untersucht. Der Zustand der kleineren adulten Würmer war teilweise so schlecht, dass die Anzahl der adulten *Teladorsagia* spp. nur geschätzt und *Trichostrongylus* spp. des Dünndarms nicht erfasst wurden. Die Auszählung der adulten *H. contortus* war hingegen möglich. Alle Labmägen der Sektion 2009 waren mit *H. contortus* befallen (Soay Schafe: Summe: 77, arithmet. Mittel: 25,67, SD: $\pm 25,01$, Min.: 1, Max.: 51; Texel Schafe: Summe: 607, arithmet. Mittel: 202,33, SD: $\pm 198,97$, Min.: 82, Max.: 432; Soay- und Texel Schafe: Summe: 684, arithmet. Mittel: 114, SD: $\pm 159,53$, Min.: 1, Max.: 432). Die Untersuchungsergebnisse der Sektion 2009 sind insgesamt kritisch zu sehen, da von einer eigentlichen Mischinfektion ausgegangen werden muss, die nicht erfasst werden konnte. Die Ergebnisse der Sektion 2009 werden in der dem Text folgenden Tabelle Nr. 18 dargestellt.

Tabelle 18: Anzahl der adulten *H. contortus* der Labmagen-Sektion 2009

Schaf ID	Rasse	<i>H. contortus</i> -Anzahl
694	Soay	51
635	Soay	25
632	Soay	1
743	Texel	82
730	Texel	93
749	Texel	432

Im Jahr 2010 wurde die Sektion wie im Material- und Methodenteil beschrieben durchgeführt. Im Jahr 2010 konnte bei der Sektion der Labmägen der Soay- und Texel

Schafe in allen Labmägen ein *T. circumcincta* Befall nachgewiesen werden. *H. contortus* sowie *T. trifurcata* konnten nur in jeweils einem der drei Labmägen der Soay Schafe gefunden werden, zwei Labmägen waren gemischt infiziert. Innerhalb der Texelschafe konnte der Befall zweier Labmägen mit *H. contortus* und jeweils eines Labmagens mit *T. trifurcata* und *Tr. colubriformis*, sowie Mischinfektionen aller Labmägen festgestellt werden. Von allen Helminthenspezies bis auf *T. trifurcata* konnten sowohl weibliche als auch männliche adulte Wurmstadien gefunden werden. In der folgenden Tabelle Nr. 19 werden die Labmagen-Sektionsergebnisse des Jahres 2010 dargestellt.

Tabelle 19: Anzahl der adulten Helminthen der Labmagen-Sektion 2010

Schaf-ID	Rasse	<i>H. contortus</i>	<i>Teladorsagia</i> spp.	<i>Trichostrongylus</i> spp.
915	Soay	0	291	0
881	Soay	0	15	0
961	Soay	13	297	0
887	Texel	21	109	0
954	Texel	4	32	0
958	Texel	0	8	3

In der Sektion konnte ein Befall der Soay-Labmägen mit insgesamt 13 (arithmet. Mittel: 4,34, SD: $\pm 7,51$, Min.: 0, Max.: 13) adulten *H. contortus* und 603 adulten *Teladorsagia* spp. (arithmet. Mittel: 201, SD: $\pm 161,11$, Min.: 15, Max.: 297) sowie ein gesamter Befall der Texel-Labmägen mit ca. 25 (arithmet. Mittel: 8,33, SD: $\pm 11,15$, Min.: 0, Max.: 21) adulten *H. contortus*, 149 (arithmet. Mittel: 49,67, SD: $\pm 52,77$, Min.: 8, Max.: 109) adulten *Teladorsagia* spp. und drei (arithmet. Mittel: 1, SD: $\pm 1,73$, Min.: 0, Max.: 3) adulten *Trichostrongylus* spp. festgestellt werden. Die höchste Prävalenz der Labmagen-Helminthen konnte in der Sektion der Soay- und Texel Schafe *Teladorsagia* spp. (1), gefolgt von *H. contortus* (0,5) und *Trichostrongylus* spp. (0,17) zugeschrieben werden.

Bei der Dünndarm-Sektion im Jahr 2010 konnte bei den Soay- und Texel Schafen eine Mischinfektion aller Dünndärme mit adulten weiblichen und männlichen *Trichostrongylus* spp. (*Tr. vitrinus* und *Tr. colubriformis*) und *Nematodirus* spp. wie auch teilweise ein geringer Befall mit *T. circumcincta* nachgewiesen werden. Die Soay Schaf-Dünndärme waren insgesamt mit 2 (arithmet. Mittel: 0,7, SD: $\pm 0,67$, Min.: 0, Max.: 1) adulten

Ergebnisse

Teladorsagia spp., 563 (arithmet. Mittel: 281,5, SD: $\pm 167,60$, Min.: 35, Max.: 367) adulten *Trichostrongylus* spp. und 574 (arithmet. Mittel: 191,33, SD: $\pm 269,73$, Min.: 1, Max.: 500) adulten *Nematodirus* spp. befallen. Die Texel Schaf-Dünndarme waren insgesamt mit 6 *Teladorsagia* spp. (arithmet. Mittel: 2, SD: $\pm 3,46$, Min.: 0, Max.: 6), 217 (arithmet. Mittel: 72,33, SD: $\pm 39,51$, Min.: 37, Max.: 115) *Trichostrongylus* spp. und 11 (arithmet. Mittel: 3,67, SD: $\pm 4,04$, Min.: 0, Max.: 8) *Nematodirus* spp. befallen. Die Prävalenz unter den in der Sektion gefundenen Dünndarm-Helminthen ist insgesamt am höchsten für *Trichostrongylus* spp. (1), gefolgt von *Nematodirus* spp. (0,83) und *Teladorsagia* spp. (0,5). Die Ergebnisse der Dünndarm-Sektion 2010 werden in der dem Text folgenden Tabelle Nr. 20 dargestellt.

Tabelle 20: Anzahl der adulten Helminthen der Dünndarm-Sektion 2010

Schaf-ID	Rasse	<i>Teladorsagia</i> spp.	<i>Trichostrongylus</i> spp.	<i>Nematodirus</i> spp.
915	Soay	1	367	500
881	Soay	0	35	1
961	Soay	1	161	73
887	Texel	0	65	8
954	Texel	6	115	3
958	Texel	0	37	0

Im folgenden Balkendiagramm (Abbildung Nr. 8) wird die Gesamtanzahl der in der Sektion nachgewiesenen adulten Helminthen von Labmagen und Dünndarm der beiden Schafrassen dargestellt. Die Prävalenz für die in der Sektion gefundenen Labmagen- und Dünndarm-Helminthen ist für *Trichostrongylus* spp. (1) und *Teladorsagia* spp. (1) am höchsten, gefolgt von *Nematodirus* spp. (0,83) und *H. contortus* (0,5). Im Mittel waren Soay Schafe in der Sektion 2010 mit 4,3 (SD: $\pm 7,51$) *H. contortus*, 201,67 (SD: $\pm 161,69$) *Teladorsagia* spp., 187 (SD: $\pm 167,76$) *Trichostrongylus* spp., 191,33 (SD: $\pm 269,73$) *Nematodirus* spp. und die Texel Schafe mit 8,3 (SD: $\pm 11,15$) *H. contortus*, 51,67 (SD: $\pm 51,87$) *Teladorsagia* spp., 73,33 (SD: $\pm 38,19$) *Trichostrongylus* spp. und 3,67 (SD: $\pm 4,04$) *Nematodirus* spp. befallen.

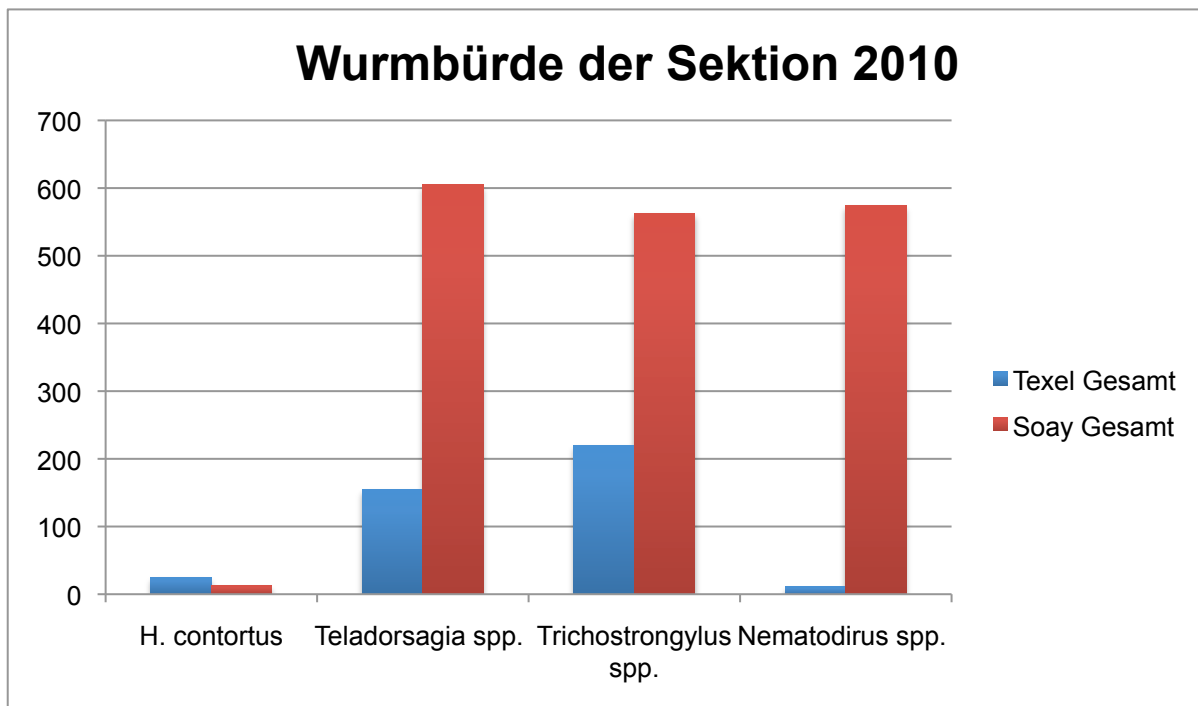


Abbildung 8: Gesamtanzahl der bei der Sektion 2010 nachgewiesenen adulten Helminthen im Labmagen und Dünndarm beider Schafrassen

Aufgrund der geringen Fallzahl wurde von weiteren Interpretationen der Sektionsergebnisse abgesehen. Ein Vergleich zwischen den Jahren 2009 und 2010 ist aufgrund der unterschiedlichen Untersuchungstechniken nur in Bezug auf den *H. contortus* Befall des Labmagens möglich. Bei den seziierten Soay- und Texel Schafen im Jahr 2009 konnte ein stärkerer *H. contortus*-Befall der Labmägen nachgewiesen werden als im Jahr 2010.

In der folgenden Betrachtung wurden die Ergebnisse der Sektion 2009 und 2010 mit den Untersuchungsergebnissen vom 02.11.2009 und 13.11.2010 auf Zusammenhänge untersucht. Wenn man wie bei der Sektion 2009 allein die adulten *H. contortus* betrachtet, war die Wurmanzahl der adulten *H. contortus* leicht negativ, jedoch nicht signifikant korreliert mit dem MDS-EpGlog (p-Wert: 0,9561) und signifikant negativ korreliert mit dem Hämatokritwert vom 02.11.2009 (p-Wert: 0,00301**). Wenn man die gesamte adulte Wurmanzahl (Labmagen- und Dünndarm-Helminthen) aus der Sektion 2010 betrachtet, ist diese signifikant negativ korreliert mit dem MDS-EpGlog vom 13.11.2010 (p-Wert: 0,04584[†]) und nicht signifikant, leicht negativ korreliert mit dem Hämatokritwert vom 13.11.2010 (p-Wert: 0,784; n.s.). Die FAMACHA[®] Anaemia guide Kategorie vom 13.11.2010 unterschied sich nicht bei den Tieren in der Sektion 2010.

Ergebnisse

1.8 Gattungsspezifische PCR

Die gattungsspezifische PCR wurde nur im Untersuchungsjahr 2010 mit aus Larven gewonnener DNA durchgeführt. Es fehlen die PCRs für die Probenahmen vom 21.08.2010, 09.09.2010 und 13.11.2010. Aus den Sammelkotproben vom 13.07.2010 konnten keine Larven angezüchtet werden. Insgesamt waren 17 PCRs von insgesamt 40 PCRs negativ (siehe Tabelle Nr. 21 und Abbildung Nr. 9). 13 Soay Schaf-PCRs und 10 Texel Schaf-PCRs waren positiv. Innerhalb der Soay Schafgruppe konnte am häufigsten *Tr. colubriformis* (Relative Häufigkeit von 1), gefolgt von *H. contortus* (Relative Häufigkeit von 0,8) und *T. circumcineta* (Relative Häufigkeit von 0,8) nachgewiesen werden. Bei den Texel Schafen wurden am häufigsten *Tr. colubriformis* (Relative Häufigkeit von 0,8) und *H. contortus* (Relative Häufigkeit von 0,8), gefolgt von *T. circumcineta* (Relative Häufigkeit von 0,4) nachgewiesen.

Tabelle 21: Ergebnisse der gattungsspezifischen PCR

Probennahme- datum	Rasse	<i>H.</i> <i>contortus</i>	<i>T.</i> <i>circumcineta</i>	<i>Tr.</i> <i>colubriformis</i>	<i>O.</i> <i>leptospicularis</i>
31.07.2010	S	+	+	+	0
31.07.2010	T	+	+	+	0
23.09.2010	S	+	0	+	0
23.09.2010	T	+	0	+	0
02.10.2010	S	0	+	+	0
02.10.2010	T	+	+	+	0
16.10.2010	S	+	+	+	0
16.10.2010	T	0	0	+	0
31.10.2010	S	+	+	+	0
31.10.2010	T	+	0	0	0

Legende: Soay Schafe (S), Texel Schafe (T), positiv (+), negativ (0)

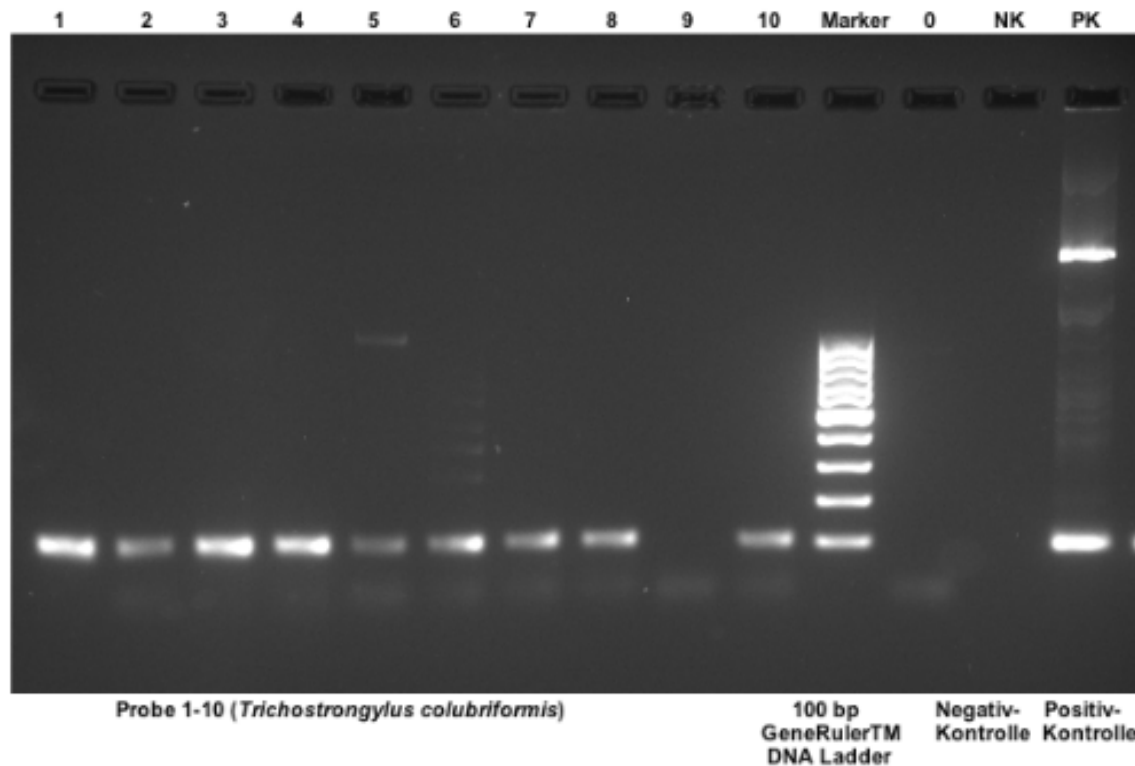


Abbildung 9: Beispiel für das Ergebnis einer qualitativen gattungsspezifischen PCR für *Tr. colubriformis* (die nachgewiesenen Banden liegen bei 100 bp)

2 Analytische Statistik

Nachdem die einzelnen Variablen deskriptiv untersucht wurden, wurden anschließend für verschiedene abhängige Variablen wie dem logarithmierten *S. papillosus*-EpG (EpG1log), dem logarithmierten MDS-EpG (EpG2log), dem logarithmierten Kokzidien-OpG (OpGlog) oder der Hämatokritwertabweichung Modelle gefittet, welche den Einfluss mehrerer unabhängiger Variablen wie Geschlecht, Rasse, Jahr oder Gewichtsveränderung gemeinsam betrachteten. Die Wahl fiel dabei auf „Generalisierte Lineare Gemischte Modelle“ (GLMM), da diese sowohl für stetige als auch für dichotome abhängige Variablen geeignet sind. Außerdem sind die Messungen nicht unabhängig voneinander, da dieselben Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht wurden. Dieses wurde über einen sogenannten zufälligen Effekt modelliert (daher auch der Ausdruck „mixed“, für fixe interessierende Effekte und zufällige Effekte).

Im Folgenden werden nun die einzelnen Modelle und die zugehörigen Effekte vorgestellt und interpretiert. Im „Linearen Gemischten Modell“ (LMM) wurde sich mit der Frage befaßt, wie hoch die Belastung der Tiere (Befallsstärke) mit dem jeweiligen Parameter ist. Daher wurde nur der positive Datensatz (>0) der Parameter logarithmierter *S. papillosus*-EpG,

Ergebnisse

MDS-EpG und Kokzidien-OpG betrachtet. Im GLMM hingegen wurde sich auf die Frage konzentriert, ob im Kot der Tiere Eier bzw. Oozysten nachgewiesen werden konnten oder nicht (Prävalenz). Daher wurde der Datensatz >0 und $=0$ betrachtet und die Daten wie binäre Daten behandelt. Im Anschluß wurde mittels Rückwärts-Selektion schrittweise der jeweils fixe Effekt mit dem höchsten p-Wert einzeln eliminiert und das Modell erneut berechnet bis zuletzt nur noch die statistisch signifikanten Variablen in einem reduzierten Modell verblieben. Wenn die Interaktion (Rasse 2 :Jahr 2010) den untersuchten Parameter im Modell signifikant beeinflusste, wurden die Hypothesen zusätzlich über ein lineares Hypothesensystem getestet. Die Anpassung des vollen und reduzierten Modells wurden mittels ANOVA (Analysis of Variance) bzw. LQ-Test (Likelihood-Quotienten-Test) miteinander verglichen. Die Daten wurden hinsichtlich ihrer Verteilung und Varianzhomogenität überprüft.

2.1 Gewichtsveränderung, LMM (1)

In den folgenden Tabellen sind die Untersuchungsergebnisse für den Parameter Gewichtsveränderung im LMM, zunächst in einem vollen Modell (Tabelle Nr. 22) und darauffolgend in einem reduzierten Modell (Tabelle Nr. 23) in Abhängigkeit zu den aufgelisteten Variablen (jeweils linke Spalte) dargestellt. Die Modelle wurden anschließend mittels ANOVA bzw. LQ-Test verglichen (Tabelle Nr. 24).

Formel: $y_{ij} = \beta_0 + \beta_1 \text{ Geschlecht}_i + \beta_2 \text{ Rasse}_i + \beta_3 \text{ EpG1log}_{ij} + \beta_4 \text{ EpG2log}_{ij} + \beta_5 \text{ OpGlog}_{ij} + \beta_6 \text{ hwertd}_{ij} + \beta_7 \text{ sfarbe}_{ij} + \beta_8 \text{ Rasse:Jahr}_{ij} + \beta_9 \text{ Jahr}_{ij} + \gamma_i + \gamma_j + \varepsilon_{ij}$

Tabelle 22: Ergebnisse des LMM (1) für die Gewichtsveränderung

Fixe Effekte (Variable)	Koeffizienten (Estimate)	Standardfehler (Std. Error)	t-Wert	p-Wert
(Intercept)	-0,0213	0,0433	0,492	0,6264
EpG1log	0,0023	0,0020	1,133	0,2581
OpGlog	0,0008	0,0018	0,442	0,6589
EpG2log	-0,0027	0,0023	-1,183	0,2377
Jahr 2010	0,0141	0,0478	0,294	0,7733
Rasse 2	-0,0095	0,0218	-0,433	0,6708

Geschlecht 1	0,0027	0,0093	0,290	0,7716
hwertd	0,0024	0,0012	2,086	0,0378*
sfarbe	0,0106	0,0109	0,974	0,3309
Interaktion Rasse 2: Jahr 2010	-0,0033	0,0299	-0,111	0,9130

(Signifikanz-Code: $p \leq 0,001$ ***, $p \leq 0,01$ ** , $p \leq 0,05$ *; EpG1log: logarithmierter *S. papillosus*-EpG, OpGlog: logarithmierter OpG, EpG2log: logarithmierter MDS-EpG, Rasse 2: Texel Schafe, Geschlecht 1: Weibliche Tiere, hwertd: Hämatokritwertabweichung, sfarbe: FAMACHA[®] Anaemia guide Kategorie)

Tabelle 23: Ergebnisse des reduzierten LMM (1red) für die Gewichtsveränderung

Fixe Effekte (Variable)	Koeffizienten (Estimate)	Standardfehler (Std. Error)	t-Wert	p-Wert
(Intercept)	0,0335	0,0119	2,828	0,0095**
hwertd	0,0024	0,0011	2,086	0,0377*

(Signifikanz-Code: $p \leq 0,001$ ***, $p \leq 0,01$ ** , $p \leq 0,05$ *; hwertd: Hämatokritwertabweichung)

Tabelle 24: Ergebnisse des Vergleichs zwischen vollem (1) und reduzierten (1red) LMM für die Gewichtsveränderung mittels ANOVA und Chi-Quadrat-Test

Modell	Df	AIC	BIC	logLik	Dev	LQ	Chisq	Df	Pr(<Chisq)
1red	7	-721,64	-694,62	367,82	-735,64	1red			
1	15	-711,14	-653,23	370,57	-741,14	vs. 1	5,54998	8	0,7031

(Df: Degrees of freedom, AIC: Akaike Information Criterion, BIC: Bayesian Information Criterion, logLik: log-Likelihood, Dev: Abweichung, LQ: LQ-Test, Chisq: Chi-Quadrat-Test, Pr(<Chisq): p-Wert für den Chi-Quadrat-Test, red: reduziert)

Die Hämatokritwertabweichung beeinflusste die Gewichtsveränderung signifikant (p-Wert: 0,0377*). Je höher die Hämatokritwertabweichung desto höher die Gewichtsveränderung (siehe positiver Koeffizient für hwertd). Das reduzierte Modell wurde gewählt, da das AIC im

Ergebnisse

Vergleich zum vollen Modell niedriger ist. Das reduzierte Modell war nicht signifikant besser als das volle Modell (p-Wert: 0,7031).

2.2 FAMACHA[®] Anaemia guide Kategorie, LMM (2)

In den folgenden Tabellen sind die Untersuchungsergebnisse für den Parameter FAMACHA[®] Anaemia guide im LMM, zunächst in einem vollen Modell (Tabelle Nr. 25) und darauffolgend in einem reduzierten Modell (Tabelle Nr. 26) in Abhängigkeit zu den aufgelisteten Variablen (jeweils linke Spalte) dargestellt. Die Modelle wurden anschließend mittels ANOVA bzw. LQ-Test verglichen (Tabelle Nr. 27).

$$\text{Formel: } y_{ij} = \beta_0 + \beta_1 \text{ Geschlecht}_i + \beta_2 \text{ Rasse}_i + \beta_3 \text{EpG1log}_{ij} + \beta_4 \text{EpG2log}_{ij} + \beta_5 \text{OpGlog}_{ij} + \beta_6 \text{hwertd}_{ij} + \beta_7 \text{gewichtszunahme}_{ij} + \beta_8 \text{Rasse:Jahr}_{ij} + \beta_9 \text{Jahr}_{ij} + \gamma_i + \gamma_j + \varepsilon_{ij}$$

Tabelle 25: Ergebnisse des LMM (2) für die FAMACHA[®] Anaemia guide Kategorie

Fixe Effekte (Variable)	Koeffizienten (Estimate)	Standardfehler (Std. Error)	t-Wert	p-Wert
(Intercept)	1,976	0,0793	24,94	<2 ^{-16***}
EpG1log	0,0093	0,0098	0,944	0,3461
OpGlog	0,0006	0,0082	0,076	0,9398
EpG2log	0,0099	0,0100	0,987	0,3253
Jahr 2010	0,2413	0,0620	3,893	0,00019***
Rasse 2	-0,0253	0,0843	-0,301	0,7676
Geschlecht 1	-0,0373	0,0461	-0,810	0,4184
Gewichtsveränderung	0,2299	0,2260	1,017	0,3101
hwertd	-0,0049	0,0050	-0,968	0,3340
Interaktion Rasse 2: Jahr 2010	0,0824	0,1165	0,707	0,4906

(Signifikanz-Code: p≤0,001***, p≤0,01**, p≤0,05*; EpG1log: logarithmierter *S. papillosus*-EpG, OpGlog: logarithmierter OpG, EpG2log: logarithmierter MDS-EpG, Rasse 2: Texel Schafe, Geschlecht 1: Weibliche Tiere, hwertd: Hämatokritwertabweichung)

Tabelle 26: Ergebnisse des reduzierten LMM (2red) für die FAMACHA® Anaemia guide Kategorie

Fixe Effekte (Variable)	Koeffizienten (Estimate)	Standardfehler (Std. Error)	t-Wert	p-Wert
(Intercept)	2,0149	0,0432	46,614	<2 ⁻¹⁶ ***
Jahr 2010	0,2544	0,0583	4,363	0,000415***

(Signifikanz-Code: p≤0,001***, p≤0,01**, p≤0,05*)

Tabelle 27: Ergebnisse des Vergleichs zwischen vollem (2) und reduzierten (2red) LMM für die FAMACHA® Anaemia guide Kategorie mittels ANOVA und Chi-Quadrat-Test

Modell	Df	AIC	BIC	logLik	Dev	LQ	Chisq	Df	Pr(<Chisq)
2red	7	372,88	399,19	-179,44	358,88	2red vs. 2			
2	15	383,46	441,37	-176,73	353,46		5,4182	8	0,7121

(Df: Degrees of freedom, AIC: Akaike Information Criterion, BIC: Bayesian Information Criterion, logLik: log-Likelihood, Dev: Abweichung, LQ: LQ-Test, Chisq: Chi-Quadrat-Test, Pr(<Chisq): p-Wert für den Chi-Quadrat-Test, red: reduziert)

Im Jahr 2010 war die FAMACHA® Anaemia guide Kategorie bei beiden Rassen höher als im Jahr 2009 (p-Wert: 0,000415***, höchst signifikant; Interaktion Jahr 2010:Rasse 2 nicht signifikant unterschiedlich). Das reduzierte Modell wurde gewählt, da das AIC im Vergleich zum vollen Modell niedriger ist. Das reduzierte Modell war nicht signifikant besser als das volle Modell (p-Wert: 0,7121).

2.3 Hämatokritwertabweichung, LMM (3)

In den folgenden Tabellen sind die Untersuchungsergebnisse für den Parameter Hämatokritwertabweichung im LMM, zunächst in einem vollen Modell (Tabelle Nr. 28) und darauffolgend in einem reduzierten Modell (Tabelle Nr. 29) in Abhängigkeit zu den aufgelisteten Variablen (jeweils linke Spalte) dargestellt. Die Modelle wurden anschließend mittels ANOVA bzw. LQ-Test verglichen (Tabelle Nr. 30).

Formel: $y_{ij} = \beta_0 + \beta_1 \text{Geschlecht}_i + \beta_2 \text{Rasse}_i + \beta_3 \text{EpG1log}_{ij} + \beta_4 \text{EpG2log}_{ij} + \beta_5 \text{OpGlog}_{ij} + \beta_6 \text{gewichtszunahme}_{ij} + \beta_7 \text{sfarbe}_{ij} + \beta_8 \text{Rasse:Jahr}_{ij} + \beta_9 \text{Jahr}_{ij} + \gamma_i + \gamma_j + \varepsilon_{ij}$

Ergebnisse

Tabelle 28: Ergebnisse des LMM (3) für die Hämatokritwertabweichung

Fixe Effekte (Variable)	Koeffizienten (Estimate)	Standardfehler (Std. Error)	t-Wert	p-Wert
(Intercept)	0,2907	1,8339	0,159	0,8749
Epg1log	-0,0368	0,0922	-0,399	0,6903
OpGlog	-0,0521	0,0866	-0,602	0,5476
EpG2log	0,1234	0,1103	1,118	0,2642
Jahr 2010	-0,0444	1,9037	-0,023	0,9818
Rasse 2	-0,8733	0,9152	-0,954	0,3558
Geschlecht 1	-0,1481	0,4267	-0,347	0,7289
Gewichtsveränderung	4,3654	2,4646	1,771	0,0774
sfarbe	-0,2916	0,5087	-0,573	0,5669
Interaktion Rasse 2: Jahr 2010	0,7883	1,2609	0,625	0,5421

(Signifikanz-Code: $p \leq 0,001^{***}$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,05^*$; EpG1log: logarithmierter *S. papillosus*-EpG, OpGlog: logarithmierter OpG, EpG2log: logarithmierter MDS-EpG, Rasse 2: Texel Schafe, Geschlecht 1: Weibliche Tiere, sfarbe: FAMACHA[®] Anaemia guide Kategorie)

Tabelle 29: Ergebnisse des reduzierten LMM (3red) für die Hämatokritwertabweichung

Fixe Effekte (Variable)	Koeffizienten (Estimate)	Standardfehler (Std. Error)	t-Wert	p-Wert
(Intercept)	-0,5362	0,7297	-0,735	0,475

(Signifikanz-Code: $p \leq 0,001^{***}$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,05^*$)

Tabelle 30: Ergebnisse des Vergleichs zwischen vollem (3) und reduzierten (3red) LMM für die Hämatokritwertabweichung mittels ANOVA und Chi-Quadrat-Test

Modell	Df	AIC	BIC	logLik	Dev	LQ	Chisq	Df	Pr(<Chisq)
3red	6	1969,7	1992,8	-978,82	1957,7	3red			

3	15	1981,9	2039,8	-975,93	1951,9	vs. 3	5,7886	9	0,7609
---	----	--------	--------	---------	--------	-------	--------	---	--------

(Df: Degrees of freedom, AIC: Akaike Information Criterion, BIC: Bayesian Information Criterion, logLik: log-Likelihood, Dev: Abweichung, LQ: LQ-Test, Chisq: Chi-Quadrat-Test, Pr(<Chisq): p-Wert für den Chi-Quadrat-Test, red: reduziert)

Die Hämatokritwertabweichung wurde von keinem Parameter signifikant beeinflusst. Tendenziell galt: Je höher die Gewichtsveränderung desto höher die Hämatokritwertabweichung (p-Wert: 0,08, nicht signifikant; Koeffizient für Gewichtsveränderung: 4,37).

2.4 Magen-Darm-Strongyliden-Eiausscheidung pro Gramm Kot, LMM (4a)

In den folgenden Tabellen sind die Untersuchungsergebnisse für den Parameter Magen-Darm-Strongyliden-Eiausscheidung pro Gramm Kot im LMM, zunächst in einem vollen Modell (Tabelle Nr. 31) und darauffolgend in einem reduzierten Modell (Tabelle Nr. 32) in Abhängigkeit zu den aufgelisteten Variablen (jeweils linke Spalte) dargestellt. Die Modelle wurden anschließend mittels ANOVA bzw. LQ-Test verglichen (Tabelle Nr. 33).

$$\text{Formel: } y_{ij} = \beta_0 + \beta_1 \text{ Geschlecht}_i + \beta_2 \text{ Rasse}_i + \beta_3 \text{ Jahr}_{ij} + \beta_4 \text{ Rasse:Jahr}_{ij} + \beta_5 \text{ gewichtszunahme}_{ij} + \gamma_i + \gamma_j + \varepsilon_{ij}$$

Tabelle 31: Ergebnisse des LMM (4a) für die MDS-EpG (EpG2log)

Fixe Effekte (Variable)	Koeffizienten (Estimate)	Standardfehler (Std. Error)	t-Wert	p-Wert
(Intercept)	5,4682	0,2560	21,362	< 2,0 ^{-16***}
Geschlecht 1	0,1315	0,1462	0,900	0,3733
Rasse 2	0,6215	0,2381	2,610	0,0141*
Jahr 2010	-0,6430	0,3084	-2,085	0,0500*
Gewichtsveränderung	-0,5506	0,5158	-1,067	0,2870
Interaktion Rasse 2: Jahr 2010	-0,7103	0,3175	-2,237	0,0334*

(Signifikanz-Code: p≤0,001***, p≤0,01**, p≤0,05*; Rasse 2: Texel Schafe, Geschlecht 1: Weibliche Tiere)

Ergebnisse

Tabelle 32: Ergebnisse des reduzierten LMM (4a red) für die MDS-EpG (EpG2log)

Fixe Effekte (Variable)	Koeffizienten (Estimate)	Standardfehler (Std. Error)	t-Wert	p-Wert
(Intercept)	5,5404	0,2375	23,331	< 2,0 ⁻¹⁶ ***
Rasse 2	0,5940	0,2306	2,576	0,0154*
Jahr 2010	-0,6503	0,3072	-2,117	0,0472*
Interaktion Rasse 2: Jahr 2010	-0,7581	0,3093	-2,451	0,0208*

(Signifikanz-Code: $p \leq 0,001$ ***, $p \leq 0,01$ ** , $p \leq 0,05$ *; Rasse 2: Texel Schafe)

Tabelle 33: Ergebnisse des Vergleichs zwischen vollem (4a) und reduzierten (4a red) LMM für die MDS-EpG (EpG2log) mittels ANOVA und Chi-Quadrat-Test

Modell	Df	AIC	BIC	logLik	Dev	LQ	Chisq	Df	Pr(<Chisq)
4ared	9	613,4	663,59	-306,70	613,40	4ared vs. 4a			
4a	11	633,45	672,78	-305,72	611,45		1,9578	2	0,3757

(Df: Degrees of freedom, AIC: Akaike Information Criterion, BIC: Bayesian Information Criterion, logLik: log-Likelihood, Dev: Abweichung, LQ: LQ-Test, Chisq: Chi-Quadrat-Test, Pr(<Chisq): p-Wert für den Chi-Quadrat-Test, red: reduziert)

Die Untersuchung über ein lineares Hypothesensystem ergab für das reduzierte Modell einen Rasseunterschied im Jahr 2009: LMM: p-Wert: >0,01*, einen Rasseunterschied im Jahr 2010: LMM: p-Wert: 0,426, einen Jahresunterschied für Soay Schafe: LMM: p-Wert: 0,034* und einen Jahresunterschied für Texel Schafe: LMM: p-Wert: 0,00000017***.

Die Rassezugehörigkeit (t-Test, p-Wert: 0,0154*) und das Untersuchungsjahr (t-Test, p-Wert: 0,0472*), sowie die Interaktion von Rasse:Jahr (t-Test, p-Wert: 0,0208*) hatten einen signifikanten Einfluß auf die Höhe der MDS-EpGlog. Das reduzierte Modell wurde gewählt, da das AIC im Vergleich zum vollen Modell niedriger ist. Das reduzierte Modell war nicht signifikant besser als das volle Modell (p-Wert: 0,3757).

Die MDS-Eiausscheidung der Texel Schafe war im Jahr 2009 signifikant höher als bei den Soay Schafen (p-Wert: >0,01*). Soay Schafe schieden im Jahr 2010 tendenziell nicht signifikant (p-Wert: 0,426) mehr MDS-Eier mit dem Kot aus als Texel Schafe. Soay Schafe

schieden im Jahr 2010 signifikant mehr (p-Wert: 0,034*) MDS-Eier mit dem Kot aus als im Jahr 2009. Texel Schafe schieden im Untersuchungsjahr 2009 höchst signifikant (p-Wert: 0,00000017***) mehr MDS-Eier mit dem Kot aus als im Jahr 2010.

2.5 Magen-Darm-Strongyliden-Eiausscheidung pro Gramm Kot, GLMM (4b)

In den folgenden Tabellen sind die Untersuchungsergebnisse für den Parameter Magen-Darm-Strongyliden-Eiausscheidung pro Gramm Kot im GLMM, zunächst in einem vollen Modell (Tabelle Nr. 34) und darauffolgend in einem reduzierten Modell (Tabelle Nr. 35) in Abhängigkeit zu den aufgelisteten Variablen (jeweils linke Spalte) dargestellt. Die Modelle wurden anschließend mittels ANOVA bzw. LQ-Test verglichen (Tabelle Nr. 36).

$$\text{Formel: } y_{ij} = h (\beta_0 + \beta_1 \text{ Geschlecht}_i + \beta_2 \text{ Rasse}_i + \beta_3 \text{ Rasse:Jahr}_{ij} + \beta_4 \text{ gewichtszunahme}_{ij} + \beta_5 \text{ Jahr}_{ij} + \gamma_i + \gamma_j)$$

Tabelle 34: Ergebnisse des GLMM (4b) für die MDS-EpG (EpG2log)

Fixe Effekte (Variable)	Koeffizienten (Estimate)	Standardfehler (Std. Error)	z-Wert	Pr(> z) p-Wert
(Intercept)	-0,6105	1,1435	-0,534	0,5935
Geschlecht 1	0,4512	0,4707	0,959	0,3378
Rasse 2	3,1961	0,9604	3,328	0,000875***
Jahr 2010	1,6704	1,4781	1,130	0,2584
Gewichtsveränderung	-0,6304	2,1499	-0,293	0,7694
Interaktion Rasse 2:Jahr 2010	-3,4711	1,2362	-2,808	0,004987**

(Signifikanz-Code: $p \leq 0,001$ ***, $p \leq 0,01$ ** , $p \leq 0,05$ *; Rasse 2: Texel Schafe, Geschlecht 1: Weibliche Tiere)

Tabelle 35: Ergebnisse des reduzierten GLMM (4b red) für die MDS-EpG (EpG2log)

Fixe Effekte (Variable)	Koeffizienten (Estimate)	Standardfehler (Std. Error)	z-Wert	Pr(> z) p-Wert
(Intercept)	-0,3605	1,1252	-0,320	0,7487
Rasse 2	3,1234	0,9667	3,231	0,00123**

Ergebnisse

Jahr 2010	1,6803	1,5117	1,112	0,26634
Interaktion Rasse 2:Jahr 2010	-3,5996	1,2250	-2,868	0,00413**

(Signifikanz-Code: $p \leq 0,001^{***}$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,05^*$: Rasse 2: Texel Schafe)

Tabelle 36: Ergebnisse des Vergleichs zwischen vollem (4b) und reduzierten (4b red) GLMM für die MDS-EpG (EpG2log) mittels ANOVA und Chi-Quadrat-Test

Modell	Df	AIC	BIC	logLik	Dev	LQ	Chisq	Df	Pr(<Chisq)
4b red	8	332,09	363,94	-158,04	316,09	4b red vs. 4b			
4b	10	335,11	374,93	-157,56	315,11		0,9732	2	0,6147

(Df: Degrees of freedom, AIC: Akaike Information Criterion, BIC: Bayesian Information Criterion, logLik: log-Likelihood, Dev: Abweichung, LQ: LQ-Test, Chisq: Chi-Quadrat-Test, Pr(<Chisq): p-Wert für den Chi-Quadrat-Test, red: reduziert)

Die Untersuchung über ein lineares Hypothesensystem ergab für das reduzierte Modell einen Rasseunterschied im Jahr 2009: GLMM: p-Wert: 0,00123**, einen Rasseunterschied im Jahr 2010: GLMM: p-Wert: 0,523, einen Jahresunterschied für Soay Schafe: GLMM: p-Wert: 0,266 und einen Jahresunterschied für Texel Schafe: GLMM: p-Wert: 0,274.

Die Rassezugehörigkeit (t-Test, p-Wert: 0,00123***) und die Interaktion von Rasse:Jahr (t-Test, p-Wert: 0,00413**) hatte einen signifikanten Einfluß auf die Häufigkeit mit der MDS-Eier im Kot der Tiere ausgeschieden wurden. Das reduzierte Modell wurde gewählt, da das AIC im Vergleich zum vollen Modell niedriger ist. Das reduzierte Modell war nicht signifikant besser als das volle Modell (p-Wert: 0,6147).

Texel Schafe schieden im Jahr 2009 häufiger MDS-Eier aus als Soay Schafen (p-Wert 0,00123***). Soay Schafe schieden im Jahr 2010 tendenziell nicht signifikant (p-Wert: 0,523) öfter MDS-Eier mit dem Kot aus als Texel Schafe. Im Jahr 2010 schieden die beiden Schafrassen nicht signifikant häufiger MDS-Eier mit dem Kot aus als im Jahr 2009 (p-Wert: 0,27). Die Häufigkeit der MDS-Eiausscheidung mit dem Kot unterschied sich für Soay Schafe (p-Wert: 0,266) und Texel Schafe (p-Wert: 0,274) zwischen den Untersuchungsjahren nicht signifikant.

2.6 *S. papillosus*-Eiausscheidung pro Gramm Kot, LMM (5a)

In den folgenden Tabellen sind die Untersuchungsergebnisse für den Parameter *Str. papillosus*-Eiausscheidung pro Gramm Kot im LMM, zunächst in einem vollen Modell (Tabelle Nr. 37) und darauffolgend in einem reduzierten Modell (Tabelle Nr. 38) in Abhängigkeit zu den aufgelisteten Variablen (jeweils linke Spalte) dargestellt. Die Modelle wurden anschließend mittels ANOVA bzw. LQ-Test verglichen (Tabelle Nr. 39).

$$\text{Formel: } \gamma_{ij} = \beta_0 + \beta_1 \text{ Geschlecht}_i + \beta_2 \text{ Rasse}_i + \beta_3 \text{ Jahr}_{ij} + \beta_4 \text{ Rasse:Jahr}_{ij} + \beta_5 \text{ gewichtszunahme}_{ij} + \gamma_i + \gamma_j + \varepsilon_{ij}$$

Tabelle 37: Ergebnisse des LMM (5a) für die *S. papillosus*-EpG (EpG1log)

Fixe Effekte (Variable)	Koeffizienten (Estimate)	Standardfehler (Std. Error)	t-Wert	p-Wert
(Intercept)	4,9197	0,1724	28,54	2,0 ^{-16***}
Geschlecht 1	0,0934	0,1215	0,768	0,4459
Rasse 2	-0,0893	0,1897	-0,471	0,6424
Jahr 2010	-0,5926	0,1957	-3,028	0,00755**
Gewichtsveränderung	-0,5668	0,5005	-1,132	0,2604
Interaktion Rasse 2: Jahr 2010	0,2398	0,2509	0,9656	0,3518

(Signifikanz-Code: $p \leq 0,001^{***}$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,05^*$; Geschlecht 1: Weibliche Tiere, Rasse 2: Texel Schafe)

Tabelle 38: Ergebnisse des reduzierten LMM (5a) für die *Str. papillosus*-EpG (EpG1log)

Fixe Effekte (Variable)	Koeffizienten (Estimate)	Standardfehler (Std. Error)	t-Wert	p-Wert
(Intercept)	4,8925	0,1008	48,540	2,0 ^{-16***}
Jahr 2010	-0,4720	0,1370	-3,445	0,00243**

(Signifikanz-Code: $p \leq 0,001^{***}$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,05^*$)

Ergebnisse

Tabelle 39: Ergebnisse des Vergleichs zwischen vollem (5a) und reduzierten (5a red) LMM für die *Str. papillosus*-EpG (EpG1log) mittels ANOVA und Chi-Quadrat-Test

Modell	Df	AIC	BIC	logLik	Dev	LQ	Chisq	Df	Pr(<Chisq)
5a red	7	269,87	291,17	-127,93	255,87	5a red vs. 5a			
5a	11	275,02	308,50	-126,51	253,03		2,8411	4	0,5848

(Df: Degrees of freedom, AIC: Akaike Information Criterion, BIC: Bayesian Information Criterion, logLik: log-Likelihood, Dev: Abweichung, LQ: LQ-Test, Chisq: Chi-Quadrat-Test, Pr(<Chisq): p-Wert für den Chi-Quadrat-Test, red: reduziert)

Das Untersuchungs-jahr hatte einen signifikanten Einfluß auf die Höhe der Ausscheidung von *S. papillosus*-Eiern im Kot der Tiere (p-Wert: 0,00243**). Das reduzierte Modell wurde gewählt, da das AIC im Vergleich zum vollen Modell niedriger ist. Das reduzierte Modell war nicht signifikant besser als das volle Modell (p-Wert: 0,5848). Im Jahr 2010 war die *S. papillosus*-Eiausscheidung niedriger als im Jahr 2009 (Koeffizient: -0,4720).

2.7 *S. papillosus*-Eiausscheidung pro Gramm Kot, GLMM (5b)

In den folgenden Tabellen sind die Untersuchungsergebnisse für den Parameter *S. papillosus*-Eiausscheidung pro Gramm Kot im GLMM, zunächst in einem vollen Modell (Tabelle Nr. 40) und darauffolgend in einem reduzierten Modell (Tabelle Nr. 41) in Abhängigkeit zu den aufgelisteten Variablen (jeweils linke Spalte) dargestellt. Die Modelle wurden anschließend mittels ANOVA bzw. LQ-Test verglichen (Tabelle Nr. 42).

Formel: $y_{ij} = h(\beta_0 + \beta_1 \text{ Geschlecht}_i + \beta_2 \text{ Rasse}_i + \beta_3 \text{ Rasse:Jahr}_{ij} + \beta_4 \text{ gewichtszunahme}_{ij} + \beta_5 \text{ Jahr}_{ij} + \gamma_i + \gamma_j)$

Tabelle 40: Ergebnisse des GLMM (5b) für die *S. papillosus*-EpG (EpG1log)

Fixe Effekte (Variable)	Koeffizienten (Estimate)	Standardfehler (Std. Error)	z-Wert	Pr(> z) p-Wert
(Intercept)	-0,9313	0,3471	-2,68	0,0073**
Geschlecht 1	0,4526	0,2439	1,855	0,0635
Rasse 2	0,5060	0,3744	1,352	0,1765
Jahr 2010	-0,3316	0,3942	-0,841	0,4003

Gewichtsveränderung	-0,1245	1,2371	-0,101	0,9199
Interaktion Rasse 2: Jahr 2010	0,7021	0,4956	1,417	0,1566

(Signifikanz-Code: $p \leq 0,001^{***}$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,05^*$; Geschlecht 1: Weibliche Tiere, Rasse 2: Texel Schafe)

Tabelle 41: Ergebnisse des reduzierten GLMM (5b) für die *S. papillosus*-EpG (EpG1log)

Fixe Effekte (Variable)	Koeffizienten (Estimate)	Standardfehler (Std. Error)	z-Wert	Pr(> z) p-Wert
(Intercept)	-0,0848	0,2061	-4,115	3,88 ^{-5***}
Rasse 2	0,7459	0,2664	2,8	0,00512**

(Signifikanz-Code: $p \leq 0,001^{***}$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,05^*$; Rasse 2: Texel Schafe)

Tabelle 42: Ergebnisse des Vergleichs zwischen vollem (5b) und reduzierten (5b red) GLMM für die *S. papillosus*-EpG (EpG1log) mittels ANOVA und Chi-Quadrat-Test

Modell	Df	AIC	BIC	logLik	Dev	LQ	Chisq	Df	Pr(<Chisq)
5b red	6	524,56	548,45	-256,28	512,56	5b red vs. 5b			
5b	10	527,71	567,52	-253,85	507,71		4,8568	4	0,3023

(Df: Degrees of freedom, AIC: Akaike Information Criterion, BIC: Bayesian Information Criterion, logLik: log-Likelihood, Dev: Abweichung, LQ: LQ-Test, Chisq: Chi-Quadrat-Test, Pr(<Chisq): p-Wert für den Chi-Quadrat-Test, red: reduziert)

Die Rassezugehörigkeit hatte einen signifikanten Effekt auf Häufigkeit der *S. papillosus*-Eiausscheidung (p-Wert: 0,00512**). Texel Schafe schieden in beiden Untersuchungsjahren öfter *S. papillosus*-Eier mit dem Kot aus als Soay Schafe. Das reduzierte Modell wurde gewählt, da das AIC im Vergleich zum vollen Modell niedriger ist. Das reduzierte Modell war nicht signifikant besser als das volle Modell (p-Wert: 0,3023).

Ergebnisse

2.8 Kokzidien-Oozystenausscheidung pro Gramm Kot, LMM (6a)

In den folgenden Tabellen sind die Untersuchungsergebnisse für den Parameter Kokzidien-Oozystenausscheidung pro Gramm Kot im LMM, zunächst in einem vollen Modell (Tabelle Nr. 43) und darauffolgend in einem reduzierten Modell (Tabelle Nr. 44) in Abhängigkeit zu den aufgelisteten Variablen (jeweils linke Spalte) dargestellt. Die Modelle wurden anschließend mittels ANOVA bzw. LQ-Test verglichen (Tabelle Nr. 45).

$$\text{Formel: } y_{ij} = \beta_0 + \beta_1 \text{ Geschlecht}_i + \beta_2 \text{ Rasse}_i + \beta_3 \text{ Jahr}_{ij} + \beta_4 \text{ Rasse:Jahr}_{ij} + \beta_5 \text{ gewichtszunahme}_{ij} + \gamma_i + \gamma_j + \varepsilon_{ij}$$

Tabelle 43: Ergebnisse des LMM (6a) für die Kokzidien-OpG (OpGlog)

Fixe Effekte (Variable)	Koeffizienten (Estimate)	Standardfehler (Std. Error)	t-Wert	p-Wert
(Intercept)	7,0208	0,3936	17,840	7,74 ^{-13***}
Geschlecht 1	-0,2020	0,1676	-1,205	0,234
Rasse 2	-0,0738	0,3482	-0,212	0,834
Jahr 2010	-0,2871	0,5055	-0,568	0,578
Gewichtsveränderung	0,0868	0,6899	0,126	0,900
Interaktion Rasse 2: Jahr 2010	0,4281	0,4688	0,913	0,373

(Signifikanz-Code: $p \leq 0,001^{***}$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,05^*$; Geschlecht 1: Weibliche Tiere, Rasse 2: Texel Schafe)

Tabelle 44: Ergebnisse des reduzierten LMM (6a red) für die Kokzidien-OpG (OpG1log)

Fixe Effekte (Variable)	Koeffizienten (Estimate)	Standardfehler (Std. Error)	t-Wert	p-Wert
(Intercept)	6,84	0,22	31,44	4,44 ^{-16***}

(Signifikanz-Code: $p \leq 0,001^{***}$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,05^*$)

Tabelle 45: Ergebnisse des Vergleichs zwischen vollem (6a) und reduzierten (6a red) LMM für die Kokzidien-OpG (OpG1log) mittels ANOVA und Chi-Quadrat-Test

Modell	Df	AIC	BIC	logLik	Dev	LQ	Chisq	Df	Pr(<Chisq)
6a red	6	1036,2	1059,0	-512,11	1024,2	6a red vs. 6a			
6a	11	1042,6	1084,3	-510,30	1020,6		3,1615	5	0,606

(Df: Degrees of freedom, AIC: Akaike Information Criterion, BIC: Bayesian Information Criterion, logLik: log-Likelihood, Dev: Abweichung, LQ: LQ-Test, Chisq: Chi-Quadrat-Test, Pr(<Chisq): p-Wert für den Chi-Quadrat-Test, red: reduziert)

Keinem untersuchten Parameter konnte ein signifikanter Einfluss auf die Höhe des OpGlog nachgewiesen werden.

2.9 Kokzidien-Oozystenausscheidung pro Gramm Kot, GLMM (6b)

In den folgenden Tabellen sind die Untersuchungsergebnisse für den Parameter Kokzidien-Oozystenausscheidung pro Gramm Kot im GLMM, zunächst in einem vollen Modell (Tabelle Nr. 46) und darauffolgend in einem reduzierten Modell (Tabelle Nr. 47) in Abhängigkeit zu den aufgelisteten Variablen (jeweils linke Spalte) dargestellt. Die Modelle wurden anschließend mittels ANOVA bzw. LQ-Test verglichen (Tabelle Nr. 48). Die Variable Gewichtszunahme konvergierte nicht und konnte daher nicht mit in das Modell aufgenommen werden.

Formel: $y_{ij} = h(\beta_0 + \beta_1 \text{ Geschlecht}_i + \beta_2 \text{ Rasse}_i + \beta_3 \text{ Rasse:Jahr}_{ij} + \beta_4 \text{ gewichtszunahme}_{ij} + \beta_5 \text{ Jahr}_{ij} + \gamma_i + \gamma_j)$

Tabelle 46: Ergebnisse des GLMM (6b) für die Kokzidien-OpG (OpGlog)

Fixe Effekte (Variable)	Koeffizienten (Estimate)	Standardfehler (Std. Error)	z-Wert	Pr(> z) p-Wert
(Intercept)	2,4614	0,7882	3,123	0,00179**
Geschlecht 1	-0,3977	0,3485	-1,141	0,2538
Rasse 2	-0,3126	0,5167	-0,605	0,5453
Jahr 2010	-0,0274	0,9817	-0,028	0,9777

Ergebnisse

Interaktion Rasse 2: Jahr 2010	0,3123	0,6969	0,448	0,6541
--------------------------------	--------	--------	-------	--------

(Signifikanz-Code: $p \leq 0,001^{***}$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,05^*$; Geschlecht 1: Weibliche Tiere, Rasse 2: Texel Schafe)

Tabelle 47: Ergebnisse des GLMM (6b) für die Kokzidien-OpG (OpGlog)

Fixe Effekte (Variable)	Koeffizienten (Estimate)	Standardfehler (Std. Error)	z-Wert	Pr(> z) p-Wert
(Intercept)	2,18	0,4639	4,7	$2,6^{-06^{***}}$

(Signifikanz-Code: $p \leq 0,001^{***}$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,05^*$)

Tabelle 48: Ergebnisse des Vergleichs zwischen vollem (6b) und reduzierten (6b red) GLMM für die Kokzidien-OpG (OpG1log) mittels ANOVA und Chi-Quadrat-Test

Modell	Df	AIC	BIC	logLik	Dev	LQ	Chisq	Df	Pr(<Chisq)
6b red	5	302,13	322,04	-146,06	292,13	6b red vs. 6b			
6b	9	308,60	344,43	-145,30	290,60		1,5287	4	0,8215

(Df: Degrees of freedom, AIC: Akaike Information Criterion, BIC: Bayesian Information Criterion, logLik: log-Likelihood, Dev: Abweichung, LQ: LQ-Test, Chisq: Chi-Quadrat-Test, Pr(<Chisq): p-Wert für den Chi-Quadrat-Test, red: reduziert)

Es wurden keine signifikanten Einflüsse der überprüften Variablen auf die Häufigkeit der Oozysten-Ausscheidung mit dem Kot der untersuchten Schafressen festgestellt.

2.10 Zusammenfassung der Modellergebnisse, Untersuchung der Varianzhomogenität und Verteilung der Daten

Im LMM (und GLMM für OpGlog) wurden für die Parameter OpGlog und die Hämatokritabweichung keine signifikanten Ergebnisse gemessen. Für die Parameter Gewichtsveränderung, MDS-EpGlog, *S. papillosus*-EpGlog und die FAMACHA® Anaemia guide Kategorie wurden im LMM sowie für MDS-EpGlog und *S. papillosus*-EpGlog im GLMM signifikante Werte errechnet und anschließend reduzierte Modelle erstellt. Für die Parameter MDS-EpGlog, *S. papillosus*-EpGlog, Gewichtsveränderung und FAMACHA® Anaemia guide

Kategorie wurden die reduzierten Modelle gewählt, da das AIC im Vergleich zu den vollen Modellen niedriger war. Die reduzierten Modelle waren (nicht signifikant) besser als die vollen Modelle.

Um die Anpassungsgüte der angewandten Modelle zu überprüfen, wurden die Daten hinsichtlich ihrer Varianzhomogenität und Verteilung untersucht. In Streudiagrammen (Abbildungen Nr. 10-15) wurden die Residuen auf der y-Achse den gefitteten Werten (den prognostizierten Antworten) auf der x-Achse gegenübergestellt. Diese Gegenüberstellung wird allgemein genutzt um nicht-lineare, nicht-gleichmäßige (Error) Varianzen und Ausreißer zu erkennen (Fahrmeir et al., 2007). Die Residuen waren zufällig um die Nulllinie verteilt, daher wurde eine lineare Beziehung der Werte angenommen. Wenn die Werte sich grob horizontal um die Nulllinie verteilen, läßt dies vermuten, dass die Varianzen der Fehler-Terme gleich sind. Insgesamt konnte den Werten in den Streudiagrammen kein Trend zugewiesen werden. Vereinzelt wurden jedoch Ausreißer festgestellt. Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Q-Q-Plot grafisch überprüft (Abbildungen Nr. 16-21). Auch nach der Logarithmierung der Daten zeigten *S. papillosus*-EpGlog und MDS-EpGlog und FAMACHA[®] Anaemia guide leichte Abweichungen von der Normalverteilung, während OpGlog, Gewichtsveränderung und Hämatokritwertabweichung ziemlich genau einer Normalverteilung entsprachen. Für die weitere Analyse wurden diese Abweichungen jedoch aufgrund der relativ hohen Fallzahl (n=487) als nicht ausschlaggebend erachtet.

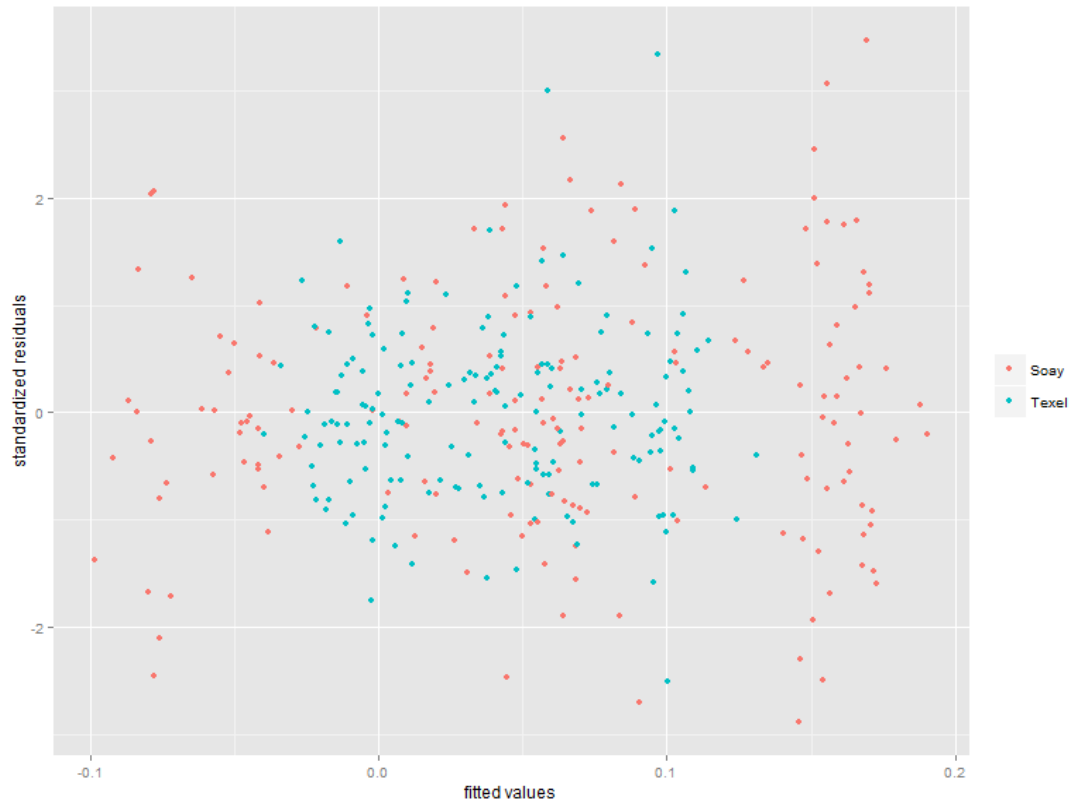


Abbildung 10: Verteilung der Residuen für die Gewichtsveränderung

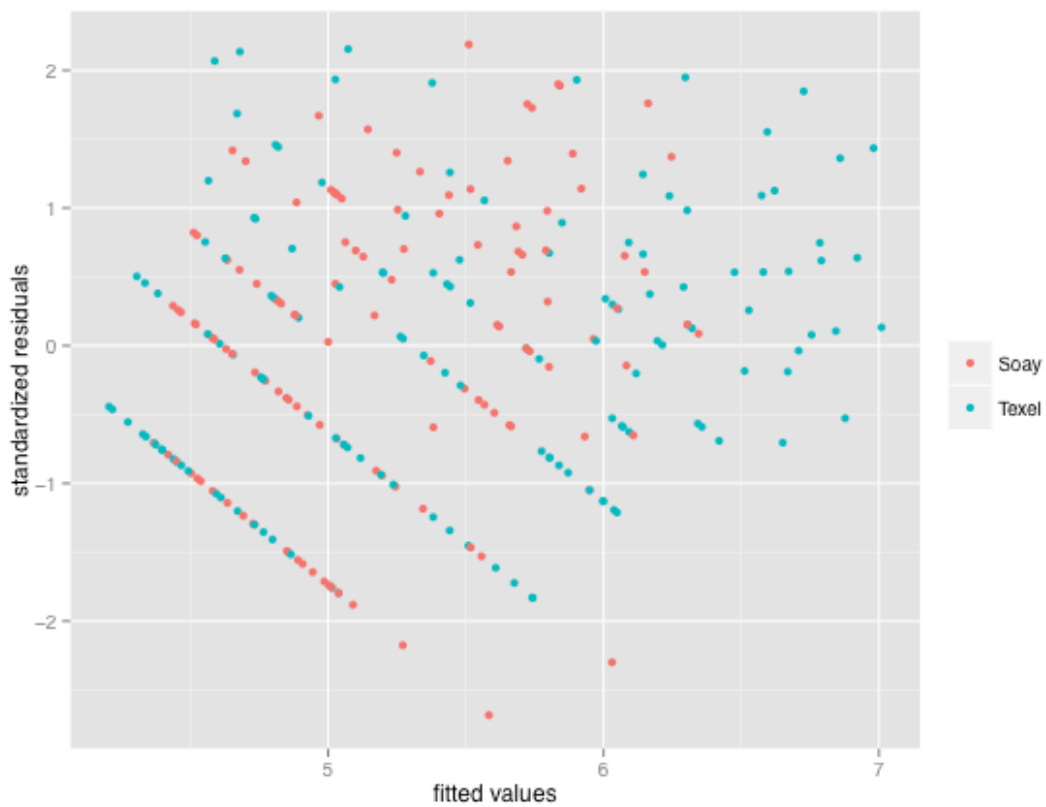


Abbildung 11: Verteilung der Residuen für die MDS-EpGlog

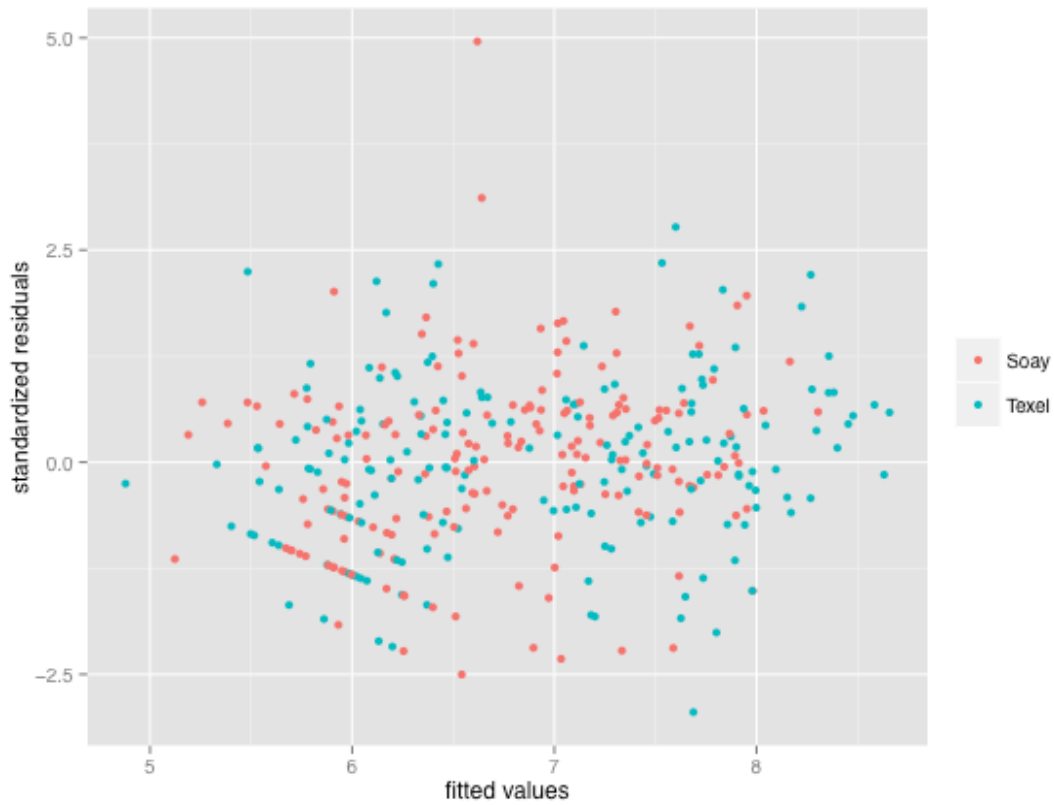


Abbildung 12: Verteilung der Residuen für die OpGlog

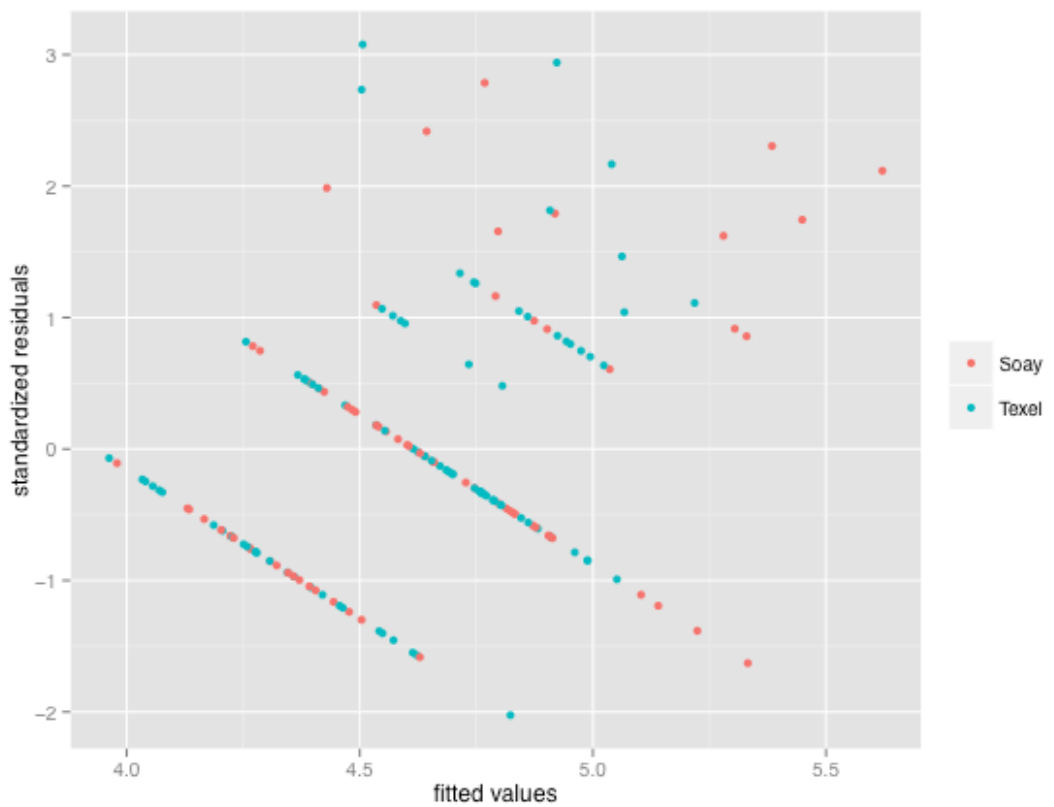


Abbildung 13: Verteilung der Residuen für die *S. papillosus*-EpGlog

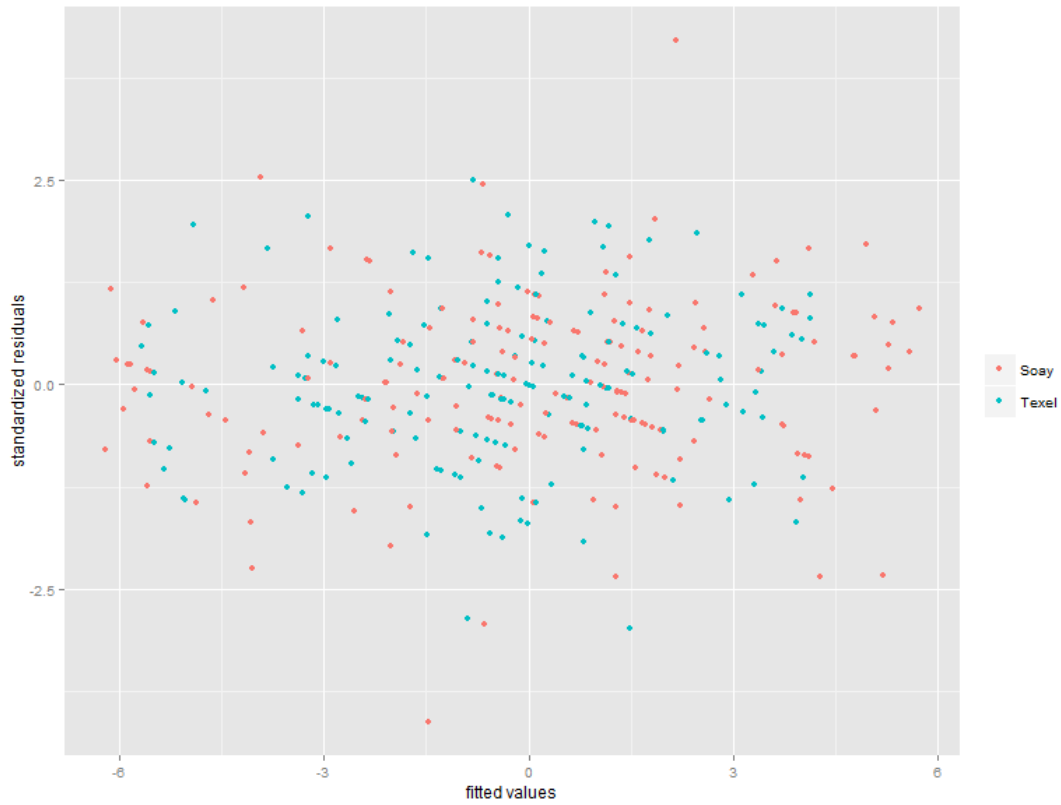


Abbildung 14: Verteilung der Residuen für die Hämatokritwertabweichung

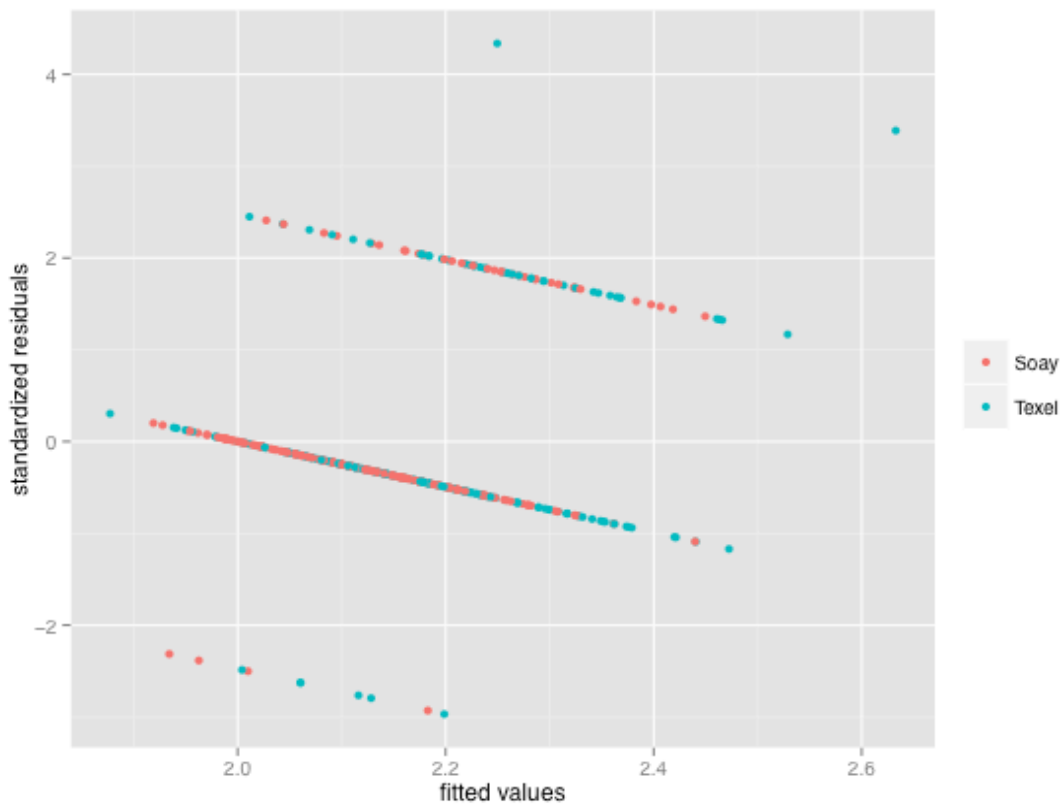


Abbildung 15: Verteilung der Residuen für die FAMACHA[®] Anaemia guide Kategorie

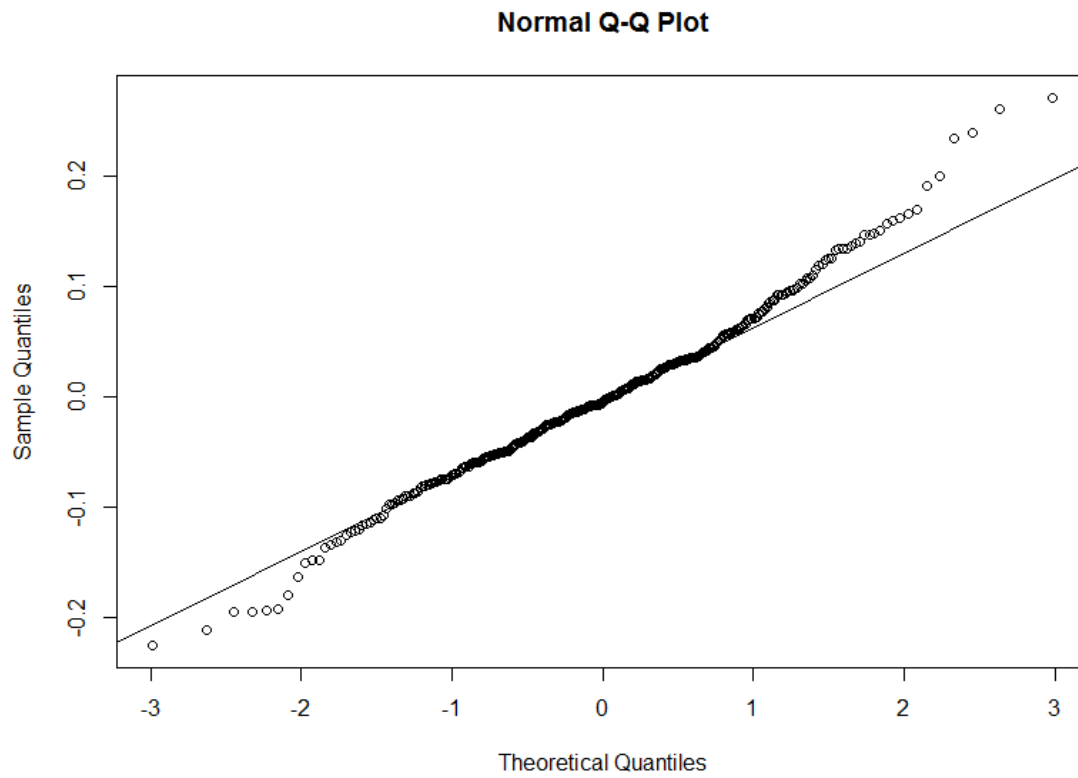


Abbildung 16: QQ-Plot der Residuen der Gewichtsveränderung

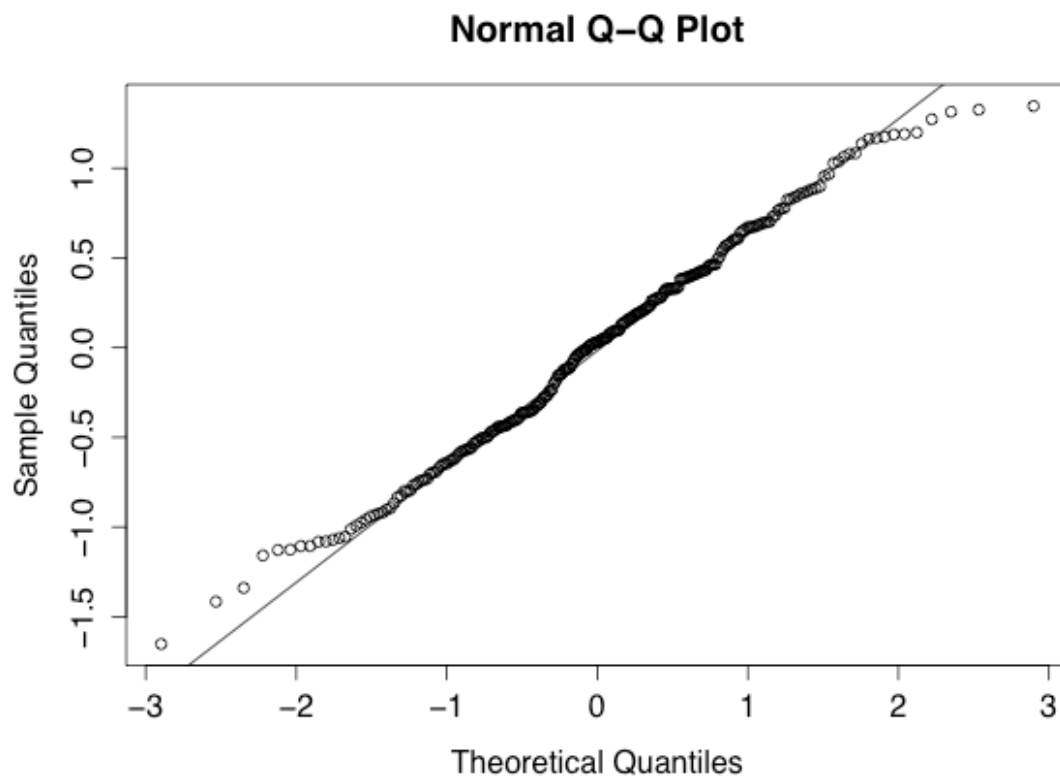


Abbildung 17: QQ-Plot der Residuen der MDS-EpGlog

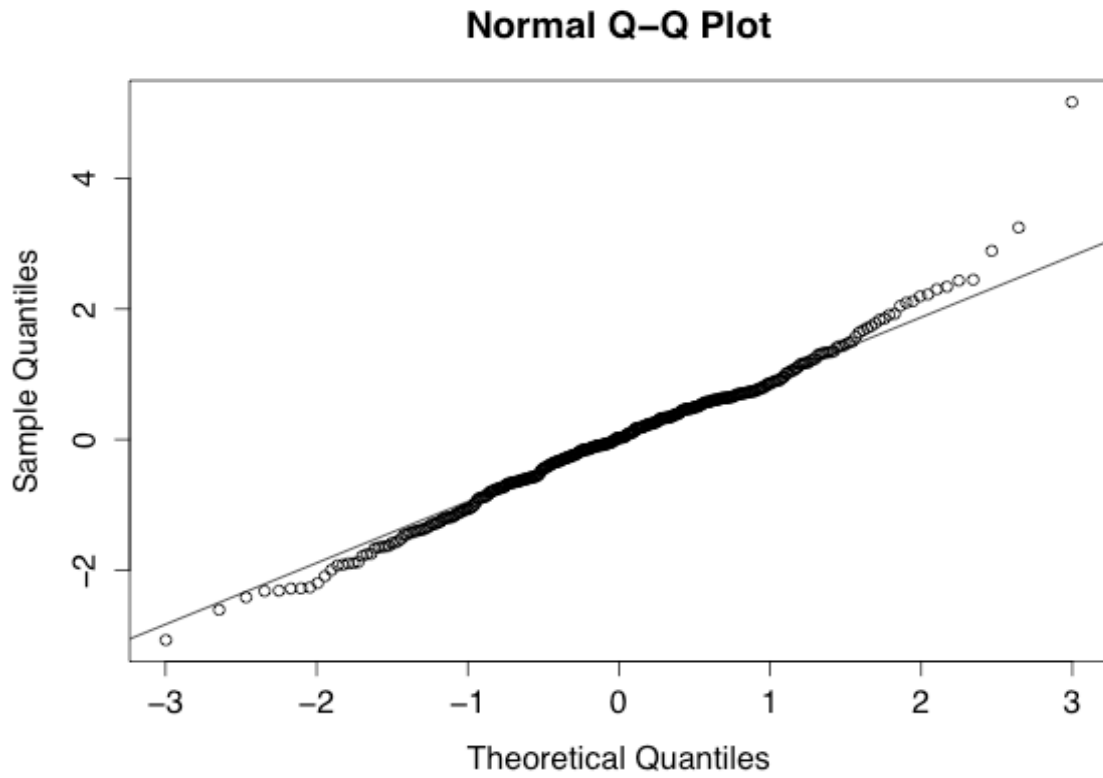


Abbildung 18: QQ-Plot der Residuen der OpGlog

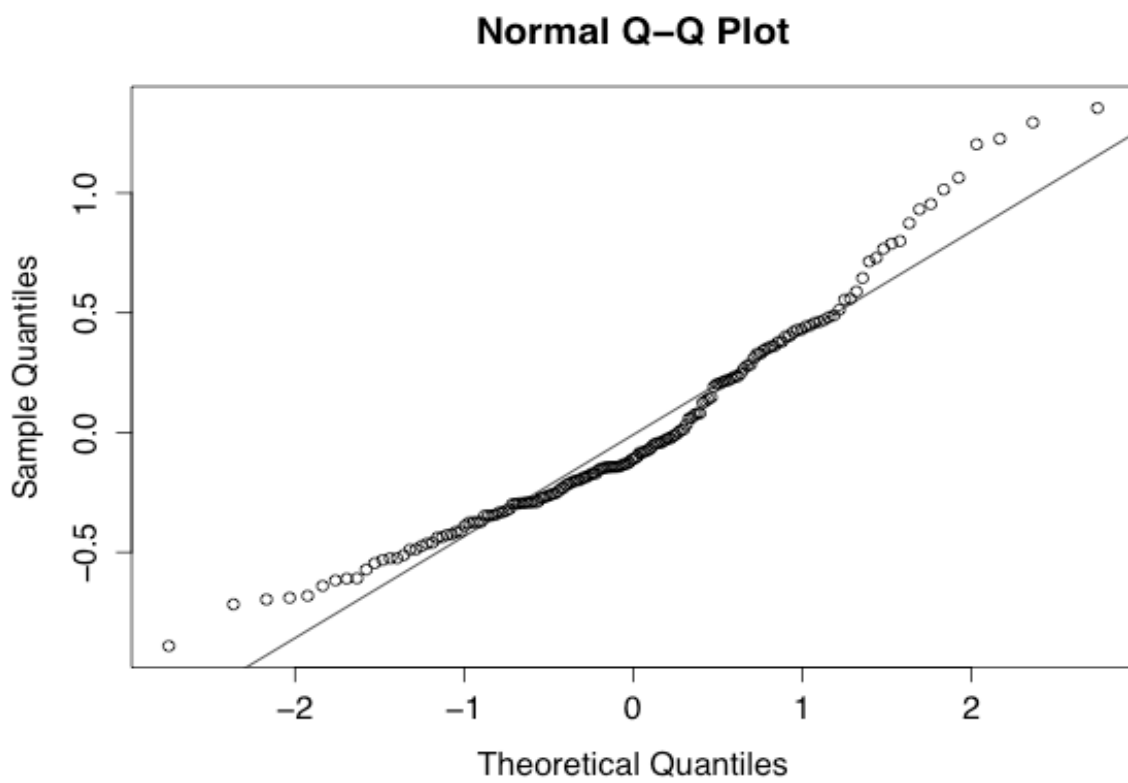


Abbildung 19: QQ-Plot der Residuen der *S. papillosus*-EpGlog

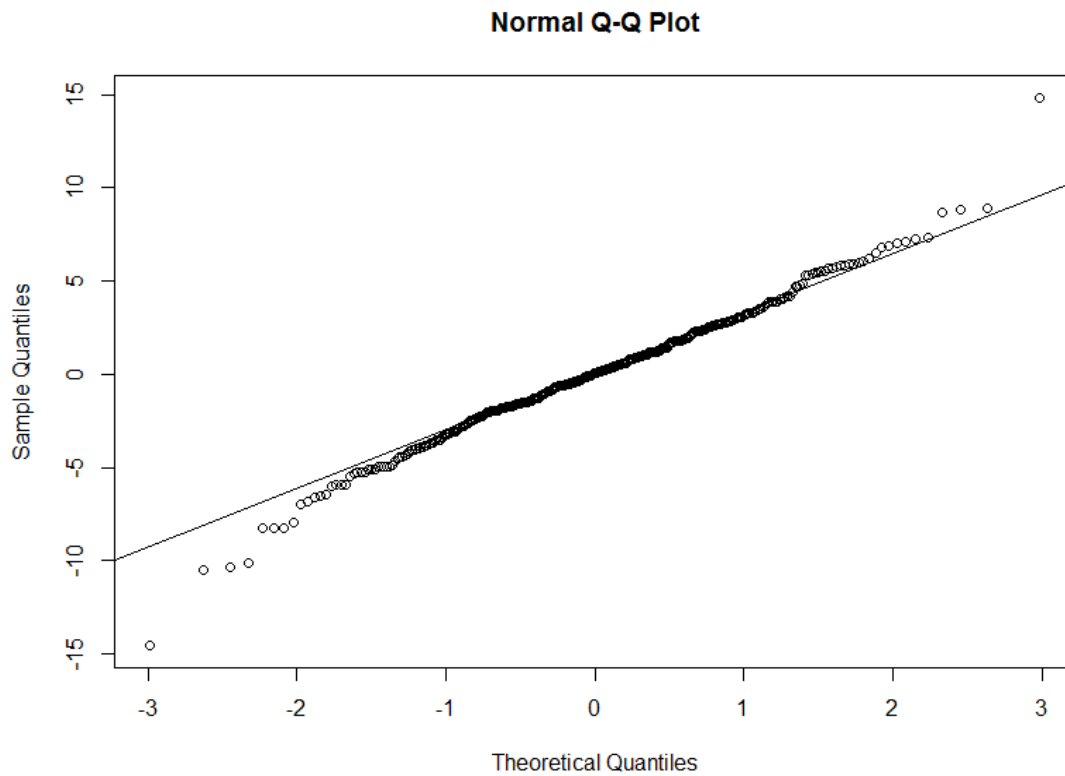


Abbildung 20: QQ-Plot der Residuen der Hämatokritwertabweichung

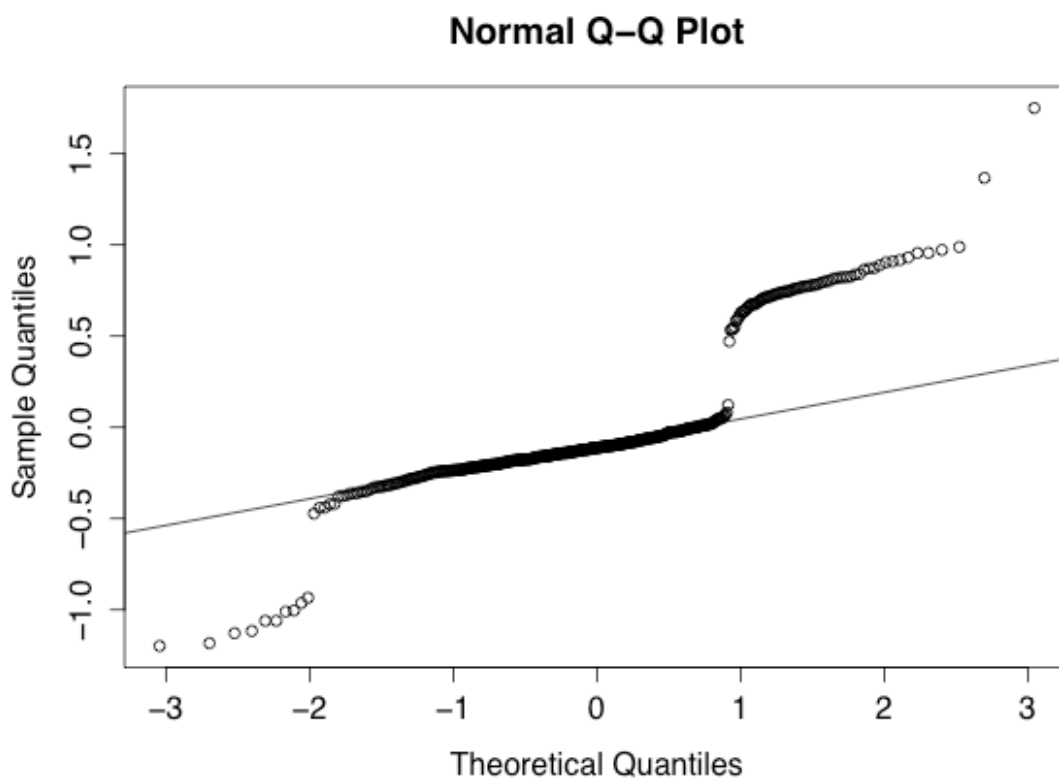


Abbildung 21: QQ-Plot der Residuen der FAMACHA[®] Anaemia guide Kategorie

3 Ergebnisse der Molekularbiologischen Verfahren

3.1 Ergebnisse des Verfahrens zur Herstellung des 24 kDa exkretorisch-sekretorischen Proteins von *H. contortus*

Die aus zehn adulten weiblichen *H. contortus* des FU Bestandes erfolgreich isolierte RNA wurde zur Synthese von cDNA eingesetzt und diese anschließend als Template für die PCR benutzt. Die Produkte der RT-PCR für den Einsatz in den beiden verschiedenen Vektoren (pBAD202/D-TOPO[®] und pET151/D-TOPO[®]) lagen bei der Überprüfung in der Gelelektrophorese im erwarteten Bereich des offenen Leserasters des 24 kDa exkretorisch-sekretorischen Gens von *H. contortus* bei ca. 650 bp (siehe Abbildung Nr. 22) wie bei Li et al. (2007).

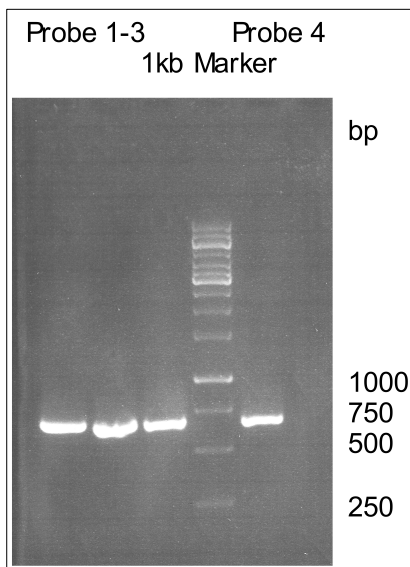


Abbildung 22: RT-PCR Amplifikation des offenen Leserasters von HcES24 für den Einsatz im pET151/D-TOPO[®] Vektor

Die anschließende Klonierung und Transformation wurde mittels *Nco*I-Verdau überprüft und ergab die für richtig orientierte Inserts erwarteten Banden im Bereich von 807 bp (pBAD202/D-TOPO[®]) und 506 bp (pET151/D-TOPO[®]). Die Sequenzierung der GATC Biotech AG (Konstanz) des One Shot[®]TOP10 chemisch kompetenten *E. coli* pBAD202/D-TOPO[®] HcES24 Klons ergab eine Nukleotidgröße von 666 bp (Sequenz von 222 Aminosäuren) und stimmte zu 98 % mit der Sequenz in der GenBank[™] (U64793) überein. Die des One Shot[®]TOP10 chemisch kompetenten *E. coli* pET151/D-TOPO[®] HcES24 Klons

ergab eine Nukleotidgröße von 673 bp. Beide Klone enthielten nahezu identische Aminosäuresequenzen wie die in Studien von Schallig et al. (1997b) bzw. Li et al. (2007).

In Induktionsversuchen der HcES24 pBAD202/D-TOPO[®] und HcES24 pET151/D-TOPO[®] One Shot[®] TOP10 chemisch kompetenten *E. coli* Zellen mit verschiedenen Arabinosekonzentrationen konnte für keinen Klon ein Unterschied zwischen Nullprobe und induzierter Probe im SDS-Page erhoben werden.

Eine Transformation des HcES24 pBAD202/D-TOPO[®] und Expression Control Plasmids aus den One Shot[®]TOP10 chemisch kompetenten *E. coli* in LMG 194 Zellen über Calcium selektive Platten wurde mittels Anleitung nach Chen et al. (2001) versucht, war aber erst mit der Durchführung nach dem Protokoll „Fresh competent *E. coli* prepared using calcium chlorid“ (Sambrook et al., 1989) erfolgreich.

Im SDS-Page konnten für die mit 2 %iger Arabinose induzierten LMG194/HcEs24 Zellen (siehe folgende Abbildung Nr. 23: SDS-Page-Gel 3 vom 28.10.2011: Probe 6/Klon vom 23.10.2011) auffällige Banden im Bereich von ca 40 – 43 kDa nachgewiesen werden (erwartete Proteingröße ca. 40 kDa).

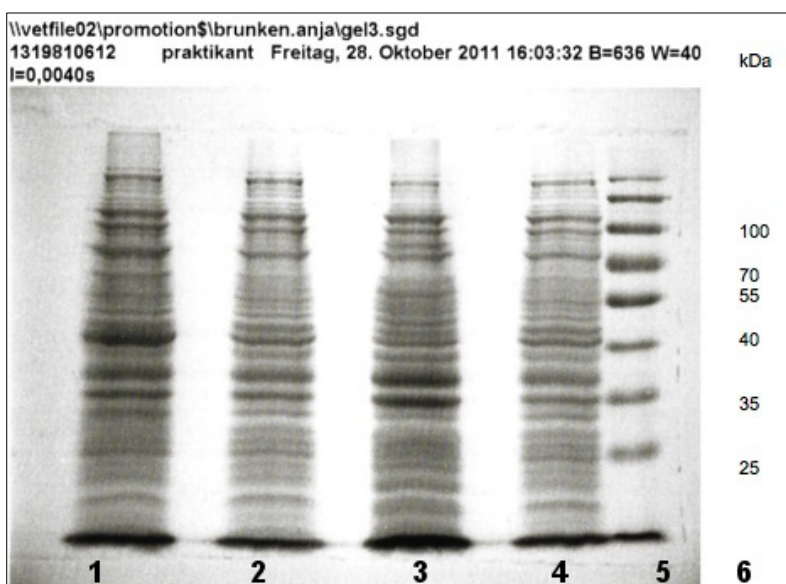


Abbildung 23: LMG194/HcES24 im SDS-Page;

(Legende: **1** und **2**: LMG194/HcES24 (Klon vom 23.10.2011) mit 2% Arabinose 1: induziert, 2: nicht induziert; **3** und **4**: LMG194/HcES24 (Klon vom 08.09.2011) mit 0,0002% Arabinose 3: induziert, 4: nicht induziert; **5**: Page Ruler™ Prestained Protein Ladder; **6**: Maßstab für den Page Ruler™ Prestained Protein Ladder in kDa)

Ergebnisse

Die induzierte Positivprobe (LMG194/ECP) ergab im erwarteten Bereich von 133 kDa eine induzierte Bande. Beim Einsatz derselben Proben im Western Blot konnten jedoch keine bzw. bei einem erneuten Versuch mehrere Banden (ca. bei 10, 25 und 40 kDa) nachgewiesen werden. Auch für die IPTG induzierten pET151/HcES24 BL21 Star™ Zellen konnte kein eindeutiger Unterschied zwischen induzierten und nicht induzierten Proben-Banden im SDS-Page festgestellt werden. Die Proben wurden daher für die getrennte Analyse von löslichen und unlöslichen Proteinen nach Herstellerangaben vorbereitet. Im SDS-Page konnte für die im Überstand der 6 h IPTG induzierten Probe befindlichen löslichen Proteine eine eindeutig induzierte Bande zwischen ca. 55 – 72 kDa und eine sehr schwach induzierte Bande im erwarteten Proteingrößen-Bereich von ca. 30 kDa (Li et al., 2007) nachgewiesen werden. Die Positivkontrolle zeigte eine Bande im erwarteten Bereich von 120 kDa. Im Western Blot konnten bei der Untersuchung des Überstandes der 6 h IPTG induzierten pET151/HcES24 BL21 Star™ Zellen Proteinbanden im Bereich von ca. 55 kDa und ca. 30 kDa nachgewiesen werden, wobei auch bei den nicht induzierten Proben eine schwache Bande im Bereich von 30 kDa sichtbar wurde.

Trotz der vermuteten erneuten Bindung von Anti-V5-Antikörper an mehrere Proteine oder Proteinfragmente der Proben im Western Blot, wurde versucht das Poly-His-Tag-HcEs24-Protein aus den Proben aufzureinigen. Zunächst wurde dazu das Protein in größeren Mengen hergestellt (3 × 200 ml Übertagkulturen der BL21/HcEs24 Klon 1 Zellen, 6 h IPTG induziert) und danach aus dem Pellet mittels (Protino® Ni-IDA Kit, Macherey & Nagel, Aufreinigung des Polyhistidin gebundenen Proteins von *E. coli* unter denaturierenden Konditionen) Aufreinigungs-Kit gelöst. Die Proteinkonzentration betrug im Mittel 108,3 µg/ml (gemessen im Spektrophotometer gegen Aqua bidest. bei einer OD_{595nm} mittels CB-X™-Protein-Assay). Im SDS-Page konnten für die jeweils mit der höchsten Proteinkonzentration versehenen Proben der 1. Elution mehrere Banden (v. a. von ca. 30 und 45 kDa) nachgewiesen werden. Da sich das Ergebnis auch nach erneuter Anzucht der BL21/HcEs24 Klon 1 Zellen und Protein-Aufreinigung im SDS-Page wiederholte, wurde die Zellpellet-Aufreinigung mit einem Zusatz von 0,1 % Triton X 100 vor dem Ultraschall, 10-minütiger Inkubation in 2,5 U/µl Benzonase nach dem Ultraschall und dem Versetzen des denaturierenden Lösungspuffers mit 1 mM Imidazol intensiviert. Nach der Elution wurde eine mittlere Proteinkonzentration von 740 µg/ml mittels CB-X™-Protein-Assay gemessen. Im SDS-PAGE konnten die ca. 45 und ca. 32 kDa Proteinbanden erneut visualisiert werden (siehe Abbildung Nr. 24). Alle gesammelten Protein-Elutate wurden zu einer Probe vermischt und ergaben im CB-X™-Protein-Assay eine ungefähre mittlere Proteinkonzentration von 490 µg/ml (Für den Einsatz im ELISA wurde aber aufgrund der

offensichtlichen starken Verunreinigung des Proteins von einer niedrigeren Konzentration des 24 kDa exkretorisch-sekretorischen Proteins von 450 µg/ml ausgegangen).

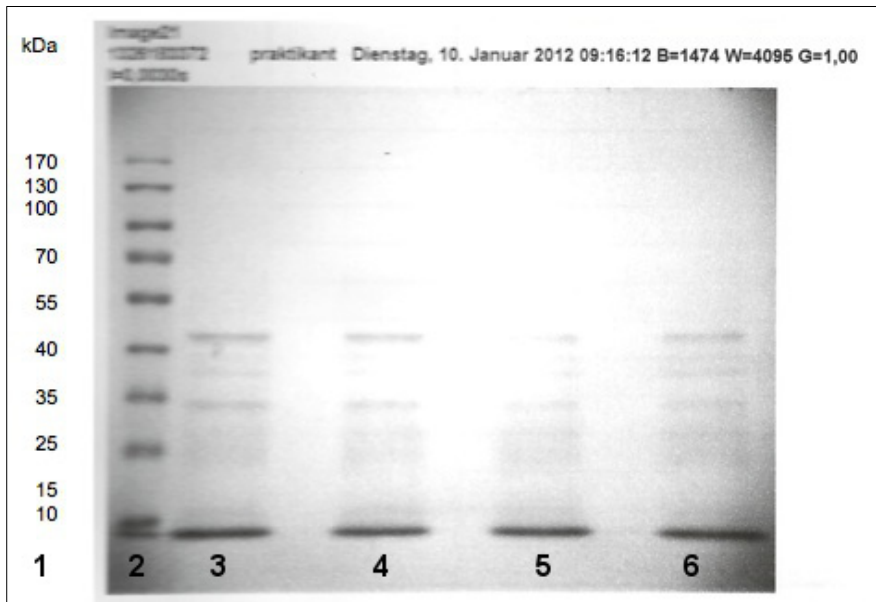


Abbildung 24: Aufgereinigtes HcES24-Protein mit schwachen Banden bei 32 und 45 kDa im SDS-Page

(Legende: **1** und **2**: Maßstab für den Page Ruler™ Prestained Protein Ladder in kDa; **3-6**: aufgereinigtes HcES24-Protein).

Im Western Blot konnte für diese aufgereinigte und vermischte Proteinlösung nach zweistündiger Inkubation mit Anti-V5-Antikörper (Verdünnung 1:5000 in Roti®-Block-Arbeitslösung) und einstündiger Inkubation in Meerrettichperoxidase-konjugiertem-Ziege-anti-Maus-IgG (Verdünnung 1:5000 in Roti®-Block-Arbeitslösung) eine einzelne Bande bei 30 kDa nachgewiesen werden (siehe Abbildung Nr. 25 rechts). Im Serum-Blot konnte nach zweistündiger Inkubation in *H. contortus* positivem Schafserum (Schaf-ID 887, Verdünnung 1:33,33 in Roti®-Block-Arbeitslösung) und einstündiger Inkubation mit Meerrettichperoxidase-konjugiertem-Kaninchen-anti-Schaf-IgG (H+L) für die gleiche Probe eine Bande bei ca. 30 kDa und zwei weitere, allerdings sehr schwache Banden im Bereich von 60 und 40 kDa, nachgewiesen werden (siehe Abbildung Nr. 25 links).

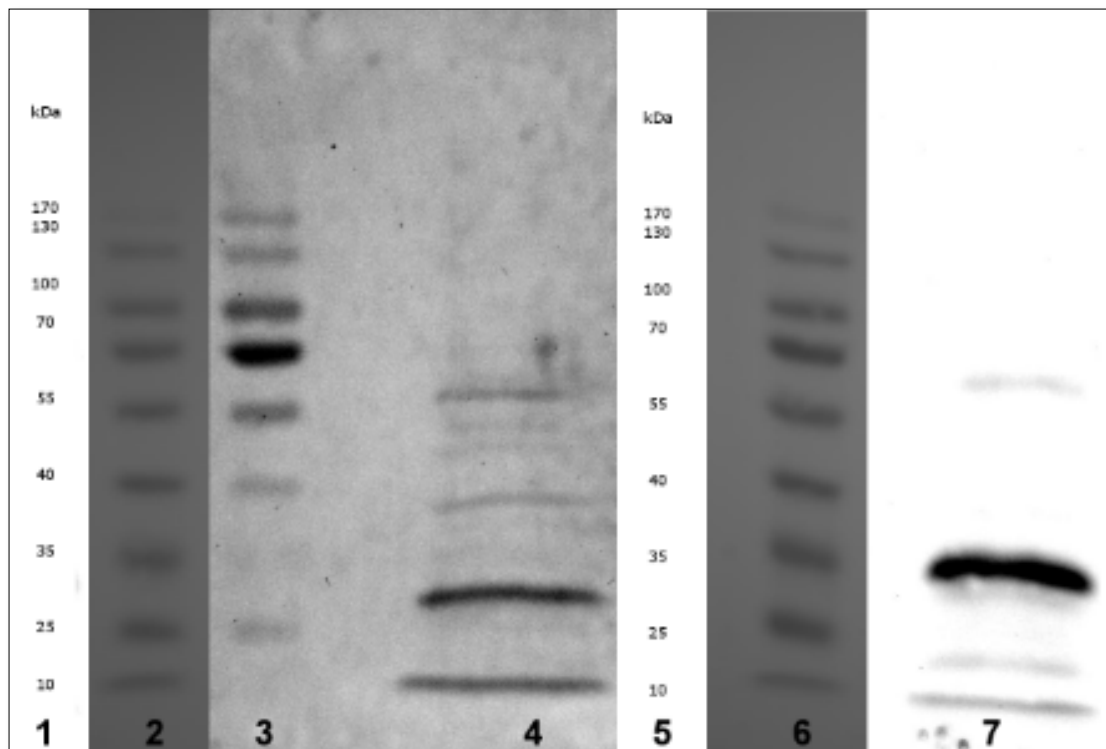


Abbildung 25: Darstellung des aufgereinigten 24 kDa ES-Proteins von *H. contortus* im Western Blot

(Legende: **1** und **5**: Maßstab des Page Ruler™ Prestained Protein Ladder in kDa; **2** und **6**: Livebild vom Page Ruler™ Prestained Protein Ladder; **3**: Page Ruler™ Prestained Protein Ladder im Western Blot; **4**: Western Blot: Positives *H. contortus*-Serum, Meerrettichperoxidase-konj.-Kaninchen-Anti-Schaf-Antikörper; **7**: Western Blot: Anti-V5-Antikörper, Meerrettichperoxidase-konj.-Ziege-Anti-Maus-Antikörper)

4 Ergebnisse der ELISA

4.1 Einsatz des 24 kDa exkretorisch-sekretorischen Proteins von *H. contortus* (HcES24) im ELISA

Für die Durchführung des ELISA wurden verschiedene Antigenkonzentrationen (5 µg/ml, 6 µg/ml, 7 µg/ml, 7,5 µg/ml, 10 µg/ml) vom HcES24-Protein in Coating-Puffer, verschiedene Blockierungspuffer (PBS mit 10 % fetalem Kälberserum, PBS ohne fetales Kälberserum, 2 g Milchpulver in 100 ml 0,05 % PBS Tween 20 und Kaninchenserum 10 %ig in PBS), verschiedene Serumverdünnungen (1:40, 1:100) in Lösungspuffer (PBS mit 10 %igem fetalem Kälberserum und 0,05 % Tween 20) und verschiedene Konjugatverdünnungen (1:2000, 1:5000, 1:6000, 1:7000, 1:10.000, 1:20.000) aus Meerrettichperoxidase-konjugiertem-Kaninchen-anti-Schaf-IgG (H+L) bzw. Meerrettichperoxidase-konjugiertem-

Kaninchen-anti-Ziege-IgG (H+L) in Lösungspuffer (s. o.) mittels Schachbrett-Titrationstechnik für die verschiedenen potentiellen Negativ- und Positivseren (Schaf und Ziege) überprüft.

Die Durchführung des ELISA wurde abgebrochen, da mit den zur Verfügung stehenden Negativseren (gesamter Seren-Pool der zweijährigen Untersuchung, zusätzlich genomene *H. contortus*-Antikörper negative Serumproben von neugeborenen Schafen und im Institut vorhandene *H. contortus*-Antikörper negative Seren aus Ziegen und Schafen) keine nach Messung der OD_{492 nm} ausreichende Distribution zwischen *H. contortus*-Antikörper negativen und positiven Seren festgestellt werden konnte. Tendenziell wurden für alle eingesetzten Negativseren zu hohe OD_{492nm}-Werte gemessen. Während beim Einsatz des Schaf-Sekundärantikörpers die negativen Serumproben (aus Schafen und Ziegen) viel zu hohe OD_{492nm}-Messergebnisse (doppelt so hohe Werte wie die der Positivprobe) erzielten, lagen die Messungen für die negativen Serumproben beim Einsatz des Ziegen-Sekundärantikörpers unter denen der positiven Serumproben. Trotzdem war die Distribution der Positiv- und Negativproben beim Einsatz des Ziegen-Sekundärantikörpers nicht ausreichend für eine eindeutige Detektion. Der Einsatz von PBS mit 10 %igem fetalem Kälberserum als Blockierungspuffer erbrachte wie bei Li et al. (2007) die besten Ergebnisse.

4.2 Ergebnisse zum Versuch der Etablierung eines ELISA zum Nachweis von spezifischem *T. circumcincta* IgG in Schafserum

Die Durchführung des ELISA erfolgte wie bereits im Material- und Methodenteil beschrieben wurde. Es konnten jedoch keine geeigneten Negativ- und Positivseren evaluiert werden. Bei der Messung der OD_{450nm} und OD_{492nm} lagen Konjugat- und Substratkontrolle bei nahezu 0, während die Meßergebnisse für die Negativproben zu hoch bzw. höher waren als die der Positivproben. Die Durchführung wurde daraufhin abgebrochen.

V Diskussion

Ziel der vorliegenden Studie war einerseits der Vergleich zwischen Soay- und Texel Schafen hinsichtlich der Widerstandsfähigkeit gegenüber MDS-Infektionen bei natürlicher Infektion unter den gleichen Haltungsbedingungen, andererseits die Untersuchung der Prävalenz der im Tierpark Arche Warder e.V. in Schleswig-Holstein vorkommenden Magen-Darm-Strongyloiden. Im Folgenden werden diese zwei Gesichtspunkte anhand der Ergebnisse der Studie diskutiert.

Die eingangs aufgestellte Nullhypothese, Texel Schafe wären widerstandsfähiger/resistenter bzw. genauso widerstandsfähig gegenüber MDS-Infektionen wie Soay Schafe, konnte durch die vorliegenden Untersuchungsergebnisse nicht eindeutig widerlegt werden, da im Jahr 2010 keine signifikante, aber dennoch tendenziell höhere (LMM, p-Wert: 0,426) und häufigere (GLMM: p-Wert: 0,522) MDS-Eiausscheidung für Soay Schafe festgestellt wurde. Die aufgestellte Arbeitshypothese, Soay Schafe wären widerstandsfähiger/resistenter gegenüber einer MDS-Infektion als Texel Schafe, konnte in dieser Studie nur durch die Untersuchungsergebnisse des Jahres 2009 gestützt werden. Im Jahr 2009 schieden Texel Schafe signifikant mehr ($p = >0,01^*$) und öfter MDS-Eier ($p = 0,00123^{**}$) mit dem Kot aus als Soay Schafe. Die Ergebnisse der Kotuntersuchung, der gattungsspezifischen PCR und der Sektion aus den Jahren 2009 und 2010 weisen auf eine Mischinfektion der Tiere mit den Spezies *H. contortus*, *Teladorsagia* spp., *Nematodirus* spp., *Moniezia* spp., *Eimeria* spp. und *S. papillosus* hin. Im Jahr 2010 konnten *Trichostrongylus* spp. in der Sektion und gattungsspezifischen PCR am häufigsten nachgewiesen werden. Eine Beteiligung von *Trichostrongylus* spp. an der Wurmbürde 2009 konnte durch die Sektion nicht nachgewiesen werden, ist aber aufgrund der geringen Anzahl der seziierten Schafe trotzdem sehr wahrscheinlich.

MDS-EpGlog

Die Rasse, das Untersuchungsjahr und die Interaktion Rasse 2:Jahr 2010 hatten einen signifikanten Einfluß auf die MDS-EpGlog Höhe (LMM-Modell). Rasse und Interaktion Rasse 2:Jahr 2010 hatten einen signifikanten Einfluß auf die Häufigkeit der MDS-EpGlog-Ausscheidung (GLMM-Modell).

Die Veränderung von Umwelteinflüssen, des genetischen Ursprunges der Schafe und der Populationsdichte in den beiden Untersuchungsjahren kann sich auf die Variation der Resistenz der Schafe gegenüber Infektionen allgemein und damit auf die Variation der

untersuchten Parameter auswirken. Der signifikante Einfluß des Untersuchungsjahres auf die MDS-EpGlog war daher zu erwarten und konnte auch in anderen Studien beobachtet werden (Coltman et al., 1999).

Im Jahr 2009 schieden Texel Schafe signifikant mehr und öfter MDS-Eier mit dem Kot aus als Soay Schafe, während im Jahr 2010 kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte. Die Ergebnisse des Jahres 2010 sind aufgrund einer im Widerspruch zur Versuchsplanung durchgeführten Entwurmung und dem dadurch beeinflussten Infektionsverlauf nicht komplett mit den Ergebnissen des Vorjahres vergleichbar. Die MDS-EpGlog war im Jahr 2010 zwar tendenziell (nicht signifikant) bei den Soay Schafen höher und häufiger, dennoch ist ein Einfluß der Entwurmung auf den Infektionsverlauf und die MDS-EpGlog Ergebnisse im Jahr 2010 wahrscheinlich und sollte bei der weiteren Interpretation berücksichtigt werden.

Betrachtet man die Ergebnisse des Untersuchungsjahres 2009 allein, sprechen die Ergebnisse (signifikant höhere und häufigere MDS-EpGlog für Texel Lämmer) für eine erhöhte Widerstandsfähigkeit der Soay Schafe (bzw. der ursprünglichen Schafrasse) gegenüber MDS-Infektionen. Diese Ergebnisse sind deutlicher (LMM, p-Wert: 0,01*) als die in der Studie von Idris et al. (2012), in der Texel Lämmer im Vergleich zu Rhön-, Merinoland-, und Dt. Schwarzkopf Lämmern tendenziell eine höhere EpG (p-Wert >0,05) aufwiesen. Die signifikant höhere mittlere MDS-EpGlog für Texel Lämmer im Jahr 2009 sollte dennoch nicht unmittelbar mit einer höheren Wurmbürde bei einer Mischinfektion verknüpft werden, da die Höhe der Eiausscheidung zwischen den Wurmspezies stark variiert (Cole, 1986) und gerade im Untersuchungsjahr 2009 wenige Informationen über die Zusammensetzung der Wurmbürde vorliegen. Trotzdem könnte die höhere mittlere MDS-EpGlog der Texel Schafe ein Hinweis auf eine erniedrigte Fähigkeit zur Abwehr von MDS-Infektionen (bzw. die erniedrigte relative Resistenz gegenüber MDS-Infektionen) im Vergleich zu den Soay Schafen und ein Hinweis auf die erhöhte Fertilität der Nematodenspezies sein, wie bereits in Selektionsstudien vermutet wurde (Bisset et al., 1996; Kemper et al., 2010). Im Jahr 2010 war die Höhe und Häufigkeit der MDS-EpGlog beider Schafrassen nicht signifikant unterschiedlich. Ganz im Gegensatz zum Vorjahr schienen Texel Lämmer im Jahr 2010 genauso widerstandsfähig gegenüber MDS-Infektionen zu sein, wie die Soay Schafe. Auch bei dem Vergleich zwischen Hochleistungsschafrassen: Texel- und Suffolk Lämmern, sowie Texel- und Suffolk Mutterschafen bei einer natürlichen Infektion mit MDS, wurden für Texel Lämmer und Mutterschafe niedrigere EpG nachgewiesen als für Suffolk Schafe (Good et al., 2006). Insgesamt sprechen die Ergebnisse beider Untersuchungsjahre für einen tendenziellen,

wenn auch nicht großen Unterschied der MDS-EpGlog Höhe und Häufigkeit zwischen den beiden in der vorliegenden Studie untersuchten Schafrassen.

Die Höhe und Häufigkeit der MDS-Eiausscheidung unterschied sich in dieser Studie zwischen den Geschlechtern nicht signifikant. Auch in anderen Studien hatte das Geschlecht keinen signifikanten Einfluß auf die EpG bei präpubertären Lämmern nach Mischinfektion (Knight et al., 1972; Werne et al., 2013) und *H. contortus* Infektion (Courtney et al., 1985; Idris et al., 2011). Weibliche Haarschafe wiesen einen höheren EpG auf als männliche, hingegen konnte bei Wollschafen kein geschlechtsspezifischer Unterschied festgestellt werden (Notter et al., 2003). Männliche Lämmer unterschiedlicher Rassen waren signifikant empfänglicher als weibliche Lämmer (Idris et al., 2012) und das Geschlecht von Soay Schafen hatte einen signifikanten Effekt auf die MDS-EpG, wobei männliche Soay Schafe eine höhere EpG aufwiesen als weibliche Soay Schafe (Coltman et al., 1999). So wurde vermutet, dass weibliche Schafe früher und intensiver eine Immunität gegenüber *H. contortus*- (Luffau et al., 1981; Gauly et al., 2006) und *Tr. colubriformis*-Infektionen (Windon und Dineen, 1981) ausbilden als männliche Schafe.

Die MDS-EpGlog war in dieser Studie schwach negativ korreliert mit der Gewichtsveränderung (Spearman's Rang Korrelation, Korrelation nach Pearson sowie im LMM/ GLMM). Die negative Korrelation zwischen MDS-EpGlog und Gewichtsveränderung konnte auch in anderen Studien ermittelt werden (Gauly und Erhardt, 2001). Die MDS-EpG von Soay Schafen (St. Kilda) war negativ korreliert mit dem Lebendgewicht (Coltman et al., 2001a; Craig et al., 2008; Hayward et al., 2014) und der Winter-Überlebenswahrscheinlichkeit (Coltman et al., 1999). Auf die Korrelationen des MDS-EpGlog mit OpGlog, FAMACHA[®] Anaemia guide Kategorie, Hämatokritwertabweichung und *S. papillosus*-EpGlog (Spearman's Rang Korrelation und Korrelation nach Pearson) wird im weiteren Text näher eingegangen.

Körpergewicht/ Gewichtsveränderung

Soay- und Texel Schafe zeigten hinsichtlich des Körpergewichtes einen starken Rasseunterschied der im Jahr 2009 ca. 20 kg und im Jahr 2010 ca. 10 kg betrug. Das normalerweise deutlich höhere Körpergewicht der männlichen Schafe beider Rassen (Craig et al., 2008; Idris et al., 2011), unterschied sich in dieser Studie für beide Untersuchungsjahre nur für Soay Schafe signifikant (p-Wert: 0,04*). Für Texel Schafe konnten hinsichtlich des Geschlechtes keine signifikanten Unterschiede des Körpergewichtes für beide Untersuchungsjahre nachgewiesen werden. Das Geschlecht

hatte keinen signifikanten Einfluß auf die Gewichtsveränderung (LMM: p-Wert: ca. 0,77; n.s.).

Bei der Betrachtung der Gewichtsveränderung (LMM) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Schafrassen in den Jahren 2009 und 2010 festgestellt werden. Ganz im Gegensatz dazu konnten in der Studie von Alba-Hurtado et al. (2010) bei den mit *H. contortus* experimentell infizierten Suffolk Lämmern signifikante Einbußen im Body Condition Score (BCS) und der kumulativen Lebendgewichtzunahme beobachtet werden, während der BCS der infizierten resistenteren Criollo Lämmer keine Einbußen zu verzeichnen hatte und das kumulative Lebendgewicht nur leicht negativ im Vergleich zur Kontrollgruppe beeinflusst wurde.

Bei der Untersuchung der Gewichtsveränderung im LMM konnte eine signifikante Beeinflussung durch die Hämatokritwertabweichung festgestellt werden (p-Wert: 0,0378*). Hämatokritwertabweichung und Gewichtsveränderung waren im LMM signifikant positiv korreliert, während MDS-EpGlog und Gewichtsveränderung nicht signifikant negativ korreliert waren. Eine positive Korrelation zwischen Hämatokritwert und Körpergewicht, sowie eine negative Korrelation zwischen Körpergewicht und MDS-EpGlog konnten in der Studie von Vanimisetti et al. (2004) während einer *H. contortus*-Infektion beobachtet werden. Die in der vorliegenden Studie beobachteten Tendenzen ähneln denen bei natürlich infizierten Soay Schafen gemessenen signifikant negativen Effekten der MDS-EpG auf das Körpergewicht (Craig et al., 2008) bzw. der bei experimentell mit *H. contortus* infizierten Texel Schafen und anderen Schafrassen beobachteten negativen Korrelation zwischen dem Körpergewicht und der EpG (Idris et al., 2011).

FAMACHA[®] Anaemia Guide Kategorie

Das Untersuchungsjahr beeinflusste die FAMACHA[®] Anaemia guide Kategorie im LMM signifikant, während Schafrasse, Geschlecht, MDS-EpGlog, *S. papillosus*-EpGlog, OpGlog, Gewichtsveränderung, Hämatokritwertabweichung und die Interaktion Rasse 2: Jahr 2010 keinen signifikanten Effekt hatten. Da die FAMACHA[®] Anaemia guide Kategorie im Jahr 2010 bei beiden Rassen höher war als im Jahr 2009 (p-Wert: 0,000415*** höchst signifikant), ist von einer stärkeren Beeinflussung des Anämiestatus im Jahr 2010 auszugehen. In beiden Untersuchungsjahren konnte *H. contortus* in der Sektion nachgewiesen werden, wobei für das Untersuchungsjahr 2009 eine stärkere Beteiligung von *H. contortus* an der Wurmbürde dokumentiert wurde. Aufgrund der geringen Fallzahl der Schafe in der Sektion sind diese Ergebnisse allerdings nur schwach aussagekräftig. Für die in dieser Studie nachgewiesene nur schwach negative Korrelation zwischen

Hämatokritwertabweichung und FAMACHA[®] Anaemia guide Kategorie, sowie schwach positive Korrelationen zwischen FAMACHA[®] Anaemia guide Kategorie und MDS-EpGlog (Spearman's Rang Korrelation), konnten hingegen in anderen Studien signifikante Korrelationen dokumentiert werden. Bei der Untersuchung von Schafen und Ziegen aus unterschiedlichen Regionen der USA konnten signifikant negative Korrelationen zwischen Hämatokritwert und FAMACHA[®] Anaemia guide Kategorie, Hämatokritwert und EpG, eine signifikant positive Korrelation zwischen EpG und FAMACHA[®] Anaemia guide Kategorie und eine Sensitivität des FAMACHA[®] Anaemia guides von 100 % in den Kategorien 3 - 5 sowie bei einem Hämatokritwert von <15 % (bei geringer Spezifität) festgestellt werden (Kaplan et al., 2004). Bei dem Vergleich von mit *H. contortus* experimentell infizierten Criollo- und Suffolk Lämmern konnte eine signifikante negative Korrelation zwischen FAMACHA[®] Anaemia guide Kategorie und Hämatokritwert für beide Rassen festgestellt werden. Die infizierten Suffolk-Lämmer hatten eine signifikant höhere EpG und Anzahl von adulten Würmern in der Sektion (Alba-Hurtado et al., 2010). Auch bei der Untersuchung von natürlich infizierten Schafen in Süditalien konnten signifikant negative Korrelationen zwischen Hämatokritwert und FAMACHA[®] Anaemia guide Kategorie dokumentiert werden (Di Loria et al., 2009). Jedoch konnte dem FAMACHA[®] System hier nur eine geringe Sensitivität in der Detektion von anämischen Tieren zugewiesen werden. Nicht nur die Sensitivität des FAMACHA[®] Anaemia guides zur Detektion von Mischinfektionen mit MDS scheint umstritten (Koopmann et al., 2006), es scheint auch fraglich ob rassespezifisch die Farbe der subkonjunktivalen Mukosa von Schafen stark voneinander abweicht und eine Kategorisierung erschwert (Moors und Gauliy, 2009). Es ist nicht auszuschließen, dass die in dieser Studie für den FAMACHA[®] Anaemia guide nachgewiesenen nur schwachen Korrelationen mit der Hämatokritwertabweichung und der MDS-EpGlog, durch Mischinfektionen, in denen *H. contortus* wahrscheinlich nicht dominierend war, und durch signifikante Rasseunterschiede bezüglich des Hämatokritwertes und den eventuell damit in Zusammenhang stehenden rasseabhängigen Farbunterschieden der subkonjunktivalen Mukosa, bedingt worden sind.

Hämatokritwert/Hämatokritwertabweichung

Der mittlere Hämatokritwert der Schafrassen unterschied sich schon zu Beginn dieser Studie (vor Weidegang in beiden Untersuchungsjahren) signifikant bzw. auch als Mittelwert für beide Untersuchungsjahre (arithmet. Mittel der beiden Untersuchungsjahre: Soay Schafe: ca. 33,6 %, Texel Schafe: ca. 30,1 %). Um dieser Tatsache in der Bewertung des Hämatokritwertes und seiner Korrelationen Rechnung zu tragen, wurde ausschließlich die Hämatokritwertabweichung betrachtet. Bei der Untersuchung des Einflusses von Schafrasse,

Geschlecht, Untersuchungsjahr, MDS-EpGlog, *S. papillosus*-EpGlog, OpGlog, Gewichtsveränderung und FAMACHA[®] Anaemia guide Kategorie auf die Hämatokritwertabweichung im LMM war keine der Beziehungen signifikant. In der Vielzahl der vergleichbaren Untersuchungen wurde nicht auf einen eventuell bereits vorab bestehenden signifikanten Unterschied des Hämatokritwerts hingewiesen. In der Studie von Gauly et al. (2002) wurde kein Unterschied des Hämatokritwertes zwischen Rhön- und Merinoland Schafen sowie innerhalb der Rassen nach experimenteller Infektion mit *H. contortus* festgestellt. Hämatokritwert und MDS-EpG der Studie waren bei beiden Rassen (wie in der vorliegenden Studie die Hämatokritwertabweichung und die MDS-EpG) negativ korreliert. Ganz im Gegensatz dazu konnte in der Studie von Herrmann (2010) ein signifikanter Effekt des Genotyps auf den Hämatokritwert vor Infektion festgestellt werden (p-Wert: $\leq 0,01^{**}$). Auch das Geschlecht beeinflusste den Hämatokritwert vor bis 6 Wochen *post infectionem* hoch signifikant, bzw. die Hämatokritveränderung bis 4 Wochen *post infectionem* signifikant. Das Geschlecht hatte in dieser Studie keinen signifikanten Einfluß auf die Hämatokritwertabweichung (p-Wert: 0,7289). Bei dem Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Rhön- und Merinoland Schafen konnten den männlichen Schafen nach experimenteller *H. contortus*-Infektion signifikant niedrigere Hämatokritwerte, höhere Wurmbürden und erhöhte logarithmierte EpG zugewiesen werden (Gauly et al., 2006). Altersbedingte Veränderungen der Erythrozytenzahl und -größe wurden für Schafe im ersten Lebensjahr nachgewiesen und können in dieser Studie den Hämatokritwert und die Hämatokritwertabweichung der Lämmer beider Rassen stark beeinflusst haben (Bostedt und Mayr, 1976; Beddies, 1999).

Die Hämatokritwertabweichung war in der vorliegenden Studie nur schwach negativ korreliert mit FAMACHA[®] Anaemia guide Kategorie, MDS-EpGlog, *S. papillosus*-EpGlog und der Gewichtsveränderung, während zur OpGlog eine schwach positive Korrelation bestand (Spearman's Rang Korrelation). Eine negative Korrelation zwischen Hämatokritwert und EpG sowie der Gewichtsveränderung konnte bereits durch andere Studien nach Infektion mit *H. contortus* belegt werden (Yacob et al., 2009; Figueroa Castillo et al., 2011).

Infektionsverlauf

Die Prävalenz für gastrointestinale Parasiteneier/-oozysten in der Kotuntersuchung betrug für beide Schafrassen und Untersuchungsjahre ca. 59 % (MDS-Eier), ca. 37 % (*S. papillosus*-Eier), ca. 82 % (Kokzidien-Oozysten), ca. 4 % (*Moniezia* spp.-Eier) und ca. 3,1 % (*Nematodirus* spp.-Eier).

In anderen in Deutschland durchgeführten Studien konnten ebenfalls Prävalenzen von MDS von > 50 % festgestellt werden (Benesch, 1993; Moritz, 2005; Idris et al., 2012). Ähnliche Prävalenzen wie in dieser Studie konnten hinsichtlich des Kokzidienbefalls (88,6 %), stark abweichende Prävalenzen hinsichtlich der *S. papillosus*- (0,7 %), *Moniezia* spp.- (13,2 %) sowie *Nematodirus* spp.-Befalls (13 %) in der Studie von Idris et al. (2012) nachgewiesen werden. Die geringere Prävalenz der Kokzidien-Oozysten und *Moniezia* spp.-Eier in dieser Studie könnten mit den erfolgten Behandlungen gegen Kokzidien mit Toltrazuril (Baycox[®], Bayer AG, Leverkusen) und gegen Bandwürmer mit Praziquantel (Cestocur[®], Bayer AG, Leverkusen) im Jahr 2010 in Zusammenhang stehen. Auch der für die beiden Untersuchungsjahre und Schafrassen errechnete Mittelwert der MDS-EpG positiven Untersuchungen von ca. 351,32 (SD: ±407,63) (der errechnete Mittelwert für alle MDS-EpG negativen und positiven Untersuchungen liegt bei ca. 206,29; SD: ±141,42) ähnelt den Ergebnissen der Studie von Idris et al. (2012): Mittelwert: 315,3; SD: ±776,8. In der Studie von Moritz (2005) konnte ein Kokzidien-Befall bei 76 %, MDS-Befall bei 71 %, Strongyloides-Befall bei 30 % und *Moniezia* spp.-Befall bei 18 % der untersuchten Proben festgestellt werden.

Infektionsverlauf 2009

Hinsichtlich des Infektionsverlaufes im Jahr 2009 konnten schon bei der ersten koproskopischen Untersuchung der Lämmer im Mai 2009 (vor Weideaustrieb) Kokzidien-Oozysten und *S. papillosus*-Eier und erst ca. 10 Wochen nach Weideaustrieb Anfang Juni 2009, MDS-Eier (Erstnachweis: 09.08.2009) nachgewiesen werden. Eine galaktogene Übertragung von *S. papillosus* sollte durch die Entwurmung der Muttertiere vor der Geburt weitestgehend verhindert werden.

Nematodirus spp.-Eier konnten einmalig am 01.11.2009 bei 5 Tieren und *Moniezia* spp.-Eier bei einem Tier am 20.10.2009 festgestellt werden.

Da im Jahr 2009 keine qualitative gattungsspezifische PCR der Larven durchgeführt wurde, gibt es hinsichtlich der an der Wurmbürde beteiligten Spezies während des Infektionsverlaufs keine genaueren Informationen. Auch die Sektionsergebnisse geben keinen Hinweis über die im Dünndarm an der Wurmbürde beteiligten Spezies. In der Sektion konnte ein Befall mit *H. contortus* und *T. circumcincta* nachgewiesen werden.

Insgesamt kann im Jahr 2009 von einer Mischinfektion der Tiere mit den Spezies *H. contortus*, *T. circumcincta*, *Nematodirus* spp., *Moniezia* spp., *Eimeria* spp. und *S. papillosus* aufgrund der erhobenen Ergebnisse aus der koproskopischen Untersuchung und der Sektion ausgegangen werden. Die Beteiligung weiterer MDS an der Wurmbürde im

Jahr 2009 wie z. B. *Trichostrongylus* spp., ist aufgrund der hohen Prävalenz von *Trichostrongylus* spp. in Deutschland, im Speziellen im Tierpark Arche Warder e.V. und im Untersuchungsjahr 2010 dieser Studie sehr wahrscheinlich (Rudolph und Wichelmann, 1995; Idris et al., 2012).

Infektionsverlauf 2010

Auch im Untersuchungsjahr 2010 konnten Kokzidien-Oozysten und *S. papillosus*-Eier ab dem ersten (vor Weideaustrieb) bis zum letzten Untersuchungsdatum in den Fäzes der Schafflämmer nachgewiesen werden. Am 31.07.2010, ca. 3,5 Wochen nach Weideaustrieb am 07.07.2010, konnten bei der koproskopischen Untersuchung der Lämmer MDS-Eier und in der qualitativen gattungsspezifischen PCR ein Befall mit *H. contortus*, *T. circumcincta* und *Tr. colubriformis* nachgewiesen werden. *Nematodirus* spp. und *Moniezia* spp.-Eier wurden am 21.08.2010 im Kot von einzelnen Tieren zum ersten Mal festgestellt. Nach der Behandlung mit Praziquantel (Cestocur[®], Bayer AG, Leverkusen) am 09.09.2010 ging der Bandwurmbefall zurück. Die bereits in der koproskopischen Untersuchung und in der qualitativen gattungsspezifischen PCR der Larven nachgewiesenen Parasitenspezies konnten größtenteils auch in der Sektion im November 2010 gefunden werden.

Trichostrongylus spp. waren mit einem prozentualen Anteil an der gesamten Wurmbürde aller Schafe von 36,15 %, die am häufigsten in der Sektion nachgewiesene Parasitenart, gefolgt von *Teladorsagia* spp. mit 35,09 %, *Nematodirus* spp. mit 27,01 % und *Haemonchus* spp. mit 1,75 %. Die Prävalenz in der Sektion lag für *Trichostrongylus* spp. und *Teladorsagia* spp. bei 100 %, für *Nematodirus* spp. bei 83 % und für *H. contortus* bei 50 %. Auch in der Larven-PCR konnten die höchsten Prävalenzen für *Trichostrongylus* spp. (90 %), hingegen gefolgt von *H. contortus* (80 %) und *Teladorsagia* spp. (60 %) gemessen werden.

In der Studie von Idris et al. (2012) wurden bei der Untersuchung verschiedener Schafrassen in verschiedenen Gebieten Deutschlands mit Hilfe der L3-Differenzierung *Trichostrongylus* spp. dominierende MDS-Mischinfektionen der Schafen nachgewiesen. Die Prävalenz bei der L3-Differenzierung betrug 52,8 % für *Trichostrongylus* spp., 32,9 % für *H. contortus*, 14 % für *Teladorsagia* spp. und 0,3 % für *Cooperia* spp.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten darauf hin, dass die Mischinfektionen der Schafe im Jahr 2010 allgemein durch *Trichostrongylus* spp. dominiert wurden. Die Ergebnisse der Larven-PCR decken sich hinsichtlich der Prävalenz von *H. contortus* und *Teladorsagia* spp. nicht mit den Ergebnissen der Sektion. Die in der PCR erhöhte Prävalenz für *H. contortus* könnte durch die je MDS-Spezies variierende Höhe der Eiablage, bzw.

Diskussion

durch die intermittierende (nicht kontinuierliche) MDS-Eiausscheidung beeinflusst worden sein. Adulte *H. contortus* Weibchen können täglich ca. 5000 - 10.000 Eier ausscheiden, während den weiblichen Adulten der *Trichostrongylus* spp. und *Teladorsagia (Ostertagia)* spp. nur eine tägliche Eiausscheidung von 100 - 200 Eiern sowie *Nematodirus* spp. eine von 50 Eiern/Wurm/Tag zugesprochen wird (Cole, 1986). Je höher die Prävalenz von Eiern im Kot ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich aus einigen Eiern in der Larvenkultur Larven entwickeln und diese in der PCR nachgewiesen werden können. Andererseits darf aufgrund der geringen Anzahl der Sektions-Schafe, das Sektionsergebnis bei der Interpretation nicht zu stark gewichtet werden.

Die in der vorliegenden Studie niedrige Prävalenz von *H. contortus* in der Sektion wurde auch schon für andere natürlichen MDS-Infektionen in Deutschland beschrieben (Bauer et al., 1986; Rudolph und Wichelmann, 1995; Koopmann et al., 2006). Bis auf den fehlenden Nachweis von *Cooperia* spp. in dieser Studie, decken sich die Ergebnisse für die in Deutschland am häufigsten an Mischinfektionen beteiligten Spezies (*Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* spp., *Teladorsagia* spp., *Nematodirus* spp. und *Cooperia* spp.) (Benesch, 1993; Rehbein et al., 1996). Im Tierpark Arche Warder e.V. selbst konnten in den Jahren 1993/1994 von Rudolph und Wichelmann (1995) bei der koproskopischen Untersuchung (Flotation, Kombiniertes Flotations-Sedimentationsverfahren und L3-Differenzierung nach Larvenkultur) aller Schafressen besonders häufig und mit hoher Eizahl *Trichostrongylus* spp. und *Ostertagia* spp. nachgewiesen werden. Speziell bei den Soay Schafen konnte eine durchgehende Kokzidien-Infektion mit besonders hohen Oozystenanzahlen im August 1993 und Mai 1994, sowie ein stetiger Nachweis von *Trichostrongylus* spp., sowie weniger häufiger der Nachweis von *Ostertagia* spp. und *Cooperia* spp. festgestellt werden.

Da in der Stallperiode keine MDS-Eier im Kot der Lämmer nachgewiesen werden konnten, ist es wahrscheinlich, dass eine Primärinfektion der Lämmer mit MDS erst auf den Weiden erfolgte. Als Infektionsquelle könnten einerseits überwinterte L3 auf den Weiden dienen. Andererseits ist es möglich, dass die während der Immunsuppression um den Partus und die während der Laktation aktivierten hypobiotischen larvalen MDS-Stadien (wie z. B. von *H. contortus*, *Teladorsagia* spp.) (Roeber et al., 2013) in den Mutterschafen für die Parasitenpopulation im Magen-Darm-Trakt und die daraus resultierende MDS-Ei-Kontamination der Weiden verantwortlich sind (Gibbs, 1986).

Im Jahr 2010 erfolgte ab August zunächst ein moderater Anstieg der Mittelwerte der logarithmierten MDS-EpG Daten im Gegensatz zum wesentlich steileren Anstieg der Werte im August 2009. Einerseits könnte durch die Entwurmung im Mai 2010 ein niedrigerer Parasiteneintrag auf den Weiden durch die Mutterschafe erfolgt sein, andererseits könnte durch die auslaufende Wirkung des Medikamentes Cydectin® (Moxidectin) in den Lämmern

eine starke Infektion mit L3 zunächst unterdrückt worden sein. Der Wirkstoff Moxidectin ist wirksam gegen adulte und larvale Stadien von *H. contortus* und *T. circumcincta* für ca. 35 Tage (Uriarte et al., 1994; Kerboeuf et al., 1995a). Gegen *Trichostrongylus* spp. ist die subkutane Moxidectin-Injektionslösung für ca. 21 Tage, die orale Lösung für kürzere Zeit (Kerboeuf et al., 1995b) wirksam. Die orale Behandlung von graviden Mutterschafen mit 0,2 mg Moxidectin je kg Körpergewicht (Cydectin® 0,1 % orale Lösung, Pfizer Deutschland GmbH, Berlin) war nach natürlicher Mischinfektion mit MDS von Tag 7 - 75 nach Behandlung höchst effektiv (>98 %) und bis Tag 105 nach Behandlung effektiv (90 - 98 %) im Vergleich zur Kontrollgruppe (FECRT) (Cringoli et al., 2009). Daher konnte vor dem 14.06.2010 nicht mit einer MDS-Infektion gerechnet werden. Im Vergleich zum Vorjahr 2009, in dem der Weideaustrieb der Schafe Anfang Juni erfolgte und die ersten MDS-EpG positiven Tiere am 09.08.2009 zu verzeichnen waren, ist das Auftreten der MDS-EpG positiven Schafe am 31.07.2010 (24 Tage nach Weideaustrieb, 82 Tage nach Entwurmung) vergleichsweise früh, gerade im Bewußtsein der vorherigen Entwurmung.

Spitzen der Mittelwerte der logarithmierten MDS-EpG Daten für beide Schafrassen wurden im Jahr 2009 im August mit tendenziellem Anstieg bis zum Versuchsende und im Jahr 2010 im September und Oktober erreicht. Vlassoff (1973, 1976) beobachtete zwei MDS-EpG-Spitzen bei der Infektion von Lämmern mit Trichostrongyliden: Ende des Frühjahrs bzw. Anfang des Sommers sowie im Spätsommer bzw. Herbst. Während er für die erste Infektion der Lämmer die Infektion mit überwinterten L3 auf den Weiden und den durch Mutterschafe verursachten Eintrag von MDS-Eiern auf die Weiden zuschrieb, machte er für die Spitzen der MDS-EpG Ausscheidung im Spätsommer und Herbst die Infektion mit den aus infizierten Lämmern ausgeschiedenen und zur L3 entwickelten MDS-Eiern verantwortlich. Der starke Abfall der Mittelwerte der logarithmierten MDS-EpG Daten im November 2010 könnte mit einer erhöhten Anzahl von Larven, die in ein Hypobiose-Stadium übergehen oder mit einer zu diesem Zeitpunkt sich entwickelnden Immunität gegenüber den MDS verknüpft werden (Roeber et al., 2013).

Der Nachweis von Kokzidien-Oozysten im Kot der Lämmer konnte in beiden Untersuchungsjahren schon während der Haltung der Tiere im Stall erfolgen. In beiden Untersuchungsjahren konnten während des gesamten Infektionsverlaufes Kokzidien-Oozysten im Kot von Schaflämmern detektiert werden.

Die Empfänglichkeit für eine Kokzidien-Infektion ist im Lebensalter der Lämmer von ca. vier bis acht Wochen am höchsten und führt nach der Präpatenzzeit von je nach *Eimeria*-Art unterschiedlichen ca. 10 - 20 Tagen zu einer starken Kontamination der Umwelt mit Kokzidien-Oozysten. Nach einer Infektion bildet sich meist eine Immunität der Lämmer aus (Deplazes et al., 2012).

Diskussion

In dieser Studie wurde innerhalb der koproskopischen Untersuchung nur die Anzahl der Kokzidien-Oozysten und nicht die Spezies bestimmt. Aufgrund der bei der Untersuchung festgestellten offensichtlichen Variation in Größe und Form der Kokzidien-Oozysten, kann aber wie bei den meisten Kokzidien-Infektionen von einer Mischinfektion der Lämmer mit verschiedenen *Eimeria* spp. ausgegangen werden (Deplazes et al., 2012).

Während in einer anderen Studie OpG-Spitzen in den Monaten Januar bis Juni dokumentiert wurden (Moritz, 2005), konnten in dieser Studie OpG-Spitzen in den Monaten August (2009) und September (2010) beobachtet werden. Im Juli 2010 wurde eine klinische Kokzidiose bei einem verstorbenen Lamm nachgewiesen. Die daraufhin erfolgende Behandlung aller Lämmer mit 20 mg/kg Toltrazuril (Baycox[®], Bayer AG, Leverkusen) am 16.07.2010 führte zu einer fast vollkommenen Reduktion des OpG am 31.07.2010 (der OpG war für 3 Schafe >0, für alle anderen Schafe = 0), wie zuvor in anderen Studien festgestellt wurde (Gjerde und Helle, 1991; Mundt et al., 2009). Am 21.08.2010 konnte ein im Mittel höherer OpG für beide Schafrassen nachgewiesen werden als bei der Untersuchung am 13.07.2010 vor Behandlung.

In beiden Untersuchungsjahren konnten während des gesamten Infektionsverlaufes *S. papillosus*-Eier im Kot von Schaflämmern nachgewiesen werden. Neben dieser kontinuierlichen Ausscheidung konnten in beiden Jahren keine wirklichen *S. papillosus*-EpG Ausscheidungsspitzen erfaßt werden. Im Jahr 2010 konnten nach der oralen Entwurmung der Lämmer mit Moxidectin (Cydectin[®] 0,1 % orale Lösung, Pfizer Deutschland GmbH, Berlin) am 10.05.2010 schon bei der Untersuchung am 31.05.2010 *S. papillosus*-Eier im Kot von acht Tieren festgestellt werden. Moxidectin ist nur gegen die adulten Stadien von *S. papillosus* wirksam. Die larvalen Stadien werden bei ihrer trachealen oder somatischen Wanderung oder im Zustand der Hypobiose nicht erfasst und können schon kurz nach einer Moxidectin-Behandlung wieder zu einer Ausscheidung von *S. papillosus*-Eiern im Kot durch adulte weibliche *S. papillosus* führen (Oosthuizen et al., 1993; Bauer und Conraths, 1994). Dahingehend war ein Auftreten von *S. papillosus*-Eiern im Kot der Tiere 21 Tage nach Moxidectin-Behandlung zu erwarten. Die Rasse beeinflusste in dieser Studie die Häufigkeit der *S. papillosus*-Ausscheidung signifikant (p-Wert: 0,00512**). Texel Schafe schieden häufiger *S. papillosus* aus als Soay Schafe, wobei im Jahr 2009 beide Schafrassen mehr *S. papillosus* mit dem Kot ausschieden (p-Wert: 0,00243**) als im Jahr 2010. In Studien vom St. Kilda Archipel konnten *S. papillosus*-Infektionen in Soay Schafen nachgewiesen werden (Craig et al., 2009). Derzeit sind der Autorin keine Studien bekannt, in denen die erhöhte Widerstandsfähigkeit von Soay Schafen gegenüber *S. papillosus*-Infektionen nachgewiesen wird. Die Ergebnisse dieser Studie könnten somit ein erster Hinweis auf eine eventuelle

erhöhte Widerstandsfähigkeit dieser Rasse gegenüber *S. papillosus*-Infektionen im Vergleich zu Texel Schafen sein.

Bei der Betrachtung der Infektionsverläufe von MDS-EpG, OpG und *S. papillosus*-EpG fällt die Korrespondenz der MDS-EpG-, OpG- und *S. papillosus*-EpG-Mittelwert Spitzen im August 2009 und September und Oktober 2010 auf. Ähnliche Beobachtungen machten Idris et al. (2012) zwischen MDS-EpG und OpG, wobei wie in dieser Studie, keiner der Parameter den anderen signifikant beeinflusste (in dieser Studie waren MDS-EpGlog und OpGlog nur schwach positiv korreliert (Korrelation nach Pearson). Bei der Untersuchung von Lämmern in Ghana konnten von Agyei (2003) nach starken Regenfällen ansteigende OpGs, gefolgt von ansteigenden MDS-EpG-Werten beobachtet werden. Einerseits könnte dieser Zusammenhang in den unterschiedlichen Entwicklungszyklen der Parasiten begründet sein, andererseits ist es wahrscheinlich, dass der starken Oozystenausscheidung eine Immunsuppression der Lämmer folgt, die eine erhöhte Ausscheidung von MDS-Eiern bedingt (Catchpole und Harris, 1989; Agyei, 2003).

VI Schlussfolgerung und Ausblick

Die Untersuchungsergebnisse des Jahres 2009 stützen die Vermutung, dass die ursprünglichen Soay Schafe widerstandsfähiger gegenüber MDS-Infektionen sind als Texel Schafe. Da die Studienergebnisse aus dem Jahre 2009 jedoch im Untersuchungsjahr 2010 nicht bestätigt werden konnten, sind für eine abschließende Betrachtung weitere vergleichende Untersuchungen zwischen diesen Rassen bezüglich der Widerstandsfähigkeit gegenüber MDS-Infektionen nötig.

Als sinnvoll erachtet wird eine längerfristige Studie, die das Alter der Tiere und eine Reinfektion der Schafrassen im Zeitraum nach der vollkommenen Ausbildung von immunoprotektiven Eigenschaften der Schafe einschließt. Die Ausbildung der Th₂-Immunantwort gegenüber MDS-Infektion steht in diesem Zusammenhang im Fokus. Bei einer Untersuchung von Suffolk- und Texel Lämmern, sowie von Mutterschafen beider Rassen, konnten den Lämmern höhere EpG zugewiesen werden als den Mutterschafen (Good et al., 2006). Haarschafen (wie z. B. St. Croix Schafen) wird allgemein eine erhöhte Fähigkeit der Abwehr/Unterdrückung von MDS-Infektionen (wie z. B. *H. contortus*-Infektionen) zugewiesen (Bowdridge et al., 2013). So konnten bei der natürlichen Primärinfektion (*H. contortus*) von St. Croix und Dorset Lämmern, den St. Croix Lämmern niedrigere EpG und niedrigere Wurmbürden zugewiesen werden (Gamble und Zajac, 1992). Bei der experimentellen Primärinfektion hingegen war die EpG beider Rassen noch relativ hoch. Eine auffällige Reduktion der EpG konnte nach Reinfektion mit *H. contortus* bei den St. Croix Lämmern festgestellt werden. Auch in der Studie von Courtney et al. (1985) konnte bei der Untersuchung von St. Croix, Florida Native, Barbados Black Belly, $\frac{3}{4}$ St. Croix und Hausschafen nach einer Primärinfektion mit *H. contortus* kein signifikanter Unterschied der EpG der Tiere nachgewiesen werden. Hingegen konnte nach einer Reinfektion ein deutlicher Unterschied: eine hohe EpG bei den Hausschafen und niedrigere EpG bei den exotischen Rassen festgestellt werden. Die Wurmbürde nach Primärinfektion war bei den St. Croix nicht signifikant und nach Reinfektion signifikant vermindert. Eventuell könnte der in dieser Studie gewonnene Hinweis auf die erhöhte Widerstandsfähigkeit der Soay Schafe gegenüber MDS-Infektionen im Jahr 2009 durch eine in die Studie eingeschlossene Reinfektion deutlicher gemacht werden.

Da die EpG keinen Rückschluss auf die Höhe der Wurmbürde v. a. bei einer Mischinfektion zulässt, sollten neben der EpG weitere Parameter in die Studie eingeschlossen werden. Die Auswahl der Parameter (oder Indikatoren) stellt sich bei Mischinfektionen im Gegensatz zu

Monoinfektionen wie z. B. mit *H. contortus* als schwierig dar. Die verschiedenen möglichen beteiligten Parasitenspezies bei einer Mischinfektion erhöhen zwingend die Menge der benötigten spezifischen Parameter, um diese nachzuweisen. Gleichzeitig droht aber deren Sensitivität unter den Umständen einer Mischinfektion (z. B. durch Kreuzreaktivitäten) zu leiden. Da für den FAMACHA[®] Anaemia guide und die Hämatokritabweichung, die normalerweise bei einer Monoinfektion mit *H. contortus* stark korrelieren, in dieser Studie nur schwache Korrelationen nachgewiesen werden konnten, sollten weitere Parameter wie z. B. DISCO (Diarrhoe Score) und Body Condition Score (BCS) in die Studie einbezogen werden. In Studien zu natürlichen Mischinfektionen mit MDS konnte DISCO (Diarrhoe Score) als effektiver Indikator 80 % der behandlungswürdigen Schafe identifizieren (Bentounsi et al., 2012). Der BCS waren negativ assoziiert mit der Anzahl der internalen Parasiten, wobei gemischte Infektionen einen stärker negativen Effekt auf den BCS hatten als Monoinfektionen (Sweeny et al., 2012). Auch die in dieser Studie gescheiterten Verfahren zur Identifikation von spezifischen Antikörper-Spiegeln gegen bestimmte MDS wie *T. circumcincta* (Malama et al., 2014) und *H. contortus* (Li et al., 2007) können wichtige Informationen über die Immunitätslage der Wirtstiere liefern und sollten weiterhin in zukünftigen Studien eingesetzt werden. Molekulardiagnostische Methoden wie die gattungsspezifische PCR in dieser Studie geben genaue Informationen über die qualitative Zusammensetzung der Wurmbürde und sind bei Mischinfektionen daher von herausragender Bedeutung. Wenn es in der Zukunft möglich ist, die aus dem Ei isolierte gattungsspezifische DNA (Demeler et al., 2013b) nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ zu bestimmen, könnte es möglich sein bei Berücksichtigung der Höhe der Eiausscheidung je Parasitenspezies, diese gemessene DNA-Menge auf die Anzahl der adulten Parasiten, die an der Wurmbürde beteiligt sind, je Spezies zurückzurechnen bzw. zu bestimmen. 2013 wurden bereits Studien zum qPCR-Assay für die Detektion und relative Quantifizierung von *Ostertagia ostertagi* und *Cooperia oncophora* (Höglund et al., 2013) und *H. contortus*, *T. circumcincta* und *Tr. colubriformis* (McNally et al., 2013) veröffentlicht. Wenn zukünftig durch weitere molekulare/genetische Untersuchungen Indikatormerkmale für Resistenz gegen MDS-Infektionen mit Genbereichen assoziiert werden können, wäre mit entsprechenden Gentests die Einstufung von Tieren in einen bestimmten Resistenzstatus möglich (Herrmann, 2010). Tiere mit erhöhtem Resistenzstatus gegen MDS-Infektionen könnten gezielt in Kreuzungen innerhalb einer bzw. zwischen Schafrassen und im Zuge des Managements (TST/TT) eingesetzt werden.

VII Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Widerstandsfähigkeit von Soay- und Texel Lämmern gegenüber Infektionen mit Magen-Darm-Strongyloiden (MDS) bei einer natürlichen Infektion unter gleichen Haltungsbedingungen anhand der Parameter: Körpergewicht, FAMACHA[®] Anaemia guide, EpG, Hämatokritwert, Speziesbestimmung von Drittlarven nach Larvenkultur aus rassespezifisch gepoolten Proben, Bestimmung von speziesspezifischen Antikörpern im Serum gegen *T. circumcincta* und *H. contortus* und der Anzahl der Helminthen in der Sektion zu vergleichen und die Prävalenz der im Tierpark Arche Warder e.V. in Schleswig-Holstein vorkommenden GIN zu bestimmen.

Hierzu wurden im Jahr 2009 14 Texel- (9 weiblich/5 männlich) und 11 Soay Lämmer (4 weiblich/7 männlich) und im Jahr 2010 12 Texel- (9 weiblich/3 männlich) und 17 Soay Lämmer (6 weiblich/11 männlich) nach dem Ablammen gemeinsam im Stall und anschließend auf einer Versuchswaide bis zum Ende der Weidesaison (November) gehalten. Die Untersuchung der Lämmer erfolgte im Stall und nach dem Weidegang (Juni 2009/Juli 2010) zunächst im dreiwöchigen bzw. nach Anstieg der EpG >300 im zweiwöchigen Abstand. Bei jeder Probennahme wurden die Lämmer gewogen, allgemein untersucht, eine EDTA- und Serum-Blutprobe aus der *V. jugularis externa* und eine Kotprobe rektal entnommen und kranke Tiere behandelt. Im Anschluss an die Probennahme wurden je Lamm die EpG/OpG mit dem modifizierten McMaster-Zählverfahren (untere Nachweisgrenze 2009: 100, 2010: 50) und der Hämatokritwert mit der Mikrohämatokritmethode ermittelt. Im Jahr 2010 wurden je Rasse gepoolte Kotproben zur Larvenkultur vermischt, 7 Tage lang inkubiert und daraus Drittlarven mittels modifizierten Larvenauswanderungsverfahren nach Baermann-Wetzel gewonnen. Im Labor des Instituts für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der FU Berlin wurden die Drittlarven zur Speziesbestimmung mittels qualitativer gattungsspezifischer PCR untersucht. Ein bereits im Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der FU Berlin etablierter ELISA zur Detektion von spezifischen Antikörpern gegen *T. circumcincta* Ganzwurmantigen in Ziegen wurde als Grundlage für die Etablierung eines ELISA zur Detektion von spezifischen Antikörpern gegen *T. circumcincta* Ganzwurmantigen in Schafen genutzt. Zur Detektion von spezifischen Antikörpern gegen das 24 kDa exkretorisch-sekretorische Protein von *H. contortus* (HcES24) wurde das HCES24 Protein für den Einsatz im ELISA rekombinant hergestellt. Am Ende eines jeden Untersuchungsjahres wurden 3 Lämmer zufällig ausgewählt, euthanasiert und der Magen-Darm-Trakt in der Sektion auf adulte Helminthen untersucht. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Programm Microsoft[®] Excel[®]

2008 for Mac Version 12.2.0 (090605) und R Version 2.12.2 ((2011-02-25), ©2011 The R Foundation for Statistical Computing).

Für beide Untersuchungsjahre unterschieden sich das mittlere Körpergewicht (Texel Schafe (T): 32,47 kg, Soay Schafe (S): 13,93 kg) und der mittlere Hämatokritwert (S: 33,6 %, T: 30,1 %) zwischen den Rassen höchst signifikant (t-Test, p-Wert: $\leq 0,001^{***}$), wobei nur für Soay Schafe ein signifikanter geschlechtsspezifischer Unterschied des mittleren Körpergewichts festgestellt werden konnte (mittleres KGW weiblich: ca. 13,29 kg/männlich: ca. 14,29 kg; t-Test, p-Wert: 0,04*). Die Hämatokritwertabweichung hatte einen signifikanten Einfluß auf die Gewichtsveränderung (LMM; p-Wert: 0,0377*): Je höher die Hämatokritwertabweichung desto höher die Gewichtsveränderung. Die mittlere Hämatokritwertabweichung war im Jahr 2009 tendenziell für beide Rassen negativer als im Jahr 2010 (2009: S:-0,21, T:-0,82, 2010: S: +0,3, T:-0,01) und Texel Schafe hatten eine negativere mittlere Hämatokritwertabweichung als Soay Schafe im Jahr 2009. Die FAMACHA[®] Anaemia guide Kategorie war bei beiden Rassen im Jahr 2010 höher als im Jahr 2009 (LMM: p-Wert: 0,000415^{***}) und Texel Schafe hatten eine tendenziell höhere FAMACHA[®] Anaemia guide Kategorie als Soay Schafe in beiden Untersuchungsjahren.

In beiden Untersuchungsjahren konnten vor Weideaustrieb keine MDS-Eier und Lungenwurmlarven, vereinzelt aber *S. papillosus*- und Kokzidien-Eier in den Kotproben der Schafrassen nachgewiesen werden. Die Prävalenz für gastrointestinale Parasiteneier in der Kotuntersuchung betrug für beide Schafrassen und Untersuchungsjahre ca. 59 % (MDS-Eier), ca. 37 % (*S. papillosus*-Eier), ca. 82 % (Kokzidien-Oozysten), ca. 4 % (*Moniezia* spp.-Eier) und ca. 3,1 % (*Nematodirus* spp.-Eier).

Die MDS-Eiausscheidung der Texel Schafe war im Jahr 2009 signifikant höher (LMM: p-Wert: 0,01*) und häufiger (GLMM: p-Wert: 0,0012^{**}) als bei den Soay Schafen. Soay Schafe schieden im Jahr 2010 tendenziell nicht signifikant (p-Wert: 0,426) mehr und nicht signifikant öfter (p-Wert: 0,523) MDS-Eier mit dem Kot aus als Texel Schafe. Die Höhe der MDS-Eiausscheidung war im Jahr 2009 für Texel Schafe höchst signifikant (p-Wert: $< 0,001^{***}$) höher als im Jahr 2010, während für Soay Schafe die Höhe der MDS-Eiausscheidung in 2010 signifikant (p-Wert: 0,034*) höher war als im Jahr 2009.

Texel Schafe schieden häufiger *S. papillosus*-Eier mit dem Kot aus als Soay Schafe (GLMM: p-Wert: 0,00512^{**}). Im Jahr 2010 war die *S. papillosus*-Eiausscheidung niedriger als im Jahr 2009 (LMM: p-Wert: 0,0023^{**}). Hinsichtlich der Kokzidien-Oozysten-Ausscheidung konnte keinem der untersuchten Parameter ein signifikanter Einfluss zugesprochen werden.

Bei der Untersuchung mittels gattungsspezifischer PCR konnte für beide Schafrassen am häufigsten ein Befall mit *Tr. colubriformis*: (Relative Häufigkeit: S:1/T:0,8) gefolgt von

Zusammenfassung

H. contortus: (S:0,8/T:0,8) und *T. circumcincta*: (S:0,8/T:0,4) nachgewiesen werden. Während bei der Sektion im Jahr 2010 im Labmagen *Teladorsagia* spp. gefolgt von *H. contortus* dominierten, waren im Dünndarm vor allem *Trichostrongylus* spp. und *Nematodirus* spp. zu finden. Insgesamt weisen die Ergebnisse der Kotuntersuchung, der gattungsspezifischen PCR und der Sektion beider Untersuchungsjahre auf eine Mischinfektion der Tiere im Tierpark Arche Warder e.V. mit den Spezies *Trichostrongylus* spp., *Nematodirus* spp., *Teladorsagia* spp., *H. contortus*, *Moniezia* spp., *Eimeria* spp. und *S. papillosus* hin.

Die Durchführung der ELISA wurde abgebrochen, da mit den zur Verfügung stehenden Negativseren keine nach Messung der OD_{492 nm} ausreichende Distribution zwischen *H. contortus*-Antikörper bzw. *T. circumcincta*-Antikörper negativen und positiven Seren festgestellt werden konnte. Das 24 kDa exkretorisch-sekretorische Protein von *H. contortus* konnte jedoch erfolgreich rekombinant hergestellt werden.

Bei der Interpretation der Ergebnisse wurden die (aufgrund der im Widerspruch zur Versuchsplanung durchgeführten Entwurmung der Schafe im Mai 2010) voneinander abweichenden Infektionsverläufe der beiden Untersuchungsjahre getrennt berücksichtigt. Die nur für das Jahr 2009 nachgewiesene signifikant höhere MDS-Eiausscheidung der Texel Schafe kann somit ein Hinweis für die stärkere Widerstandsfähigkeit der Soay Schafe gegenüber MDS-Infektionen sein. Dennoch kann die eingangs aufgestellte Hypothese, Soay Schafe wären widerstandsfähiger gegenüber einer MDS-Infektion als Texel Schafe, nicht allein durch diese Studie gestützt werden. Weitere vergleichende und eine Reinfektion mit MDS einschließende Studien zwischen diesen Schafrassen sind nötig, um genauere Aussagen hinsichtlich der Widerstandsfähigkeit gegenüber MDS-Infektionen machen zu können und die bereits durch diese Studie gewonnenen interessanten Ergebnisse im Jahr 2009 zu ergänzen.

VIII Summary

Comparing investigations of the natural infection with *Haemonchus contortus* and *Teladorsagia circumcincta* including immunological and clinical parameters in a high performance sheep breed (Texel sheep) and an old domestic sheep breed (Soay sheep)

The objective of the present study was to compare Soay- and Texel lamb regarding potential resilience/resistance against the natural infection with gastrointestinal nematodes by determining the parameters: live weight, FAMACHA[®] Anaemia guide, faecal egg count, blood packed cell volume, species determination of third-stage larvae after larval culture of pooled faecal samples, determination of species-specific antibodies of sera against *T. circumcincta* and *H. contortus* and the number of adult helminths in section and to determine the prevalence of gastrointestinal nematodes in the Tierpark Arche Warder e.V. in Schleswig-Holstein. For this study 14 Texel (9 female/5 male) and 11 Soay lambs (4 female/7 male) in 2009 and 12 Texel (9 female/5 male) and 17 Soay lambs (6 female/11 male) in 2010 were kept together in the same stable after lambing and on the same pasture until the end of the pasture season (November).

The first investigation of lambs was carried out in stable and then subsequently from June 2009/July 2010 initially in a three-weekly interval and after an faecal egg count value >300 in a two-weekly interval on pasture. At every sampling occasion the lambs were clinically examined, weighted, blood (EDTA/serum) and faecal samples were taken and sick animals were treated. Additionally individual faecal and oocyst egg counts were determined using a modified McMaster technique (detection limit 2009:100, 2010:50) and the packed cell volume obtained using the standard microhematocrit-method. In 2010 faecal samples of all animals of the same breed were pooled, mixed for larval culture, incubated 7 days and third stage larvae were extracted by modified larval migration (Baermann-Wetzel) technique. In the laboratory (Institute of Parasitology and Tropical Veterinary Medicine, FU Berlin) third stage larvae were used for species determination by qualitative genus-specific PCR. An already established ELISA for the detection of specific antibodies against *T. circumcincta* total (crude) worm antigen in goats of the institute was used as basis for the establishment of an ELISA for the detection of specific antibodies against *T. circumcincta* total (crude) worm antigen in sheep. For the detection of specific antibodies against the 24 kDa excretory-secretory protein of *H. contortus* (HcES24), the HcES24 protein was produced recombinant

Summary

for the use in ELISA. At the end of the investigation three lambs were selected randomly, were euthanased and the gastrointestinal tract was investigated for presence of adult helminths.

The statistical analysis was carried out with program Microsoft® Excel® 2008 for Mac Version 12.2.0 (090605) and R Version 2.12.2 ((2011-02-25), ©2011 The R Foundation for Statistical Computing). Mean body weight (Texel sheep: 32.47 kg, Soay sheep: 13.93 kg; t-test, p-value: $\leq 0.001^{***}$) and mean hematocrit value (Soay sheep: 33.6 %, Texel sheep: 30.1 %; t-test, p-value: $\leq 0.001^{***}$) of both breeds and for both investigation years were significantly different, and only in Soay sheep a significant gender-specific difference of the mean body weight was found (mean female body weight: ca. 13.29 kg, mean male body weight: ca. 14.29 kg; t-test, p-value: 0.04*). The hematocrit deviance had a significant effect on the body weight change (LMM; p-Wert: 0.0377*): The higher hematocrit deviance the higher body weight change. The mean hematocrit deviance for both breeds were by trend more negative in 2009 than in 2010 (2009: S:-0.21, T:-0.82, 2010: S: +0.3, T:-0.01) and Texel sheep had a more negative mean hematocrit value than Soay sheep in 2009. For both breeds FAMACHA® Anaemia guide category was higher in 2010 than in 2009 (LMM: p-value: 0.000415^{***}) and Texel sheep had by trend a higher FAMACHA® Anaemia guide category than Soay sheep in both investigation years. In 2009 and 2010 no MDS-eggs and lung worm larvae, but sporadically *S. papillosus*- and *Coccidia*-oocysts were found in faecal samples of both sheep breeds prior to turnout. The prevalence of gastrointestinal nematode eggs in the faecal samples for both breeds and years were ca. 59 % (MDS), ca. 37 % (*S. papillosus*), ca. 82 % (*Coccidia* spp.), ca. 4 % (*Moniezia* spp.) and ca. 3.1 % (*Nematodirus* spp.).

In 2009, intensity (LMM: p-value: 0.01*) and frequency (GLMM: p-value: 0.0012**) of MDS egg excretion of Texel sheep were significantly increased compared to those of Soay sheep. In 2010 Soay sheep had by trend a higher (p-value: 0.426) and more frequently (p-value: 0,523) MDS egg excretion than Texel sheep. The intensity of MDS egg excretion of Texel sheep was high significantly (p-value: $< 0,001^{***}$) higher in 2009 compared to those of 2010, while the intensity of MDS egg excretion of Soay sheep was significantly higher in 2010 (p-value: 0.034*) compared to those of 2009.

Texel sheep had a higher *S. papillosus* egg excretion frequency than Soay sheep (GLMM: p-value: 0.00512**). In 2010 *S. papillosus* egg excretion intensity was lower than 2009 (LMM: p-value: 0.0023**). Concerning the *Coccidia* oocyst excretion no significant influence of any parameter was found.

The qualitative genus-specific PCR revealed that animals of both breeds were most frequently infected with *Tr. colubriformis*: (S:1/T:0.8) followed by *H. contortus*: (S:0.8/T:0.8)

and *T. circumcincta*: (S:0.8/T:0.4). In 2010 *Teladorsagia* spp. dominated, followed by *H. contortus* in the abomasum and in the small intestine most frequently *Trichostrongylus* spp., followed by *Nematodirus* spp. were found in sectioned animals. The results of coproscopical analyses, PCR and section in 2009 and 2010 also indicated a mixed infection in sheep of both breeds with *Trichostrongylus* spp., *Nematodirus* spp., *Teladorsagia* spp., *H. contortus*, *Moniezia* spp., *Eimeria* spp. and *S. papillosus* in Tierpark Arche Warder e.V.

The procedure of ELISA had been cancelled, because there could not be determined an adequate distribution between the provided *H. contortus*- and *T. circumcincta*-antibody negative and positive sera. However the recombinant production of 24 kDa excretory-secretory protein of *H. contortus* was successful.

Regarding interpretation of the results both investigation years were considered separately due to the deviation in the infection process of following the accidental deworming of sheep in May 2010 (which was inconsistent with the experimental plan). The significantly higher excretion of MDS-eggs in Texel sheep could be seen as a potential evidence for the increased resilience/resistance of Soay sheep against MDS-infection. However, the initial hypothesis, Soay sheep would be more resilient/resistant against MDS-infection than Texel sheep, could not be clearly corroborated. Accordingly, additional studies including comparison and reinfection between these breeds are necessary provide better insight regarding potential resilience/resistance against gastrointestinal nematode infection of one of the investigated breeds and to verify the interesting results of 2009 in this study.

IX Literaturverzeichnis

- Abbott, K. A., Taylor, M. A., Stubbings, L. A., 2004, Anthelmintic resistance management in sheep. *Vet Rec* 154, 735-736.
- Agyei, A. D., 2003, Epidemiological studies on gastrointestinal parasitic infections of lambs in the Coastal Savanna regions of Ghana. *Trop Anim Health Prod* 35, 207-217.
- Alba-Hurtado, F., Muñoz-Guzmán, M. A., 2013, Immune responses associated with resistance to haemonchosis in sheep. *Biomed Res Int* 2013, Article ID 162158.
- Alba-Hurtado, F., Romero-Escobedo, E., Muñoz-Guzmán, M. A., Torres-Hernández, G., Becerril-Pérez, C. M., 2010, Comparison of parasitological and productive traits of Criollo lambs native to the central Mexican Plateau and Suffolk lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 172, 277-282.
- Albers, G. A., Gray, G. D., Piper, L. R., Barker, J. S., Le Jambre, L. F., Barger, I. A., 1987, The genetics of resistance and resilience to *Haemonchus contortus* infection in young merino sheep. *Int J Parasitol* 17, 1355-1363.
- Almeida, F. A., Garcia, K. C., Torgerson, P. R., Amarante, A. F., 2010, Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. *Parasitol Int* 59, 622-625.
- Álvarez-Sánchez, M. A., Pérez García, J., Bartley, D., Jackson, F., Rojo-Vázquez, F. A., 2005, The larval feeding inhibition assay for the diagnosis of nematode anthelmintic resistance. *Experimental Parasitology* 110, 56-61.
- Amarante, A. F. T., Bricarello, P. A., Huntley, J. F., Mazzolin, L. P., Gomes, J. C., 2005, Relationship of abomasal histology and parasite-specific immunoglobulin A with the resistance to *Haemonchus contortus* infection in three breeds of sheep. *Vet Parasitol* 128, 99-107.
- Arunkumar, S., Sangaran, A., 2009, An immunological analysis on sharing of antigens amongst gastro-intestinal nematodes using inhibition ELISA. *Indian Journal of Science and Technology* 2, 31-35.
- Askenasy, N., Kaminitz, A., Yarkoni, S., 2008, Mechanisms of T regulatory cell function. *Autoimmun Rev* 7, 370-375.
- Australian Pesticides & Veterinary Medicines Authority, 2013, Application Summary for Application No 59575, http://www.apvma.gov.au/application_summaries/59575.pdf.
- Avrameas, S., 1969, Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. *Immunochemistry* 6, 43-52.
- Avrameas, S., Uriel, J., 1966, Méthode de marquage d'antigènes et d'anticorps avec des enzymes et son application en immunodiffusion. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 262, 2543-2545.
- Baermann, G., 1917, Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum- (Nematoden)- Larven in Erdproben. *Geneesk. Tijdschr. Nederl. - Indië* 57, 131-137.
- Bahirathan, M., Miller, J. E., Barras, S. R., Kearney, M. T., 1996, Susceptibility of Suffolk and Gulf Coast Native suckling lambs to naturally acquired strongylate nematode infection. *Vet Parasitol* 65, 259-268.
- Baker, K. E., George, S. D., Stein, P. A., Seewald, W., Rolfe, P. F., Hosking, B. C., 2012, Efficacy of monepantel and anthelmintic combinations against multiple-resistant

- Haemonchus contortus in sheep, including characterisation of the nematode isolate. *Vet Parasitol* 186, 513-517.
- Baker, R.L., Gray, G.D. , 2004, Appropriate breeds and breeding schemes for sheep and goats in the tropics, ACIAR Monograph 113 Edition Canberra, Australien.
- Balic, A., Bowles, V. M., Liu, Y. S., Meeusen, E. N., 2003, Local immune responses in sensitized sheep following challenge infection with *Teladorsagia circumcincta*. *Parasite Immunol* 25, 375-381.
- Balic, A., Cunningham, C. P., Meeusen, E. N., 2006, Eosinophil interactions with *Haemonchus contortus* larvae in the ovine gastrointestinal tract. *Parasite Immunol* 28, 107-115.
- Barger, I. A., 1988, Resistance of young lambs to *Haemonchus contortus* infection, and its loss following anthelmintic treatment. *Int J Parasitol* 18, 1107-1109.
- Barger, I. A., 1993, Influence of sex and reproductive status on susceptibility of ruminants to nematode parasitism. *Int J Parasitol* 23, 463-469.
- Barnes, E. H., Dobson, R. J., Donald, A. D., Waller, P. J., 1988, Predicting populations of *Trichostrongylus colubriformis* infective larvae on pasture from meteorological data. *Int J Parasitol* 18, 767-774.
- Barrère, V., Falzon, L. C.T., Shakya, K. P., Menzies, P. I., Peregrine, A. S., Prichard, R. K., 2013, Assessment of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* in sheep flocks in Ontario, Canada: Comparison of detection methods for drug resistance. *Vet Parasitol* 198, 159-165.
- Bartley, D. J., Devin, L., Nath, M., Morrison, A. A., 2015, Selection and characterisation of monepantel resistance in *Teladorsagia circumcincta* isolates. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 5, 69-76.
- Bartram, D. J., Leathwick, D. M., Taylor, M. A., Geurden, T., Maeder, S. J., 2012, The role of combination anthelmintic formulations in the sustainable control of sheep nematodes. *Vet Parasitol* 186, 151-158.
- Bath, G. F., Wyk, J. A. 2001. Using the FAMACHA© system on commercial sheep farms in South Africa. In Proceedings of the 5th International Sheep Veterinary Congress (Cape Town, South Africa).
- Bauer, C., Conraths, F. J., 1994, Comparative efficacy of moxidectin and mebendazole against gastrointestinal nematodes in experimentally infected lambs. *Vet Rec* 135, 136-138.
- Bauer, C., Dauschies, A., Schnieder, T., Stoye, M., 1986, Effect of a combination of fenbendazole and triclabendazole on naturally acquired helminth infections of sheep. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 93, 456-458.
- Beddies, G., 1999. Erstellung hämatologischer Referenzwerte mit dem für die Tierart Schaf etablierten Hämatologiesystem Technion H*1. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Beh, K. J., Maddox, J. F., 1996, Prospects for development of genetic markers for resistance to gastrointestinal parasite infection in sheep. *Int J Parasitol* 26, 879-897.
- Benavides, Magda Vieira, Sonstegard, Tad S., Kemp, Stephen, Mugambi, John M., Gibson, John P., Baker, Robert Leyden, Hanotte, Olivier, Marshall, Karen, Van Tassell, Curtis, 2015, Identification of Novel Loci Associated with Gastrointestinal Parasite Resistance in a Red Maasai x Dorper Backcross Population. *PLoS ONE* 10, e0122797.
- Bendixsen, T., Windon, R. G., Huntley, J. F., MacKellar, A., Davey, R. J., McClure, S. J., Emery, D. L., 2004, Development of a new monoclonal antibody to ovine chimeric IgE and its detection of systemic and local IgE antibody responses to the intestinal nematode *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet Immunol Immunopathol* 97, 11-24.

- Benesch, C., 1993. Parasiten des Magen-Darm-Traktes von Schafen in Hessen: eine Sektionsstudie. Universität Giessen, Giessen, Deutschland.
- Bennet, E.-M., Behm, C., Bryant, C., Chevis, R. A. F., 1980, Synergistic action of mebendazole and levamisole in the treatment of a benzimidazole-resistant *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet Parasitol* 7, 207-214.
- Bentounsi, B., Meradi, S., Cabaret, J., 2012, Towards finding effective indicators (diarrhoea and anaemia scores and weight gains) for the implementation of targeted selective treatment against the gastro-intestinal nematodes in lambs in a steppic environment. *Vet Parasitol* 187, 275-279.
- Beraldi, D., McRae, A. F., Gratten, J., Pilkington, J. G., Slate, J., Visscher, P. M., Pemberton, J. M., 2007, Quantitative trait loci (QTL) mapping of resistance to strongyles and coccidia in the free-living Soay sheep (*Ovis aries*). *Int J Parasitol* 37, 121-129.
- Bickhardt, K., König, G., 1985, Blutmesswerte von gesunden Mutterschafen der Merino- und Schwarzkopfrasse zur Zeit der Geburt (Referenzwerte). *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 92, 319-322.
- Bishop, S. C., 2012, Possibilities to breed for resistance to nematode parasite infections in small ruminants in tropical production systems. *Animal* 6, 741-747.
- Bishop, S. C., Jackson, F., Coop, R. L., Stear, M. J., 2004, Genetic parameters for resistance to nematode infections in Texel lambs. *Anim Sci* 78, 185-194.
- Bishop, S. C., Morris, C. A., 2007, Genetics of disease resistance in sheep and goats. *Small Ruminant Research* 70, 48-59.
- Bisset, S. A., Vlassoff, A., Douch, P. G., Jonas, W. E., West, C. J., Green, R. S., 1996, Nematode burdens and immunological responses following natural challenge in Romney lambs selectively bred for low or high faecal worm egg count. *Vet Parasitol* 61, 249-263.
- Bisset, S. A., Vlassoff, A., West, C. J., Morrison, L., 1997, Epidemiology of nematodosis in Romney lambs selectively bred for resistance or susceptibility to nematode infection. *Vet Parasitol* 70, 255-269.
- Borgsteede, F., H., Dercksen, D., D., Huijbers, R., 2007, Doramectin and albendazole resistance in sheep in The Netherlands. *Vet Parasitol* 144, 180-183.
- Bostedt, H., Mayr, B., 1976, Über die Entwicklung des roten Hämogrammes bei Lämmern in den ersten Lebenswochen unter natürlichen und artifiziellen Aufzuchtbedingungen *Berl Münch Tierarztl Wochenschr* 89, 336-340.
- Bostedt, H. und Dedié, K., 1996, Schaf- und Ziegenkrankheiten, 2. Aufl. Edition. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.
- Bowdridge, S., MacKinnon, K., McCann, J. C., Zajac, A. M., Notter, D. R., 2013, Hair-type sheep generate an accelerated and longer-lived humoral immune response to *Haemonchus contortus* infection. *Vet Parasitol* 196, 172-178.
- Bradford, M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of micro-gram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Bradley Sr, R. E., Radhakrishnan, C. V., Patil Kulkarni, V. G., Loggins, P. E., 1973, Responses in Florida native and Rambouillet lambs exposed to one and two oral doses of *Haemonchus contortus*. *Am J Vet Res* 34, 729-735.
- Bricarello, P. A., Gennari, S. M., Oliveira-Sequeira, T. C. G., Vaz, C. M. S. L., Gonçalves de Gonçalves, I., Echevarria, F. A. M., 2004, Worm burden and immunological responses in Corriedale and Crioula Lanada sheep following natural infection with *Haemonchus contortus*. *Small Ruminant Research* 51, 75-83.

- Brown, E. A., Pilkington, J. G., Nussey, D. H., Watt, K. A., Hayward, A. D., Tucker, R., Graham, A. L., Paterson, S., Beraldi, D., Pemberton, J. M., Slate, J., 2013, Detecting genes for variation in parasite burden and immunological traits in a wild population: testing the candidate gene approach. *Mol Ecol* 22, 757-773.
- Burke, J. M., Miller, J. E., 2004a, Relative resistance to gastrointestinal nematode parasites in Dorper, Katahdin, and St. Croix lambs under conditions encountered in the southeastern region of the United States. *Small Ruminant Research* 54, 43-51.
- Burke, J. M., Miller, J. E., Mosjidis, J. A., Terrill, T. H., 2012, Use of a mixed sericea lespedeza and grass pasture system for control of gastrointestinal nematodes in lambs and kids. *Vet Parasitol* 25, 328-336.
- Burke, J. M., Miller, J. E., Olcott, D. D., Olcott, B. M., Terrill, T. H., 2004b, Effect of copper oxide wire particles dosage and feed supplement level on *Haemonchus contortus* infections in lambs. *Vet Parasitol* 123, 235-243.
- Burnette, W. N., 1981, "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112, 195-203.
- Buske, R., Santurio, J. M., de Oliveira, C. V., Bianchini, L. A., da Silva, J. H., de la Rue, M. L., 2013, In vitro influence of temperature on the biological activity of the fungus *Duddingtonia flagrans* against *Haemonchus contortus* in sheep. *Parasitol Res* 112, 473-478.
- Calvete, C., Uriarte, J., 2013, Improving the detection of anthelmintic resistance: Evaluation of faecal egg count reduction test procedures suitable for farm routines. *Vet Parasitol* 196, 438-452.
- Castillo, J. A., Medina, R. D., Villalobos, J. M., Gayosso-Vázquez, A., Ulloa-Arvízu, R., Rodríguez, R. A., Ramírez, H. P., Morales, R. A., 2011, Association between major histocompatibility complex microsatellites, fecal egg count, blood packed cell volume and blood eosinophilia in Pelibuey sheep infected with *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 177, 339-344.
- Catchpole, E. A., Morgan, B. J. T., Coulson, T. N., Freeman, S. N., Albon, S. D., 2000, Factors influencing Soay sheep survival. *Journal of the Royal Statistical Society: Series C (Applied Statistics)* 49, 453-472.
- Catchpole, J., Harris, T. J., 1989, Interaction between coccidia and *Nematodirus battus* in lambs on pasture. *Vet Rec* 124, 603-605.
- Chandrawathani, P., Waller, P. J., Adnan, M., Höglund, J., 2003, Evolution of high-level, multiple anthelmintic resistance on a sheep farm in Malaysia. *Trop Anim Health Prod* 35, 17-25.
- Charon, K. M., 2004, Genes controlling resistance to gastrointestinal nematodes in ruminants. *Animal Science Papers and Reports* 22, 135-139.
- Chen, X., Guo, P., Xie, Z., Shen, P., 2001, A convenient and rapid method for genetic transformation of *E. coli* with plasmids. *Antonie Van Leeuwenhoek* 80, 297-300.
- Chessa, B., Pereira, F., Arnaud, F., Amorim, A., Goyache, F., Mainland, I., Kao, R. R., Pemberton, J. M., Beraldi, D., Stear, M. J., Alberti, A., Pittau, M., Iannuzzi, L., Banabazi, M. H., Kazwala, R. R., Zhang, Y. P., Arranz, J. J., Ali, B. A., Wang, Z., Uzun, M., Dione, M. M., Olsaker, I., Holm, L. E., Saarma, U., Ahmad, S., Marzanov, N., Eythorsdottir, E., Holland, M. J., Ajmone-Marsan, P., Bruford, M. W., Kantanen, J., Spencer, T. E., Palmarini, M., 2009, Revealing the history of sheep domestication using retrovirus integrations. *Science* 324, 532-536.

- Christley, R. M., Morgan, K. L., Parkin, T. D., French, N. P., 2003, Factors related to the risk of neonatal mortality, birth-weight and serum immunoglobulin concentration in lambs in the UK. *Prev Vet Med* 57, 209-226.
- Clark, C. H., Kiesel, G. K., Goby, C. H., 1962, Measurements of blood loss caused by *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Am J Vet Res* 23, 977-980.
- Clutton-Brock, T. H., Pemberton, J. M. 2004. *Soay Sheep: Dynamics and Selection in an Island Population* (Cambridge, UK, Cambridge University Press).
- Clutton-Brock, T. H., Price, O. F., Albon, S. D., Jewell, P. A., 1992, Early Development and Population Fluctuations in Soay Sheep. *Journal of Animal Ecology* 61, 381-396.
- Colditz, I. G., Le Jambre, L. F., 2008, Development of a faecal occult blood test to determine the severity of *Haemonchus contortus* infections in sheep. *Vet Parasitol* 153, 93-99.
- Colditz, I. G., Le Jambre, L. F., Hosse, R., 2002, Use of lectin binding characteristics to identify gastrointestinal parasite eggs in faeces. *Vet Parasitol* 105, 219-227.
- Cole, V. G., 1986, *Helminth parasites of sheep and cattle Vol 8*. Australian Government Publishing Service, Canberra.
- Coles, G. C., Bauer, C., Borgsteede, F. H. M., Geerts, S., Klei, T. R., Taylor, M. A., Waller, P. J., 1992, World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 44, 35-44.
- Coles, G. C., Jackson, F., Pomroy, W. E., Prichard, R. K., von Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., Taylor, M. A., Vercruysse, J., 2006, The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 136, 167-185.
- Coltman, D. W., Pilkington, J. G., Smith, J. A., Pemberton, J. M., 1999, Parasite-Mediated Selection against Inbred Soay Sheep in a Free-Living, Island Population. *Evolution* 53, 1259-1267.
- Coltman, D. W., Pilkington, J., Kruuk, L. E., Wilson, K., Pemberton, J. M., 2001a, Positive genetic correlation between parasite resistance and body size in a free-living ungulate population. *Evolution* 55, 2116-2125.
- Coltman, D. W., Wilson, K., Pilkington, J. G., Stear, M. J., Pemberton, J. M., 2001b, A microsatellite polymorphism in the gamma interferon gene is associated with resistance to gastrointestinal nematodes in a naturally-parasitized population of Soay sheep. *Parasitology* 122, 571-582.
- Conolly, J., Colledge, S., Dobney, K., Vigne, J.-D., Peters, J., Stopp, B., Manning, K., Shennan, S., 2011, Meta-analysis of zooarchaeological data from SW Asia and SE Europe provides insight into the origins and spread of animal husbandry. *Journal of Archaeological Science* 38, 538-545.
- Coop, R. L., Huntley, J. F., Smith, W. D., 1995, Effect of dietary protein supplementation on the development of immunity to *Ostertagia circumcincta* in growing lambs. *Res Vet Sci* 59, 24-29.
- Coop, R. L., Kyriazakis, I., 1999, Nutrition-parasite interaction. *Vet Parasitol* 84, 187-204.
- Courtney, C. H., Parker, C. F., McClure, K. E., Herd, R. P., 1985, Resistance of exotic and domestic lambs to experimental infection with *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol* 15, 101-109.
- Craig, B. H., Jones, O. R., Pilkington, J. G., Pemberton, J. M., 2009, Re-establishment of nematode infra-community and host survivorship in wild Soay sheep following anthelmintic treatment. *Veterinary Parasitology* 161, 47-52.

- Craig, B. H., Pilkington, J. G., Pemberton, J. M., 2006, Gastrointestinal nematode species burdens and host mortality in a feral sheep population. *Parasitology* 133, 485-496.
- Craig, B. H., Tempest, L. J., Pilkington, J. G., Pemberton, J. M., 2008, Metazoan-protozoan parasite co-infections and host body weight in St Kilda Soay sheep. *Parasitology* 135, 433-441.
- Craig, N. M., Miller, H. R., Smith, W. D., Knight, P. A., 2007, Cytokine expression in naive and previously infected lambs after challenge with *Teladorsagia circumcincta*. *Vet Immunol Immunopathol* 120, 47-54.
- Craig, T. M., 2007, Parasites of Sheep and Goats, In: Baker, D.G. (Ed.) *Flynn's Parasites of Laboratory Animals*. Blackwell Publishing Ltd, pp. 661-662.
- Craig, T. M., Baker, D. G., 2008, Parasites of Sheep and Goats, In: *Flynn's Parasites of Laboratory Animals*. Blackwell Publishing Ltd, pp. 641-691.
- Cringoli, G., 2006, FLOTAC® , a novel apparatus for a multivalent faecal egg count technique. *Parassitologia* 48, 381-384.
- Cringoli, G., Rinaldi, L., Aureli, M. P., Utzinger, J., 2010, FLOTAC®: New multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. *Nature Protocols* 5, 503-515.
- Cringoli, G., Veneziano, V., Jackson, F., Vercruysse, J., Greer, A. W., Fedele, V., Mezzino, L., Rinaldi, L., 2008, Effects of strategic anthelmintic treatments on the milk production of dairy sheep naturally infected by gastrointestinal strongyles. *Vet Parasitol* 156, 340-345.
- Cringoli, G., Veneziano, V., Mezzino, L., Morgogliano, M., Pennacchio, S., Rinaldi, L., Salamina, V., 2009, The effect of moxidectin 0,1% vs ivermectin 0,08% on milk production in sheep naturally infected by gastrointestinal nematodes. *BMC Vet Res* 5, 41.
- Crofton, H. D., 1965, Ecology and biological plasticity of sheep nematodes. I. The effect of temperature on the hatching of eggs of some nematode parasites of sheep. *Cornell Vet* 55, 242-250.
- Cruz-Rojo, M. A., Martínez-Valladares, M., Álvarez-Sánchez, M. A., Rojo-Vázquez, F. A., 2012a, Effect of infection with *Teladorsagia circumcincta* on milk production and composition in Assaf dairy sheep. *Vet Parasitol* 185, 194-200.
- Cruz-Rojo, M. A., Martínez-Valladares, M., Rojo-Vázquez, F. A., 2012b, *Teladorsagia circumcincta* antibodies in serum and milk samples in experimentally infected lactating ewes. *Vet Parasitol* 188, 386-390.
- Da Silva, Aleksandro S., Schafer, Andressa S., Aires, Adelina R., Tonin, Alexandre A., Pimentel, Victor C., Oliveira, Camila B., Zanini, Daniela, Schetinger, Maria R. C., Lopes, Sonia T. A., Leal, Marta L. R., 2013, E-ADA activity in erythrocytes of lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus* and its possible functional correlations with anemia. *Research in Veterinary Science* 95, 1026-1030.
- Dargie, J. D., Allonby, E. W., 1975, Pathophysiology of single and challenge infections of *Haemonchus contortus* in Merino sheep: studies on red cell kinetics and the "self-cure" phenomenon. *Int J Parasitol* 5, 147-157.
- Datta, F. U., Nolan, J. V., Rowe, J. B., Gray, G. D., 1998, Protein supplementation improves the performance of parasitised sheep fed a straw-based diet. *Int J Parasitol* 28, 1269-1278.
- Demeler, J., Gill, J. H., von Samson-Himmelstjerna, G., Sangster, N. C., 2013a, The in vitro assay profile of macrocyclic lactone resistance in three species of sheep trichostrongyloids. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 3, 109-118.
- Demeler, J., Küttler, U., El-Abdellati, A., Stafford, K., Rydzik, A., Varady, M., Kenyon, F., Coles, G., Höglund, J., Jackson, F., Vercruysse, J., von Samson-Himmelstjerna, G., 2010,

- Standardization of the larval migration inhibition test for the detection of resistance to ivermectin in gastro intestinal nematodes of ruminants. *Vet Parasitol* 174, 58-64.
- Demeler, J., Ramunke, S., Wolken, S., Ianiello, D., Rinaldi, L., Gahutu, J. B., Cringoli, G., von Samson-Himmelstjerna, G., Krucken, J., 2013b, Discrimination of gastrointestinal nematode eggs from crude fecal egg preparations by inhibitor-resistant conventional and real-time PCR. *PLoS One* 8, e61285.
- Demeler, J., Schein, E., von Samson-Himmelstjerna, G., 2012, Advances in laboratory diagnosis of parasitic infections of sheep. *Vet Parasitol* 189, 52-64.
- Demeler, J., von Samson-Himmelstjerna, G., Sangster, N. C., 2014, Measuring the effect of avermectins and milbemycins on somatic muscle contraction of adult *Haemonchus contortus* and on motility of *Ostertagia circumcincta* in vitro. *Parasitology* 141, 948-956.
- Deplazes, P., Eckert, J., von Samson-Himmelstjerna, G., Zahner, H., 2012, Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin, 3. Aufl. Edition. Enke Verlag, Stuttgart, Deutschland.
- Di Loria, A., Veneziano, V., Piantedosi, D., Rinaldi, L., Cortese, L., Mezzino, L., Cringoli, G., Ciaramella, P., 2009, Evaluation of the FAMACHA© system for detecting the severity of anaemia in sheep from southern Italy. *Vet Parasitol* 161, 53-59.
- Díaz-Rivera, P., Torres-Hernández, G., Osorio-Arce, M. M., Pérez-Hernández, P., Pulido-Albores, Á. R. , Becerril-Pérez, C. M., Herrera-Haro, J. G. , 2000, Resistance to gastrointestinal parasites in Florida and Pelibuey sheep and their hybrids in the Mexican tropics. *Agrociencia* 34, 13-20.
- Diez-Baños, P., Pedreira, J., Sánchez-Andrade, R., Francisco, I., Suárez, J. L., Díaz, P., Panadero, R., Arias, M., Paineira, A., Paz-Silva, A., Morrondo, P., 2008, Field evaluation for anthelmintic-resistant ovine gastrointestinal nematodes by in vitro and in vivo assays. *J Parasitol* 94, 925-928.
- Domestic Animal Diversity Information Service (FAO), 2014, <http://dad.fao.org>.
- Drudge, J. H., Leland, S. E., Wyant, Z. N. , 1957, Strain variation in the response of sheep nematodes to the action of phenothiazine: II. Studies on pure infections of *Haemonchus contortus*. *Am J Vet Res* 18, 317-325.
- Duncan, J. L., Smith, W. D., Dargie, J. D., 1978, Possible relationship of levels of mucosal IgA and serum IgG to immune unresponsiveness of lambs to *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 4, 21-27.
- Eady, S. J., Woolaston, R. R., Barger, I. A., 2003, Comparison of genetic and nongenetic strategies for control of gastrointestinal nematodes of sheep. *Livestock Production Science* 81, 11-23.
- Egwang, T. G., Slocombe, J. O., 1982, Evaluation of the Cornell-Wisconsin centrifugal flotation technique for recovering trichostrongylid eggs from bovine feces. *Can J Comp Med* 46, 133-137.
- Engvall, E. , Perlmann, P., 1971, Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8, 871-875.
- Epe, C., Kaminsky, R., 2013, New advancement in anthelmintic drugs in veterinary medicine. *Trends Parasitol* 29, 129-134.
- Eysker, M., Bakker, N., Kooyman, F. N., Ploeger, H. W., 2005, The possibilities and limitations of evasive grazing as a control measure for parasitic gastroenteritis in small ruminants in temperate climates. *Vet Parasitol* 129, 95-104.
- Fahrmeir, L., Kneib, T., Lang, S., 2007, Regression: Modelle, Methoden und Anwendungen, 1 Edition. Springer Verlag Berlin-Heidelberg, XIV, 502 pp.

- Figuroa Castillo, Juan Antonio, Medina, Rubén Danilo Méndez, Villalobos, José Manuel Berruecos, Gayosso-Vázquez, Amanda, Ulloa-Arvizu, Raúl, Rodríguez, Rebeca Acosta, Ramírez, Hugo Pérez, Alonso Morales, Rogelio A., 2011, Association between major histocompatibility complex microsatellites, fecal egg count, blood packed cell volume and blood eosinophilia in Pelibuey sheep infected with *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 177, 339-344.
- Fleming, S. A., Craig, T., Kaplan, R. M., Miller, J. E., Navarre, C., Rings, M., 2006, Anthelmintic resistance of gastrointestinal parasites in small ruminants. *J Vet Intern Med* 20, 435-444.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013, Biodiversity for a world without hunger, <http://www.fao.org/biodiversity/en/>.
- Frey, H.-H., Löscher, W., 2002, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin, Vol 2. . © Enke Verlag, Stuttgart.
- Gaba, S., Cabaret, J., Sauvé, C., Cortet, J., Silvestre, A., 2010, Experimental and modeling approaches to evaluate different aspects of the efficacy of Targeted Selective Treatment of anthelmintics against sheep parasite nematodes. *Vet Parasitol* 171, 254-262.
- Gallidis, E., Papadopoulos, E., Ptochos, S., Arsenos, G., 2009, The use of targeted selective treatments against gastrointestinal nematodes in milking sheep and goats in Greece based on parasitological and performance criteria. *Vet Parasitol* 164, 53-58.
- Gamble, H. R., Zajac, A. M., 1992, Resistance of St. Croix lambs to *Haemonchus contortus* in experimentally and naturally acquired infections. *Vet Parasitol* 41, 211-225.
- Gasser, R. B., Bott, N. J., Chilton, N. B., Hunt, P., Beveridge, I., 2008, Toward practical, DNA-based diagnostic methods for parasitic nematodes of livestock - bionomic and biotechnological implications. *Biotechnology Advances* 26, 325-334.
- Gauly, M., Erhardt, G., 2001, Genetic resistance to gastrointestinal nematode parasites in Rhön sheep following natural infection. *Vet Parasitol* 102, 253-259.
- Gauly, M., Kraus, M., Vervelde, L., Van Leeuwen, M. A. W., Erhardt, G., 2002, Estimating genetic differences in natural resistance in Rhön and Merinoland sheep following experimental *Haemonchus contortus* infection. *Vet Parasitol* 106, 55-67.
- Gauly, M., Schackert, M., Hoffmann, B., Erhardt, G., 2006, Influence of sex on the resistance of sheep lambs to an experimental *Haemonchus contortus* infection. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 113, 178-181.
- Geurden, T., Hoste, H., Jacquiet, P., Traversa, D., Sotiraki, S., Frangipane di Regalbono, A., Tzanidakis, N., Kostopoulou, D., Gaillac, C., Privat, S., Giangaspero, A., Zanardello, C., Noé, L., Vanimisetti, B., Bartram, D., 2014, Anthelmintic resistance and multidrug resistance in sheep gastro-intestinal nematodes in France, Greece and Italy. *Vet Parasitol* 201, 59-66.
- Gibbs, H. C., 1986, Hypobiosis and the periparturient rise in sheep. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2, 345-353.
- Gill, H. S., 1991, Genetic control of acquired resistance to haemonchosis in Merino lambs. *Parasite Immunol* 13, 617-628.
- Gill, H. S., Gray, G. D., Watson, D. L., Husband, A. J., 1993, Isotype-specific antibody responses to *Haemonchus contortus* in genetically resistant sheep. *Parasite Immunol* 15, 61-67.
- Gill, J. H., Redwin, J. M., Van Wyk, J. A., Lacey, E., 1995, Avermectin inhibition of larval development in *Haemonchus contortus*_Effects of ivermectin resistance. *Int J Parasitol* 25, 463-470.

- Gjerde, B., Helle, O., 1991, Chemoprophylaxis of coccidiosis in lambs with a single oral dose of toltrazuril. *Vet Parasitol* 38, 97-107.
- Good, B., Hanrahan, J. P., Crowley, B. A., Mulcahy, G., 2006, Texel sheep are more resistant to natural nematode challenge than Suffolk sheep based on faecal egg count and nematode burden. *Vet Parasitol* 136, 317-327.
- Gordon, H. L., Whitlock, H. V., 1939, A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J Counc Sci Industr Res Anst* 12, 50-52.
- Gossner, A. G., Venturina, V. M., Shaw, D. J., Pemberton, J. M., Hopkins, J., 2012, Relationship between susceptibility of Blackface sheep to *Teladorsagia circumcincta* infection and an inflammatory mucosal T cell response. *Vet Res* 43, 26.
- Greer, A. W., Kenyon, F., Bartley, D. J., Jackson, E. B., Gordon, Y., Donnan, A. A., McBean, D. W., Jackson, F., 2009, Development and field evaluation of a decision support model for anthelmintic treatments as part of a targeted selective treatment (TST) regime in lambs. *Vet Parasitol* 164, 12-20.
- Gruner, L., Aumont, G., Getachew, T., Brunel, J. C., Pery, C., Cognié, Y., Guérin, Y., 2003, Experimental infection of Black Belly and INRA 401 straight and crossbred sheep with trichostrongyle nematode parasites. *Vet Parasitol* 116, 239-249.
- Gruner, L., Bouix, J., Brunel, J. C., 2004, High genetic correlation between resistance to *Haemonchus contortus* and to *Trichostrongylus colubriformis* in INRA 401 sheep. *Vet Parasitol* 119, 51-58.
- Gulland, F. M., Albon, S. D., Pemberton, J. M., Moorcroft, P. R., Clutton-Brock, T. H., 1993, Parasite-associated polymorphism in a cyclic ungulate population. *Proc Biol Sci* 254, 7-13.
- Gutiérrez-Gil, B., Pérez, J., Álvarez, L., Martínez-Valladares, M., de la Fuente, L. F., Bayón, Y., Meana, A., San Primitivo, F., Rojo-Vázquez, F. A., Arranz, J. J., 2009, Quantitative trait loci for resistance to trichostrongylid infection in Spanish Churra sheep. *Genet Sel Evol* 41, 46.
- Hamel, D., 2008. Untersuchungen zum Parasitenbefall des Gamswildes in Deutschland-Helminthen des Gastrointestinaltrakts. LMU, München.
- Harrison, G. B., Pulford, H. D., Hein, W. R., Severn, W. B., Shoemaker, C. B., 2003, Characterization of a 35-kDa carbohydrate larval antigen (CarLA) from *Trichostrongylus colubriformis*; a potential target for host immunity. *Parasite Immunol* 25, 79-86.
- Hayward, A. D., Nussey, D. H., Wilson, A. J., Berenos, C., Pilkington, J. G., Watt, K. A., Pemberton, J. M., Graham, A. L., 2014, Natural selection on individual variation in tolerance of gastrointestinal nematode infection. *PLoS Biol* 12, e1001917.
- Hayward, A. D., Pilkington, J. G., Pemberton, J. M., Kruuk, L. E., 2010, Maternal effects and early-life performance are associated with parasite resistance across life in free-living Soay sheep. *Parasitology* 137, 1261-1273.
- Hein, W. R., Pernthaner, A., Piedrafita, D., Meeusen, E. N., 2010, Immune mechanisms of resistance to gastrointestinal nematode infections in sheep. *Parasite Immunol* 32, 541-548.
- Herrmann, A., 2010. Charakterisierung genetisch bedingter Unterschiede dach experimenteller Infektion mit *Haemonchus contortus* bei Kreuzungen verschiedener Fleischschafzrassen mit Merionlandschaf. Inaugural-Dissertation. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Höglund, J., Engström, A., von Samson-Himmelstjerna, G., Demeler, J., Tydén, E., 2013, Real-time PCR detection for quantification of infection levels with *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora* in cattle faeces. *Vet Parasitol* 197, 251-257.

- Höglund, J., Gustafsson, K., Ljungström, B. L., Engström, A., Donnan, A., Skuce, P., 2009, Anthelmintic resistance in Swedish sheep flocks based on a comparison of the results from the faecal egg count reduction test and resistant allele frequencies of the beta-tubulin gene. *Vet Parasitol* 161, 60-68.
- Hooda, V., Yadav, C. L., Chaudhri, S. S., Rajpurohit, B. S., 1999, Variation in resistance to haemonchosis: selection of female sheep resistant to *Haemonchus contortus*. *J Helminthol* 73, 137-142.
- Houdijk, J. G., Jackson, F., Coop, R. L., Kyriazakis, I., 2006, Rapid improvement of immunity to *Teladorsagia circumcincta* is achieved through a reduction in the demand for protein in lactating ewes. *Int J Parasitol* 36, 219-227.
- Hubert, J., Kerboeuf, D., 1992, A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Vet Rec* 130, 442-446.
- Hunt, P. W., Kijas, J., Ingham, A., 2013, Understanding parasitic infection in sheep to design more efficient animal selection strategies. *Vet J* 197, 143-152.
- Huntley, J. F., Redmond, J., Welfare, W., Brennan, G., Jackson, F., Kooyman, F., Vervelde, L., 2001, Studies on the immunoglobulin E responses to *Teladorsagia circumcincta* in sheep: purification of a major high molecular weight allergen. *Parasite Immunol* 23, 227-235.
- Huntley, J. F., Schallig, H. D., Kooyman, F. N., MacKellar, A., Millership, J., Smith, W. D., 1998, IgE responses in the serum and gastric lymph of sheep infected with *Teladorsagia circumcincta*. *Parasite Immunol* 20, 163-168.
- Idika, I. K., Chiejina, S. N., Mhomga, L. I., Nnadi, P. A., Ngongeh, L. A., 2012, Correlates of resistance to gastrointestinal nematode infection in Nigerian West African dwarf sheep. *Asian Pac J Trop Med* 5, 529-532.
- Idris, A., Moors, E., Budnick, C., Herrmann, A., Erhardt, G., Gauly, M., 2011, Is the establishment rate and fecundity of *Haemonchus contortus* related to body or abomasal measurements in sheep? *Animal* 5, 1276-1282.
- Idris, A., Moors, E., Sohnrey, B., Gauly, M., 2012, Gastrointestinal nematode infections in German sheep. *Parasitol Res* 110, 1453-1459.
- Informationssystem genetische Ressourcen (GENRES), 2014, <http://www.genres.de/haus-und-nutztiere/internationales/>.
- Ingham, A., Reverter, A., Windon, R., Hunt, P., Menzies, M., 2008, Gastrointestinal nematode challenge induces some conserved gene expression changes in the gut mucosa of genetically resistant sheep. *Int J Parasitol* 38, 431-442.
- Israf, D. A., Coop, R. L., Stevenson, L. M., Jones, D. G., Jackson, F., Jackson, E., MacKellar, A., Huntley, J. F., 1996, Dietary protein influences upon immunity to *Nematodirus battus* infection in lambs. *Vet Parasitol* 61, 273-286.
- Jackson, F., Bartley, D., Bartley, Y., Kenyon, F., 2009, Worm control in sheep in the future. *Small Ruminant Research* 86, 40-45.
- Jacobs, H. J., Wiltshire, C., Ashman, K., Meeusen, E., 1999, Vaccination against the gastrointestinal parasite *Haemonchus contortus* using a purified larval surface antigen. *Vaccine* 17, 362-368.
- Johnson, D. A., Behnke, J. M., Coles, G. C., 2004, Copro-antigen capture ELISA for the detection of *Teladorsagia (Ostertagia) circumcincta* in sheep: improvement of specificity by heat treatment. *Parasitology* 129, 115-126.
- Johnstone, C., 1998, *Parasites and Parasitic Diseases of Domestic Animals*. University of Pennsylvania.

- Jørgensen, L. T., Leathwick, D. M., Charleston, W. A. G., Godfrey, P. L., Vlassoff, A., Sutherland, I. A., 1998, Variation between hosts in the developmental success of the free-living stages of trichostrongyle infections of sheep. *Int J Parasitol* 28, 1347-1352.
- Kahn, L. P., Knox, M. R., Gray, G. D., Lea, J. M., Walkden-Brown, S. W., 2003, Enhancing immunity to nematode parasites in single-bearing Merino ewes through nutrition and genetic selection. *Vet Parasitol* 112, 211-225.
- Kaminsky, R., Bapst, B., Stein, P. A., Strehlau, G. A., Allan, B. A., Hosking, B. C., Rolfe, P. F., Sager, H., 2011, Differences in efficacy of monepantel, derquantel and abamectin against multi-resistant nematodes of sheep. *Parasitol Res* 109, 19-23.
- Kaminsky, R., Ducray, P., Jung, M., Clover, R., Rufener, L., Bouvier, J., Weber, S. S., Wenger, A., Wieland-Berghausen, S., Goebel, T., Gauvry, N., Pautrat, F., Skripsky, T., Froelich, O., Komoin-Oka, C., Westlund, B., Sluder, A., Mäser, P., 2008a, A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature* 452, 176-180.
- Kaminsky, R., Gauvry, N., Schorderet Weber, S., Skripsky, T., Bouvier, J., Wenger, A., Schroeder, F., Desaulles, Y., Hotz, R., Goebel, T., Hosking, B. C., Pautrat, F., Wieland-Berghausen, S., Ducray, P., 2008b, Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate. *Parasitol Res* 103, 931-939.
- Kaplan, R. M., 2004, Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol* 20, 477-481.
- Kaplan, R. M., Burke, J. M., Terrill, T. H., Miller, J. E., Getz, W. R., Mobini, S., Valencia, E., Williams, M. J., Williamson, L. H., Larsen, M., Vatta, A. F., 2004, Validation of the FAMACHA® eye color chart for detecting clinical anemia in sheep and goats on farms in the southern United States. *Vet Parasitol* 123, 105-120.
- Kemper, K. E., Palmer, D. G., Liu, S. M., Greeff, J. C., Bishop, S. C., Karlsson, L. J., 2010, Reduction of faecal worm egg count, worm numbers and worm fecundity in sheep selected for worm resistance following artificial infection with *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet Parasitol* 171, 238-246.
- Kenyon, F., Greer, A. W., Coles, G. C., Cringoli, G., Papadopoulos, E., Cabaret, J., Berrag, B., Varady, M., Van Wyk, J. A., Thomas, E., Vercruyse, J., Jackson, F., 2009, The role of targeted selective treatments in the development of Refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Vet Parasitol* 164, 3-11.
- Kenyon, F., Jackson, F., 2012, Targeted flock/herd and individual ruminant treatment approaches. *Vet Parasitol* 186, 10-17.
- Kerboeuf, D., Hubert, J., Cardinaud, B., Blond, F., 1995a, Efficacy of oral moxidectin against benzimidazole-resistant isolates of gastrointestinal nematodes in sheep. *Vet Rec* 136, 16-17.
- Kerboeuf, D., Hubert, J., Cardinaud, B., Blond-Riou, F., 1995b, The persistence of the efficacy of injectable or oral moxidectin against *Teladorsagia*, *Haemonchus* and *Trichostrongylus* species in experimentally infected sheep. *Vet Rec* 137, 399-401.
- Knight, R. A., Vegers, H. H., Lindahl, I. L., 1972, Comparative gastrointestinal nematode parasitism in naturally infected ewe and ram lambs. *J Parasitol* 58, 1216.
- Knox, M. R., Steel, J. W., 1999, The effects of urea supplementation on production and parasitological responses of sheep infected with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet Parasitol* 83, 123-135.
- Knox, M. R., Torres-Acosta, J. F. J., Aguilar-Caballero, A. J., 2006, Exploiting the effect of dietary supplementation of small ruminants on resilience and resistance against gastrointestinal nematodes. *Vet Parasitol* 139, 385-393.

- Koopmann, R., Holst, C., Epe, C., 2006, Experiences with the FAMACHA-Eye-Colour-Chart for identifying sheep and goats for targeted anthelmintic treatment. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 119, 436-442.
- Kooyman, F. N., Van Kooten, P. J., Huntley, J. F., MacKellar, A., Cornelissen, A. W., Schallig, H. D., 1997, Production of a monoclonal antibody specific for ovine immunoglobulin E and its application to monitor serum IgE responses to *Haemonchus contortus* infection. *Parasitology* 114 395-406.
- Kyriazakis, I., Anderson, D. H., Coop, R. L., Jackson, F., 1996, The pathophysiology and development of immunity during long-term subclinical infection with *Trichostrongylus colubriformis* of sheep receiving different nutritional treatments. *Vet Parasitol* 65, 41-54.
- Lacroux, C., Nguyen, T. H., Andreoletti, O., Prévot, F., Grisez, C., Bergeaud, J. P., Gruner, L., Brunel, J. C., Francois, D., Dorchies, P., Jacquiet, P., 2006, *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) infection in lambs elicits an unequivocal Th2 immune response. *Vet Res* 37, 607-622.
- Laemmli, U. K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Landesverband Schleswig-Holsteinischer Schaf-und Ziegenzüchter e.V., 2015, Texel Schaf, www.schafzucht-kiel.de.
- Larson, G., Burger, J., 2013, A population genetics view of animal domestication. *Trends Genet* 29, 197-205.
- Le Jambre, L. F., 1976, Egg hatch as an in vitro assay of thiabendazole resistance in nematodes. *Vet Parasitol* 2, 385-391.
- Le Jambre, L. F., Dominik, S., Eady, S. J., Henshall, J. M., Colditz, I. G., 2007, Adjusting worm egg counts for faecal moisture in sheep. *Vet Parasitol* 145, 108-115.
- Le Jambre, L. F., Ractliffe, L. H., Uhazy, L. S., Whitlock, J. H., 1971, Fecal egg output of lambs in relationship to *Haemonchus contortus* burden. *Int J Parasitol* 1, 157-160.
- Le Jambre, L. F., Windon, R. G., Smith, W. D., 2008, Vaccination against *Haemonchus contortus*: Performance of native parasite gut membrane glycoproteins in Merino lambs grazing contaminated pasture. *Vet Parasitol* 153, 302-312.
- Leathwick, D. M., Hosking, B. C., Bisset, S. A., McKay, C. H., 2009, Managing anthelmintic resistance: is it feasible in New Zealand to delay the emergence of resistance to a new anthelmintic class? *N Z Vet J* 57, 181-192.
- Levecke, B., Rinaldi, L., Charlier, J., Maurelli, M. P., Bosco, A., Vercruyse, J., Cringoli, G., 2012, The bias, accuracy and precision of faecal egg count reduction test results in cattle using McMaster, Cornell-Wisconsin and FLOTAC egg counting methods. *Vet Parasitol* 188, 194-199.
- Li, X., Du, A., Cai, W., Hou, Y., Pang, L., Gao, X., 2007, Evaluation of a recombinant excretory secretory *Haemonchus contortus* protein for use in a diagnostic enzyme-linked immunosorbent assay. *Exp Parasitol* 115, 242-246.
- Lichtenfels, J. R., Pilitt, P. A., Lancaster, M. B., 1988, Systematics of the nematodes that cause ostertagiasis in cattle, sheep and goats in North America. *Vet Parasitol* 27, 3-12.
- Lindqvist, A., Ljungstrom, B. L., Nilsson, O., Waller, P. J., 2001, The dynamics, prevalence and impact of nematode infections in organically raised sheep in Sweden. *Acta Vet Scand* 42, 377-389.
- Little, P. R., Hodge, A., Maeder, S. J., Wirtherle, N. C., Nicholas, D. R., Cox, G. G., Conder, G. A., 2011, Efficacy of a combined oral formulation of derquantel-abamectin against the

- adult and larval stages of nematodes in sheep, including anthelmintic-resistant strains. *Vet Parasitol* 181, 180-193.
- Lucius, R., Loss-Frank, B., 2008, *Biologie von Parasiten*, Vol 2. Aufl. . Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin.
- Luffau, G., Pery, P., Charley, J., 1981, [Immune response in sheep experimentally infected with *Haemonchus contortus*, Comparative study in male and female (author's transl)]. *Ann Rech Vet* 12, 173-181.
- MAFF, 1986, *Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques*. Her Majesty's Stationary Office, London, UK.
- Maizels, R. M., Balic, A., Gomez-Escobar, N., Nair, M., Taylor, M. D., Allen, J. E., 2004, Helminth parasites--masters of regulation. *Immunol Rev* 201, 89-116.
- Maizels, R. M., Pearce, E. J., Artis, D., Yazdanbakhsh, M., Wynn, T. A., 2009, Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections. *J Exp Med* 206, 2059-2066.
- Malama, E., Hoffmann-Kohler, P., Biedermann, I., Koopmann, R., Krucken, J., Molina, J. M., Moreno, A. M., von Samson-Himmelstjerna, G., Sotiraki, S., Demeler, J., 2014, Development of a milk and serum ELISA test for the detection of *Teladorsagia circumcincta* antibodies in goats using experimentally and naturally infected animals. *Parasitol Res*.
- Malan, F. S., Van Wyk, J. A., Wessels, C. D., 2001, Clinical evaluation of anaemia in sheep: early trials. *Onderstepoort J Vet Res* 68, 165-174.
- Mandonnet, N., Aumont, G., Fleury, J., Arquet, R., Varo, H., Gruner, L., Bouix, J., Khang, J. V., 2001, Assessment of genetic variability of resistance to gastrointestinal nematode parasites in Creole goats in the humid tropics. *J Anim Sci* 79, 1706-1712.
- Marshall, K., Mugambi, J. M., Nagda, S., Sonstegard, T. S., Van Tassell, C. P., Baker, R. L., Gibson, J. P., 2013, Quantitative trait loci for resistance to *Haemonchus contortus* artificial challenge in Red Maasai and Dorper sheep of East Africa. *Anim Genet* 44, 285-295.
- Martínez-Valladares, M., Donnan, A., Geldhof, P., Jackson, F., Rojo-Vázquez, F. A., Skuce, P., 2012, Pyrosequencing analysis of the beta-tubulin gene in Spanish *Teladorsagia circumcincta* field isolates. *Vet Parasitol* 184, 371-376.
- Matika, O., Nyoni, S., van Wyk, J. B., Erasmus, G. J., Baker, R. L., 2003, Resistance of Sabi and Dorper ewes to gastro-intestinal nematode infections in an African semi-arid environment. *Small Ruminant Research* 47, 95-102.
- Matthews, J. B., McArthur, C., Robinson, A., Jackson, F., 2012, The in vitro diagnosis of anthelmintic resistance in cyathostomins. *Vet Parasitol* 185, 25-31.
- McKellar, Q. A., 1993, Interactions of *Ostertagia* species with their bovine and ovine hosts. *Int J Parasitol* 23, 451-462.
- McLeod, R. S., 1995, Costs of major parasites to the Australian livestock industries. *Int J Parasitol* 25, 1363-1367.
- McNally, J., Callan, D., Andronicos, N., Bott, N., Hunt, P. W., 2013, DNA-based methodology for the quantification of gastrointestinal nematode eggs in sheep faeces. *Vet Parasitol* 198, 325-335.
- McNeilly, T. N., Devaney, E., Matthews, J. B., 2009, *Teladorsagia circumcincta* in the sheep abomasum: defining the role of dendritic cells in T cell regulation and protective immunity. *Parasite Immunol* 31, 347-356.
- Miller, J. E., Bahirathan, M., Lemarie, S. L., Hembry, F. G., Kearney, M. T., Barras, S. R., 1998, Epidemiology of gastrointestinal nematode parasitism in Suffolk and Gulf Coast Native sheep with special emphasis on relative susceptibility to *Haemonchus contortus* infection. *Vet Parasitol* 74, 55-74.

- Miller, J. E., Horohov, D. W., 2006, Immunological aspects of nematode parasite control in sheep. *J Anim Sci* 84 Suppl, E124-132.
- Molina, J. M., Hernández, Y., Ruiz, A., González, J. F., Argüello, A., Ferrer, O., Forbes, A. B., 2009, Preliminary study on the use of a *Teladorsagia circumcincta* bulk milk ELISA test in dairy goats under experimental conditions. *Vet Parasitol* 166, 228-234.
- Moors, E., Gauly, M., 2009, Is the FAMACHA chart suitable for every breed? Correlations between FAMACHA scores and different traits of mucosa colour in naturally parasite infected sheep breeds. *Vet Parasitol* 166, 108-111.
- Moritz, E. I., 2005. Ein Beitrag zum Befall mit Endoparasiten und zum Nachweis von Benzimidazolresistenzen bei Magen-Darm-Strongylyden der Schafe in Niedersachsen. Tierärztliche Hochsch., Hannover.
- Mugambi, J. M., Bain, R. K., Wanyangu, S. W., Ihiga, M. A., Duncan, J. L., Murray, M., Stear, M. J., 1997, Resistance of four sheep breeds to natural and subsequent artificial *Haemonchus contortus* infection. *Vet Parasitol* 69, 265-273.
- Mundt, H. C., Dittmar, K., Dauschies, A., Grzonka, E., Bangoura, B., 2009, Study of the comparative efficacy of toltrazuril and diclazuril against ovine coccidiosis in housed lambs. *Parasitol Res* 105 Suppl 1, 141-150.
- Murphy, L., Eckersall, P. D., Bishop, S. C., Pettit, J. J., Huntley, J. F., Burchmore, R., Stear, M. J., 2010, Genetic variation among lambs in peripheral IgE activity against the larval stages of *Teladorsagia circumcincta*. *Parasitology* 137, 1249-1260.
- Nakane, P. K., Pierce, G. B., 1967, Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. *Journal of Cell Biology* 33, 307-318.
- Nari, A., Salles, J., Gil, A., Waller, P. J., Hansen, J. W., 1995, The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheeo in Southern Latin America: Uruguay. *Vet Parasitol* 62, 213-222.
- Newton, S. E., Munn, E. A., 1999, The Development of Vaccines against Gastrointestinal Nematode Parasites, Particularly *Haemonchus contortus*. *Parasitology Today* 15, 116-122.
- Nielsen, M. K., Vidyashankar, A. N., Andersen, U. V., DeLisi, K., Pilegaard, K., Kaplan, R. M., 2010, Effects of fecal collection and storage factors on strongyloid egg counts in horses. *Vet Parasitol* 167, 55-61.
- Nimbkar, C., Ghalsasi, P. M., Swan, A. A., Walkden-Brown, S. W., Kahn, L. P., 2003, Evaluation of growth rates and resistance to nematodes of Deccani and Bannur lambs and their crosses with Garole. *Anim Sci* 76, 503-515.
- Nisbet, A. J., McNeilly, T. N., Wildblood, L. A., Morrison, A. A., Bartley, D. J., Bartley, Y., Longhi, C., McKendrick, I. J., Palarea-Albaladejo, J., 2013, Successful immunization against a parasitic nematode by vaccination with recombinant proteins. *Vaccine* 31, 4017-4023.
- Nisbet, A. J., Smith, S. K., Armstrong, S., Meikle, L. I., Wildblood, L. A., Beynon, R. J., Matthews, J. B., 2010, *Teladorsagia circumcincta*: activation-associated secreted proteins in excretory/secretory products of fourth stage larvae are targets of early IgA responses in infected sheep. *Exp Parasitol* 125, 329-337.
- Notter, D. R., Andrew, S. A., Zajac, A. M., 2003, Responses of hair and wool sheep to a single fixed dose of infective larvae of *Haemonchus contortus*. *Small Ruminant Research* 47, 221-225.
- Nussey, D. H., Watt, K. A., Clark, A., Pilkington, J. G., Pemberton, J. M., Graham, A. L., McNeilly, T. N., 2014, Multivariate immune defences and fitness in the wild: complex but ecologically important associations among plasma antibodies, health and survival. *Proc Biol Sci* 281, 20132931.

- O'Connor, L. J., Walkden-Brown, S. W., Kahn, L. P., 2006, Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. *Vet Parasitol* 142, 1-15.
- Oosthuizen, W. T., Erasmus, J. B., Boelema, E., Grove, J. T., 1993, Efficacy of moxidectin against internal parasites of sheep. *J S Afr Vet Assoc* 64, 28-30.
- Ouzir, M., Berrag, B., Benjouad, A., Cabaret, J., 2011, Use of pathophysiological indicators for individual decision of anthelmintic treatment of ewes against gastro-intestinal nematodes in Morocco. *Vet Parasitol* 180, 372-377.
- Paolini, V., De La Farge, F., Prevot, F., Dorchies, P., Hoste, H., 2005, Effects of the repeated distribution of sainfoin hay on the resistance and the resilience of goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Vet Parasitol* 127, 277-283.
- Peña, M. T., Miller, J. E., Fontenot, M. E., Gillespie, A., Larsen, M., 2002, Evaluation of *Duddingtonia flagrans* in reducing infective larvae of *Haemonchus contortus* in feces of sheep. *Vet Parasitol* 103, 259-265.
- Pernthaler, A., Cole, S. A., Morrison, L., Green, R., Shaw, R. J., Hein, W. R., 2006, Cytokine and antibody subclass responses in the intestinal lymph of sheep during repeated experimental infections with the nematode parasite *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet Immunol Immunopathol* 114, 135-148.
- Pernthaler, A., Cole, S. A., Morrison, L., Hein, W. R., 2005, Increased expression of interleukin-5 (IL-5), IL-13, and tumor necrosis factor alpha genes in intestinal lymph cells of sheep selected for enhanced resistance to nematodes during infection with *Trichostrongylus colubriformis*. *Infect Immun* 73, 2175-2183.
- Peter, J. W., Chandrawathani, P., 2005, *Haemonchus contortus*: parasite problem No. 1 from tropics - Polar Circle. Problems and prospects for control based on epidemiology. *Trop Biomed* 22, 131-137.
- Piedrafita, D. P., de Veer, M. J., Sherrard, J., Kraska, T., Elhay, M., Meeusen, E. N., 2012, Field vaccination of sheep with a larval-specific antigen of the gastrointestinal nematode, *Haemonchus contortus*, confers significant protection against an experimental challenge infection. *Vaccine* 30, 7199-7204.
- Piedrafita, D., Preston, S., Kemp, J., de Veer, M., Sherrard, J., Kraska, T., Elhay, M., Meeusen, E., 2013, The effect of different adjuvants on immune parameters and protection following vaccination of sheep with a larval-specific antigen of the gastrointestinal nematode, *Haemonchus contortus*. *PLoS One* 8, e78357.
- Rainbird, M. A., Macmillan, D., Meeusen, E. N., 1998, Eosinophil-mediated killing of *Haemonchus contortus* larvae: effect of eosinophil activation and role of antibody, complement and interleukin-5. *Parasite Immunol* 20, 93-103.
- Rare Breeds Survival Trust, 2011, Soay, https://www.rbst.org.uk/sitemanager/uploads/ck_files/files/Soay%20-%20Fact%20Sheet.pdf.
- Rehbein, S., Kollmannsberger, M., Visser, M., Winter, R., 1996, Untersuchungen zum Helminthenbefall von Schlachtschafen in Oberbayern, 1. Mitt.: Artenspektrum, Befallsextenstität und Befallsintensität. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 109, 161-167.
- Rehbein, S., Visser, M., Winter, R., 1998, Endoparasitic infections in sheep from the Swabian Alb. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 105, 419-424.
- Reynolds, L. A., Filbey, K. J., Maizels, R. M., 2012, Immunity to the model intestinal helminth parasite *Heligmosomoides polygyrus*. *Semin Immunopathol* 34, 829-846.
- Riggio, V., Abdel-Aziz, M., Matika, O., Moreno, C. R., Carta, A., Bishop, S. C., 2014, Accuracy of genomic prediction within and across populations for nematode resistance and body weight traits in sheep. *animal* 8, 520-528.

- Riley, D. G., Van Wyk, J. A., 2009, Genetic parameters for FAMACHA® score and related traits for host resistance/resilience and production at differing severities of worm challenge in a Merino flock in South Africa. *Vet Parasitol* 164, 44-52.
- Rinaldi, L., Coles, G. C., Maurelli, M. P., Musella, V., Cringoli, G., 2011, Calibration and diagnostic accuracy of simple flotation, McMaster and FLOTAC® for parasite egg counts in sheep. *Vet Parasitol* 177, 345-352.
- Roberts, B., Antonopoulos, A., Haslam, S. M., Dicker, A. J., McNeilly, T. N., Johnston, S. L., Dell, A., Knox, D. P., Britton, C., 2013, Novel expression of *Haemonchus contortus* vaccine candidate aminopeptidase H11 using the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*. *Vet Res* 44, 111.
- Roberts, F. H. S., O'Sullivan, P. J., 1950, Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research* 1, 99-102.
- Rocha, R. A., Bricarello, P. A., Silva, M. B., Houdijk, J. G., Almeida, F. A., Cardia, D. F., Amarante, A. F., 2011, Influence of protein supplementation during late pregnancy and lactation on the resistance of Santa Ines and Ile de France ewes to *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 181, 229-238.
- Roeber, F., Jex, A. R., Gasser, R. B., 2013, Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance - an Australian perspective. *Parasit Vectors* 6, 153.
- Roeber, F., Larsen, J. W., Anderson, N., Campbell, A. J., Anderson, G. A., Gasser, R. B., Jex, A. R., 2012, A molecular diagnostic tool to replace larval culture in conventional faecal egg count reduction testing in sheep. *PLoS One* 7, e37327.
- Rossanigo, C. E., Gruner, L., 1995, Moisture and temperature requirements in faeces for the development of free-living stages of gastrointestinal nematodes of sheep, cattle and deer. *J Helminthol* 69, 357-362.
- Rowe, A., McMaster, K., Emery, D., Sangster, N., 2008, *Haemonchus contortus* infection in sheep: Parasite fecundity correlates with worm size and host lymphocyte counts. *Vet Parasitol* 153, 285-293.
- Roy, E. A., Hoste, H., Beveridge, I., 2004, The effects of concurrent experimental infections of sheep with *Trichostrongylus colubriformis* and *T. vitrinus* on nematode distributions, numbers and on pathological changes. *Parasite* 11, 293-300.
- Rudolph, A., Wichelmann, M., 1995. Rückbesinnung auf alte Haustierrassen: Bewertung der Ansprüche und Vitalität von vierzehn Landschaftsrassen und neun alten Rinderrassen im Tierpark Warder (Schleswig-Holstein) anhand von Beobachtungen und parasitologischen Untersuchungen. CAU, Kiel.
- Rufener, L., Bedoni, N., Baur, R., Rey, S., Glauser, D. A., Bouvier, J., Beech, R., Sigel, E., Puoti, A., 2013, acr-23 Encodes a monepantel-sensitive channel in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Pathog* 9, e1003524.
- Rufener, L., Kaminsky, R., Maser, P., 2009, In vitro selection of *Haemonchus contortus* for benzimidazole resistance reveals a mutation at amino acid 198 of beta-tubulin. *Mol Biochem Parasitol* 168, 120-122.
- Ryder, M., 1981, A survey of European primitive breeds of sheep. *Ann Genet Sel Anim* 13, 381-418.
- Ryder, M. L., 1983, *Sheep & Man*. Duckworth
- Sackett, D., Holmes, P., Abbott, K., Jephcott, S., Barber, M. 2006. Assessing the Economic Cost of Endemic Disease on the Profitability of Australian Beef Cattle and Sheep Producers.

Meat and Livestock Australia Final Report AHW 087. In Meat and Livestock Australia Limited (Sydney, Australia).

Saddiqi, H. A., Iqbal, Z., Khan, M. N., Sarwar, M., Muhammad, G., Yaseen, M., Jabbar, A., 2010, Evaluation of three Pakistani sheep breeds for their natural resistance to artificial infection of *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 168, 141-145.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 1989, *Molecular cloning: A Laboratory Manual: Vol-1, Vol 1*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanchez, J., Dohoo, I., Nødtvedt, A., Keefe, G., Markham, F., Leslie, K., DesCoteaux, L., Campbell, J., 2002, A longitudinal study of gastrointestinal parasites in Canadian dairy farms. The value of an indirect *Ostertagia ostertagi* ELISA as a monitoring tool. *Vet Parasitol* 107, 209-226.

Sargison, N. D., Bartram, D. J., Wilson, D. J., 2012, Use of a long acting injectable formulation of moxidectin to control the periparturient rise in faecal *Teladorsagia circumcincta* egg output of ewes. *Vet Parasitol* 189, 274-283.

Sargison, N. D., Jackson, F., Gilleard, J. S., 2011, Effects of age and immune suppression of sheep on fecundity, hatching and larval feeding of different strains of *Haemonchus contortus*. *The Veterinary Journal* 189, 296-301.

Sayers, G., Good, B., Hanrahan, J. P., Ryan, M., Angles, J. M., Sweeney, T., 2005a, Major histocompatibility complex DRB1 gene: its role in nematode resistance in Suffolk and Texel sheep breeds. *Parasitology* 131, 403-409.

Sayers, G., Good, B., Hanrahan, J. P., Ryan, M., Sweeney, T., 2005b, Intron 1 of the interferon γ gene: Its role in nematode resistance in Suffolk and Texel sheep breeds. *Research in Veterinary Science* 79, 191-196.

Schallig, H. D., 2000, Immunological responses of sheep to *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 120 Suppl, 63-72.

Schallig, H. D. F. H., Hornok, S., Cornelissen, J. B. W. J., 1995a, Comparison of two enzyme immunoassays for the detection of *Haemonchus contortus* infections in sheep. *Vet Parasitol* 57, 329-338.

Schallig, H. D. F. H., Van Leeuwen, M. A. W., Cornelissen, W. C. A., 1997a, Protective immunity induced by vaccination with two *Haemonchus contortus* excretory secretory proteins in sheep. *Parasite Immunol* 19, 447-453.

Schallig, H. D. F. H., van Leeuwen, M. A. W., Hendriks, W. M. L., 1994a, Immune responses of Texel sheep to excretory/ secretory products of adult *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 108, 351-357.

Schallig, H. D. F. H., Van Leeuwen, M. A. W., Hendriks, W. M. L., 1995b, Isotype specific serum antibody responses of sheep to *Haemonchus contortus* antigens. *Vet Parasitol* 56, 149-162.

Schallig, H. D. F. H., van Leeuwen, M. A. W., Verstrepen, B. E., Cornelissen, W. C. A., 1997b, Molecular characterization and expression of two putative protective excretory secretory proteins of *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol* 88, 203-213.

Schwaiger, F. W., Gostomski, D., Stear, M. J., Duncan, J. L., McKellar, Q. A., Epplen, J. T., Buitkamp, J., 1995, An ovine major histocompatibility complex DRB1 allele is associated with low faecal egg counts following natural, predominantly *Ostertagia circumcincta* infection. *Int J Parasitol* 25, 815-822.

Scott, I., Dick, A., Irvine, J., Stear, M. J., McKellar, Q. A., 1999, The distribution of pepsinogen within the abomasa of cattle and sheep infected with *Ostertagia* spp. and sheep infected with *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 82, 145-159.

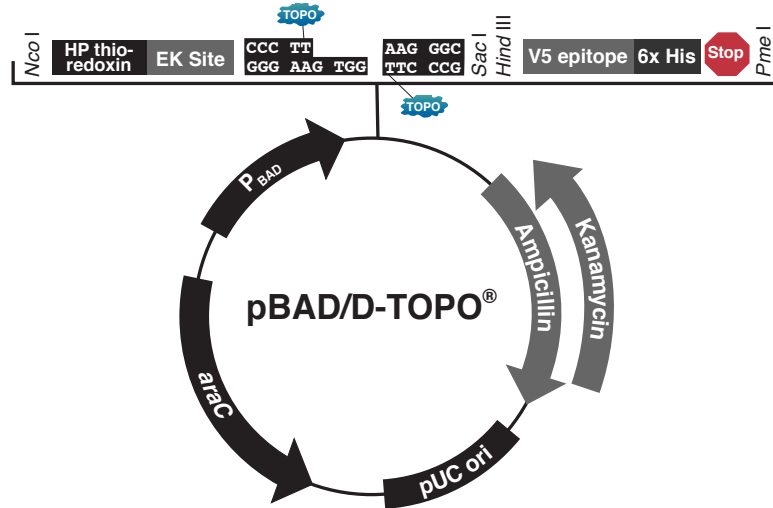
- Scott, I., Pomroy, W. E., Kenyon, P. R., Smith, G., Adlington, B., Moss, A., 2013, Lack of efficacy of monepantel against *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet Parasitol* 198, 166-171.
- Scott, I., Stear, M. J., Irvine, J., Dick, A., Wallace, D. S., McKellar, Q. A., 1998, Changes in the zymogenic cell populations of the abomasa of sheep infected with *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 116 569-577.
- Shaw, R. J., Gatehouse, T. K., McNeill, M. M., 1998, Serum IgE responses during primary and challenge infections of sheep with *Trichostrongylus colubriformis*. *Int J Parasitol* 28, 293-302.
- Shaw, R. J., Morris, C. A., Wheeler, M., Tate, M., Sutherland, I. A., 2012, Salivary IgA: a suitable measure of immunity to gastrointestinal nematodes in sheep. *Vet Parasitol* 186, 109-117.
- Shayan, P., Eslami, A., Borji, H., 2007, Innovative restriction site created PCR-RFLP for detection of benzimidazole resistance in *Teladorsagia circumcincta*. *Parasitol Res* 100, 1063-1068.
- Smith, S. K., Nisbet, A. J., Meikle, L. I., Inglis, N. F., Sales, J., Beynon, R. J., Matthews, J. B., 2009, Proteomic analysis of excretory/secretory products released by *Teladorsagia circumcincta* larvae early post-infection. *Parasite Immunol* 31, 10-19.
- Smith, W. D., Zarlenga, D. S., 2006, Developments and hurdles in generating vaccines for controlling helminth parasites of grazing ruminants. *Vet Parasitol* 139, 347-359.
- Smith, W.D., Newlands, G.F.N., Fitzpatrick, J.L., Dobson, R., Besier, B., 2013, Barbervax: Potentially a new tool for the control of Barbers's pole worm of sheep. *Flock and herd, Case notes*.
- Soulsby, E. J. L., Stewart, D. F., 1960, Serological studies of the self-cure reaction in sheep infected with *Haemonchus contortus*. *Australian Journal of Agricultural Research* 11, 595-603.
- Soulsby, L., 2007, New concepts in strongyle control and anthelmintic resistance: the role of refugia. *Vet J* 174, 6-7.
- Spellmeyer, O., 1996. Untersuchungen zur Helminthenfauna von Reh- und Schwarzwild aus Norddeutschland. *Tierärztl. Hochsch.*, Hannover.
- Sréter, T., Molnár, V., Kassai, T., 1994, The distribution of nematode egg counts and larval counts in grazing sheep and their implications for parasite control. *Int J Parasitol* 24, 103-108.
- St. Kilda Soay Sheep Project, 2014, St. Kilda Soay Sheep Project, <http://soaysheep.biology.ed.ac.uk>.
- Stafford, K. A., Morgan, E. R., Coles, G. C., 2009, Weight-based targeted selective treatment of gastrointestinal nematodes in a commercial sheep flock. *Vet Parasitol* 164, 59-65.
- Stear, M. J., Bairden, K., Duncan, J. L., Eckersall, P. D., Fishwick, G., Graham, P. A., Holmes, P. H., McKellar, Q. A., Mitchell, S., Murray, M., Parkins, J. J., Wallace, D. S., 2000, The influence of relative resistance and urea-supplementation on deliberate infection with *Teladorsagia circumcincta* during winter. *Vet Parasitol* 94, 45-54.
- Stear, M. J., Bishop, S. C., 1999, The curvilinear relationship between worm length and fecundity of *Teladorsagia circumcincta*. *Int J Parasitol* 29, 777-780.
- Stear, M. J., Bishop, S. C., Doligalska, M., Duncan, J. L., Holmes, P. H., Irvine, J., McCririe, L., McKellar, Q. A., Sinski, E., Murray, M., 1995, Regulation of egg production, worm burden,

- worm length and worm fecundity by host responses in sheep infected with *Ostertagia circumcincta*. *Parasite Immunol* 17, 643-652.
- Stear, M. J., Bishop, S. C., Henderson, N. G., Scott, I., 2003, A key mechanism of pathogenesis in sheep infected with the nematode *Teladorsagia circumcincta*. *Anim Health Res Rev* 4, 45-52.
- Stevenson, L. M., Huntley, J. F., Smith, W. D., Jones, D. G., 1994, Local eosinophil- and mast cell-related responses in abomasal nematode infections of lambs. *FEMS Immunol Med Microbiol* 8, 167-173.
- Strain, S. A., Stear, M. J., 2001, The influence of protein supplementation on the immune response to *Haemonchus contortus*. *Parasite Immunol* 23, 527-531.
- Supperer, R., Boch, J., Schnieder, T., 2006, *Veterinärmedizinische Parasitologie*, 6. Edition. Parey Bei Mvs.
- Sweeny, J. P., Robertson, I. D., Ryan, U. M., Jacobson, C., Woodgate, R. G., 2012, Impacts of naturally acquired protozoa and strongylid nematode infections on growth and faecal attributes in lambs. *Vet Parasitol* 184, 298-308.
- Taylor, M. A., 2010, Parasitological examinations in sheep health management. *Small Ruminant Research* 92, 120-125.
- Taylor, M., Coop, R., Wall, R., 2007, Parasites of sheep and goats, In: *Veterinary Parasitology*. Blackwell Publishing, pp. 158-161.
- Technion Group, Ltd., 2015, FECPAK, www.fecpak.com.
- Terefe, G., Lacroux, C., Andreoletti, O., Grisez, C., Prévot, F., Bergeaud, J. P., Penicaud, J., Rouillon, V., Gruner, L., Brunel, J. C., Francois, D., Bouix, J., Dorchies, P., Jacquiet, P., 2007, Immune response to *Haemonchus contortus* infection in susceptible (INRA 401) and resistant (Barbados Black Belly) breeds of lambs. *Parasite Immunol* 29, 415-424.
- Texelschafe Deutschland e.V., 2015, Die Rasse www.texelschafe-deutschland.de.
- TGRDEU, 2014, Tiergenetische Ressourcen Deutschland, Zentrale Dokumentation Tiergenetischer Ressourcen in Deutschland, <http://tgrdeu.genres.de>.
- Thermoscientific 2010. ELISA technical guide and protocols, TECH TIP # 65, (Thermoscientific Fisher Scientific Inc.©, Pierce Biotechnology).
- Tiwari, J., Kumar, S., Kolte, A. P., Swarnkar, C. P., Singh, D., Pathak, K. M., 2006, Detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using RFLP-PCR technique. *Vet Parasitol* 138, 301-307.
- Tizard, I. R., 2008, *Veterinary Immunology: An introduction*, 8. Aufl. Edition. Saunders.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1992, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 24, 145-149.
- UNESCO, WHC, 1992-2014, World Heritage List, <http://whc.unesco.org/en/list/387>.
- Uriarte, J., Gracia, M. J., Almeria, S., 1994, Efficacy of moxidectin against gastrointestinal nematode infections in sheep. *Vet Parasitol* 51, 301-305.
- Van den Brom, R., Moll, L., Kappert, C., Vellema, P., 2015, *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. *Vet Parasitol* 209, 278-280.
- Van Wyk, J. A., 2001, Refugia—overlooked as perhaps the most important factor concerning the development of anthelmintic resistance. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 68, 55-67.

- Van Wyk, J. A. , Mayhew, E., 2013, Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: A practical lab guide. Onderstepoort J. Vet. Res. 80, Art. #539.
- Van Wyk, J. A., Groeneveld, H. T., 1997, Comments on the paper ,World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine),. Vet Parasitol 70, 283-288.
- Vanimisetti, H. B., Andrew, S. L., Zajac, A. M., Notter, D. R., 2004, Inheritance of fecal egg count and packed cell volume and their relationship with production traits in sheep infected with *Haemonchus contortus*. J Anim Sci 82, 1602-1611.
- Venturina, V. M., Gossner, A. G., Hopkins, J., 2013, The immunology and genetics of resistance of sheep to *Teladorsagia circumcincta*. Vet Res Commun 37, 171-181.
- Vervelde, L., Van Leeuwen, M. A. W., Kruidenier, M., Kooyman, F. N. J., Huntley, J. F., Van Die, I., Cornelissen, A. W. C. A., 2002, Protection studies with recombinant excretory/secretory proteins of *Haemonchus contortus*. Parasite Immunol 24, 189-201.
- Vetidata, 2014, Veterinärmedizinischer Informationsdienst für Arzneimittelanwendung, Toxikologie und Arzneimittelrecht, <http://www.vetidata.de>.
- Vlassoff, A., 1973, Seasonal incidence of infective trichostrongyle larvae on pasture grazed by lambs. New Zealand Journal of Experimental Agriculture 1, 293-301.
- Vlassoff, A., 1976, Seasonal incidence of infective trichostrongyle larvae on pasture: The contribution of the ewe and the role of the residual pasture infestation as sources of infection to the lamb. New Zealand Journal of Experimental Agriculture 4, 281-284.
- Voigt, K., Scheuerle, M., Hamel, D., Pfister, K., 2012, High perinatal mortality associated with triple anthelmintic resistance in a German sheep flock. Tierärztl. Prax. Ausg. G. Grosstiere Nutztiere 40, 107-111.
- von Engelhardt, W. und Breves, G., 2010, Physiologie der Haustiere, 3. Aufl. Edition. Enke Verlag, Stuttgart.
- 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., Vercruyse, J., Wirtherle, N., 2009a, Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes. Parasitol Res 105, 825-834.
- von Samson-Himmelstjerna, G., Harder, A., Sangster, N. C., Coles, G. C., 2005, Efficacy of two cyclooctadepsipeptides, PF1022A and emodepside, against anthelmintic-resistant nematodes in sheep and cattle. Parasitology 130, 343-347.
- von Samson-Himmelstjerna, G., Harder, A., Schnieder, T., 2002, Quantitative analysis of ITS2 sequences in trichostrongyle parasites. Int J Parasitol 32, 1529-1535.
- von Samson-Himmelstjerna, G., Walsh, T. K., Donnan, A. A., Carriere, S., Jackson, F., Skuce, P. J., Rohn, K., Wolstenholme, A. J., 2009b, Molecular detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using real-time PCR and pyrosequencing. Parasitology 136, 349-358.
- Walkden-Brown, S. W., Banks, D. J. D. 1986. Integrated small ruminant cropping systems in Fiji with health as a major constraint. In: Proceedings of the Workshop on Small Ruminant Production Systems in South and South East Asia, Bogor, Indonesia, October 6–10.
- Wallace, D. S., Bairden, K., Duncan, J. L., Eckersall, P. D., Fishwick, G., Holmes, P. H., McKellar, Q. A., Mitchell, S., Murray, M., Parkins, J. J., Stear, M. J., 1999, The influence of increased feeding on the susceptibility of sheep to infection with *Haemonchus contortus*. Animal Science 69, 457-463.

- Waller, P. J., Rudby-Martin, L., Ljungström, B. L., Rydzik, A., 2004, The epidemiology of abomasal nematodes of sheep in Sweden, with particular reference to over-winter survival strategies. *Vet Parasitol* 122, 207-220.
- Weber-Werrighen, R., 1987. Zum Endoparasitenbefall bei Schafen in Abhängigkeit zu Haltungform sowie Untersuchungen über *Cysticercus tenuicollis*. LMU, München.
- Werne, S., Isensee, A., Maurer, V., Perler, E., Drewek, A., Heckendorn, F., 2013, Integrated control of gastrointestinal nematodes in lambs using a bioactive feed × breed approach. *Vet Parasitol* 198, 298-304.
- Wetzel, R., 1930, Zur Diagnose der Lungenwurminvasionen bei Rind und Schaf. *Dtsch Tierärztl Wschr* 38, 49-50.
- Whitlock, H. V. , 1948, Some modifications of the McMaster helminth egg-counting technique and apparatus. *J Councl Sci Ind Res Aus* 21, 177-180.
- Wilson, A. J., Pilkington, J. G., Pemberton, J. M., Coltman, D. W., Overall, A. D., Byrne, K. A., Kruuk, L. E., 2005, Selection on mothers and offspring: whose phenotype is it and does it matter? *Evolution* 59, 451-463.
- Wilson, K., Grenfell, B. T., Pilkington, J. G., Boyd, H. E. G., Gulland, F. M. D. , 2004, In *Soay Sheep: Parasites and their impact*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Wimmer, B., Craig, B. H., Pilkington, J. G., Pemberton, J. M., 2004, Non-invasive assessment of parasitic nematode species diversity in wild Soay sheep using molecular markers. *Int J Parasitol* 34, 625-631.
- Winton, R. G., Dineen, J. K., 1981, The effect of selection of both sire and dam on the response of F1 generation lambs to vaccination with irradiated *Trichostrongylus colubriformis* larvae. *Int J Parasitol* 11, 11-18.
- Wood, I. B., Amaral, N. K., Bairden, K., Duncan, J. L., Kassai, T., Malone, J. B., Jr., Pankavich, J. A., Reinecke, R. K., Slocombe, O., Taylor, S. M. et al., 1995, World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Vet Parasitol* 58, 181-213.
- Woolaston, R. R., 1990, Genetic improvement of resistance to internal parasites in sheep. *Wool technology and sheep breeding* 38, 1-6.
- Woolaston, R. R., 1992, Selection of Merino sheep for increased and decreased resistance to *Haemonchus contortus*: Peri-parturient effects on faecal egg counts. *Int J Parasitol* 22, 947-953.
- Woolaston, R. R., Baker, R. L., 1996, Prospects of breeding small ruminants for resistance to internal parasites. *Int J Parasitol* 26, 845-855.
- Woolaston, R. R., Piper, L. R., 1996, Selection of Merino sheep for resistance to *Haemonchus contortus*: genetic variation. *Animal Science* 62, 451-460.
- Yacob, H. T., Mistre, Ch, Adem, A. H., Basu, A. K., 2009, Parasitological and clinical responses of lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus* (L3) with and without ivermectin treatment. *Vet Parasitol* 166, 119-123.
- Zajac, A. M., 2006, Gastrointestinal nematodes of small ruminants: life cycle, anthelmintics, and diagnosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 22, 529-541.
- Zajac, A. M., Herd, R. P., McClure, K. E., 1988, Trichostrongylid parasite populations in pregnant or lactating and unmated Florida Native and Dorset/Rambouillet ewes. *Int J Parasitol* 18, 981-985.
- Zajac, A. M., Krakowka, S., Herd, R. P., McClure, K. E., 1990, Experimental *Haemonchus contortus* infection in three breeds of sheep. *Vet Parasitol* 36, 221-235.

Anhang



Comments for:	pBAD102/D-TOPO® 4471 nucleotides	pBAD202/D-TOPO® 4448 nucleotides
Arabinose O ₂ operator region:	4-19	4-19
Arabinose O ₁ operator region:	161-182	161-182
CAP binding site:	203-216	203-216
Arabinose I ₁ and I ₂ region:	213-251	213-251
Arabinose minimal promoter:	248-276	248-276
Ribosome binding site:	329-332	329-332
His-Patch Thioredoxin ORF:	346-674	346-674
TrxFus Forward priming site:	655-672	655-672
Enterokinase recognition site:	691-705	691-705
TOPO® recognition site 1:	718-722	718-722
Overhang:	723-726	723-726
TOPO® recognition site 2:	727-731	727-731
V5 epitope:	748-789	748-789
Polyhistidine (6xHis) region:	799-816	799-816
pBAD Reverse priming site:	872-889	872-889
<i>rrnB</i> transcriptional termination region:	922-1079	922-1079
Ampicillin (<i>bla</i>) resistance gene:	1358-2218	---
Kanamycin resistance gene (c):	---	1448-2242
pUC origin:	2363-3036	2340-3013
<i>araC</i> ORF (c):	3532-4410	3544-4422

(c) = complementary strand



Abbildung 26: Vektorkarte von pBAD/D-TOPO® (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

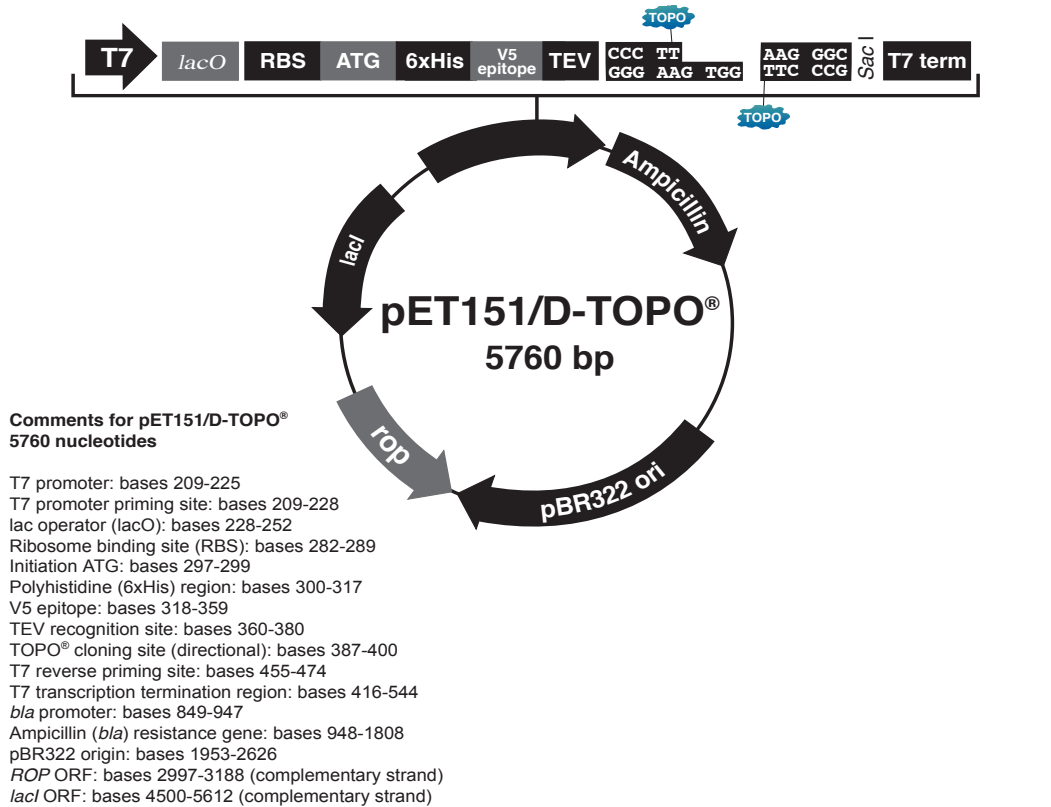


Abbildung 27: Vektorkarte von pET151/D-TOPO® (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

Tabelle 49: Auflistung der eingesetzten Sera im ELISA

<i>T. circumcincta</i> -Antikörper Schafserum	negatives	20.07.2010, FU Berlin, Stammhaltung
Serum von neugeborenem Schaflamm		Mutterschaf Nr. 01036, Entnahme vor Kolostrumaufnahme am 15.01.2012, FU Berlin, Stammhaltung

Serum Schaflamm 315		14.04.2011, Hof Rathenow bei Berlin, * 01.03.2011, Kotuntersuchungsergebnis: MDS negativ, ggr. Kokzidien, letzte Entwurmung der Muttertiere 11/2010
Serum Schaf 314		19.04.2011, Hof Rathenow bei Berlin
Serum Soaylamm 595		13.07.2010, Arche Warder
Serum Soaylamm 881		31.07.2010, Arche Warder
Serum Soaylamm 882		13.07.2010, Arche Warder
Serum Texellamm 887		31.05.2010, Arche Warder
Serum Texellamm 889		13.07.2010, Arche Warder
Serum Texellamm 895		13.07.2010, Arche Warder
Serum Soaylamm 917		31.07.2010, Arche Warder
Serum Soaylamm 920		13.07.2010, Arche Warder
Serum Texellamm 954		31.05.2010, Arche Warder
Serum Texellamm 958		13.07.2010, Arche Warder
Serum Soaylamm 960		31.05.2010, Arche Warder
Serum Soaylamm 962		31.05.2010, Arche Warder
<i>H. contortus</i> -Antikörper Ziegenserum	positives	Insa Biedermann, FU Berlin
<i>H. contortus</i> -Antikörper Schafserum	positives-	08.09.2010, FU Berlin, Stammhaltung, Schaf 9)
<i>T. circumcincta</i> -Antikörper Schafserum	positives	20.07.2010, FU Berlin, Stammhaltung
Positiv Serum Schaf		30.07.2010, FU Berlin, Stammhaltung
Serum Texellamm 886		31.10.2010, Arche Warder
Serum Texellamm 887		13.11.2010, Arche Warder
Serum Soaylamm 879		13.11.2010, Arche Warder
Serum Soaylamm 917		16.10.2010, Arche Warder
Serum Soaylamm 918		13.11.2010, Arche Warder
Serum Texellamm 954		21.08.2010, Arche Warder

Anhang

Serum Texellamm 954	31.10.2010, Arche Warder
Serum Texellamm 958	13.07.2010, Arche Warder
Serum Soaylamm 595	16.10.2010, Arche Warder
Serum Soaylamm 961	13.11.2010, Arche Warder

Tabelle 50: Liste der Versuchstiere 2009

Schaf ID	Geburtsdatum	Geschlecht	Rasse
219	10.04.09	Weiblich	Soay Schaf
235	10.04.09	Männlich	Soay Schaf
010110079632*	10.04.09	Männlich	Soay Schaf
010110079633	10.04.09	Weiblich	Soay Schaf
010110079634	10.04.09	Weiblich	Soay Schaf
010110079635*	10.04.09	Männlich	Soay Schaf
010110079636	10.04.09	Männlich	Soay Schaf
010110079685	10.04.09	Männlich	Soay Schaf
010110079686	10.04.09	Weiblich	Soay Schaf
010110079694*	10.04.09	Männlich	Soay Schaf
010110079696	10.04.09	Männlich	Soay Schaf
010110079616	07.04.09	Weiblich	Texel Schaf
010110079729	07.04.09	Weiblich	Texel Schaf
010110079730*	07.04.09	Männlich	Texel Schaf
010110079731	07.04.09	Weiblich	Texel Schaf
010110079732	07.04.09	Weiblich	Texel Schaf
010110079733	07.04.09	Männlich	Texel Schaf
010110079736	07.04.09	Weiblich	Texel Schaf
010110079737	07.04.09	Männlich	Texel Schaf
010110079741	07.04.09	Weiblich	Texel Schaf

010110079742	07.04.09	Weiblich	Texel Schaf
010110079743*	07.04.09	Männlich	Texel Schaf
010110079749*	07.04.09	Männlich	Texel Schaf
010110079750	07.04.09	Weiblich	Texel Schaf
010110079751	07.04.09	Weiblich	Texel Schaf

Die mit * gekennzeichneten Schafe sind am Ende des Versuchs euthanasiert und sezirt worden.

Tabelle 51: Liste der Versuchstiere 2010

Schaf ID	Geburtsdatum	Geschlecht	Rasse
010110106881*	31.03.10	Weiblich	Soay Schaf
010110106882	31.03.10	Männlich	Soay Schaf
010110106883	31.03.10	Männlich	Soay Schaf
010110106897	31.03.10	Weiblich	Soay Schaf
010110106914	31.03.10	Weiblich	Soay Schaf
010110106915*	31.03.10	Männlich	Soay Schaf
010110106916	31.03.10	Männlich	Soay Schaf
010110106917	31.03.10	Männlich	Soay Schaf
010110106918	31.03.10	Männlich	Soay Schaf
010110106919	31.03.10	Männlich	Soay Schaf
010110106920	31.03.10	Männlich	Soay Schaf
010110106959	31.03.10	Weiblich	Soay Schaf
010110106960	31.03.10	Männlich	Soay Schaf
010110106961*	31.03.10	Weiblich	Soay Schaf
010110106962	31.03.10	Weiblich	Soay Schaf
010110106879	31.03.10	Männlich	Soay Schaf
010110106880	31.03.10	Männlich	Soay Schaf

Anhang

010110106884	03.04.10	Weiblich	Texel Schaf
010110106885	03.04.10	Männlich	Texel Schaf
010110106886	03.04.10	Männlich	Texel Schaf
010110106887*	03.04.10	Männlich	Texel Schaf
010110106889	03.04.10	Weiblich	Texel Schaf
010110106892	03.04.10	Weiblich	Texel Schaf
010110106895	03.04.10	Weiblich	Texel Schaf
010110106954*	03.04.10	Weiblich	Texel Schaf
010110106955	03.04.10	Weiblich	Texel Schaf
010110106956	03.04.10	Weiblich	Texel Schaf
010110106957	03.04.10	Weiblich	Texel Schaf
010110106958*	03.04.10	Weiblich	Texel Schaf

Die mit * gekennzeichneten Schafe sind am Ende des Versuchs euthanasiert und sezirt worden.

Publikationsliste

Posterpräsentation:

4. bis 6. Juli 2011

Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft – Fachgruppe Parasitologie; Diagnostik, Epidemiologie und Bekämpfung von Parasitosen bei Nutz-, Haus- und Heimtieren, Berlin,

A. Brunken, J. Demeler, K. Frölich, G. von Samson-Himmelstjerna, E. Schein

„Vergleichende Untersuchungen zur Wurmbürde sowie zu ausgewählten immunologischen und klinischen Parametern zwischen einer Hochleistungsschafsrasse und einer ursprünglichen, alten Haustierrasse“

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei dem Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der FU Berlin, namentlich Prof. Dr. med. vet. Janina Demeler, PD Dr. rer. nat. Jürgen Krücken, Univ.-Prof. Dr. Georg von Samson-Himmelstjerna, Prof. Dr. med. vet. Peter-Henning Clausen, Sabrina Ramünke, Peggy Hoffmann-Köhler, Katharina Seidl, Tanja Bartmann, Thomas Brandt, Louise Le Bel und den Doktoranden des Instituts, dem Mitarbeiter M. Sc. Marcus Groß der FU:STAT, dem Leiter der Veterinärmedizinischen Bibliothek Dr. Tobias Gäng, dem Tierpark Arche Warder e.V. mit namentlich Prof. Dr. Dr. Kai Frölich, Heike Rudolph, Hardy Marienfeld, Eike Fandrey, Dr. Anabell Jandrowsky und allen Probennahme-Helfern bedanken, ohne deren intensive fachliche, finanzielle und tatkräftige Unterstützung dieses Projekt nicht möglich gewesen wäre.

Gleichzeitig gilt mein Dank an die beiden Tierarztpraxen in denen ich während meiner Promotionszeit als Tierärztin in Vollzeitbeschäftigung angestellt war: Das Fachtierärztliche Zentrum für Kleintiere in Flensburg mit Christina Müller, Dr. Ulrich Wölk, Dr. Torsten Schottstedt, Dr. Wibke Becker, Dr. Ann-Kathrin Brons, Dr. Britta Richter, Dr. Gudrun Bolln, Dr. Frauke Klein, Lena Brix, Dr. Julia Kauder sowie Petra, Susanne, Janine, Lisa, Rike, Randi, Rebecca, Ann-Kathrin, Marie, Pia, Nadine, Franzi und Rolf und die Gemeinschaftspraxis Dres. H. H. Lagershausen und H. D. Schürmann in Berne mit Hans-Dieter, Hans-Hermann, Andrea, Beate, Liane, Marie, Elke und Sabiha. Nur durch die flexible

Publikationsliste/ Danksagung

Arbeitseinteilung zur Zeit der Probennahmen in den Jahren 2009/2010 und während der Laborarbeit im Jahr 2011-2013 war es möglich, das Projekt durchzuführen.

Mein Dank gilt vor allem auch meinen Freunden, die mir während meiner Aufenthalte in Berlin immer eine Unterkunft zur Verfügung gestellt haben, vor allem Sabine, Sebastian, Marlene, Carla und Caspar, Tina und Cons und Kristin, Christian, Theo, Selma und Laddy.

Für die unendliche Geduld und Zeit danke ich meiner Familie, die mir immer wieder Mut zur Vollendung dieser Arbeit zugesprochen und sich um meine Liebsten gekümmert hat.

Zu allerletzt möchte ich zwei Menschen erwähnen, denen ich nicht mehr persönlich danken kann, die aber mit ihrer überaus aufmunternden Art mich immer zum Weitermachen getrieben haben: Prof. Dr. Eberhard Schein und Dr. Hubert Klein.

Selbständigkeitserklärung

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

Berlin, den 28.07.2016

Anja Brunken