

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

**Untersuchung möglicher Auswirkungen des
Klimawandels auf das Vorkommen und die
Anthelminthikaresistenzentwicklung von
trichostrongyliden Weideparasiten des Rindes**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Friederike Marie-Luise Knapp-Lawitzke geb. Knapp
Tierärztin aus Riedlingen

Berlin 2015

Journal-Nr.: 3829

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek

1. Gutachter/in: Prof. Dr. Janina Demeler

2. Gutachter/in: Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Heuwieser

3. Gutachter/in: Univ.-Prof. Dr. Marcus G. Doherr

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus)

Climate change, cattle, *Cooperia oncophora*, *Ostertagia ostertagi*, benzimidazoles,
resistance, tubulin, monitoring, models, pastures, soil

Tag der Promotion: 02. Februar 2016

*In Gedenken an meinen Großvater Anton Geiger, der immer daran geglaubt hat, dass
ich Tierärztin werde, und mich dabei immer unterstützt hat.*

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis:.....	IV
Tabellenverzeichnis:.....	IV
Abkürzungsverzeichnis:.....	V
1 Einleitung	1
2 Klimawandel.....	3
2.1 Klimawandel und damit verbundene Herausforderungen für die Menschheit	3
2.2 Auswirkungen des Klimawandels auf die Tierwelt.....	4
2.3 Effekte des Klimawandels auf die Rinderhaltung in Deutschland	4
2.3.1 Auswirkungen des Klimawandels auf die Futterproduktion	6
2.3.2 Auswirkungen des Klimawandels auf den Befall mit Rinderparasiten	7
3 Nematoden.....	9
3.1 Wichtige gastrointestinale Nematoden beim Rind in Europa	9
3.2 Entwicklungszyklus der Trichostrongyloiden	11
3.3 Einfluss von Trichostrongyloiden auf die Rinderhaltung	16
3.4 Parasitosen sind Faktorenerkrankungen.....	17
3.4.1 Immunstatus.....	17
3.4.2 Weidemanagement	20
3.5 Umweltbedingungen die das Weidemanagement beeinflussen.....	22
3.5.1 Temperaturanstieg	22
3.5.2 Trockenstress.....	23
3.5.3 UV-Strahlung.....	24
3.6 Parasitenkontrolle	26
3.6.1 Benzimidazole	26
3.7 Anthelminthika-Resistenz.....	28
3.7.1 Anthelminthika-Resistenz bei Weideparasiten der Schafe	28
3.7.2 Status quo für Benzimidazol-Resistenzen bei den Weideparasiten des Rindes....	29
3.7.3 Molekularbiologische Grundlagen der Benzimidazol-Resistenz	30
3.8 Nachweismöglichkeiten der Anthelminthika-Resistenz.....	31
3.8.1 Anthelminthika-Resistenz Nachweis mittels FECRT	31
3.8.2 Anthelminthika-Resistenz Nachweis mittels <i>in vitro</i> Verfahren.....	35
3.8.3 Molekularbiologische Methoden	36
3.9 Gründe für die Verbreitung von Anthelminthika-Resistenzen	37
3.9.1 Unterdosierung von Anthelminthika	37
3.9.2 Zu häufige Behandlung aus Gründen der Gewinnmaximierung	38
3.9.3 Unzureichendes Weidemanagement.....	39
3.9.4 Ein geringes Refugium erhöht den Selektionsdruck.....	39

Inhaltsverzeichnis

4	Wie wirkt sich der Klimawandel auf die Resistenzentwicklung von <i>Ostertagia</i> spp. und <i>Cooperia</i> spp. in den nächsten 100 Jahren in Deutschland aus?	41
5	Veröffentlichungen in parasitologischen Fachzeitschriften.....	42
5.1	Recovery of strongylid third-stage larvae from herbage samples: standardisation of a laboratory method and its application in the field (Graswaschmethode)	42
5.2	Rapid method for recovery of strongylid third-stage larvae from small soil samples (Erdwaschmethode).....	49
5.3	Assessment of the impact of plant species composition and drought stress on survival of strongylid third-stage larvae in a greenhouse experiment (Gewächshausversuch)	54
5.4	Rapid selection for β -tubulin alleles in codon 200 conferring benzimidazole resistance in an <i>Ostertagia ostertagi</i> isolate on pasture (Weideversuch)	65
5.5	Elevated temperatures and long drought periods have a negative impact on survival and fitness of strongylid third stage larvae (Klimakammerversuch)	75
6	Einzeldiskussionen	85
6.1	Diskussion der Graswaschmethode	85
6.2	Diskussion der Erdwaschmethode	85
6.2.1	Beitrag der Gras- und Erdwaschmethode zum Fortschritt der Wissenschaft.....	86
6.3.1	Beitrag des Gewächshausversuchs zum Fortschritt der Wissenschaft	91
6.4	Diskussion des Weideversuchs.....	94
6.4.1	Beitrag des Weideversuchs zum Fortschritt der Wissenschaft.....	96
6.5	Diskussion des Klimakammerversuchs	97
6.5.1	Beitrag des Klimakammerversuchs zum Fortschritt der Wissenschaft	98
7	Gesamtdiskussion	99
7.1	Zusammenführung der Ergebnisse aus Gewächshaus- Klimakammer- und Weideversuch.....	99
7.2	Parasiten sind sehr anpassungsfähig.....	101
7.3	Neues Verbraucherbewusstsein bezüglich Medikamentenrückständen	101
7.3.1	Möglichkeiten durch reine Stallhaltung die Anthelminthikagabehäufigkeit bei Rindern zu verringern	102
7.3.2	Nachhaltige Parasitenkontrolle durch besseres Weidemanagement	103
7.3.3	„Alternative“ Methoden zur MDS-Kontrolle.....	104
7.4	Modelle zur Kontrolle der Parasitenbürde	107
8	Zusammenfassungen	109
8.1	Zusammenfassung und Ausblick	109
8.2	Summary and outlook	111
9	Literaturverzeichnis	113
10	Anhang.....	VI
10.1	Spezies-spezifische Primer	VI
10.2	Veröffentlichungen in weiteren Medien	VI

Inhaltsverzeichnis

10.3 Vorträge von 2011 bis 2015	IX
10.4 Poster	XI
10.5 Publikationsverzeichnis	XV
11 Danksagungen	XVI
12 Eidesstattliche Erklärung	XVII

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1 unterschiedliche Entwicklungsstadien von MDS-Eiern, 400fache Vergrößerung	11
Abbildung 2 infektiöses drittes Larvenstadium (L3), ca. 500 fache Vergrößerung.....	13
Abbildung 3 L3 von MDS des Rindes mit Längenmessung in Mikrometern	14
Abbildung 4 Besonderheiten von Kopf- und Schwanzbereich der L3 von MDS des Rindes, in Mikrometern gemessen	15
Abbildung 5 Prozentuale Abweichung von verschiedenen gewichteten UV-B integralen abhängig von unterschiedlichen Ozonszenarios.....	25
Abbildung 6 Modell über die Wechselwirkung von BZ mit der Polymerisation der Mikrotubuli	27
Abbildung 7 Teil der insgesamt 80 Pflanztöpfe im Gewächshaus der Agrarwissenschaftlichen Universität Göttingen	55

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1 Vergleich FECRT und Anteil des mit Resistenz assoziierten SNP von <i>O. ostertagi</i> im Weideversuch vor Behandlung (v. B.) und nach Behandlung (n. B.).....	96
---	----

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis:

A	Adenin
AR	Anthelminthika Resistenz
BZ	Benzimidazol
C	Cytosin
EHA	Egg Hatch Assay
EpG	Eier pro Gramm Kot
FEC	Faecal Egg Count
FECR	Faecal Egg Count Reduction
FECRT	Faecal Egg Count Reduction Test (Eizahl-Reduktionstest)
FWC	Faecal Water Content
IVM	Ivermectin
LMIA	Larval Migration Inhibition Assay
L3	infektiöses drittes Larvenstadium von Magendarmstrongyliden
MDS	Magendarmstrongyliden
ML	Makrozyklische Laktone
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
T	Thymin

Einleitung

1 Einleitung

In der Zukunft wird die Menschheit viele neue Aufgaben bewältigen müssen. Neben dem immensen Wachstum der Bevölkerung, welches bis zum Jahr 2050 bereits zu einer Weltbevölkerung von 9,6 Milliarden Menschen führen soll (UN 2012), ist der Klimawandel, dessen Folgen sich auf Menschen, Tiere und Pflanzen auswirken wird, das größte Problem. Dass der Klimawandel die bedrohlichste Herausforderung für zukünftige Generationen darstellt, wird mittlerweile auch vom amerikanischen Präsidenten anerkannt (McDonnel 2015). Beide Probleme verschärfen sich gegenseitig, denn durch das Bevölkerungswachstum und die Industrialisierung konnten so große Mengen an Treibhausgasen entstehen, dass dies zu einer starken Klimaerwärmung geführt hat. Die Konzentration von Treibhausgasen wird voraussichtlich auch weiterhin noch zunehmen. Gleichzeitig verstärkt der Klimawandel die Probleme, die durch die Intensivierung der Landwirtschaft entstehen, welche zur Versorgung einer sich stetig vergrößernden Bevölkerung unvermeidlich ist. Somit wird die Weidehaltung von landwirtschaftlichen Nutztieren wie zum Beispiel Rindern weltweit zunehmen. Eine leistungsorientierte Rinderhaltung ist ohne den Einsatz wirksamer Anthelminthika nicht oder nur sehr begrenzt möglich, da Weideparasiten sowohl die Gesundheit als auch die Leistungsbereitschaft stark einschränken können. Viele Parasitenspezies haben durch den über lange Zeit sorglosen Einsatz von Anthelminthika Resistenzen entwickelt. Dies ist in der Schafhaltung bereits ein großes Problem (Jackson et al. 2000) und wird auch immer wichtiger in der Rinder- und Pferdehaltung (Kaplan et al. 2012).

Ziel dieser Doktorarbeit war es zu ermitteln, wie sich der Klimawandel auf die freilebenden Stadien eines der häufigsten trichostrongyloiden Weideparasiten des Rindes, *Cooperia oncophora* auswirkt. Ein weiterer, auch molekularbiologisch untersuchter Teil der Doktorarbeit beschäftigte sich in einem Weideversuch mit dem Problem der Entwicklung von Anthelminthikaresistenzen (AR). AR werden unter anderem insbesondere durch zu häufiges und unterdosiertes Entwurmen, ein Umstand der in der Praxis relativ häufig vorkommt, hervorgerufen. Der Weideversuch wurde mit naiven Kälbern und einem *Ostertagia ostertagi* Isolat, welches zu 50 % einen mit Benzimidazol(BZ)-Resistenz assoziierten SNP aufwies, durchgeführt. *O. ostertagi* ist weltweit ein sehr häufiger Trichostrongyloide und für das Rind in Europa am pathogensten. Um einerseits das Vorkommen von *O. ostertagi* feststellen zu können, sowie andererseits die Häufigkeit der Resistenz assoziierten Allele in der *O. ostertagi* Population überwachen zu können, wurden spezies-spezifische PCR und Pyrosequenzierungstechnik eingesetzt. Der Weideversuch bestätigte, dass frequente Behandlungen in Kombination mit Unterdosierung innerhalb weniger Parasitengenerationen zu einem enormen Anstieg resistenz-assoziierten Allele in einer Population führen. Außerdem wurde belegt, dass zur Feststellung von BZ-Resistenzen die Pyrosequenzierung dem Faecal

Einleitung

Egg Count Reduction Test (FECRT) hinsichtlich der Sensitivität weit überlegen ist. Der FECRT ist die momentan in der Praxis am häufigsten angewendete Methode zur Feststellung von AR und wird auch von der „World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology“ (WAAVP) empfohlen. Die meisten Stadien der trichostrongyliden Weideparasiten verbringen den größten Teil ihres Lebens außerhalb ihres Wirtes auf der Weide. Bislang liegen für die Spezies *Cooperia* wenig Informationen hinsichtlich des Verhaltens (z.B. „Wanderbereitschaft“) bzw. der Überlebensdauer von Larven auf Gras und im Boden vor. Die in dieser Doktorarbeit gewonnenen Daten und Erkenntnisse liefern somit einen wichtigen Beitrag zur Optimierung des Weide- und Parasiten-Managements von Rindern. Hierfür ist es unter anderem sehr wichtig, die Parasitendichte auf der Weide (Boden und Bewuchs) möglichst genau bestimmen zu können. Eine höhere Wiedergewinnungsrate für das dritte infektiöse Larvenstadium (L3) von Weideparasiten erlaubt eine genauere Bestimmung der Parasitendichte. Die für diese Doktorarbeit entwickelten passiven Methoden um L3 aus Gras- und aus Bodenproben zu waschen haben eine bessere Wiedergewinnungsrate, als die der bisher gängigen aktiven Auswanderungsverfahren oder früheren passiven Waschmethoden. Andere, für das Weidemanagement wichtige Erkenntnisse, wie der Einfluss von Trockenstress, höheren Temperaturen, Vegetationszusammensetzung und Lokalisation der L3 auf Pflanzen und im Boden, konnten im Gewächshaus- und Klimakammerexperiment gewonnen und im Weideversuch bei der Gras- und Bodenprobenuntersuchung bestätigt werden. Die für Deutschland prognostizierten zukünftigen Wetterbedingungen werden den Selektionsdruck für Trichostrongyliden wahrscheinlich ansteigen lassen. Denn Tage mit extremer Hitze und länger andauernde Trockenzeiten schränken das natürliche Refugium der L3 auf der Weide ein. Das bedeutet, dass der bisherige Umgang mit Anthelminthika dringend den zukünftigen klimatischen Voraussetzungen angepasst werden muss, da in Deutschland sonst ähnliche Resistenzproblematiken zu erwarten sind, wie sie jetzt schon in Ländern bestehen, deren klimatische Bedingungen einen negativen Einfluss auf das Refugium der L3 haben.

2 Klimawandel

2.1 Klimawandel und damit verbundene Herausforderungen für die Menschheit

Die vom Menschen erzeugten Treibhausgase (Feldman et al. 2015) beschleunigen höchstwahrscheinlich den momentanen Klimawandel. Dies hat offensichtliche Auswirkungen, wie z.B. das immer stärkere Abschmelzen der Gletscher. Im Fall der Westantarktis werden sich die Gletscher auch nicht mehr aufbauen können, da der kritische Kippunkt im Frühjahr 2014 überschritten wurde (Rignot et al. 2014). Dies wird sich in einem weiteren Anstieg des Meeresspiegels äußern. Zusätzlich häufen sich in den letzten Jahren Umweltkatastrophen, wie beispielsweise in den USA verheerende Fluten, Hurrikane oder extrem heiße Tage mit jährlich steigenden finanziellen Schäden in Milliardenhöhe (Easterling et al. 2000). In Indien könnte der Monsun mit 5 – 10 % mehr Niederschlagsmenge in Zukunft mehr Menschen- und Tierleben fordern und insgesamt die Lebensbedingungen erschweren. Dieses Szenario ist sehr wahrscheinlich, da die Luft über dem Indischen Ozean in Zukunft wärmer sein wird und somit mehr Feuchtigkeit aufnehmen kann (Turner 2012). Auch in Europa treten regelmäßig „Jahrhunderthochwasser“ auf (Belz 2013; Bissolli 2010; Rudolf 2003; Rudolf B. et al. 2006). Trotz aller klimatischen Widrigkeiten wird die Bevölkerung auf der Erde weiter wachsen. Es wird mittlerweile davon ausgegangen, dass im Jahr 2050 9,6 Milliarden Menschen die Welt bevölkern werden (UN 2012). Da diese ernährt werden müssen und die landwirtschaftlich nutzbare Fläche auf der Welt begrenzt ist, bleibt keine andere Möglichkeit, als die Landwirtschaft zu intensivieren. Dies wird sich auch in einer verstärkten Milch- und Fleischproduktion durch Rinder äußern, denn es gibt viele Flächen die nur von Weidetieren genutzt werden können. Diese sind für den Ackerbau ungeeignet oder werden dies aufgrund der Klimaerwärmung (Mendelsohn et al. 1994). Da alle Tiere, die Zugang zu Weideland haben, sich zwangsläufig mit Parasiten infizieren, wird sich durch eine zukünftige Intensivierung der Weidehaltung wahrscheinlich auch das Risiko für Krankheiten erhöhen, die durch Weideparasiten ausgelöst werden (Morgan et al. 2013).

Auch das Wetter in Europa wird sich in den nächsten 100 Jahren ändern (Jacob 2012). Schon jetzt gibt es Belege für einen Anstieg der durchschnittlichen Lufttemperatur in den letzten 40 Jahren (Chmielewski et al. 2004). Das Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) hat verschiedene Klimaszenarien für die Zukunft erstellt, welche auf unterschiedlichen Entwicklungen der Wirtschaft beruhen. Das A1B Szenario geht bspw. von der Vermutung aus, dass die Wirtschaft weiter wächst und somit immer mehr Treibhausgase erzeugt werden. Gleichzeitig kann der Emissionsanstieg durch den Einsatz neuer Technologien eingedämmt werden (Solomon 2007). Der Forschungsverbund Klimafolgenforschung in Niedersachsen (KLIFF) hat auf Basis des A1B Szenarios Modelle für die Entwicklung des Wetters in Deutschland bis zum Jahr 2099 entwickelt. Modell REMO, welches vom Max-Planck-Institut

Klimawandel

für Meteorologie entwickelt wurde, rechnet mit einem Anstieg der durchschnittlichen Sommertemperatur um 2,5 °C und einem Niederschlagsrückgang von 18 – 22 %. Das Modell CLM prognostiziert sogar um 3° C höhere Sommertemperaturen und 22 – 28 % weniger Niederschlag (Haberlandt et al. 2010; Jacob 2012)

2.2 Auswirkungen des Klimawandels auf die Tierwelt

Der Klimawandel beeinflusst alle Lebewesen im Meer (Roessig et al. 2004) und an Land, in dem er sich auf Populationsvorkommen, die Speziesverteilung, Morphologie und das Sozialverhalten auswirkt (Easterling et al. 2000). Auch Parasiten werden beeinflusst, da schon kleine Temperaturveränderungen zu einer signifikant gesteigerten Entwicklungsrate führen können (Kutz et al. 2005). Die Erderwärmung vergrößert zudem auch die Verbreitungsgebiete von Parasiten, deren Übertragung von Mindesttemperaturen abhängig ist. Dies erklärt auch das autochthone Auftreten des Fadenwurms *Dirofilaria repens*, der bis dahin in Deutschland nur als Reisekrankheit bekannt war (Czajka et al. 2014), und die Ausbreitung der Zeckenart *Dermacentor marginatus* (Rubel et al. 2014). Durch die Klimaerwärmung können Zecken wie *Ixodes* spp. auch ganzjährig aktiv sein (Gray et al. 2009). Da durch den Klimawandel auch die Weideperioden länger werden können, werden bei Weideparasiten auch mehr Generationswechsel pro Saison möglich sein (Smolik et al. 1982). Dies bedeutet auch, dass sich AR assoziierte Gene schneller verbreiten können.

2.3 Effekte des Klimawandels auf die Rinderhaltung in Deutschland

Studien, die auf den von KLIFF bereitgestellten Modellen CLM und REMO beruhen, zeigten, dass die klimabedingten heißeren Tage und höheren Durchschnittstemperaturen dem Tier direkt durch entstehenden Hitzestress schaden. Das wirkt sich auf die Fleisch- und Milchleistung aus und kann im Extremfall lebensbedrohlich sein (Gauly et al. 2013).

Da die Rinderhaltung in Deutschland einen wichtigen Wirtschaftszweig der Landwirtschaft darstellt, wird der Klimawandel Deutschland auch ökonomisch gesehen treffen. Im Jahr 2013 fanden sich auf fast 50 % der agrarwirtschaftlichen Betriebe Rinder und auf 11 % der Betriebe wurden sogar mehr als 200 Rinder gehalten. Damit hatte die deutsche Rinderhaltung einen Produktionswert von 15 Milliarden Euro und war in der EU der größte Milcherzeuger sowie nach Frankreich der zweitgrößte Rinder- und Kalbfleischlieferant (BMEL 2014).

Momentan ist die Rinderzucht auf Leistungssteigerung ausgelegt, was sich darin widerspiegelt, dass die Milchproduktion pro Jahr und Kuh um 2 – 3 % (Gauly et al. 2013), und das durchschnittliche Schlachtgewicht ansteigen. Dieses lag 1960 für einen Mastbullen noch bei 268 kg, 1990 bereits bei 355 kg und im Jahr 2013 bei 390 kg (BMEL 2014). Es ist wichtig

Klimawandel

zu beachten, dass die gemessenen Temperaturwerte von Wetterstationen sich von der Hitzebelastung im Tierstall unterscheiden und selbst moderne Ställe mit künstlicher Belüftung keine optimalen Temperaturen garantieren (Schüller et al. 2013). In Schüllers Studie wurden sieben Tierställe in Sachsen-Anhalt und Brandenburg untersucht und es wurde festgestellt, dass allein 2012 zwischen Juni und Oktober im Stall an bis zu 44 Tagen extreme Hitze- und Luftfeuchtwerte auftraten. Der Temperatur-Luftfeuchtigkeits-Index (Temperature Humidity Index, THI) beschreibt die Belastung, die durch hohe Temperaturen und hohe Luftfeuchtigkeit auf die Tiere wirken. Da Rinder ihre Körpertemperatur mittels Transpiration der Haut herunterregulieren können, leiden sie bei hoher Luftfeuchtigkeit stärker unter hohen Temperaturen. Dies liegt daran, dass die Feuchtigkeit dann schlechter von ihrer Haut verdampfen kann. Kann der Schweiß nicht in einen gasförmigen Zustand übergehen, da die Luft schon zu stark mit Wasserdampf gesättigt ist, findet keine endotherme Reaktion statt und somit wird der Rinderhaut keine Wärme entzogen. Der THI wird wie in der unten stehenden Formel für Grad Celsius berechnet. Je höher der Wert ausfällt desto mehr leidet das Tier (Kendall et al. 2009):

$$\text{THI} = (1.8 * \text{Temperatur} + 32) - ((0.55 - 0.0055 * \text{relative Luftfeuchtigkeit}) * (1.8 * \text{Temperatur} - 26))$$

In Schüllers Studie wird belegt, dass schon eine Stunde mit einem THI ≥ 73 ausreicht, um die Trächtigkeitsrate der Kühe um 31 – 12 % zu verschlechtern (Schüller et al. 2014). Andere Interpretationen gehen sogar davon aus, dass unter europäischen Wetterbedingungen ein THI ≥ 68 ausreicht, um die Rinder dem Hitzestress auszusetzen (Gauly et al. 2013). Auch wenn sich Wissenschaftler bei der Einteilung verschiedener THI Bereiche nicht einig sind, gehen die meisten davon aus, dass Werte ≥ 72 für die Rinder unangenehm sind und bei Werten von ≥ 84 der Hitzestress zu akuten Nottfällen führen kann (Bohmanova et al. 2007).

Gerade laktierende Kühe leiden schneller unter hohen Umgebungstemperaturen. Dies liegt daran, dass sie mehr Energie aufnehmen müssen, um Milch produzieren zu können. Die gesteigerte Verdauung und die Milchproduktion bewirken folgend einen Anstieg der Körpertemperatur. Die Milchproduktion kann sogar mehr als die Hälfte der gesamten Wärmeproduktion einer Hochleistungsmilchkuh ausmachen (Coppock 1985). Hochleistungsmilchkühe sind darauf gezüchtet, mehr Futter aufzunehmen, um die Milchproduktion steigern zu können. Dadurch steigt deren natürliche metabolische Wärmeproduktion und wiederum auch ihre Anfälligkeit für den durch den Klimawandel öfters vorkommenden Hitzestress (Kadzere et al. 2002). Unter Hitzestress verringern Rinder die Aufnahme von Futtermasse, da so ihre metabolische Wärmeproduktion herabgesetzt wird. Außerdem tendieren sie zur Aufnahme von Kraft- anstatt Raufutter, was das Risiko einer Pansenazidose vergrößert (Gauly et al. 2013). Ein schon geschwächtes Verdauungssystem leidet entsprechend schneller unter einer Parasitenbürde als ein gesundes. Außerdem konnte

Klimawandel

belegt werden, dass Hitzestress auch das Immunsystem schwächen kann. Bei Milchkühen der Rasse „Holstein“ wurden in einer heißen Umgebung geringere Konzentrationen von Immunglobulinen im Plasma und Kolostrum nachgewiesen als bei Tieren mit kühleren Standortbedingungen. Dies könnte auch erklären, warum im Sommer geborene Kälber geringere IgG-Konzentrationen im Plasma haben (Nardone et al. 1997). Wie in Kapitel 3.4 „Parasitosen sind Faktorenerkrankungen“ (Seite 17) noch ausführlicher beschrieben wird, bedeutet ein schwächeres Immunsystem, dass Rinder länger und stärker unter einem Befall mit Magendarmstrongylien (MDS) leiden. Somit könnte Hitzestress zusätzlich bei gleichzeitigem Parasitenbefall auch durch schwerer wirkende Parasitosen die Produktivität der Tiere verringern.

2.3.1 Auswirkungen des Klimawandels auf die Futterproduktion

Der Klimawandel schadet auch indirekt der Rinderhaltung, da sich beispielsweise Trockenstress negativ auf die Futterproduktion auswirkt (Gauly et al. 2013). Versuche zum Einfluss des durch den Klimawandel in Deutschland häufiger auftretenden Trockenstress auf Futterpflanzen wurden im Rahmen des KLIFF Projektes an der Fakultät für Agrarwissenschaften der Universität Göttingen durchgeführt. Hier fiel auf, dass Futterpflanzen in der Lage sind, sich auch nach längerem und wiederkehrendem Trockenstress immer wieder zu erholen. Auch der Nährwert von Gräsern, Krautpflanzen und Leguminosen konnte durch Trockenstress nicht signifikant beeinflusst werden. Aber es wurde deutlich, dass sich der Gesamtertrag der Futterproduktion durch Trockenstress verringert: moderater Trockenstress führte zu im Schnitt 12 % weniger Ertrag und starker Trockenstress zu einer durchschnittlichen Ertragsreduktion von 22 % bis höchstens 40 % (Küchenmeister et al. 2014). Der durch das Experiment beschriebene Trockenstress bedingte Volumenverlust von Futterpflanzen stellt die Rinderhalter vor ein Problem: Gibt es zu wenig Futter auf der Weide, leidet die Leistung der Tiere, Kälber nehmen schlechter zu und Milchkühe geben weniger Milch. Zusätzlich sind die Rinder gezwungen näher an ihren Kuhfladen zu grasen, da die vom Faeces weiter entfernten Stellen, an denen sie natürlicherweise fressen würden, schon abgegrast sind. Dadurch steigt die Infektionsgefahr mit Protozoen, Bakterien, Viren sowie auch die mit Weideparasiten. Auch bei der reinen Stallhaltung müssen die Tiere mit Grünfutter versorgt werden, sinkt der Ertrag auf den Feldern, bedeutet dies auch Einbußen für den Rinderhalter, da er nun größere Flächen braucht, um die gleiche Futtermenge zu produzieren. Deshalb ist es eine wichtige Herausforderung, Pflanzenkompositionen zu erforschen, die besser mit den neuen Umweltbedingungen zurechtkommen. Küchenmeister et al. (2012a) vermuten, dass die Biomassenproduktion durch einen erhöhten Leguminosenanteil gesteigert werden kann. Die

Klimawandel

biologische Begründung ist, dass Leguminosen in der Lage sind Stickstoff zu fixieren. Dies wirkt wie ein natürlicher Dünger für die anderen Pflanzen und lässt sie stärker wachsen (Huston et al. 2000). In einem Experiment zur Ertragsstabilität konnte jedoch festgestellt werden, dass durch die größere Ertragsvariabilität des Weißklee (*Trifolium repens*) die Pflanzenproduktion auch abnehmen kann (Küchenmeister et al. 2012a). Der Klimawandel könnte positiv auf das Wachstum von *T. repens* wirken, da in Zukunft Temperaturen zu erwarten sind, bei denen Weißklee optimal wachsen müsste: Im Gewächshausversuch wurden die höchsten Erträge erzielt, wenn diese Temperatur in den Sommermonaten überschritten wurde (Küchenmeister et al. 2012a). Dies ist auch deckungsgleich mit den Ergebnissen von Boller (1985), welcher die Photosynthese von *T. repens* bei unterschiedlichen Temperaturen untersuchte (10/7, 18/13 und 26/21 °C) und feststellte, dass bei einer Tag-/Nachttemperatur von 26/21 °C die jungen Blätter schneller ihre endgültige Position erreichten. Bei zu hohen Temperaturen wächst *T. repens* aber wieder schlechter (Saberri et al. 2013). Leguminosen haben ein kleineres Temperaturfenster als die in Deutschland vorkommenden Gräser, welche von 15 – 25 °C optimal wachsen können, wie z.B. *Lolium perenne* (Wilson J.R. et al. 1971) oder *Dactylis glomerata*, bei denen die optimalen Temperaturen für die Zellteilung – und damit das Wachstum – zwischen 20 und 25 °C (Davidson et al. 1965) liegen. Um eine möglichst gute Futterproduktion zu erreichen, ist es am wichtigsten, dass auf der Weide Gräser und Leguminosen vorkommen. Eine noch größere Artenvielfalt der Pflanzen kann die Produktion hingegen nicht mehr steigern (Küchenmeister et al. 2012a).

2.3.2 Auswirkungen des Klimawandels auf den Befall mit Rinderparasiten

Rinder, die durch Hitzestress oder durch trockenstressbedingten Futtermangel geschwächt sind, reagieren auch empfindlicher auf Krankheitserreger wie Bakterien, Viren oder Parasiten. Parasitische Einzeller, Trematoden, Zestoden und Nematoden beeinträchtigen das Wohlergehen der Tiere und somit auch die Wirtschaftlichkeit von Rinderbetrieben weltweit. Neben den Kokzidien, welche weltweit bei Rindern zu Durchfall mit damit verbundenem Gewichtsverlust und Exsikkose führen oder Aborte auslösen (Boch et al. 2006), schränken MDS und Leberegel die Produktivität am stärksten ein und können sogar zu tödlichen Krankheitsverläufen führen. Bei Rindern sind in einigen Regionen auch Lungenwürmer wirtschaftlich gesehen wichtig (Boch et al. 2006; Morgan et al. 2013). Insgesamt liegen weltweit keine einheitlich erhobenen Abschätzungen hinsichtlich der durch gastrointestinale Parasiten verursachten wirtschaftlichen Verluste vor. Gastrointestinale Parasiten verursachen beim Schaf unter anderem in Großbritannien Kosten von 84 000 000 £ pro Jahr (Nieuwhof et

Klimawandel

al. 2005). Bei Rindern der gesamten EU wird davon ausgegangen, dass jährlich etwa 1 Milliarde € für anthelminthische Behandlungen und tierärztliche Beratung ausgegeben werden (Jozef Vercruysse et al. 2006). Durch Analysen von 93 belgischen Milchkuhherden wurde der Medianwert für Einzelkosten bei einer MDS Infektion mit 46 € pro Kuh und Jahr berechnet. Eine Leberegelinfektion schlägt hier mit 6 € zu Buche. Eine anthelminthische Behandlung gegen gastrointestinale Nematoden kostet laut des entwickelten Berechnungsmodells ParaCalc® bei einem Jungtier 3 € und bei einem ausgewachsenem Rind 10 €. Eine Behandlung gegen Leberegel ist dagegen mit 2 bzw. 8 € etwas günstiger (Charlier et al. 2012). Falls durch den Klimawandel Überflutungen häufiger auftreten, steigert dies die Infektionsgefahr durch Kokzidienarten im Trinkwasser (Semenza et al. 2009). Da bei Rindern der Befall mit Cryptosporidien und Eimerien auch jetzt schon bei bis zu 100 % liegt (Boch et al. 2006), spielen die klimawandelbedingten neuen Verbreitungswege möglicherweise eine größere Rolle für die Infektion beim Menschen. Leberegelbefall kommt bei Wiederkäuern in letzter Zeit immer häufiger vor. Modelle haben ergeben, dass dies z.B. in England aufgrund des Klimawandels geschehen ist (Fox et al. 2011). Der große Leberegel, *Fasciola hepatica*, hat als wichtigen Zwischenwirt die Schnecke *Lymnaea truncatula*. Dadurch ist die Entwicklung und Verbreitung stark von der Niederschlagsmenge und der Temperatur abhängig. Zusätzlich könnten die in Zukunft wärmeren Winter erlauben, dass mehr Larven des Leberegels in der Lage sind zu überwintern. Dadurch könnten sich die Rinder schon anfangs der Weidesaison stärker mit Leberegeln infizieren. Durch längere Trockenzeiten im Sommer kann das Infektionsrisiko für Fasciolose zwar gesenkt werden, jedoch wird insgesamt *F. hepatica*, bspw. in Großbritannien, häufiger werden. Da der Lungenwurm *Dictyocaulus viviparus* sowohl in gemäßigten als auch in tropischen Klimazonen vorkommt und nun auch hier über beginnende Resistenzen gegenüber makrozyklischen Laktonen (ML) berichtet wird, ist es wichtig, auch in diesem Bereich mehr zu forschen, um so hoffentlich eine weitere Verbreitung eindämmen zu können (Molento et al. 2006).

Nematoden

3 Nematoden

Nematoden (gr. νήμα „Faden“) oder Fadenwürmer haben, auch wenn es auf Grund fehlender Fossilien schwer nachweisbar ist, schon vor 575 Millionen Jahren die Entwicklung des Lebens auf der Erde mitgestaltet. Damals bildeten sie mit Bakterien eine perfekte negative Rückkopplung, um den weltweiten Sauerstoffgehalt zu regulieren (Boyle et al. 2014). Auch heute beeinflussen Nematoden, von denen es mehr als 26 000 bekannte Arten gibt (Boch et al. 2006), fast jedes Lebewesen auf der Erde. Freilebende Nematodenarten tragen zur Zersetzung organischer Substanzen bei und sorgen somit für den lebenswichtigen Nährboden für die Pflanzen. Dadurch sichern sie auch die Lebensgrundlage aller sich von Pflanzen oder Tieren ernährenden Lebewesen. Parasitische Nematoden können sowohl Tiere als auch Pflanzen befallen. Ein gut angepasster Parasit schädigt seinen Endwirt so wenig wie möglich, da er für seine Verbreitung einen gesunden Wirtsorganismus benötigt. Besonders starker Parasitenbefall kann jedoch auch den Endwirt, bei dem der Parasit seine geschlechtliche Vermehrung durchläuft und somit auch die meisten Nachkommen produziert, nachhaltig schädigen oder sogar töten. Dies trägt zu einer besseren natürlichen Auslese bei: Tiere, die in der Lage sind sich durch ihr Verhalten vor Infektionen mit Parasiten zu schützen, wie z. B. Weidetiere, die nicht in der Nähe von ihren Exkrementen, sogenannten Geilstellen, grasen (Nansen et al. 1978), infizieren sich weniger stark mit Magendarmparasiten. Dieser mögliche Selektionsvorteil der Wirtstiere ist in unserer industrialisierten und auf Gewinnmaximierung spezialisierten Gesellschaft und Landwirtschaft aber nicht mehr so wichtig. Denn selbst geringe Parasitenbelastungen schmälern die Gewinnmarge durch weniger Milchproduktion oder verringerte Gewichtszunahme bei Schlachttieren, weshalb meistens auch ohne klinische Erscheinungen die komplette Herde metaphylaktisch gegen Parasiten behandelt wird.

3.1 Wichtige gastrointestinale Nematoden beim Rind in Europa

Die wichtigsten MDS beim Rind in Nordwesteuropa sind *C. oncophora* und *O. ostertagi* (Kloosterman et al. 1984). Weitere weltweit bei Wiederkäuern vorkommende und Gastroenteritis verursachende Gattungen sind *Haemonchus*, *Trichostrongylus* und *Nematodirus*. Die Familie Trichostrongylidae, deren Name vom Wort Trichos (gr. τριχος „Haar“) abgeleitet ist, bezeichnet treffend ihren haardünnen Körperbau. Die adulten Stadien sind zwischen fünf und drei Millimeter lang und haben reduzierte Mundkapseln. Weibchen erkennt man unter dem Mikroskop an ihren doppelt angelegten Ovarien und Uteri und einem Ovipositor, welcher aus paarigen Infundibula und Sphinktern sowie einem Vestibulum und einer Vagina besteht. Die Vulva befindet sich im letzten Körperdrittel. Die zugehörige Vulvaklappe kann auch innerhalb einer Art unterschiedlich ausgestaltet sein. Männchen kann man gut an ihren je nach Art unterschiedlich ausgestalteten zur Bursa copulatrix gehörenden und mit

Nematoden

jeweils fünf Rippen versehenen Seitenlappen und ihren Spikula unterscheiden (Boch et al. 2006).

O. ostertagi befällt in Mitteleuropa häufig Rinder, sowohl junge Kälber als auch ausgewachsene Tiere. Er ist einer der verbreitetsten MDS bei Rindern in den gemäßigten Klimazonen und wirkt sich negativ auf die Produktivität aus (Charlier et al. 2009). Bei starkem Befall kann *O. ostertagi* sehr pathogen sein, damit ist er der wichtigste Erreger der parasitären Gastroenteritis (PGE) und der Nematode, der zu den größten wirtschaftlichen Verlusten in der Rinderhaltung in den gemäßigten Klimazonen führt (Verschave et al. 2014).

Da wie zuvor beschrieben in Zukunft mit einer Intensivierung der Rinderhaltung gerechnet werden muss, könnten die dadurch veränderten Bedingungen für Ernährung, Haltungsform und Weidemanagement zu einem jahreszeitlich veränderten *O. ostertagi* Larvenvorkommen auf der Weide und damit zu einem anderen *O. ostertagi* Infektionsdruck für die Rinder führen (Verschave et al. 2014). Weil das *O. ostertagi* Vorkommen stark von den Umweltbedingungen abhängig ist, kann davon ausgegangen werden, dass der Klimawandel die *O. ostertagi* Kontrolle in Zukunft erschweren wird (Morgan et al. 2013). Verschave et al. (2014) geht von einer durchschnittlichen Präpatenz von 21 Tagen aus und nimmt an, dass Kälber im Schnitt zu Anfang der Weidesaison 263 und zum Ende der Saison 4365 L3 aufnehmen. Die Sterblichkeit der adulten *O. ostertagi* ist positiv mit der Infektionsdosis korreliert, d. h. je mehr *O. ostertagi* den Wirt befallen desto eher sterben die Adulten auch wieder ab ($p < 0.001$). Auch die Infektionsdauer wirkt sich negativ auf die Lebenszeit der Adulten aus, korreliert also positiv mit deren Sterblichkeitsrate ($p = 0.019$). Die Weibchen legen pro Tag ca. 284 Eier (Verschave et al. 2014). Dies ist im Vergleich mit *Haemonchus contortus*, dessen Weibchen 10 000 Eier pro Tag produzieren (van Wyk 2001), sehr wenig. Zur Gattung *Ostertagia*, deren Männchen zwischen 6 – 8 mm lang werden und deren Weibchen mit 8 – 12mm etwas größer sind, gehören auch noch *Ostertagia (Teladorsagia) circumcincta*, *Ostertagia lyrata*, *Ostertagia trifurcata*, *Ostertagia marshalli* und *Ostertagia leptospicularis*. Die letztgenannte Spezies ist pathogener als *O. ostertagi*.

Die Gattung *Cooperia* kommt weltweit vor und befällt den Dünndarm von Rindern, Schafen, Ziegen und Wildwiederkäuern (Boch et al. 2006). In Europa ist *C. oncophora* einer der häufigsten MDS beim Rind (Nogareda et al. 2006; Persson 1974). Auch weltweit kommt *C. oncophora* in den gemäßigten Klimazonen sehr häufig vor (Kanobana et al. 2004).

C. oncophora hat von allen *Cooperia* –Spezies mit 17 – 22 Tagen die längste Präpatenz und ist mit 5 – 8 mm Körperlänge bei den Männchen und 6 – 11 mm bei den Weibchen auch die größte Spezies. Auf anderen Kontinenten wie Nordamerika und Afrika findet sich dagegen eher *Cooperia punctata*. Es wird vermutet, dass *Cooperia* spp. etwas höhere Temperaturen als *Ostertagia* spp. brauchen, um sich zu entwickeln (Nogareda et al. 2006). Daneben gibt es noch *Cooperia pectinata* und *Cooperia curticei*.

3.2 Entwicklungszyklus der Trichostrongyliden

Trichostrongyliden haben einen homoxenen, also einwirtigen Lebenszyklus. Die Zygote fängt schon im Uterus an sich zu teilen. Wird sie dann mit dem Kot des Wirtstieres ausgeschieden, finden sich bei der Kotuntersuchung schon 8 bis 16 Blastomere innerhalb des Eies. In Abbildung 1 sind drei unterschiedliche Entwicklungsstadien eines MDS-Eies zu erkennen. Die Blastomere werden mit jeder Teilung kleiner, bis bereits eine L1 erahnt werden kann. MDS-Eier sind, abgesehen von den *Nematodirus* spp., mikroskopisch nicht voneinander zu unterscheiden, da sie alle ca. 40 x 80 µm groß sind und < 8 Blastomere besitzen. Im Gegensatz dazu sind *Nematodirus* spp. Eier bis zu 120 x 230 µm groß und beinhalten nur 4–8 Blastomere.



Abbildung 1 unterschiedliche Entwicklungsstadien von MDS-Eiern, 400fache Vergrößerung

Foto: Katharina Seidl Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der FU Berlin

Im Kot schlüpft dann aus dem Ei das erste Larvenstadium (L1), welches ungefähr 300 µm lang ist und sich von Bakterien im Faeces ernährt. Die L1 entwickelt sich nach einer Häutung zum zweiten Larvenstadium (L2). Die L2 verbleibt ebenfalls im Kot, um sich dort zu ernähren, zu wachsen und Energiereserven anzulegen. Danach findet eine unvollständige dritte Häutung statt, bei der die ehemalige Kutikula der L2 nicht abgestreift wird, sondern als zusätzliche Scheide um das dritte Larvenstadium (L3) erhalten bleibt. Die zusätzliche Scheide der L3 führt auf der inneren Beugeseite zu einer „bauchfaltenähnlichen Riffelung“. Diese ist ein wichtiges Hilfsmittel, um L3 unter dem Mikroskop von den etwa gleichgroßen Bodennematoden

Nematoden

unterscheiden zu können (siehe Abbildung 2). Bei MDS beträgt die optimale Temperatur zur Entwicklung zwischen 20 und 25 °C. Dieses Wissen wird am Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der Freien Universität Berlin bei der künstlichen Larvenzucht in Klimakammern genutzt, um bei 25 °C und 80 % Luftfeuchtigkeit die fertig entwickelten L3 nach nur einer Woche gewinnen zu können. Bei kühleren Temperaturen, wie sie im Frühjahr, Herbst oder kühlen Sommertagen auftreten, kann sich die Entwicklung bis zur L3 auf zwei bis drei Monate verzögern (Boch et al. 2006). Bei passenden Umweltbedingungen, also genügend Feuchtigkeit, wandern L2 und L3 aktiv aus dem Kot aus (Boch et al. 2006). Auch dieses Verhalten wird bei der Larvenzucht genutzt, um L3 vom Faeces zu isolieren. Weil die aus den Eiern geschlüpften Larven den Kot nur verlassen können, wenn genügend Feuchtigkeit vorhanden ist (Persson 1974), kann es passieren, dass die L3 bei Trockenheit noch Wochen oder sogar Monate nach ihrer Entwicklung im Kuhfladen bleiben. Die äußeren Schichten des Kuhfladens trocknen aus, die dadurch entstehende Kruste schützt das Innere des Kuhfladens und somit auch die L3 vor weiterer Austrocknung. Wird der oberflächlich ausgetrocknete Fladen durch genügend Niederschlag aufgeweicht, wandern die L3 massenhaft vom Kot auf die Weide. Dass ein besonders starker Anstieg im Larvenaufkommen die Konsequenz von Regenfällen ist, konnte auch in einem vierjährigen Feldversuch in Argentinien anhand von L3, die hauptsächlich aus *Cooperia*, *Ostertagia* und *Trichostrongylus* spp. bestanden, festgestellt werden (Fiel et al. 2012). Ein solches Massenaufkommen erzeugt natürlich auch schneller kritische Befallsstärken bei den Wirtstieren. Deshalb wird allgemein davor gewarnt, Tiere nach Regenfall, der einer längeren Trockenzeit folgt, grasen zu lassen. Wenn es um den *Haemonchus*-Befall von Schafen in Australien geht, wird auch dazu geraten, während längerer Trockenzeiten nicht, und erst vor Zeiten, für die mehr Regen angesagt ist, zu behandeln (O'Connor et al. 2008).

Nematoden



Abbildung 2 infektiöses drittes Larvenstadium (L3), ca. 500 fache Vergrößerung

Bei der Untersuchung von Gras- und Bodenproben finden sich auch viele Bodennematoden in den Proben. Diese sind deutlich von den L3 zu unterscheiden, da sie keine zusätzliche Scheide und auch keine wie bei den L3 regelmäßig angeordneten Darmzellen haben, insgesamt plumpere Bewegungen zeigen und auch einen langsamer pulsierenden dreiteiligen rhabditiformen Ösophagus besitzen. Zusätzlich können durch unterschiedliche Scheiden- und Schwanzlängen verschiedene MDS-Spezies erkannt werden (van Wyk et al. 2013). Wird die L3 vom Wirt mit dem Futter aufgenommen, dann schlüpft sie, nachdem sie den artspezifischen chemischen Reizen im Verdauungstrakt des Wirtes ausgesetzt war, aus ihrer Scheide und nistet sich in der Mukosa des Wirtes ein. Manche Arten entwickeln sich in den Drüsen der Magenschleimhaut von der L3 zur L4 und dann zum präadulten Stadium und andere in den Krypten von Darmzellen. Das präadulte Stadium begibt sich auf die Mukosa und wird hier zum adulten Männchen oder Weibchen. Zwei bis vier Wochen nach einer Infektion können die ersten Eier im Kot nachgewiesen werden (Boch et al. 2006).

MDS sind auch zur Hypobiose, einem Zustand, in dem sie ihre Entwicklung für längere Zeit unterbrechen können, fähig. Bei *O. ostertagi* findet eine Hypobiose der L4 häufiger dann statt, wenn das Wirtstier auch mit anderen, also mit *Ostertagia* spp. in Konkurrenz stehenden, MDS befallen ist. Dies könnte auf einer Art Kreuzimmunität des Wirtes beruhen (Verschave et al. 2014). *Ostertagia* spp. scheinen aber auch in der Lage zu sein zu „spüren“, wann die Umweltbedingungen, z.B. vom Winter bis zum Frühjahr, eine Hypobiose sinnvoll machen (Eysker 1997). So wird das Überleben der Spezies gesichert. Wie die Nematoden in der Lage sind, die Wetterverhältnisse außerhalb ihres Wirtes (in dessen Darm es immer gleich warm

Nematoden

ist) zu erkennen, ist hingegen noch unerforscht. Sollte der Mechanismus hierfür entschlüsselt werden, könnte das immense Effekte für die Rinderwirtschaft haben. *Ostertagien*, die Ende des Winters oder im Frühjahr massenhaft die Hypobiose beenden, können für den Wirt extrem gefährlich sein. Dieses Phänomen wird auch Winterostertagiose genannt (Boch et al. 2006). Ein Verhindern der Hypobiose könnte daher neben dem Verhindern der Winterostertagiosegefahr auch dazu führen, dass im Winter mehr Eier von adulten *Ostertagien* ausgeschieden werden. Diese könnten wegen den schlechten Entwicklungsbedingungen im Stall oder auf der verschneiten Weide weniger zum Infektionsdruck im Frühjahr beitragen.

Die L3 von *C. oncophora* ist zwischen 790 und 980 µm lang und beinhaltet 16 Darmzellen. *O. ostertagi* hat ebenfalls 16 Darmzellen und eine ähnliche Körperlänge (siehe Abbildung 3; (van Wyk et al. 2013). Ein zusätzliches Erkennungsmerkmal für die *Cooperia* spp. sind zwei lichtbrechende Strukturen im „Kopfbereich“ der L3, durch die sie sich von L3 anderer MDS unterscheiden (Siehe Abbildung 4). L3 kann man anhand ihres Verhältnisses von Körperlänge zu Scheide bzw. Filament (van Wyk et al. 2013) unterscheiden (Abbildung 4: Der X-Wert bezieht sich auf die Schwanzlänge im Vergleich zu *Trichostrongylus colubriformis* oder *Trichostrongylus axei*, wobei deren Schwanzlänge als „X“ angenommen wird. *Cooperia* spp., deren Schwanzlänge doppelt so lang wie die von *Trichostrongylus* ist, werden somit mit 2,0*X für ihre Schwanzlänge beschrieben). Die heutzutage sicherste Bestimmung unterschiedlicher MDS ist mittels speziesspezifischer PCR, wie sie für *C. oncophora*, *O. ostertagi*, *H. contortus* und *T. colubriformis* im Weideversuch angewendet wurden (Knapp-Lawitzke et al. 2015).

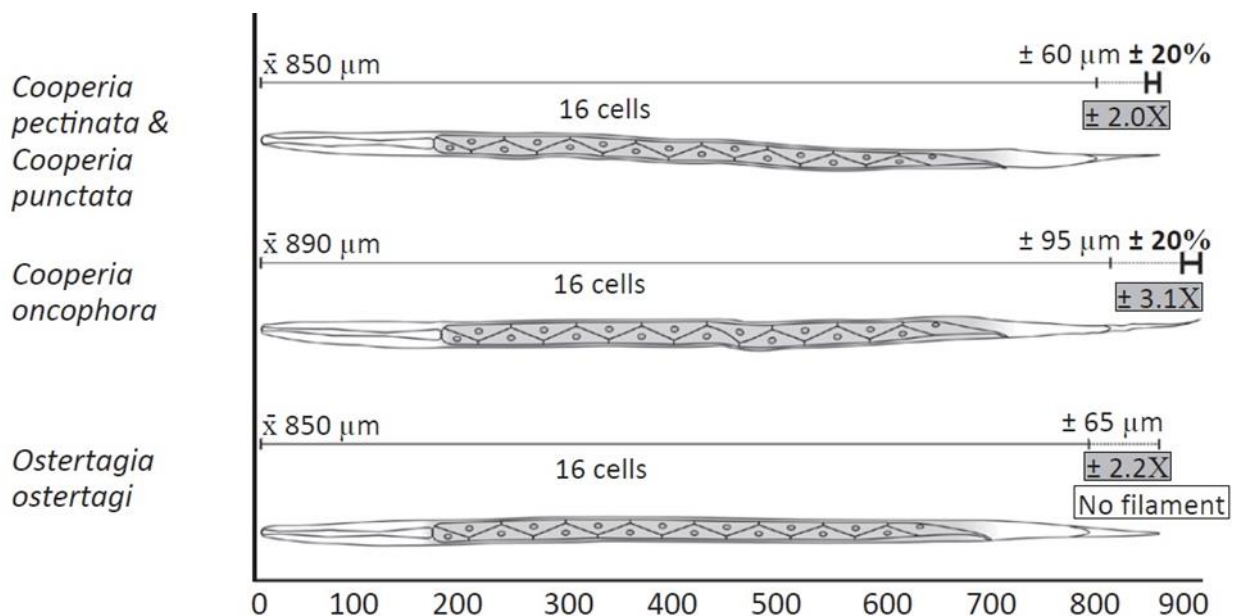


Abbildung 3 L3 von MDS des Rindes mit Längenmessung in Mikrometern

Quelle: The Onderstepoort journal of veterinary research (van Wyk et al. 2013)

Nematoden

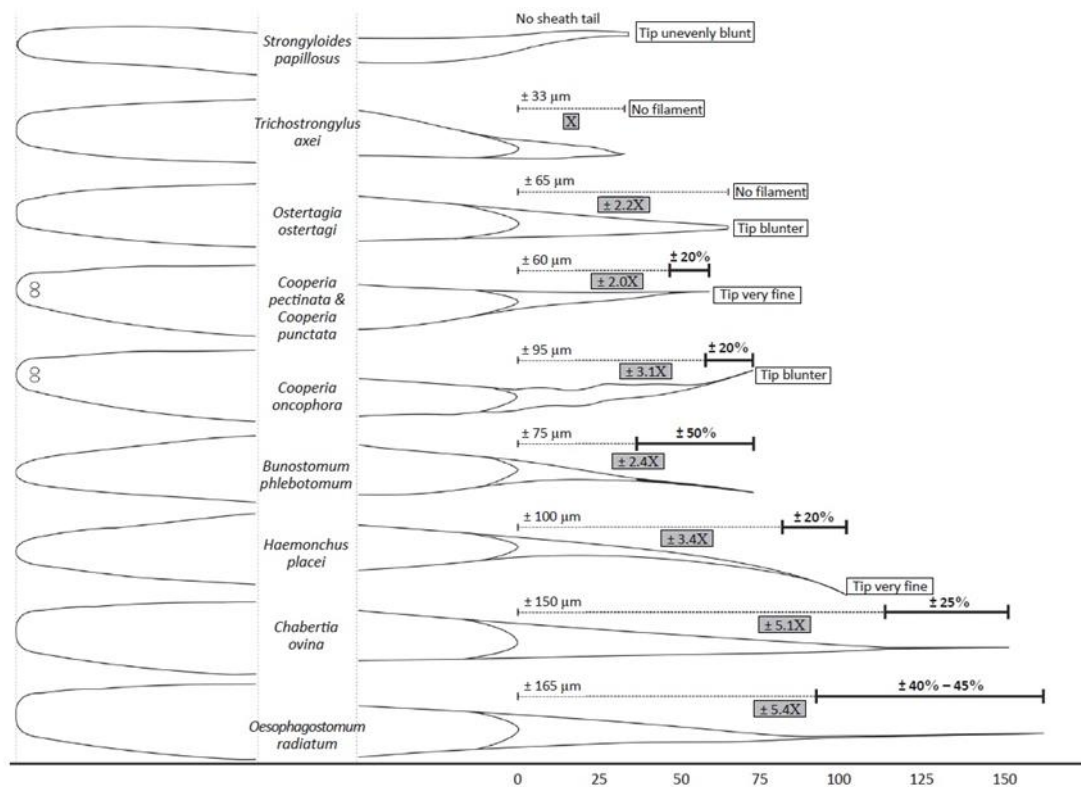


Abbildung 4 Besonderheiten von Kopf- und Schwanzbereich der L3 von MDS des Rindes, in Mikrometern gemessen

Quelle: The Onderstepoort journal of veterinary research (van Wyk et al. 2013)

Wird die L3 der *Cooperia* spp. vom Wirt aufgenommen, so schlüpft sie erst aus ihrer schützenden Scheide (Ecdysis), wenn sie mit chemischen Schlüsselreizen des Pansens in Kontakt kommt (pH-Wert von 6,5 – 6,9; spezieller CO₂ – Gehalt der Gasphase, H₂CO₃/HCO₃ – Puffersystem). Dies ist selten für eine Trichostrongylidenart, die in den Schleimhautkrypten des Dünndarmes parasitiert. Der Großteil reagiert auf die chemischen Reize im Labmagen (saurer pH, Pepsin und CO₂ (Deplazes et al. 2012)). Bei stärkerem *Cooperia* Befall kann es zu einer Verdickung der Dünndarmmukosa kommen. Dadurch wird die Nahrungsverwertung des Wirtes herabgesetzt. Zusätzlich können durch die Entzündungsprozesse bedingt vergrößerte Lymphknoten und verringerter Appetit nachgewiesen werden. Dies wirkt sich zusätzlich negativ auf die Nahrungsaufnahme aus (Boch et al. 2006). Die L3 von *O.ostertagi* schlüpfen ebenfalls im Pansen aus ihrer Scheide, bevor sie sich dann in den Drüsen des Labmagens weiterentwickeln. Durch die Entwicklung des Parasiten reduzieren sich die Belegzellen, welche Salzsäure produzieren, und der pH-Wert wird hierdurch erhöht. Dies verändert die Bakterienzusammensetzung und stört dadurch die Eiweißverdauung. Außerdem werden durch den Parasitenbefall die Zellverbände im Labmagen gelockert, wodurch Plasmaproteine verloren gehen (Boch et al. 2006).

3.3 Einfluss von Trichostrongyliden auf die Rinderhaltung

Weideparasiten kommen weltweit vor und führen daher bei jedem Rinderhalter, der seine Tiere grasen lässt, zur Infektion der Weidetiere und damit verbundenen Produktionseinbußen. Die Tiere fressen wegen der Entzündung des Magendarmtraktes weniger und verwerten zusätzlich das Futter schlechter. Dadurch geben befallene Kühe weniger Milch (Kloosterman et al. 1984; Sanchez et al. 2004) und Kälber nehmen schlechter an Gewicht zu (Charlier et al. 2010; Stromberg et al. 2012). Laut Armour et al. (1987) sind die Krankheiten, die durch Trichostrongyliden bei den Rindern ausgelöst werden, für deren Gesundheit und Produktivität am schwerwiegendsten. *O. ostertagi* ist die häufigste Ursache für klinische und subklinische Gastroenteritis bei nordeuropäischen Kälbern. Die klinische Form tritt meistens während der ersten Weideperiode ab August auf (Henriksen et al. 1976). Bei einer geringen Befallsstärke kann das Tier unbehandelt bleiben, während eine hohe Parasitenbelastung zu einer parasitenbedingten Zerstörung der Mukosa und Entzündungen des Magendarmtraktes (Parasitäre Gastroenteritis, PGE) führt. Das Tier hat somit Schmerzen ohne vernünftigen Grund, was laut §1 des Tierschutzgesetzes einen Verstoß darstellt und unterbunden werden muss. Des Weiteren können schlimme Verläufe, wie sie z.B. bei der Sommer- oder Winterostertagiose bei Kälbern oder trächtigen immunsupprimierten Kühen auftreten, sogar bis zum Tod führen (Deplazes et al. 2012; Gasser et al. 2000; Knox et al. 2012).

Die Pathogenität von *C. oncophora* wird geringer als die von *O. ostertagi* eingeschätzt. Allerdings zeigt eine groß angelegte Studie, dass auch eine Einzelinfektion mit *Cooperia punctata* zu signifikanter Leistungsminderung führt, da bei *C. oncophora* Befall das Körpergewicht im Schnitt pro Tag nur um 1,36 kg statt 1,47 kg zunahm (Stromberg et al. 2012). Aber auch Milchkuhe, die subklinisch befallen waren, konnten ihre Milchleistung um 0,35 kg pro Kuh und Tag steigern, nachdem sie gegen MDS behandelt wurden (Sanchez et al. 2004). Auch Takagi et al. (1986) untersuchten spezifisch die Wirkung auf subklinisch infizierte Milchkuhe. Sie stellten sowohl einen Anstieg der Milchleistung als auch einen geringeren Befall mit gastrointestinalen Parasiten bei Kälbern, die mit entwurmtten Mutterkühen auf der Weide standen, fest. Dies erklärt, warum die Verwendung von Anthelminthika von Rinderhaltern gern prophylaktisch bzw. metaphylaktisch verwendet wird, denn dadurch lassen sich auch geringe Leistungseinbußen vermeiden und somit eine Gewinnmaximierung erzielen. Allerdings könnten die Tierhalter durch ein besseres Management auch auf eine metaphylaktische Behandlung verzichten, um Leistungseinbußen auszugleichen. Werden Anthelminthika aber ständig verwendet, steigt auch die Bereitschaft der Parasiten zur Resistenzbildung, wie im Kapitel 3.7 „Anthelminthika-Resistenz“ (Seite 29) beschrieben.

Nematoden

3.4 Parasitosen sind Faktorenerkrankungen

Die durch MDS ausgelösten Parasitosen werden als Faktorenerkrankungen bezeichnet, d.h. es müssen noch weitere, die Krankheit fördernde Begleitumstände vorhanden sein, um klinische Ausmaße entstehen zu lassen. Entsprechende Faktoren sind, neben einem hohen Befallsgrad von *O. ostertagi* und *C. oncophora*, immunschwächende Einflüsse, wie weitere Erkrankungen, Mangelernährung, schlechte Haltungsbedingungen, Trächtigkeit und Laktation oder ein noch unausgereiftes Immunsystem, wie bei naiven Kälbern.

3.4.1 Immunstatus

Obwohl die Immunität gegen MDS nicht vollständig protektiv ist, ist es sehr wichtig, dass sich junge Kälber in ihrer ersten Weidesaison mit Parasiten infizieren können, um zumindest eine partielle Immunität gegen diese aufzubauen, denn dadurch werden größere Produktionseinbußen in den folgenden Jahren verhindert (Ploeger et al. 1995). Dieser Schutz gegen zu hohe Infektionen mit MDS-Parasiten kann über mehrere Jahre anhalten, wenn regelmäßig ein Kontakt zu den Parasiten besteht. Der Vorteil an der Infektion junger Kälber ist, dass diese in ihrem ersten Jahr noch nicht so viel an Körpermasse aufbauen müssen bzw. noch zu jung sind, um Milch zu geben. In der zweiten Weidesaison können sie jedoch mehr Leistung bringen, da sie dann vor schweren Wurmbürden geschützt sind. Ein gutes Management, welches nicht von reiner Stallhaltung ausgeht, sollte also Kälbern Weidezugang ermöglichen. Gerade bei Biohaltung, deren Nachfrage wahrscheinlich steigen wird (Gauly et al. 2013) und die eine Weidehaltung vorsieht, ist es wichtig, dass die Kälber Kontakt mit MDS haben. Ob Rinder durch die erworbene Immunität gegen MDS ausreichend geschützt sind, hängt auch vom Klimawandel ab. Denn wie bereits in Kapitel 2.3 „Effekte des Klimawandels auf die Rinderhaltung in Deutschland“ (Seite 4) erwähnt, nehmen Rinder unter Hitzestress weniger Nahrung zu sich und der daraus resultierende Energiemangel beeinflusst auch ihr Immunsystem. Ebenso wird davon ausgegangen, dass der Körper während starker Wachstumsphasen sowie Laktation oder in einem späten Trächtigkeitsstadium weniger Energie in das Immunsystem investiert und die Tiere dann anfälliger für Parasiten sind (Coop et al. 1999).

Dass Immunität gegen MDS erworben werden kann, konnte in mehreren Studien gezeigt werden: *C. oncophora* Weibchen scheiden anfangs zwar mehr Eier aus als *O. ostertagi*, danach nimmt deren Eiausscheidung aber schnell ab (Kloosterman et al. 1984). Dies könnte laut Kloosterman et al. (1984) entweder daran liegen, dass *C. oncophora* eine höhere Immunogenität hat, also eher eine Immunantwort vom Wirt auslöst, oder aber schneller durch diese Immunantwort abgestoßen wird. Während seiner Versuche fiel auf, dass eine frühere

Nematoden

Cooperia Infektion dazu führte, dass nachfolgende *Cooperia* Adulte eine kürzere Körperlänge aufwiesen und insgesamt weniger Adulte gezählt wurden.

Interessanterweise glich sich die Gesamteizahl ausgeschiedener Eier wieder aus, da die Ovarien der *Cooperia* Weibchen in Kälbern mit geringer Wurmbürde mit mehr Eiern gefüllt waren (Kloosterman et al. 1984). Die Ergebnisse von (Kloosterman et al. 1984) zeigen, dass eine vorhergehende *Cooperia* Infektion schon sechs Wochen nach der Erstinfektion zu einer partiellen Immunität führen kann. Damit würde eine sehr hohe Wurmbürde, die klinische Symptome hervorrufen würde, verhindert werden. Trotzdem kann sich ein gewisser Anteil der *C. oncophora* noch im Wirt entwickeln und fortpflanzen. Ist die vorherige Infektion eine Mischinfektion mit *O. ostertagi*, entwickeln sich sogar noch weniger *C. oncophora* zu Adulten, und selbst eine reine *O. ostertagi* Infektion verhindert als Erstinfektion eine optimale Entwicklung von *C. oncophora* (Kloosterman et al. 1984). Neuere Experimente zeigen, dass die partielle Immunität auch noch nach zweieinhalb Monaten vorhanden ist (Kanobana et al. 2004). Dies ist wichtig, da die Tiere in landwirtschaftlichen Betrieben meist beim Aufstallen entwurmt werden und somit den ganzen Winter im Stall ohne Kontakt zu Weideparasiten bleiben. Dieses Experiment verdeutlicht auch, dass sich ein Unterschied in der Erstinfektionsdosis (30 000 vs. 100 000 *C. oncophora* L3) nicht auf die Wurmbürde auswirkt, und sich aber in einem verminderten Wachstum und Fruchtbarkeit der Parasiten zeigt. Eine Einteilung der Rinder in Tiere mit einer normalen oder verringerten Immunantwort zeigt, dass sich bei Tieren mit normaler Immunantwort viel mehr inhierte L4 finden lassen als bei Tieren mit verringerter Immunantwort oder Tieren in ihrer Erstinfektion. Claerebout et al. (2000) stellten in ihrem Review fest, dass eine Erhöhung der Anzahl parasitenspezifischer Immunglobulin A-Antikörper in der Mukosa des Labmagens signifikant mit geringeren Eizahlen im Kot und weniger Eiern pro weiblichem Wurm korreliert war. Sie vermuten, dass dies auch mit einer verminderten Fruchtbarkeit der Würmer zusammenhängt. Dass die Immunantwort des Wirtes die Länge der adulten *Ostertagia* spp. negativ beeinflusst, wird auch durch das Experiment von Kloosterman et al. (1984) bestätigt, bei dem durch eine vorhergehende Infektion mit *Ostertagia* spp. oder *Cooperia* spp. die Länge der Adulten *Ostertagia* spp. negativ beeinflusst wurde. Dies hängt sehr wahrscheinlich mit der Immunantwort zusammen, da auch hier auffiel, dass bei einer reinen *Ostertagia* spp. Infektion die Eizahl im Ovar der Weibchen durch eine vorhergehende Infektion mit *Ostertagia* spp. oder *Cooperia* spp. verringert wurde. Die Vulva-Klappen sind bei Weibchen einer Erstinfektion größer als bei nachfolgenden Infektionen (Kloosterman et al. 1984). Da die *Ostertagia* spp. aber nicht so schnell wie *Cooperia* spp. durch eine Immunantwort des Wirtes eliminiert werden können, sondern erst nach einer längeren Zeit im Wirt reduziert werden, bekräftigt sich der Verdacht von Claerebout et al. (2000), dass *O. ostertagi* in der Lage sind, die Immunantwort des Wirtes zu unterdrücken. Nach nur einer fünf Wochen andauernden Zweitinfektion wurde die Anzahl der adulten

Nematoden

Ostertagia spp. durch bspw. eine vorhergehende Infektion noch nicht beeinflusst (Kloosterman et al. 1984). Auch Dorny et al. (1997) stellten fest, dass durch eine frühere Infektion mit *Ostertagia* spp. Wachstum und Fruchtbarkeit der Adulten negativ beeinflusst wurden. Allerdings konnte selbst bei einer Dosis von 420 000 L3 von über fünf Monaten die Etablierungsrate, also der Prozentsatz der L3, die sich erfolgreich zu Adulten *O. ostertagi* entwickeln, nicht beeinträchtigt werden. Dies war bei der Studie von (Ploeger et al. 1995) ähnlich. Auch hier waren die Rinder gegen eine zweite und bleibende *Cooperia* spp. - Infektion mit 100 000 L3, aber nicht gegen eine Infektion mit 40 000 *Ostertagia* spp. geschützt. Die zweite und künstliche Infektion fand nur eine Woche nach einer Behandlung der ersten Infektion mit Oxfendazol statt. Allerdings konnte auch eine wahrscheinlich immunitätsbedingte, signifikant negative Korrelation zwischen der Stärke der Erstinfektion und Wurmbürde der Zweitinfektion festgestellt werden. Dass ein immunsystembedingter Effekt auch bei *Ostertagia* spp. vorhanden sein muss, zeigt sich auch bei Dorny et al. (1997) in dem Umstand, dass durch eine vorhergehende Infektion mit *Ostertagia* spp. der Anteil von L4, im Gegensatz zu Gruppen ohne frühere *Ostertagia* spp. Infektion, erhöht wurde. Dies zeigt, dass es auch bei *Ostertagia* spp. sinnvoll ist, wenn sich junge Kälber natürlich mit dem Parasiten infizieren. So sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass sie während ihrer zweiten Weideperiode an Ostertagiose erkranken oder ihre Produktivität stark unter dem Parasiten leidet.

Das Review von Verschave et al. (2014) belegt mittels 27 Studien aus den Jahren 1962 – 2007, dass die *Ostertagia* spp. Etablierungsrate adulter Parasiten abnimmt und in jüngeren Tieren sogar geringer ist, wenn die Infektionsdosis steigt. Dadurch wird die Abhängigkeit der Etablierungsrate, also die Chance, dass die L3 das adulte Stadium erreichen, von der Dichte der angesiedelten Parasiten deutlich. Auch die Sterblichkeit der adulten *Ostertagia* spp. ist wahrscheinlich von der Besiedlungsdichte der Parasiten im Labmagen abhängig. Verschave betont auch den Effekt von maternalen Antikörpern, die dafür verantwortlich sein könnten, dass sich bei sehr jungen Kälbern sehr wenig *Ostertagia* spp. zu Adulten entwickeln, während bei 100 Tage alten Kälbern die Etablierungsrate am größten ist und bei älteren Tieren dann wieder abnimmt. Natürlich könnte die geringe Angangsrate bei sehr jungen Kälbern auch daran liegen, dass deren Verdauungstrakt noch auf Milch als wichtigste Nahrungsquelle eingestellt und dadurch der pH-Wert im Pansen zu hoch für eine optimal ablaufende Ecdysis der *Ostertagia* spp. ist. Ein wichtiger Labmagenparasit beim Schaf ist *Haemonchus*. Von diesem wird berichtet, dass Schafe, die bereits eine Immunität gegen *Haemonchus* aufweisen, schon entscheidete L3 davon abhalten können, überhaupt erst in die Labmagenmukosa einzudringen und somit ihre weitere Entwicklung zu verhindern (Smith 1994).

3.4.2 Weidemanagement

Die Befallsstärke von Kälbern mit MDS hängt maßgeblich mit dem Infektionsdruck auf der Weide, also der Anzahl der L3 auf dem Gras, zusammen. Darum ist es sehr wichtig zu wissen, ab wann „dangerous pasture infectivity levels“, also eine Anzahl von L3, die für die Gesundheit der Tiere gefährlich werden kann, erreicht wird oder ab wann die Weiden wieder so gering kontaminiert sind, dass es für die Tiere sicher ist dort zu grasen (Eysker et al. 2005). Da die Entwicklung und Überlebenszeit der freilebenden Stadien der Weideparasiten stark von den Wetterbedingungen abhängig sind, ist bei mit Parasiten kontaminierten Weiden darauf zu achten, dass gefährdete Tiere nicht an Tagen mit extrem hohem L3 Aufkommen auf die Weide gelassen werden. Dies kann bspw. an regnerischen Tagen nach einer längeren Trockenzeit der Fall sein, da bereits entwickelte L3 in niederschlagsfreien Zeiten länger im Faeces verweilen und beim ersten Regen dann auf das Gras auswandern (Rose et al. 2015). Der Grund hierfür ist die getrocknete Kruste des Fladens, welche einerseits die Auswanderung verhindert, aber andererseits das Innere des Faeces und somit auch die L3 über längere Zeit vor Austrocknung schützen kann (Rose 1961). Gleichzeitig ist es möglich, dass die L3 aktiv den Schutz im feuchten Kot oder Boden wählt, um dem Trockenstress zu entgehen. Zu diesen Ergebnissen kamen auch die in dieser Dissertation durchgeführten Experimente im Gewächshaus und in der Klimakammer (Knapp-Lawitzke et al. 2014; Knapp-Lawitzke et al. 2016). Auch in Feldversuchen konnte gezeigt werden, dass das L3 Vorkommen von trockenen oder regnerischen Sommern beeinflusst wird (Eysker et al. 2005; Fiel et al. 2012; Henriksen et al. 1976). Im vorliegenden Weideversuch fiel bei der Weidebeprobung ebenfalls auf, dass das L3 Vorkommen abhängig von den Wetterbedingungen des jeweiligen Probenortes war. An Tagen, an denen Niederschlag fiel oder der Himmel bedeckt war, fanden sich mehr L3 auf dem Gras als an Tagen mit starker Sonneneinstrahlung (Knapp-Lawitzke et al. 2015). Die biologische Begründung hierfür liegt unter anderem in der Physiologie der L3: Zwar schützt die sie umgebende Scheide besser vor Umwelteinflüssen, denn L1 und L2 sind empfindlicher (O'Connor et al. 2006; Pandey 1972), aber die Scheide verhindert auch die Fähigkeit der L3 zur Nahrungsaufnahme. Weil die L3 somit von ihren in den Darmzellen angelegten Energiereserven zehren muss, ist sie darauf angewiesen, möglichst schnell vom Wirtstier aufgenommen zu werden. Um die Chance dafür zu erhöhen, eignet sich ein exponierter Platz auf dem Weidebewuchs. Andererseits ist für die Regeneration der durch Hitze, Trockenheit und UV-Strahlung entstehenden Schäden ebenfalls Energie nötig (van Dijk et al. 2009). Dadurch scheint es für die L3 sinnvoll zu sein, zwischen exponierten Plätzen, wie bspw. im oberen Bereich eines Grashalmes, auf denen sie aber stark der Austrocknung und Sonneneinstrahlung ausgesetzt ist, sowie Stellen, die sie möglichst gut vor schädlichen Umwelteinflüssen schützen, hin- und herzuwandern. Am einfachsten erfolgt dies im Wasser,

Nematoden

weil sich die L3 genau wie die ersten beiden Larvenstadien durch Schlängeln fortbewegt. Aber die Ergebnisse aus dem Gewächshausversuch und dem Klimakammerversuch zeigen, dass sie auch in der Lage sein muss ohne Wasserfilm zu wandern (Knapp-Lawitzke et al. 2014; Knapp-Lawitzke et al. 2016). Die L3 ist nicht nur in der Lage zwischen unterschiedlichen Grashöhen zu wechseln (Santos et al. 2012), sondern kann auch in den Boden abwandern. Fällt Niederschlag, können die L3 wieder vom Boden oder unterem Bereich des Weidebewuchses nach oben wandern.

Das L3 Vorkommen wird auch stark vom Zeitpunkt, an dem die Tiere auf die Weide gestellt werden, beeinflusst. Bei der weltweiten Kälberaufzucht gilt, dass deren Weiden in kühl temperierten Klimazonen (Europa, Kanada, Nordamerika) über das Jahr ansteigend immer stärker mit L3 kontaminiert werden und so der größte Infektionsdruck am Ende des Sommers herrscht. In Australien ist die L3-Dichte im Winter am höchsten. In Brasilien und Uruguay finden sich hingegen im Frühjahr am meisten L3 (Williams et al. 1993). Dieser typische Verlauf des L3 Vorkommens während der Weideperiode ist meist dadurch zu erklären, dass ältere Rinder, die noch über den Winter mit Trichostrongyliden infiziert waren, diese im Frühjahr in geringem Maße ausscheiden. Mit denen sich aus den wenigen Eiern entwickelnden L3 infizieren sich dann naive Kälber. Da sich die L3 in den Kälber aufgrund ihrer fehlenden Immunität gut vermehren können, scheiden diese Kälber dann viele MDS-Eier aus und führen so zu einer starken Weidekontamination mit L3. Es ist aber auch möglich, dass L3 vom Vorjahr auf der Weide überwintern (Henriksen et al. 1976; Pandey 1972). Dies soll sogar bis zu einer Höhenlage von 2400 m möglich sein. Bei einem idealen Weidemanagement müssten die Tiere alle zwei Wochen auf eine neue Weide umgestellt werden, die davor möglichst lange brach lag, weil sich durch die ungefähre Präpatenz von 21 Tagen dann fast keine Reinfektion mit MDS-Eiern ergeben kann. Dies dürfte allerdings in den wenigsten Betrieben möglich sein. Bei der Beprobung von Kälbern und den zugehörigen Weiden im Rahmen des KLIFF-Projektes war auch deutlich zu erkennen, dass auf Weiden, die einen hohen Tierbesatz hatten, deutlich mehr Parasiten in den Grasproben gefunden wurden, und auch die MDS- Eizahl pro Gramm im Kot (EpG) der beprobten Tiere höher als das EpG von Kälbern war, die auf größeren Weiden standen. Dies kann mit dem Aspekt erklärt werden, dass Weiden, auf denen viele Tiere grasen, so „abgefressen“ sind, dass die Kälber gezwungen sind, untypischerweise auch in der Nähe von Kuhfladen Gras aufzunehmen (Fernandez et al. 2001). Es konnte gezeigt werden, dass sich sehr viel höhere L3 Zahlen im Abstand von bis zu 20 cm zum Faeces nachweisen lassen (Henriksen et al. 1976), deshalb verhalten sich Tiere die diesen Bereich meiden sozusagen „klug“. Die Weide kann auch durch andere Wiederkäuer oder Gülle kontaminiert werden (Deplazes et al. 2012). Düngung der Weide mit Gülle kann die Parasitendichte erhöhen, weil es für MDS-Eier möglich ist darin zu überleben (Moore 1978). Es wird allerdings behauptet, dass eine Düngung der Weide mit Calciumcyanamid oder

Nematoden

Kalkstickstoff den Infektionsdruck auf der Weide vermindert, da die Chemikalie eine abtötende Wirkung auf Unkraut und Weideparasiten haben soll (AlzChemAG 2015). Allerdings konnten auch bei intensiver Literaturrecherche nur deutsche Berichte (Brozeit et al. 1976; Podstatzky 2012) und keine international publizierten Studien zu diesem Thema gefunden werden, die diese Wirkung belegen.

3.5 Umweltbedingungen die das Weidemanagement beeinflussen

3.5.1 Temperaturanstieg

Die höheren Temperaturen und längeren Trockenstressperioden beeinflussen neben der Konstitution des Wirtstieres auch die L3 der in Deutschland häufig vorkommenden Weideparasiten wie z.B. den MDS *C. oncophora* und *O. ostertagi*. Diese sind einen Großteil ihres Entwicklungszykluses, vom Ei über das erste und zweite bis hin zum dritten Larvenstadium außerhalb ihres Wirtes auf der Weide und hier den Umweltbedingungen ausgesetzt. Da jede Parasitenspezies unterschiedlich auf Umweltbedingungen reagiert, ist es wichtig herauszufinden, ab und bis zu welcher Temperaturschwelle die Entwicklung bei den einzelnen Spezies stattfinden kann. Hieraus können Vorhersagen bezüglich des Einflusses des Klimawandels auf Weideparasiten gewonnen werden (Hoar et al. 2012). Es ist bereits bekannt, dass höhere Temperaturen die Lebensdauer von L3 verkürzen (Boag et al. 1985; Grenfell et al. 1986; Todd et al. 1976). Studien über Pflanzenparasiten belegen, dass *Meloidogyne incognita*, welcher zur Familie der Strongylida gehört, die Fähigkeit zur Thermotaxis besitzt (Dusenbery 1989). Somit könnten auch kleine Temperaturunterschiede einen Einfluss auf andere Strongylidenarten wie die Magendarmparasiten des Rindes haben, in dem sie ihr Wanderverhalten im Boden oder zwischen Boden und Gras temperaturabhängig verändern.

Im Labor wurden schon viele Experimente durchgeführt, um Temperaturgrenzen festsetzen zu können ab denen Trichostrongylidenarten schnell absterben. Sehr viele Wissenschaftler beobachteten Temperaturen unter 30 °C, z.B. Boag et al. (1985) Temperaturen zwischen 5 und 30 °C, Leathwick (2013) Temperaturen bei 10, 20 und 30 °C, Michel et al. (1975) Temperaturen bei 4 und 15 °C, van Dijk et al. (2008) Temperaturen zwischen 4 und 30 °C. Young et al. (1980a) untersuchte das Schlupfverhalten von Trichostrongylideneiern hauptsächlich bei 10 und 20 °C und zusätzlich bei 3, 4 und 5 °C. Pandey (1972) untersuchte das Überleben von Eiern, L1 und L3 bei -10, 1, 4, 40, 45 und 50 °C, was sehr wichtig für das Verständnis ist. Temperaturen, die mehrere Stunden über 50 °C liegen, treten auf nordeuropäischen Weiden natürlicherweise nicht auf und werden dies auch in den nächsten 100 Jahren klimawandelbedingt wahrscheinlich nicht tun. Tatsächlich sind die durch den

Nematoden

Klimawandel zu erwartenden Temperaturen zwischen 25 und 40 °C relativ schwach untersucht. Ein Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es zu testen, ob ein Temperaturanstieg, zu dem es unter natürlichen Bedingungen in den nächsten 100 Jahren in Deutschland wahrscheinlich kommen wird, schon einen Einfluss auf das Überleben und die Fitness der L3 haben kann und wie sich zusätzlicher Trockenstress auswirkt. Aus diesem Grund könnten auch die Erkenntnisse, die aus dem Experiment mit der Klimakammer und dem Gewächshaus gewonnen wurden, für Modelle bezüglich des zukünftigen Parasitenvorkommens von *C. oncophora* in Europa genutzt werden. Ein Beispiel für solche differenzierten Modelle ist das GLOWORM-FL Modell (Rose et al. 2015).

Durch den Klimawandel verändern sich auch die Temperaturen außerhalb der Weidesaison im Winter. REMO und CLM berechnen, dass die Winter in Zukunft milder werden. Van Dijk (2010) geht davon aus, dass Trichostrongyliden auch dadurch geschwächt werden können, da sie bis jetzt von kalten Wintern profitieren konnten: Bei Temperaturen zwischen 5 und 10 °C rollen sich die L3 ein und bewegen sich nicht mehr. Dieses Vorgehen macht es möglich, dass ihre Energiereserven bis zum folgenden Frühling ausreichen. Sind die Temperaturen in den zukünftigen Wintern zu hoch, könnten die L3 anfangen sich zu früh wieder zu bewegen und ihre Reserven zu verbrauchen, bevor sie vom Wirtstier aufgenommen werden können. Somit könnten auch milde Winter dazu beitragen, den Selektionsdruck für L3 auf der Weide zu erhöhen.

3.5.2 Trockenstress

In Feldversuchen und Laborexperimenten wurde auch ein Einfluss von Trockenstress auf das Überleben von parasitischen Stadien festgestellt. Feuchtigkeit ist für die Entwicklung und das Überleben der Parasiten unerlässlich und erleichtert ihre Fortbewegung (Agneessens et al. 1997; Callinan et al. 1986; Demeler 2005; Nogareda et al. 2006; O'Connor et al. 2008; Shorb 1943; van Dijk et al. 2011). Es existieren Berichte, dass L3 von Rinderparasiten in einem anhydrobiotischen Zustand Trockenperioden überleben können und dadurch auch gegen andere Umwelteinflüsse besser geschützt sind (Lettini et al. 2006). Dennoch konnte in Experimenten gezeigt werden, dass L3, sollten sie eine Phase der Austrocknung überleben, danach weniger fit sind und auch die Fruchtbarkeit der daraus entstehenden adulten Weibchen negativ beeinträchtigt ist. Es ist auch wichtig zu beachten, dass alle Trichostrongylidenarten negativ auf Austrocknung und zu hohe Temperaturen reagieren. Die einzelnen Spezies unterscheiden sich jedoch hinsichtlich der Schwellenwerte für Temperaturen oder Feuchtigkeit, unter denen sie sich nicht mehr entwickeln können oder schneller absterben (Chylinski et al. 2014; Leathwick 2013; Pandey 1972).

Nematoden

Für die MDS des Schafes konnte bewiesen werden, dass die Kombination von hohen Temperaturen und geringer Luftfeuchte die Lebensdauer verkürzt und dass die L3, aufgrund ihrer nicht abgestreiften Scheide des zweiten Larvenstadiums, eine zweite, es gegen Umwelteinflüsse besser schützende Hülle hat. Außerdem kann die L3 aufgrund ihrer besseren Beweglichkeit eher vor schädigenden Bedingungen „fliehen“ als das erste (L1) oder zweite (L2) Larvenstadium (O'Connor et al. 2006).

Zu geringe Feuchtigkeit kann die Entwicklung bis zur L3 sogar gänzlich verhindern (O'Connor et al. 2008). Die Schwellenwerte für Feuchtigkeit und Temperatur sind je nach Art unterschiedlich, was deren Adaptionfähigkeiten beweist. Dies erklärt auch, warum manche Arten mehr in gemäßigten Klimazonen vorherrschen, während andere sogar unter großer Hitze und langen Trockenzeiten überleben (Waruiru et al. 1998) oder sich bei enormer Kälte verbreiten können (Carlsson et al. 2012). Bei optimalen Bedingungen sind L3 mehrere Jahre lebensfähig, dies zeigen auch die Ergebnisse aus der Stammhaltung des Institutes für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der FU Berlin.

3.5.3 UV-Strahlung

Die Modelle, die UV-Strahlung unabhängig von den Tagen mit Sonnenschein berechnen, gehen davon aus, dass die UV-Strahlung in Europa im Frühjahr noch weiter zunehmen wird. Dabei ist es unerheblich, ob diese mit optimistischen oder negativen Prognosen, was den Ozongehalt in der Atmosphäre betrifft, arbeiten. Aber für die Monate von Mai bis Dezember wird davon ausgegangen, dass zukünftig in der Stratosphäre und Troposphäre eine höhere Gesamtkonzentration von Ozon vorherrschen wird. Dadurch wird die schädigende UV-B-Strahlung in Europa in Zukunft von Mai bis Dezember in etwa gleich bleiben oder sogar verringert, siehe Abbildung 5 (Reuder et al. 2001). Ähnliche UV-Werte prognostiziert auch Taalas et al. (2000), der den Einfluss von Treibhausgasen und halogenierten Elementen auf die weltweite zukünftige UV-Belastung untersucht hat. Bei weniger zu erwartendem Niederschlag könnte man davon ausgehen, dass sich auch weniger Wolken in der Atmosphäre befinden werden. Dadurch käme es zu einer stärkeren Sonneneinstrahlung auf der Weide. Da sich UV-Strahlung negativ auf die Überlebensrate der L3 auswirkt (van Dijk et al. 2009), könnte ein größerer Einfluss des UV-Faktors vermutet werden, sodass das Larvenvorkommen auf der Weide und die Überlebenszeit der L3 im Frühjahr reduziert wird.

Für *Trichostrongylus tenuis* und *H. contortus* konnte ein positives phototaxisches Verhalten festgestellt werden, da diese bei Tageslicht auf Grashalmen nach oben und bei Dunkelheit wieder abwärts kletterten (Saunders et al. 2000). Dieses Verhalten der Trichostrongyliden begünstigt die Chance von tagsüber weidenden Wirten aufgenommen zu werden. Allerdings sind sie somit auch der durch den Klimawandel im Frühjahr möglicherweise schädlicher

Nematoden

werdenden UV-Strahlung stärker ausgesetzt. Lettini et al. (2006) berichten, dass der anhydrobiotische Zustand, der bei den L3 durch Trockenstress ausgelöst wird, sie auch besser gegen andere Umweltweinflüsse schützen kann. Ob dies auch für die UV-Strahlung zutrifft, ist noch nicht erforscht.

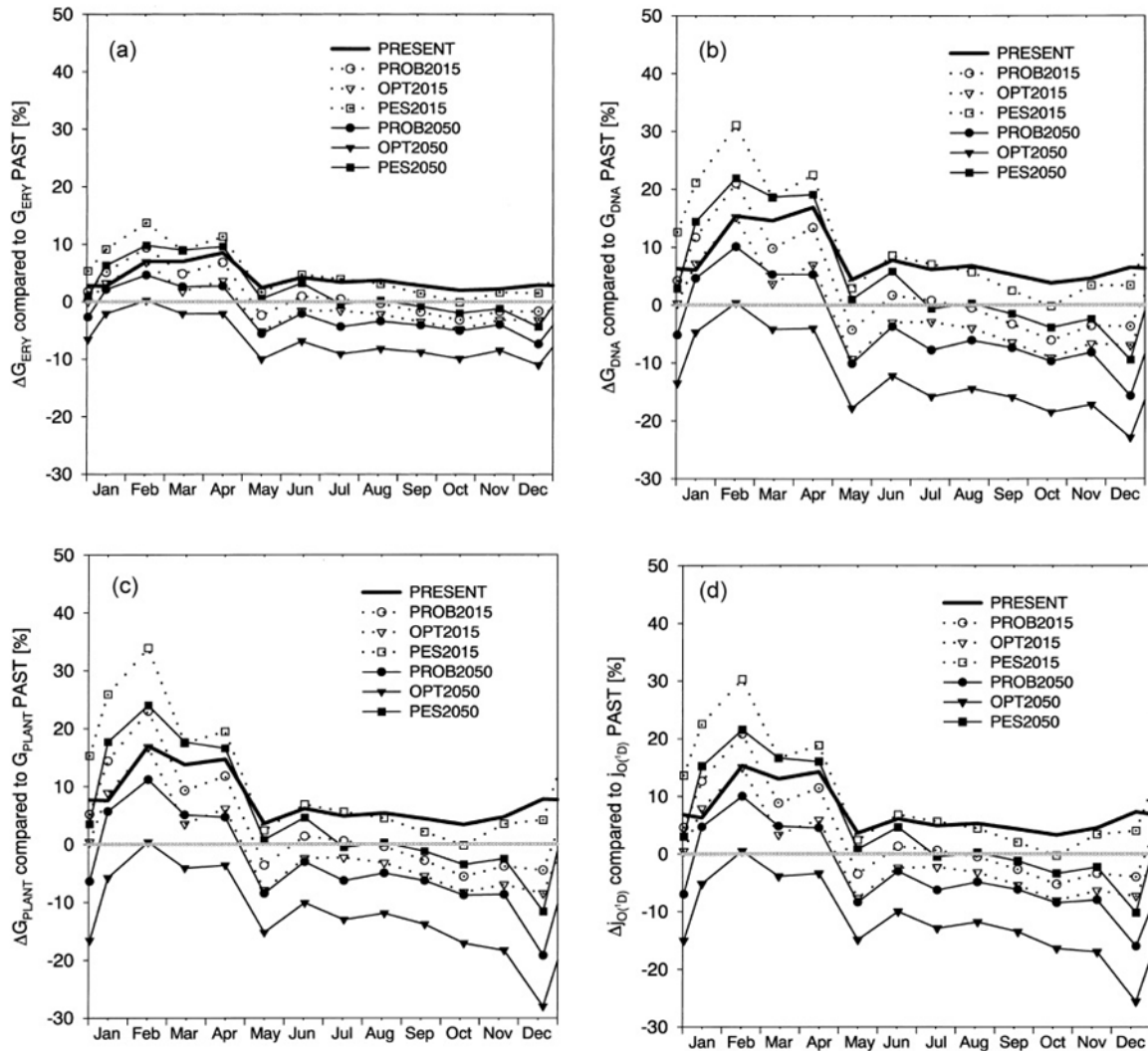


Abbildung 5 Prozentuale Abweichung von verschiedenen gewichteten UV-B integralen abhängig von unterschiedlichen Ozonszenarios

Quelle: Journal of Photochemistry and Photobiology (Reuder et al. 2001)

Parasitenkontrolle

3.6 Parasitenkontrolle

Die chemische Kontrolle von Magendarmparasiten ist bis zum jetzigen Zeitpunkt für Tierhalter die einfachste, effektivste und günstigste Möglichkeit, die Gesundheit und Produktivität ihrer Rinder zu erhalten. Da der momentane Markt hart umkämpft ist und eine sehr geringe Gewinnspanne bietet, ist das Bedürfnis groß, auch Verluste, die durch subklinische Infektionen mit Parasiten entstehen, zu verhindern (Morgan et al. 2013). Dies könnte erklären, warum häufig metaphylaktisch die ganze Herde entwurmt wird. Die bei Rindern am häufigsten verwendeten Anthelminthika können in drei Gruppen eingeteilt werden: BZ, Imidazothiazole und ML. Imidazothiazole haben als wichtigen Vertreter das Levamisol, welches keinen Tieren verabreicht werden darf, deren Milch für den menschlichen Verzehr bestimmt ist. Bei Pour-On oder oraler Verabreichung ist weiterhin eine Wartezeit von 21-22 Tagen auf das Fleisch einzuhalten. Wird es hingegen intramuskulär oder subkutan verabreicht, sinkt die Wartezeit auf 8 Tage. Die Wirkstoffklasse der ML beinhaltet unter anderem die Wirkstoffe Doramectin, Eprinomectin, Ivermectin (IVM) und Moxidectin. Sie wirken neben MDS auch gegen Lungenwürmer, Dassellarven und Ektoparasiten, wie Läuse und Milben, und dürfen zum Teil auch bei Tieren angewendet werden, deren Milch für den menschlichen Verzehr bestimmt ist. Die Wartezeit für Fleisch beträgt bei intramuskulärer oder subkutaner Injektion zwischen 49 bis 108 Tagen und bei Verabreichung als Pour-on zwischen 14 und 65 Tagen (CliniPharm 2012; vTI 23.03.2015).

3.6.1 Benzimidazole

BZ sind seit 1961 auf dem Markt. Albendazol, welches im Weideversuch verwendet wurde, wird seit 1979 gegen MDS beim Rind eingesetzt. Noch 2002 wurde ihm von Harder (2002) eine hohe Effizienz gegen Trichostrongyloiden bescheinigt. BZ sind Breitbandanthelminthika und wirken neben Strongyloiden im Labmagen, Dünn- und Dickdarm auch gegen Lungenwürmer und teilweise gegen Zestoden und Trematoden (Harder 2002).

BZ werden oral oder intraruminal verabreicht, die wichtigsten Vertreter dieser Klasse sind Albendazol, Febantel, Fenbendazol und Oxfendazol. Bei tragenden Rindern sind sie nicht anzuwenden. Intraruminal dürfen sie nicht während der Laktation verabreicht werden. Es besteht eine gesetzliche Wartezeit bei Milch zwischen vier und sechs Tagen. Das Fleisch darf erst nach einer Wartezeit von sieben bis 28 Tagen bei oraler Gabe und 200 Tagen bei intraruminaler Gabe als Nahrungsmittel dienen.

BZ sind lipophil (CliniPharm 2012), was bedeutet, dass sie sich fest an Proteine binden und dadurch über das Blut gut im Wirtsorganismus verteilt werden können (Milošević et al. 2013). Deswegen wirkt beispielsweise Oxfendazol auch schon bei einmaliger oraler Gabe gut gegen

Parasitenkontrolle

Leberegel (Ortiz et al. 2014). Roos (1997) hat festgestellt, dass BZ die Mikrotubuli und Spindelapparate der Parasiten zerstören, aber nicht die des Wirtes. Ein möglicher Grund hierfür wird im Kapitel 3.7.3 „Molekularbiologische Grundlagen der BZ-Resistenz“ (Seite 31) beschrieben. BZ wirken, indem sie sich an das β -Tubulin, der aus α - und β -Tubulin Untereinheiten aufgebauten Mikrotubuli des Parasiten, binden. Durch diese verändernde Bindung in der β -Tubulin-Struktur kann kein weiteres α -Tubulin angefügt werden und somit wird die komplette Polymerisation der Mikrotubuli gestört (siehe Abbildung 6, (Harder 2002)).

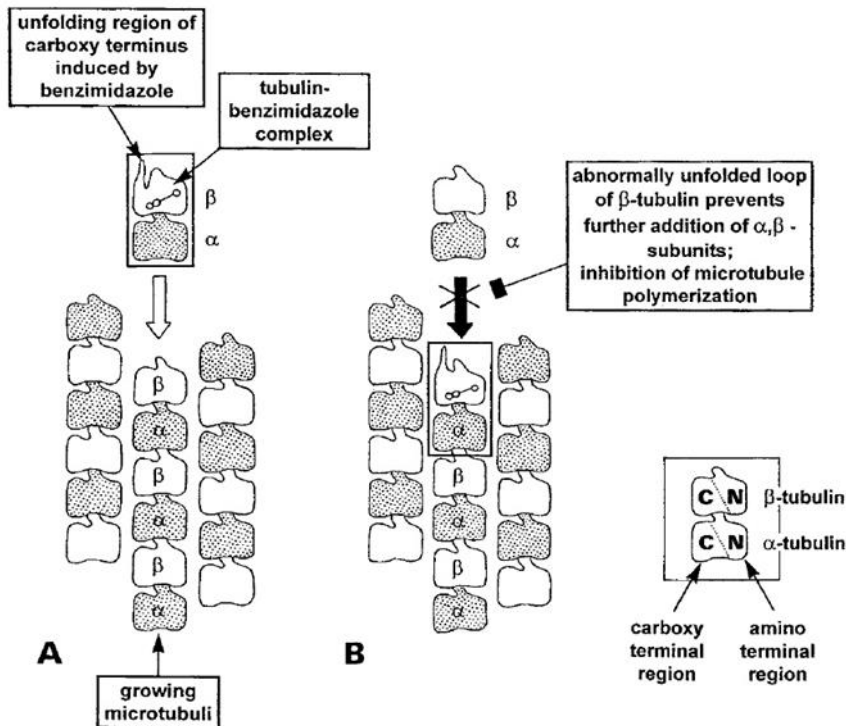


Abbildung 6 Modell über die Wechselwirkung von BZ mit der Polymerisation der Mikrotubuli

Quelle: Parasitology Research (Harder 2002)

Da gleichzeitig eine natürliche Dissoziation, also Auflösung von Mikrotubuli, stattfindet, (Margolis et al. 1998) verliert der Parasit mit den Mikrotubuli auch die Grundbausteine seines Cytoskeletts. Hierdurch ist auch kein intrazellulärer Transport mehr möglich (Nogales 2000). Es konnte bewiesen werden, dass durch das Fehlen von Mikrotubuli unter BZ-Wirkung bei Zestoden und Digena keine Glykokonjugate mehr transportiert werden können (Schmidt 1998). Kann kein Glykogen mehr transportiert werden, verhungert der Parasit.

3.7 Anthelminthika-Resistenz

Genau wie Bakterien Resistenzen gegen Antibiotika und Insekten Resistenzen gegen Insektizide entwickeln, haben auch Trichostrongyliden Resistenzen gegen Anthelminthika entwickelt. Da BZ leichter als andere Anthelminthika bei laktierenden Tieren eingesetzt werden konnten, wurden diese sehr häufig verwendet und sind nun am stärksten von AR betroffen (Humbert et al. 2001).

Auch die Berichte über einzelne, multiple und Kreuzresistenzen haben in den letzten Jahren zugenommen. Kaplan et al. (2012) fassen in ihrem Review über den weltweiten Anstieg von AR zusammen, dass es bei Rinderparasiten viel weniger Studien über die Resistenzverbreitung als bspw. bei Schafparasiten gibt. Dadurch ist es schwer zu sagen, wie verbreitet AR bei Rinderparasiten weltweit schon sind. Wenn sie aber erkannt werden, sind meistens *Cooperia*, im Gegensatz zu den weniger verbreiteten AR bei *Ostertagia* spp., betroffen. Die Tierhalter müssen mittlerweile lernen zu akzeptieren, dass einzelne Berichte über AR nichts Außergewöhnliches mehr sind, da AR und multiple AR in manchen Gegenden bereits zum Normalzustand geworden sind. Zusätzlich besteht das Problem, dass nicht schnell genug neue wirksame Anthelminthika entwickelt werden können. Falls neue Mittel gefunden werden, könnten diese für die Tierhalter zu teuer werden, weil auch die Entwicklung der Medikamente immer teurer wird (Kaplan et al. 2012).

3.7.1 Anthelminthika-Resistenz bei Weideparasiten der Schafe

Kaplan et al. (2012) fassen in ihrem Review zusammen, dass auf Schafbetrieben AR bei BZ viel häufiger vorkommen als bei Levamisol oder IVM und es nur wenig Berichte über AR bei Moxidectin gibt. In Brasilien kamen auf allen überprüften Schafbetrieben multiple ARs vor. In Australien wird von über 80 % BZ Resistenz bei *T. circumcincta* und *Trichostrongylus* spp. ausgegangen. In Neuseeland kommen Resistenzen gegen BZ bei allen Schafparasiten vor. Die Prävalenz beträgt zwischen 37 und 82 %. Es ist auffällig, dass die AR in Neuseeland niedrigere Prävalenzwerte aufweist als in Ländern mit wärmeren Klimabedingungen. Auch in Europa, in welchem ja kühlere Temperaturen als in Brasilien oder Australien vorherrschen, kommen AR viel seltener vor (Čerňanská et al. 2006; Höglund et al. 2009). Da AR bei Rinderparasiten noch nicht so verbreitet sind wie bei den Weideparasiten des Schafes, also die Bildung und Verbreitung von AR bei den Weideparasiten des Rindes später angefangen haben könnte, könnten die AR-Bildungsmuster bei den Schafparasiten als mögliches Vorhersagemodell für Rinderparasiten dienen. Auf jeden Fall sind die hohen Anteile BZ resistenter oder multiresistenter Parasiten bei den Schafen eine Warnung für die Rinderhalter.

3.7.2 Status quo für Benzimidazol-Resistenzen bei den Weideparasiten des Rindes

Es gibt bis jetzt eher wenig Studien über Resistenzen gegen BZ bei Rinderparasiten in Europa (Kaplan et al. 2012). Es ist auffällig, dass bei der weltweiten AR-Verbreitung Resistenzbildungen vermehrt in Ländern mit wärmeren Wetterbedingungen auftauchen. Bei Betrachtung der Resistenzentwicklung bei Schafparasiten müssten auch ohne zusätzliche klimawandelbedingte Effekte in Zukunft vermehrt BZ-Resistenzen bei Rindern in Europa auftreten. Da im Gegensatz zu vielen Studien über Resistenzen bei Schafparasiten bei den Rindern eher wenig geforscht wurde, ist es schwer zu sagen, ob und wie weit fortgeschritten die Problematik bereits ist. Dieser Mangel an Informationen über BZ-Resistenzen bei Rinderparasiten war, neben der Möglichkeit, die Entwicklung der BZ-Resistenz mittels Pyrosequenzierung genau überwachen zu können, ausschlaggebend für den Aufbau des Weideversuchs mit *O. ostertagi* und dem BZ Albendazol (Knapp-Lawitzke et al. 2015).

Generell scheinen AR bei den *Cooperia* Arten keine Ausnahme mehr und weltweit verbreitet zu sein. Über AR bei *Ostertagia* spp. wird seltener berichtet, aber auch hier scheinen sich die AR zu verbreiten (Edmonds et al. 2010; Jackson et al. 2006; Suarez et al. 2007; Waghorn et al. 2006). In Neuseeland treten auf 92 % der getesteten Rinderbetriebe AR gegen IVM und auf 76 % der Betriebe AR gegen Albendazol auf. Bei 74 % der Betriebe bestehen AR sogar gegen beide genannten Anthelminthika. Bei den *Cooperia* Arten in Neuseeland sind AR gegen IVM und Albendazol sehr verbreitet. Levamisol wirkt aber noch gut. Im Gegensatz dazu konnten bei den *Ostertagia* spp. AR gegen alle drei Anthelminthikagruppen nachgewiesen werden. Von AR gegen Albendazol waren 35 % der Betriebe betroffen. AR gegen IVM und Levamisol lagen bei 9 %. In Argentinien sind AR gegen IVM am stärksten verbreitet und bestanden auf 60 % der getesteten Betriebe. Gegen BZ fanden sich auf 32 % der Betriebe AR und eine AR gegen IVM und BZ fand sich auf 28 % der Betriebe. Gegen Levamisol konnten in Argentinien noch keine AR festgestellt werden. Es fiel auf, dass überwiegend *Cooperia* spp. betroffen waren. Aber auf Betrieben mit BZ-Resistenz überwogen *Ostertagia* spp. In Sao Paulo State in Brasilien ist die IVM-Resistenz weit verbreitet, dagegen ist Moxidectin noch effektiv. Allerdings sind diese Daten mit Vorsicht zu interpretieren, da es sein kann, dass Moxidectin die Eiausscheidung von *Cooperia* spp. nur kurzzeitig unterdrückt. Dadurch wird eventuell fälschlicherweise von einer guten Moxidectin Effizienz ausgegangen. Somit wäre es sicherer, die EpG-Werte anstatt an Tag 14 nach Behandlung, wie es die WAAVP-Richtlinien vorschlagen (Coles et al. 1992), an den Tagen 17 – 21 nach Behandlung nochmals zu überprüfen. Auf drei Betrieben wurde von multiplen AR gegen Albendazol sowie IVM berichtet und auf zwei weiteren Betrieben sogar gegen Albendazol, Levamisol und IVM. Die

Anthelminthika-Resistenzen

prädominanten Gattungen waren *Cooperia* und *Haemonchus*, bei diesen kamen durchweg AR vor (Kaplan et al. 2012).

3.7.3 Molekularbiologische Grundlagen der Benzimidazol-Resistenz

Parasiten, die gegen BZ resistent sind, haben zumindest eine Veränderung eines Nukleotids in ihrer DNA, einen sogenannten Einzelnukleotid-Polymorphismus, auf Englisch single nucleotide polymorphism (SNP). Dieser SNP, der sich im Fall des im Weideversuch verwendeten *O. ostertagi* Isolats an der Stelle des Codons 200 des β -Tubulin Isotyp 1 befindet, bewirkt einen Wechsel im Codon von TTC zu TAC. Dieser Austausch von Thymin durch Adenin führt zur Bildung einer anderen Aminosäure. Statt Phenylalanin wird nun an der Stelle des Codon 200 Tyrosin codiert. Tyrosin hat eine sehr ähnliche Struktur wie Phenylalanin. Sie unterscheiden sich lediglich durch die zusätzliche Hydroxylgruppe des Tyrosins. Diese Hydroxylgruppe führt zu einer Änderung der Struktur im Bereich der Bindungstasche für die BZ des β -Tubulins, sodass diese sich nicht mehr anlagern können. Somit kann auch die Polymerisation der Mikrotubuli nicht mehr verhindert werden. Die Korrelation zwischen dem SNP im Codon 200 und einem resistenten Phänotypen wurde für *H. contortus* schon 1994 bestätigt (Kwa et al. 1994). Dass Säugetiere weniger empfindlich auf BZ reagieren, könnte daran liegen, dass auch das β -Tubulin von Säugetieren an Stelle des Codon 200 Tyrosin codiert. Da Tyrosin eine Wasserstoffbrückenbindung mit Asparagin von Codon 165 eingeht, könnte dies der Grund sein, warum keine BZ in die Bindungstasche eingelagert werden können (Robinson et al. 2004).

Es wurden auch noch weitere mit BZ-Resistenz in Verbindung stehende SNPs bei Trichostrongyliden in anderen Codons gefunden, wie z.B. im Codon 167, wo durch den SNP ebenfalls statt Phenylalanin Tyrosin codiert wird (Silvestre et al. 2002). Ein weiterer mit BZ-Resistenz in Verbindung gebrachter SNP liegt im Codon 198 (GAA wird zu GCA). Hierdurch wird Alanin statt Glutamat codiert (Ghisi et al. 2007). Auch diese Änderungen der Aminosäuren verändern die Tertiärstruktur des β -Tubulin derart, dass sich keine BZ mehr anlagern können und somit ihre Wirkung verlieren.

Trotz dieser wachsenden Zahl an SNPs, die mit BZ-Resistenz in Verbindung gebracht werden, wird auch im Jahr 2014 davon ausgegangen, dass der SNP im Codon 200 der wichtigste ist, wenn es um BZ-resistente Phänotypen bei den Trichostrongyliden geht (Kotze et al. 2014). Bei parasitischen Nematoden des Rindes konnten alle drei SNPs in resistenten Populationen nachgewiesen werden (Demeler et al. 2013). Diese molekularen Kenntnisse der BZ-Resistenz machen es möglich, eine Zunahme von mit Resistenz korrelierten Genotypen mittels Pyrosequenzierung schon frühzeitig festzustellen und zu überwachen.

Anthelminthika-Resistenzen

3.8 Nachweismöglichkeiten der Anthelminthika-Resistenz

Das für den Tierhalter augenscheinlichste Phänomen einer AR ist, wenn das Tier trotz Behandlung noch klinische Symptome eines Wurmbefalles zeigt. Allerdings können diese Anzeichen, die sich bei MDS-Befall mit Durchfall, Fressunlust, geringerem Wachstum oder Milchleistung äußern, auch von vielen anderen parasitologischen, bakteriellen, viralen oder stressbedingten Krankheiten ausgelöst werden (Morgan et al. 2013). Wenn nach einer anthelminthischen Behandlung aufgrund des MDS-Befalls noch klinische Symptome auftreten, ist die AR schon in einem sehr weit fortgeschrittenen Stadium. Auch wenn nur eine subklinische Infektion vorliegt, aber dem Tierhalter MDS-bedingte Leistungseinbußen trotz anthelminthischer Behandlung seiner Tiere auffallen, müsste der Anteil resistenter Parasiten bereits relativ hoch sein. Da resistente Parasitenstämme meist mit Methoden entdeckt werden, wie z.B. FECRT oder das Egg Hatch Assay (EHA), welche erst ab einem Anteil von über 25 % eine AR nachweisen können (Martin et al. 1989), ist es sehr wahrscheinlich, dass auf vielen Betrieben unentdeckte AR bestehen. Bei Schafparasiten entwickelt sich die AR anfangs langsam. Deshalb bleiben die geringen Anteile resistenter Parasiten im Anfangsstadium lange unentdeckt. Besteht aber ein größerer Anteil der Population aus resistenten Parasiten, vermehren sich die resistenten immer stärker, so dass schnell hohe Prozentsätze mit resistenten Allelen erreicht werden (Jackson et al. 2000). Da davon ausgegangen werden kann, dass sich dies bei Rinderparasiten ähnlich verhält, ist es umso wichtiger, auf landwirtschaftlichen Betrieben regelmäßig die Wirkung der Anthelminthika zu überprüfen. Denn wenn die Tierhalter ihr herkömmliches „Entwurmungsmanagement“ beibehalten, werden sich AR schneller entwickeln als neue Medikamente auf den Markt kommen (Kaplan et al. 2012). Kaplan et al. (2012) fordern, dass bei Untersuchungen die AR-Überwachung mittels EpG-Kontrolle zur Routine wird, denn nur eine sich auf Beweise stützende, rationelle Behandlung von Parasitosen kann es möglich machen, dass der Rinderhaltung in Zukunft effektive Medikamente zur Verfügung stehen. Sie geben aber auch zu bedenken, dass der FECRT ein klinischer Test bleibt und es schwer ist, die Anfänge von AR festzustellen, da dafür alle biologischen Variabilitätsfaktoren beachtet und statistisch richtig ausgewertet werden müssen.

3.8.1 Anthelminthika-Resistenz Nachweis mittels FECRT

Die momentan am häufigsten angewendete Methode um eine bestehende oder beginnende AR nachzuweisen, ist der FECRT (Rendell 2010; Soutello et al. 2007; Walker et al. 2013; Yazwinski et al. 2009). Der eigentliche Goldstandard, um die Wirksamkeit eines Anthelminthikums zu überprüfen, wäre der Kontrolleffizienztest, hierbei müssten aber die Wirtstiere geschlachtet werden, um auf adulte MDS untersucht werden zu können. Deshalb

Anthelminthika-Resistenzen

wird der FECRT trotz seiner geringeren Sensitivität sehr häufig eingesetzt (De Graef et al. 2012). Hierbei wird das EpG vor einer anthelminthischen Behandlung mit dem EpG nach der Behandlung verglichen. Bei einer optimalen Wirkung des Medikamentes sollten alle Parasiten abgetötet und somit nach Behandlung keine Eier mehr im Kot zu finden sein, dies würde einer Effizienz von 100 % entsprechen. Die einfachste Formel zur Errechnung der Effizienz ist folgende:

$$E \% = \frac{EPG \text{ vor Behandlung} - EPG \text{ nach Behandlung}}{EPG \text{ vor Behandlung}} \times 100 \text{ (Hora et al. 2014)}$$

Die WAAVP-Richtlinien verlangen eine noch genauere Berechnung:

$FECR\% = 100 \times (1 - \frac{X_t}{X_c})$ hierbei steht X_t für das arithmetische Mittel der EpG Werte der behandelten Gruppe und X_c für das der Kontrollgruppe. Die Eizahlbestimmung sollte am 10. – 14. Tag nach der Behandlung stattfinden. Beträgt die durch die Behandlung bewirkte Reduktion der Eizahl, also die Faecal Egg Count Reduction (FECR), weniger als 95 % und das 95 % Konfidenzniveau weniger als 90 %, so bestätigt dies das Vorliegen einer Resistenz. Eine Resistenz wird vermutet, wenn nur eine der beiden Bedingungen erfüllt ist (Coles et al. 1992).

Weil nicht für alle Parasiten, Wirte und Medikamente andere Methoden vorliegen ist der FECRT momentan der Goldstandard um auf ARs zu untersuchen. Wie wichtig es wäre, auch andere Methoden zur Verfügung zu haben, zeigt die geringe Sensitivität des Tests. Denn in einer Studie über BZ-Resistenz konnte eine AR mittels FECRT nur nachgewiesen werden, wenn mehr als 25 % der Parasiten resistent sind (Martin et al. 1989).

Zusätzlich sind die Berechnungsstandards z. B. für Schafparasiten seit über 20 Jahren nicht mehr verändert bzw. verbessert worden und liegen für Pferde- und Rinderparasiten noch nicht einmal vor. Der Mangel an standardisierten Methoden führt dazu, dass die Cut-off-Werte, ab denen von einer AR gesprochen wird, oft willkürlich festgelegt werden (Kaplan et al. 2012). Eigentlich müsste für jede mögliche Kombination von Wirtstier, Parasit und Anthelminthikum das experimentelle Design und die Statistik einzeln angepasst werden, um eine AR sicher feststellen zu können. Meist werden aber immer die gleichen Protokolle und Cut-off-Werte verwendet, ohne auf die entstehenden Eigenarten jeder neuen Kombination Rücksicht zu nehmen. Denn je nach Wirt können unterschiedliche Effizienzen erwartet werden (Kaplan et al. 2012). Kaplan und Vidyashankar betonen auch, dass die Anwendungsart beachtet werden muss, da sie die Wirksamkeit beeinflussen kann. Es wurde bereits belegt, dass der gleiche Wirkstoff in einem Pour-on Präparat eine geringere Wirkung zeigt, als wenn er als Injektion verabreicht wird (Sargison et al. 2009). Auch eine mangelhafte statistische Auswertung führt dazu, dass die AR-Bestimmung von Betrieben unterschiedlicher Studien schwer vergleichbar

Anthelminthika-Resistenzen

sind. Diese Problematik der Fehlinterpretation zeigt sich am deutlichsten, wenn AR im Entstehen und nur gering verbreitet sind.

Ein weiterer wichtiger Mangel am FECRT ist der Umstand, dass EpG-Werte sehr variabel sein können. Da meistens nur einmal vor und nach der Behandlung die EpG-Werte pro Tier bestimmt werden, ist es ganz logisch, dass hier Schwankungen entstehen können, die die Effizienz des Anthelminthikums verfälschen. Eine Lösung wäre, das EpG mehrfach zu messen. Idealerweise wird das EpG zusätzlich zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen, da durch diese Mittelung die Varianzen in der Eiproduktion der Parasiten abgemildert werden.

Ein weiteres Problem ist, dass die meisten auf FECRT basierenden Studien erst dann durchgeführt werden, wenn schon eine AR vermutet wird. Dies bedeutet, dass die Effizienz erheblich gemindert ist. Somit existieren viele Daten für starke Effizienzverluste, aber nur wenige bei einer leichten Verringerung der Wirksamkeit. Es gibt auch keine FECRT Daten für Parasiten, die noch keine AR aufweisen. Dies ist ein wichtiger Umstand, denn vielleicht sind die Schwankungen in der Effizienz so stark, dass manchmal eine AR falsch diagnostiziert wird oder aber übersehen wird. Es kann außerdem vorkommen, dass eine reduzierte Effizienz sporadisch ganz ohne Vorliegen einer AR auftritt. Dies wird umso wahrscheinlicher, je mehr Betriebe mit dem FECRT auf AR untersucht werden (Kaplan et al. 2012). Die Sensitivität des Tests wird außerdem von der Methode der Eizählung bestimmt. Die wichtigsten Methoden basieren alle auf dem Prinzip der MDS-Flotation. MDS-Eier sinken in Leitungswasser ab. Wird aber die Dichte des Flotationsmediums durch z. B. Salz, Zucker, Zinksulfat, Magnesiumsulfat oder andere Stoffe erhöht, so schwimmen die Eier an der Oberfläche der Lösung. Da andere schwerere Debrisbestandteile absinken und sich somit in einer anderen Schärfeebene wiederfinden, kann man die Eier unter dem Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung leicht auszählen. Dieses Vorgehen wird beim **McMaster-Verfahren** eingesetzt, allerdings hat dieses recht einfache Verfahren den Nachteil, dass bei geringen Eiausscheidungsraten ein falsch negatives Ergebnis erhalten wird. Dies liegt daran, dass die Nachweisgrenze bei der normalerweise verwendeten Menge von vier Gramm Kot und dem Auszählen einer Doppelkammer 50 Eier pro Gramm Kot beträgt (Boch et al. 2006). Es ist deshalb angebracht, von dem Ergebnis < 50 Eier pro Gramm Kot zu sprechen und nicht von null Eiern pro Gramm Kot, wenn keine Eier gefunden werden können. Bei Anwendung der McMaster-Methode besteht die große Gefahr, dass ein geringer Anteil von resistenten Parasiten, welcher das Anfangsstadium einer AR markiert, nicht entdeckt wird. Der Grund hierfür ist, dass bei der geringen Sensitivität der Methode eine falsche Effizienz von 100 % errechnet werden kann (Kaplan et al. 2012). Werden die realen Anwendungsmöglichkeiten dieser Methode, bspw. im Herdenmanagement, betrachtet, so sollten Unterschiede der Eizahlen im Kot mit möglichst wenig Proben entdeckt werden können. Mes (2003) stellte fest, dass bei Verwendung der McMaster-Methode, um Unterschiede zwischen Kotproben, die 10, 50 oder 250 Eier pro

Anthelminthika-Resistenzen

Gramm enthielten, feststellen zu können, für die jeweiligen Gruppen 46, 25 und 27 Einzelproben benötigt werden. Man erkennt somit deutlich, dass die McMaster-Methode bei geringen Eizahlen unzureichend ist. Hierbei kann den australischen Entwicklern (Gordon et al. 1939) kein Vorwurf gemacht werden, da die Schafproben, für die diese Methode ursprünglich entwickelt wurde, sehr hohe Eizahlen aufweisen konnten (Bosco et al. 2014).

FECPAK ist eine Weiterentwicklung der McMaster Kammern und erlaubt die Untersuchung von größeren Kotmengen. Wurmeier sind nie gleichmäßig im Kot verteilt. Deshalb werden die Auszählungsergebnisse umso genauer, je größer die Kotmenge ist, die untersucht werden kann. FECPAK hat eine Sensitivität von 30 Eiern pro Gramm Kot (Godber et al. 2015). Das FECPAK System wurde 1993 entwickelt und bietet die Möglichkeit, die Eiauszählung statt im Labor auch direkt auf dem Rinderbetrieb ausführen zu können. Jedenfalls ist dies möglich, wenn die nötige Fachkenntnis gegeben ist (Mirams 2015). Es wurde in Neuseeland entwickelt, um die Behandlungsstrategien besser anpassen zu können, also um festzustellen, ob eine Behandlung nötig ist und um die Effizienz des Entwurmungsmittels überprüfen zu können. Mittlerweile ist es für Rinder, Pferde, Schafe, Ziegen, Alpakas und Rehe anwendbar. Weitere Methoden sind die **Cornell-Wisconsin-Technik**, welche mit einem Sedimentationsschritt und einer Flotation in Zuckerlösung (relative Dichte 1,27) arbeitet und damit gut geeignet ist, um auch geringe EpG-Werte anzuzeigen (Egwang et al. 1982). Die **FLOTAC Technik** hat eine sehr hohe Sensitivität. Schon ein Ei pro Gramm Kot wird hiermit gefunden. Damit gibt es bis dato keine schnellere und genauere Untersuchungsmethode, um die Anzahl von MDS Eiern im Kot zu bestimmen. Dies verbessert natürlich ganz entscheidend die Interpretation von FECRT in Tiergruppen, die sehr niedrige Eiausscheidungsraten haben. Deshalb wurde vorgeschlagen, dieses System zu verwenden, um AR bei Rinderparasiten zu überwachen (Levecke et al. 2012; Levecke et al. 2011). Hierbei gibt es einen der Flotation in Salzlösung vorgeschalteten Sedimentationsschritt in Leitungswasser und in der Zentrifuge, um die Eier von leichten Schwebstoffen zu trennen. Die Füllkammern des FLOTAC-Systems fassen zehn Milliliter und werden, um die Flotation zu optimieren, ebenfalls zentrifugiert. Die Anwendbarkeit von FLOTAC ist also an das Vorhandensein einer passenden Zentrifuge gebunden (Cringoli et al. 2010). Mittels **Mini-FLOTAC** und Salzlösung kann ab fünf Eiern pro Gramm Kot ein MDS-Befall nachgewiesen werden. Damit ist es eine verlässliche alternative Methode zur Eizahlbestimmung (Godber et al. 2015). Der größte Vorteil liegt darin, dass hier kein Zentrifugationsschritt nötig und trotzdem ein leichtes Auszählen der Eier möglich ist, da diese mittels einer drehbaren Auszählscheibe von Debrispartikeln getrennt werden können (Barda et al. 2013; Cringoli et al. 2010). Diese Methode ist dadurch sehr günstig, schnell und theoretisch auch im Feld anzuwenden und wurde auch im Weideversuch (Knapp-Lawitzke et al. 2015) verwendet. Es werden auch weiterhin neue Methoden wie bspw. **Fill-FLOTAC** entwickelt, welche dank einem integrierten Filter und Messkegel das Abwiegen der Probe

Anthelminthika-Resistenzen

überflüssig und somit die EpG-Untersuchung einfacher macht. Doch unabhängig davon, wie genau die Eizahlbestimmung im Kot ist, das Feststellen einer AR ist immer noch davon abhängig, ob die Parasiten in genügendem Maße Eier ausscheiden und die Eiausscheidung nicht durch das Anthelminthikum solange unterdrückt wird, bis sich die Parasiten erholen. Auch Kaplan et al. (2012) haben festgestellt, dass molekulare Untersuchungsmethoden sensitiver und damit dem FECRT überlegen sind, wenn es darum geht AR zu entdecken, gerade und vor allem dann, wenn sich diese, wie im Fall der Weideparasiten der Rinder in Europa, noch im Anfangsstadium ihrer Entwicklung befinden. Ein anderer Vorteil der molekularbiologischen Methoden besteht darin, dass auf Grund von Unterdosierungen AR auch nicht falsch vermutet werden können, wie es beim FECRT möglich ist (De Graef et al. 2012).

Zusätzlich können auch Anthelminthika ein und derselben Klasse unterschiedlich potent sein. Das bedeutet, dass obwohl schon eine AR gegen ein Medikament besteht, der FECRT bei einem anderen Medikament der gleichen Klasse noch > 95 % sein könnte. Laut Kaplan et al. (2012) besteht dieses Problem in allen Anthelminthikaklassen und bei verschiedenen Wirtstierarten.

3.8.2 Anthelminthika-Resistenz Nachweis mittels *in vitro* Verfahren

Auch aufwändigere *in vitro* Verfahren wie das EHA, bei welchem das Schlupfverhalten der Larven bei unterschiedlichen Anthelminthikakonzentrationen beobachtet wird, benötigen den oben beschriebenen Mindestanteil von 25 %, um eine Resistenz überhaupt feststellen zu können (Martin et al. 1989). Hierbei werden die aus den Eiern geschlüpften Larven gezählt und den Eiern, aus denen der Anthelminthikawirkung wegen keine Larven mehr schlüpfen konnten, gegenübergestellt. Mittels dieser Daten kann nun eine Dosis-Wirkungskurve erstellt werden, mit welcher auch die effektive Konzentration von 50 % (EC₅₀) oder 95 % errechnet werden kann. Das ist die Wirkstoffkonzentration, die auf 50 % bzw. 95 % der Eier tödlich wirkt (Coles et al. 1992; von Samson-Himmelstjerna et al. 2009). Abgesehen vom Forschungsaspekt hat die 25 % Marke, unter welcher Resistenzen mittels FECRT oder EHA nicht erkannt werden können, auch eine sehr praktische Bedeutung. Wahrscheinlich entwickeln sich AR am Anfang noch langsam und bleiben meistens unentdeckt, aber dann nimmt der Anteil resistenter Parasiten sehr schnell zu (Jackson et al. 2000). Diese Theorie lässt sich dadurch erklären, dass die anfänglichen geringen Anteile resistenter Allele einerseits lange Zeit vom Tierhalter unentdeckt bleiben, da eine Entwurmung durch ausreichende Reduzierung der Wurmbürde immer noch den gewünschten Effekt bringt, und andererseits wegen des oben beschriebenen Mangels an sensiblen Methoden auch nicht nachgewiesen

Anthelminthika-Resistenzen

werden konnten. Setzen sich die resistenten Allele dann aber immer stärker durch, führt das bei weiterer Anthelminthikagabe, die selektierend wirkt, zu einem immer schnelleren Anstieg des Anteils resistenter Parasiten.

3.8.3 Molekularbiologische Methoden

Eine molekularbiologische Methode um Resistenzen gegenüber BZ festzustellen und welche auch im Weideversuch (Knapp-Lawitzke et al. 2015) verwendet wurde, ist die Pyrosequenzierung. Die im Kapitel 3.7.3 „Molekularbiologische Grundlagen der BZ-Resistenz“ (Seite 31) beschriebenen SNPs sind damit nachweisbar und können als Indikator für den AR-Status der Parasitenpopulation verwendet werden. Unterschiede in der SNP Häufigkeit sind theoretisch schon ab einem Prozent SNP Anteil mit der Pyrosequenzierung darstellbar. Praktisch können Messungen ein und derselben Probe aber um drei bis fünf Prozentpunkte schwanken. Selbst wenn man von einem Mindestanteil von fünf Prozent des SNP ausgeht, welcher sicher detektierbar ist, können mit der Pyrosequenzierung die Anfänge von Resistenzentwicklungen schon viel früher dargestellt werden als mit herkömmlichen Methoden. Leider ist es zum jetzigen Zeitpunkt nur möglich, BZ-Resistenzen pyrosequenzierungstechnisch festzustellen, da keine molekularen Marker für andere Wirkstoffklassen vorhanden sind (Kaplan et al. 2012). Zur Zeit liegen auch nur relativ wenige Daten vor, um molekular nachgewiesene AR mit der Anthelminthikawirkung vergleichen zu können. Hierzu könnten aber die Ergebnisse des Weideversuchs Ansätze liefern, da neben der pyrosequenzierungstechnischen Untersuchung auch regelmäßige EpG-Bestimmungen durchgeführt wurden, die somit eine FECRT Berechnung erlauben. Wie wichtig dies ist belegt eine schwedische Studie, bei der mittels Pyrosequenzierung im Codon 200 von *H. contortus* bei 19 von 45 Schafbetrieben resistente Parasiten nachgewiesen wurden. Gleichzeitig wurde aber nur auf zwei Betrieben ein FECR < 95 % nachgewiesen (Höglund et al. 2009). Dies liegt daran, dass sich die mit Pyrosequenzierungstechnik nachweisbare genotypische AR erst sehr langsam entwickelt und erst, wenn alle relevanten Gene einen bestimmten Schwellenwert erreicht haben, fällt der resistente Phänotyp plötzlich auf.

Somit dürfte es nach wie vor schwierig sein, die Tierhalter davon zu überzeugen, ihr Entwurmungsmanagement nach molekularbiologisch gewonnenen Ergebnissen auszurichten, vor allem da die Tiere meist von mehreren Parasitenspezies befallen sind und diese alle einzeln und jeweils auch einzeln für die jeweiligen Anthelminthika getestet werden müssten und damit entsprechend Kosten verursachen würden (Kaplan et al. 2012).

Anthelminthika-Resistenzen

3.9 Gründe für die Verbreitung von Anthelminthika-Resistenzen

Weltweit gibt es immer mehr Berichte über AR. Das zeigt, wie wichtig es ist, neue Ansätze zu entwickeln, um die Parasitenbürde nachhaltig kontrollieren zu können. Dies ist natürlich nur möglich, wenn die Ursachen und Beschleuniger von AR bekannt sind.

3.9.1 Unterdosierung von Anthelminthika

Eine Fehldosierung von Anthelminthika (aus Kostengründen meistens eine Unterdosierung) kommt in der Praxis häufig vor, da es ohne Waage immer bei einer Schätzung des Gewichts der Rinder bleibt und selten die Möglichkeit besteht, die Tiere auf der Weide zu wiegen. Eine Studie aus Mexiko belegt sogar, dass kein einziger Tierhalter seine Rinder gewogen hat, um die angemessene Levamisoldosis zu berechnen (Becerra-Nava et al. 2014), obwohl eine mögliche Überdosierung von Levamisol zu schwerwiegenden Nebenwirkungen (Hsu 1980) bis hin zum Tod des Tieres führen kann. Somit steigt die Wahrscheinlichkeit, dass die Tiere eine zu geringe Levamisoldosis erhalten haben. Da der Anteil der Betriebe, auf denen AR gegen Levamisol nachgewiesen werden konnte, bei 36,4 % lag und der FECR bei nur 42 % lag, verstärkt sich der Verdacht, dass auch außerhalb des Labors unterdosierte Anthelminthika Resistenzbeschleuniger sein können. Unterdosierung von Anthelminthika dürfte auch in Europa ein großes Problem sein. Weil Anthelminthika teuer sind, erscheint es für Rinderhalter auch wenig sinnvoll „sicherheitshalber“ eine höhere Dosis zu verwenden, vor allem da selbst bei einer Unterdosierung zunächst noch der gewünschte Effekt eintritt: die meisten der Parasiten werden abgetötet und die Produktivität der Tiere erhöht. Die reale Gefahr, die von einer Unterdosierung ausgeht zeigt sich aber darin, dass eine zu geringe Behandlungsdosis tatsächlich dafür sorgen kann, AR in den behandelten Populationen zu entwickeln bzw. deren Entwicklung zu beschleunigen. Dieses wurde in der Studie von Van Zeveren et al. (2007) zum Generieren einer resistenten Population vorsätzlich durchgeführt. In dieser Studie hatte ein zu Beginn zu 100 % für Anthelminthika empfängliches *O. ostertagi* Isolat nach nur sieben Entwurmungsrunden mit unterdosierter IVM Menge und drei Entwurmungen mit therapeutischer IVM Dosis sieben Tage nach Entwurmung nur noch einer FECR von 57 %. Auch im vorliegenden Weideversuch, welcher mit einer Dosis von 50 % Prozent der therapeutischen Albendazol Dosis (bei den ersten Kälbern, die sich auf der Weide mit *O. ostertagi* infizierten) begonnen wurde und welche bis auf 65 % (bei der letzten Kälbergruppe) angehoben wurde, steigerte sich der Anteil der resistenten Allele von 15 % vor der Behandlung bei der ersten Kälbergruppe, die sich auf der Weide infizierte, bis auf fast 90 % nach der letzten Entwurmung bei der letzten Kälbergruppe des Weideversuchs. Der Anteil der resistenten *O.*

Anthelminthika-Resistenzen

ostertagi konnte hier vor und nach Behandlung mittels Pyrosequenzierung genau bestimmt werden.

Eine Unterdosierung kann auch bei genauer Gewichtsbestimmung des Tieres auftreten, bspw. bei einer Verminderung der gewollten Wirkstoffkonzentration durch eine mangelhafte Applikationsart. Der Wirkstoff eines Pour-on-Präparates kommt eventuell in einer zu geringen Dosis beim Parasiten an. Dadurch entsteht der Eindruck einer reduzierten Effizienz. Beispiele hierfür liefert die Studie von Sargison et al. (2009), bei der die Wirkung von Doramectin als Pour-on mit Doramectin als Injektionslösung verglichen wurde. Während bei der Injektion des Avermectins bei zwei Farmen eine 100 % Reduktion der Eizahlen erreicht wurde, konnte das Pour-on auf einer Farm die Eizahl nur um 27 % reduzieren. Bei der zweiten Farm fanden sich noch fünf Wochen nach Pour-on Behandlung ein durchschnittlicher EpG von 243. Würden die FECR Werte nach Pour-on Behandlungen in Studien zur AR Entwicklung einfließen, so würde fälschlicherweise ein zu hoher Anteil resistenter Parasiten gegen Doramectin vermutet. Die Verabreichung des Anthelminthikums als Pour-on kann also zu einer zu geringen Behandlungsdosis führen. Diese kann den Anteil resistenter Allele stark nach oben treiben und verschärft somit die AR Problematik.

3.9.2 Zu häufige Behandlung aus Gründen der Gewinnmaximierung

Da in Deutschland im Zuge der Gewinnmaximierung meist metaphylaktisch entwurmt wird und nicht erst nach einer Kontrolle der Eiausscheidung der Tiere, wird eventuell zu häufig oder bezüglich der Resistenzgefahr zu sorglos entwurmt. Auch Kaplan et al. (2012) stellten fest, dass in den letzten Jahrzehnten Medikamente zu häufig, gleichmäßig und „irrational“ eingesetzt wurden, um eine Produktivitätsmaximierung bei bspw. Rindern oder eine Leistungssteigerung bei Pferden zu erreichen. Dieser sorglose Umgang war ihres Erachtens nur möglich, da Medikamente wie Anthelminthika zu günstig zu erwerben waren. Selbst alternierende Behandlungen, wie der Wechsel zwischen Levamisol und BZ, können die Entwicklung von AR nicht eindämmen, wie der Studie von Leignel et al. (2010) zu entnehmen ist. Dieses Experiment überwachte die Resistenzentwicklung ähnlich dem Weideversuch zusätzlich zum FECRT mittels PCR-Technik, untersuchte aber die BZ-Resistenz von *T. circumcincta* bei Lämmern auf der Weide. Es wurde festgestellt, dass der ursprüngliche Anteil von 25 % BZ-resistenter Nematoden nicht durch Behandlung oder Nichtbehandlung mit Levamisol gesenkt werden konnte. Die Autoren begründen dies damit, dass BZ-resistente und empfängliche *T. circumcincta* eine ähnliche Fitness haben müssen und somit gleichmäßig ihre Gene weitervererben können. Bemerkenswerterweise stieg der Anteil von < 25 % BZ-resistenter *T. circumcincta* Genotypen auf 78 % an, wenn nur mit BZ behandelt wurde. Bei

Anthelminthika-Resistenzen

alternierender Behandlung mit Levamisol stieg der Anteil BZ-resistenter *T. circumcincta* Genotypen auf 47 %. Auch bei reiner Levamisolbehandlung stieg der Anteil auf 28 % BZ-resistenter Genotypen an. Diese Ergebnisse stehen im starkem Gegensatz zu der Behandlungsempfehlung, bei der durch Abwechseln der Anthelminthikaklasse oder gleichzeitige Gabe verschiedener Anthelminthika das Fortschreiten von AR abgebremst werden soll (Andrews 2000). Auch eine Levamisolgabe soll den Anteil BZ-resistenter Trichostrongyliden sogar verringern (Donald et al. 1980). Eine Möglichkeit, die Anzahl von Anthelminthikabehandlungen der Tiere zu reduzieren, ist bspw. die Anwendung von „Targeted Selective Treatments“ (TST) Konzepten (Höglund et al. 2013). Allerdings muss TST angewendet werden bevor der Anteil resistenter Parasiten < 25 % erreicht, denn dann ist die Resistenz so etabliert, dass sie selbst bei einer Verringerung der BZ-Behandlungsfrequenz weiter ansteigt (Leignel et al. 2010). Da, wie im Kapitel 3.8 „Nachweismöglichkeiten der AR“ beschrieben wird, das gängige FECRT-Verfahren erst ab einem Anteil von 25 % resistenter Parasiten die AR überhaupt feststellen kann, zeigt sich deutlich, wie wichtig molekularbiologische Methoden wie die Pyrosequenzierungstechnik sind, um AR frühzeitig zu erkennen.

3.9.3 Unzureichendes Weidemanagement

Eine rotierende Beweidung, bei denen Weiden, um den parasitären Infektionsdruck auf der Weide natürlich zu verringern, lang genug brach liegen, dürfte für die meisten Landwirte in Deutschland nicht möglich sein. Im Rahmen des KLIFF-Projektes, bei dem drei Rinderbetriebe in Niedersachsen beprobt wurden, standen die Kälber jede Saison auf der gleichen Weide, entweder weil keine anderen Weidemöglichkeiten zur Verfügung standen oder aber weil Kälber empfindlicher auf Unwetter reagieren als ausgewachsene Tiere und somit aus logistischen Gründen näher am Stall untergebracht wurden, um bei Wetterumschwüngen oder anderen möglichen Gefahren ein schnelleres Aufstallen zu ermöglichen.

3.9.4 Ein geringes Refugium erhöht den Selektionsdruck

Kurzfristig klingt es demnach so, als ob die zukünftig in Deutschland zu erwartenden heißeren und trockeneren Weidetage, die nach dem derzeitigen Kenntnisstand und wie durch den Gewächshaus- und Klimakammer-Versuch belegt (Knapp-Lawitzke et al. 2014; Knapp-Lawitzke et al. 2016) die Lebensdauer der L3 verkürzen und somit das Larvenvorkommen auf der Weide verkleinern, eine für Rinderhalter positive Folge des Klimawandels sind. Kombiniert mit der gängigen anthelminthischen Behandlung der Rinder ergibt sich aber ein differenzierteres Problem: Neben dem zu häufigen Einsatz von Anthelminthika oder aber der

Anthelminthika-Resistenzen

in der Praxis leider oft vorkommenden ungewollten Unterdosierung konnte nachgewiesen werden, dass auch der durch ein zu geringes Refugium entstehende höhere Selektionsdruck die AR-Bildung beschleunigt (van Wyk 2001; Wolstenholme et al. 2004). Dies belegen auch Studien mit *H. contortus* beim Schaf (Martin et al. 1981), weil hier gezeigt werden konnte, dass ein ausreichend großes Refugium die Resistenzbildung gegen BZ verlangsamen kann. Eine ähnliche Wirkung eines genügend großen Refugiums wird bei Rinderparasiten vermutet (Sutherland et al. 2011). Ein Refugium, also ein Ort, an dem ein gewisser Teil der Larvenpopulation den Anthelminthika nicht ausgesetzt ist, kann auch in unbehandelten Tieren der Herde bestehen. Das wird bspw. bei der Anwendung von Targeted selected treatment (TST) oder Targeted treatment (TT) praktiziert (Fahrenkrog 2013; Höglund et al. 2013; Kenyon et al. 2009). Ein Refugium kann auch im Tier bestehen, wenn sich Entwicklungsstadien der Parasiten in der Darmwand (Hypobiose) der Anthelminthikawirkung entziehen. Dies ist der Fall bei einer Behandlung mit Levamisol, weil diese Anthelminthikaklasse nur Stadien im Verdauungstrakt abtöten kann. Verwendet man allerdings ML, welche fast alle Entwicklungsstadien der Parasiten erreichen, besteht im Tier kein Refugium mehr (Kenyon et al. 2009). Ein Refugium kann sich aber auch außerhalb des Wirtes auf der Weide befinden. Die nicht von Anthelminthikabehandlung betroffenen Parasiten, also die parasitischen Stadien außerhalb des Wirtes (sogenannte Suprapopulation), müssen in den Wirt gelangen und sich fortpflanzen, um ihre für Anthelminthika empfindlichen Allele vererben zu können. Die Suprapopulation ist stark von den Umweltbedingungen abhängig. Wie im Gewächshaus- und Klimakammerversuch beschrieben wird, sterben L3 bei heißen und trockenen klimatischen Bedingungen schneller ab bzw. ihre Fitness leidet darunter (Knapp-Lawitzke et al. 2014; Knapp-Lawitzke et al. 2016). Dies würde bedeuten, dass in Ländern mit wärmerem und trockenerem Wetter ein kleineres Suprapopulationsrefugium besteht als in Ländern mit kühleren und feuchteren Verhältnissen. Belege für diese Vermutung liefert eine Studie aus Griechenland, bei der keine AR in Schaf- und Ziegenherden vom Festland nachgewiesen werden konnten, auf welchem ein feuchteres und kühleres Klima herrschte als auf einer griechischen Insel. Auf der Insel, auf der es heißer und trockener war, konnten hingegen BZ-resistente Parasiten nachgewiesen werden; der Anteil resistenter Parasiten betrug im Schnitt bei den Schafherden 14 % und bei den Ziegenherden 40 % (Papadopoulos et al. 2001). Auch weltweit gesehen fällt auf, dass Berichte über AR häufiger aus Gegenden stammen, in denen sehr warme und oft auch trockene Bedingungen herrschen, wie bspw. in Afrika, Südamerika oder Australien (Anziani et al. 2004; Anziani et al. 2001; Fiel et al. 2001; Mejía et al. 2003; Soutello et al. 2007; Suarez et al. 2007).

4 Wie wirkt sich der Klimawandel auf die Resistenzentwicklung von *Ostertagia* spp. und *Cooperia* spp. in den nächsten 100 Jahren in Deutschland aus?

Es ist mittlerweile erwiesen, dass MDS, die nicht mehr mit gängigen Anthelminthika behandelt werden können, immer häufiger auftreten (Kaplan et al. 2012). Da der Klimawandel wie oben beschrieben in den nächsten 100 Jahren in Deutschland vermutlich zu heißeren Sommertagen mit extremeren Trockenperioden führen wird, sind auch Auswirkungen auf die L3 der Weideparasiten zu erwarten. Dies zeigen sowohl der Gewächshaus- und der Klimakammerversuch sowie die Nebenergebnisse des Weideversuchs (Knapp-Lawitzke et al. 2015; Knapp-Lawitzke et al. 2014; Knapp-Lawitzke et al. 2016). Wie sich länger anhaltender Trockenstress auch in Kombination mit unterschiedlichen Pflanzenszusammensetzungen auf das Vorkommen von *C. oncophora* L3 auswirkt, wurde in dem nachfolgend beschriebenen Gewächshausversuch in Kollaboration mit der Universität Göttingen erforscht. Die Effekte von zu erwartenden höheren Sommertemperaturen im Vergleich zu kühleren Temperaturen in Kombination mit Trockenstress wurden in einem Klimakammerversuch untersucht. Hierbei konnte auch die Lichtintensität mit Tageslichtlampen (inklusive UV-Anteil) gesteuert werden. Beide Experimente zeigen, dass höhere Temperaturen und Trockenstress das Larvenvorkommen auf dem Gras verringern. Dass bei Regenmangel während der Sommertage die Larvenanzahl (hauptsächlich *Ostertagia* spp. und *Cooperia* spp.) auf dem Gras abnimmt, konnte auch in anderen Studien bewiesen werden (Nogareda et al. 2006). Treten in Zukunft trockenere Sommer mit heißeren Tagen in Europa auf, wird dies also die genetische Vielfalt der vom Wirt aufgenommenen L3 verringern. Dieser Umstand sorgt für einen höheren Selektionsdruck der Parasiten und beschleunigt somit die Resistenzbildung. Diese Ergebnisse, kombiniert mit der erstaunlich schnellen Steigerung des resistenten Anteils in der Parasitenpopulation des Weideversuchs zeigen, wie eklatant die Gefahr für die deutsche Rinderhaltung ist, sollten die Halter nicht damit beginnen ihr Entwurmungsmanagement anzupassen.

Publikation "Graswaschmethode"

5 Veröffentlichungen in parasitologischen Fachzeitschriften

5.1 Recovery of strongylid third-stage larvae from herbage samples: standardisation of a laboratory method and its application in the field (Graswaschmethode)

Erstautor: Janina Demeler

Co-Autoren: Friederike Knapp-Lawitzke, Giuliano Mario Corte, Oliver Katzschke, Katharina Steininger, Georg von Samson-Himmelstjerna

Veröffentlicht am 7 März 2012 in „Parasitology Research“, Band 110, Heft 3, Seite 1159-1164

Die Graswaschmethode wurde entwickelt, da eine genau Bestimmung des Larvenvorkommens auf dem Gras grundlegend für alle weiteren Versuche der Doktorarbeit war und die bis dato entwickelten Methoden keine genügend hohe Rückgewinnung, Genauigkeit und Reproduzierbarkeit aufweisen konnten. Es ist eine passive Methode, d. h. dass sie nicht auf einer aktiven Auswanderung der L3 beruht und somit in der Lage ist, auch immotile oder schon tote L3 zu beurteilen. Ihre Effizienz wurde mit *C. oncophora* L3 getestet und es wurden Rückgewinnungsraten, abhängig von der Menge der auf das Gras aufgetragenen L3, zwischen 68 bis 98 % erreicht. Die Methode erlaubt eine schnelle Bearbeitung von Proben, wodurch sie für Feldversuche sehr gut geeignet ist.

Die Entwicklung der Graswaschmethode begann in der Doktorarbeit von Katharina Steininger unter Mithilfe von Giuliano Corte und Oliver Katzschke. Friederike Knapp-Lawitzke arbeitete an der Evaluierung der Graswaschmethode mit und führte die erste Anwendung der Graswaschmethode in Feldversuchen im Rahmen des KLIFF-Projektes aus. Die Feldarbeit fand auf drei Rinderbetrieben mit Weidehaltung in Niedersachsen statt, diese Betriebe befanden sich in drei unterschiedlichen Klimazonen, nämlich Küste (Lammertsfehn), Heide (Jühnde) und Harz (Ruthe). Diese Ergebnisse sind in der Publikation beschrieben.

Publikation "Graswaschmethode"

Die Verlagsversion des Artikels
<http://dx.doi.org/10.1007/s00436-011-2606-y>
ist in der Onlineversion nicht enthalten.

**5.2 Rapid method for recovery of strongylid third-stage larvae from small soil samples
(Erdwaschmethode)**

Erstautor: Friederike Knapp-Lawitzke

Co-Autoren: Georg von Samson-Himmelstjerna, Janina Demeler

Veröffentlicht am 1. Juli 2014 in „Experimental Parasitology“, Band 142, Seite 91-94

L3 von Trichostrongyliden überleben nicht nur auf dem Gras, sondern auch im Boden. Vor dieser Publikation war keine mit geringem Aufwand praktikable Methode verfügbar, die eine ausreichend genaue Rückgewinnung von parasitischen Nematoden aus dem Boden vorweisen konnte. Agrarwissenschaftler haben interessante passive Verfahren zur Bestimmung des Vorkommens von Bodennematoden entwickelt. Eine in den Agrarwissenschaften verwendete Zentrifugations- und Flotationsmethode wurde für *C. oncophora* L3 angepasst, getestet und erzielte eine nur gering schwankende Rückgewinnungsrate von 75,3 %. Die Methode ist außerdem umweltfreundlich, schnell durchführbar und leicht zu erlernen. Die Entwicklung dieser Methode lieferte zusammen mit der Graswaschmethode das Grundwerkzeug für die Durchführung des Gewächshaus- und Klimakammerversuchs und konnte auch im Weideversuch angewendet werden. Ohne eine so genaue passive Erdwaschmethode wäre es nicht möglich gewesen zu untersuchen, wie sich der Klimawandel zukünftig auf freilebende L3 auswirkt, da feine Unterschiede verloren gegangen wären.

Die Literaturrecherche für die Entwicklung bzw. Verfeinerung der Methode, sowie die Evaluierungsexperimente und die statistische Analyse wurden von Friederike Knapp-Lawitzke ausgeführt.

Publikation “Erdwaschmethode”

Die Verlagsversion des Artikels

<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2014.04.006>

ist in der Onlineversion nicht enthalten.

5.3 Assessment of the impact of plant species composition and drought stress on survival of strongylid third-stage larvae in a greenhouse experiment (Gewächshausversuch)

Erstautor: Friederike Knapp-Lawitzke

Co-Autoren: Frank Küchenmeister, Kai Küchenmeister, Georg von Samson-Himmelstjerna, Janina Demeler

Veröffentlicht am 1. November 2014 in „Parasitology Research“, Band 113, Heft 11, Seite 4123-4131

Der Gewächshausversuch wurde durchgeführt, um den Einfluss des zukünftig öfters zu erwartenden Trockenstresses auf freilebende L3 zu untersuchen. Durch insgesamt zehn verschiedene Pflanzenkompositionen konnte zusätzlich deren Einfluss auf das L3 Vorkommen auf Bewuchs und im Boden untersucht werden. Nachdem auf jeden Pflanzencontainer 10 000 *C. oncophora* L3 aufgegeben worden waren, wurden die Töpfe nach einer Woche, vier und sechs Wochen beprobt. Somit konnte auch der Einflussfaktor Zeit auf die L3 untersucht werden. Als wichtige Ergebnisse konnten festgestellt werden, dass der Boden ein wichtiges L3 Refugium darstellt und ein hoher Leguminosenanteil positiv auf das L3 – Vorkommen wirkt, also eine Möglichkeit bieten könnte, das Refugium der Suprapopulation zu vergrößern und somit der Entwicklung von AR entgegenzuwirken.

Die Pflanzencontainer im Gewächshaus wurden von der Agrarwissenschaftlichen Fakultät der Universität Göttingen bereitgestellt. Kai und Frank Küchenmeister haben in Experimenten die dem Gewächshausversuch voraus gegangen sind die unterschiedlichen Pflanzenkompositionen berechnet, angebaut und während des Gewächshausversuchs die Dauer des Trockenstresses sowie die Bewässerung der Kontrolltöpfe kontrolliert. Die Gras- und Bodenproben wurden von Friederike Knapp-Lawitzke in Göttingen genommen und in Berlin von ihr und mit Hilfe von Oliver Katzschke untersucht. Der Artikel wurde hauptsächlich von Friederike Knapp-Lawitzke geschrieben. Frank und Kai Küchenmeister haben im Material-, Methoden- und Ergebnisteil die Abschnitte über den Aufbau der Pflanzencontainer, die Pflanzenkomposition und ihr Bewässerungsmanagement verfasst. Verena Pflieger von der statistischen Beratungseinheit der Freien Universität wirkte beratend bei der Entwicklung der statistischen Modelle mit.



Abbildung 7 Teil der insgesamt 80 Pflanztöpfe im Gewächshaus der Agrarwissenschaftlichen Universität Göttingen

Publikation „Gewächshausversuch“

Die Verlagsversion des Artikels

<http://dx.doi.org/10.1007/s00436-014-4084-5>

ist in der Onlineversion nicht enthalten.

5.4 Rapid selection for β -tubulin alleles in codon 200 conferring benzimidazole resistance in an *Ostertagia ostertagi* isolate on pasture (Weideversuch)

Erstautor: Friederike Knapp-Lawitzke

Co-Autoren: Georg von Samson-Himmelstjerna, Jürgen Krücken, Sabrina Ramünke, Janina Demeler

Veröffentlicht am 7. Februar 2015 in „Veterinary Parasitology“, Band 209, Heft 1-2, Seite 84-92

Da sich weltweit die BZ-Resistenz bei Rinderparasiten stark verbreitet, wurde im Weideversuch mittels fünf naiver Kälbergruppen und der molekularbiologischen Pyrosequenzierungsmethode untersucht, wie sich ein unterdosiertes Behandlungsmanagement auf die Resistenzentwicklung eines teilweise resistenten *O. ostertagi* Isolates auswirkt. Das Experiment zeigte deutlich, wie rapide der Anteil resistenter *O. ostertagi* durch eine frequente und unterdosierte Albendazolgabe (ein Umstand, der in der Praxis häufig vorkommt) ansteigen kann. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Pyrosequenzierung Resistenzen viel früher detektieren und eine viel genauere Resistenzüberwachung liefern kann als der standardmäßig eingesetzte FECRT, welcher die durch anthelminthische Behandlung erzielte Parasiteneizahlreduktion im Kot des Wirtstieres überwacht. Leider funktioniert die Methode der Pyrosequenzierung bis jetzt nur zur Überwachung bei BZ-Resistenzen, weil nur hier die für die Resistenz verantwortlichen Allele bekannt sind. Die Graswasch- und Erdwaschmethode wurde im Weideversuch erfolgreich zur Beprobung der Weide eingesetzt und zeigte, dass das L3-Vorkommen auf dem Gras stark von den Wetterbedingungen des jeweiligen Probenabgabetermins abhängig war.

Die Kälber und die Weidefläche wurde regelmäßig von Friederike Knapp-Lawitzke beprobt, ebenso wie die Überwachung der EpG-Werte, Larvenkulturanzucht, DNA-Isolierung und Pyrosequenzierung. Die Pyrosequenzierung fand unter Anleitung von Sabrina Ramünke statt. Der Artikel wurde zu großen Teilen von Friederike Knapp-Lawitzke geschrieben.

Publikation “Weideversuch“

Die Verlagsversion des Artikels
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.02.005>
ist in der Onlineversion nicht enthalten.

5.5 Elevated temperatures and long drought periods have a negative impact on survival and fitness of strongylid third stage larvae (Klimakammerversuch)

Erstautor: Friederike Knapp-Lawitzke

Co-Autoren: Georg von Samson-Himmelstjerna, Janina Demeler

Online verfügbar seit 30. Januar 2016 in „International Journal for Parasitology“, gedruckt im April 2016 in Band 46, Heft 4, Seite 229-237

Der Klimakammerversuch untersuchte den Effekt von laut des IPPC in der Zukunft zu erwartenden heißeren und trockeneren Sommern in Deutschland auf das Vorkommen und die Fitness von *C. oncophora* L3. Hierfür wurde in 106 Töpfchen *L. perenne* (deutsches Weidelgras) angezchtet. Es liefen zwei unterschiedliche Temperatur- und Lichtprofile. Die Töpfe waren zur Hälfte Trockenstress ausgesetzt und die andere Hälfte wurde ausreichend gegossen. Nach einer Woche, zwei, drei und sechs Wochen wurde das L3 Vorkommen auf Gras und im Boden mittels der beschriebenen Gras- und Erdwaschmethode untersucht. Der Einfluss der Faktoren Temperatur, Trockenstress und Dauer wurde statistisch deskriptiv und mittels linearer Modelle untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass die zukünftigen Sommer das Vorkommen und die Fitness der Suprapopulation reduzieren werden. Dies könnte erklären, warum AR bis jetzt öfters in Ländern mit heißen und trockeneren klimatischen Bedingungen als in Europa auftreten. Außerdem konnte bewiesen werden, dass sich ein großer Anteil der L3 im Boden aufhält, was verdeutlicht, wie wichtig Bodenprobennahmen bei einer Weidebeprobung sind. Der Klimakammerversuch stellte bezüglich des Ausschlusses von Störfaktoren und besser zu untersuchenden Bodenvolumina eine Verbesserung des Gewächshausversuchs dar.

Die Anzucht und Inokulation der Töpfchen sowie die Bearbeitung der Proben wurde von Friederike Knapp-Lawitzke ausgeführt. Die statistische Auswertung wurde von Verena Pflieger von der statistischen Beratungseinheit der Freien Universität unterstützt.

Publikation “Klimakammerversuch”

Die Verlagsversion des Artikels
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.10.006>
ist in der Onlineversion nicht enthalten.

Diskussion der Gras- und Erdwaschmethode

Diskussion:

6 Einzeldiskussionen

6.1 Diskussion der Graswaschmethode

Alle nachfolgend durchgeführten Versuche benötigen die Erkenntnisse aus der Entwicklung und Anwendung der Graswaschmethode. Für eine möglichst exakte Ermittlung der Larvenzahlen war es wichtig eine neue, passive Methode zu entwickeln, die eine sehr hohe und stabile Wiedergewinnungsrate hat. Methoden, die auf dem aktiven Auswanderungsverhalten von L3 basieren, wären nicht geeignet gewesen, da so keine toten oder immotilen L3, die zu schwach zum Auswandern sind, gezählt werden können. Gerade bei der Fitnessbeurteilung von L3 im Klimakammerversuch wären bei Benutzung einer aktiven Methode wichtige Ergebnisse und Erkenntnisse verloren gegangen. In vergleichbaren, ebenfalls passiven Graswaschmethoden, die innerhalb des letzten Jahrhunderts beschrieben wurden, schwanken die Rückgewinnungsrate meist stark. Wie bspw. bei der durch Sedimentationszeit über Nacht zeitintensiven Methode von Durie (1959) mit 61–94 % und somit durchschnittlich angenommenen 74 % Rückgewinnungsrate. Die Methode von Young et al. (1980b) hat eine Rückgewinnungsrate von nur 50 % und ist mit mehreren Zentrifugations- und Sedimentationsschritten über Nacht verbunden. Die Methode von Martin et al. (1990) erlaubt durch zweimalige Flotationsbearbeitung der gleichen Probe eine Summierung der in beiden Schritten wiedergewonnenen L3 zwar eine Rückgewinnungsrate von bis zu 96 %, doch auch diese Methode ist sehr arbeitsintensiv, da jede Probe eingeweicht, mittels Alkohol konserviert und über Nacht sedimentieren muss.

Die hier beschriebene Graswaschmethode benötigt inklusive Einweichzeit in mit einem Polysorbat versehener Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS-Tween), Waschvorgang mit Trennung der L3 vom Gras mittels zwei Sieben (kleinste Sieböffnung 250 µm) und zwei Zentrifugationsschritten bei 890 × G keine fünf Stunden Bearbeitungszeit pro Probe. Sie hat eine Wiedergewinnungsrate zwischen 68 % und 98 % der L3 von Gras, so dass 86 % für Hochrechnungen angenommen werden können. Bei einer stärker schwankenden Rückgewinnungsrate müsste die Wiederholbarkeit der weiteren Experimente angezweifelt werden, da so die möglichen Effekte von Trockenstress im Gewächshausversuch oder der relativ kleinen Temperaturunterschiede im Klimakammerversuch „verwaschen“ werden würden. Die Graswaschmethode fand außerdem Anwendung im Weideversuch.

6.2 Diskussion der Erdwaschmethode

Für den Gewächshaus- und Klimakammerversuch musste auch eine neue Methode zur passiven Rückgewinnung von parasitischen L3 aus Bodenproben entwickelt werden. Da im

Diskussion der Gras- und Erdwaschmethode

Gewächshausversuch wegen des großen Probenaufkommens eine gleichzeitige Bearbeitung der Proben nicht möglich war und diese deshalb mittels Formaldehydlösung konserviert wurden, konnte keine aktive Methode zur Rückgewinnung von L3 angewendet werden. Außerdem hat genau wie bei der Graswaschmethode eine passive Rückgewinnung von L3 den Vorteil, dass auch momentan inhibierte oder schon tote L3 gezählt werden können. Auch hier war eine geringe Schwankung der Rückgewinnungsrate wichtig, um eine gute Wiederholbarkeit der Experimente zu gewährleisten. Mit der hier beschriebenen Methode wurde eine Rückgewinnungsrate von 75,3 % und einer Schwankung von nur 60,8–88,6 % erreicht. Im Vergleich dazu hat die Methode zur passiven Rückgewinnung von L3 aus Bodenproben mittels Zentrifugations- und Flotationstechnik von Young et al. (1980b) eine „hochgerechnete“ Rückgewinnungsrate von 64–110,2 %. Bei einer so breiten Spanne würden die Effekte von Trockenstress, Temperatur und Zeit im Gewächshaus- und Klimakammerversuch auf das L3 Vorkommen im Boden nicht mehr dargestellt werden können. Die während der Doktorarbeit entwickelte Methode konnte auch im Weideversuch erfolgreich angewendet werden, da sich hier zeigte, dass sich im Lauf der Weideperiode immer mehr L3 in Bodenproben nachweisen ließen.

6.2.1 Beitrag der Gras- und Erdwaschmethode zum Fortschritt der Wissenschaft

Die stabilen und hohen Wiedergewinnungsraten der Gras- und Erdwaschmethode erlauben eine genauere Beurteilung von Umweltweinflüssen auf das Vorkommen und Überleben von L3 auf Gras und im Boden. Bei wissenschaftlichen Experimenten, in denen Methoden mit stark schwankenden und schlechten Wiedergewinnungsraten verwendet werden, sind die gewonnenen Ergebnisse oft fraglich oder nur schwer zu interpretieren. Denn es kann nicht bestimmt werden, ob etwaige Unterschiede von Grasspezies, Temperatur und Feuchtigkeit herrühren oder aber durch die ungenaue Wiedergewinnungsrate der L3 zufällig entstanden sind. Somit kann die Anwendung der modifizierten und verbesserten Gras- und Erdwaschmethoden wissenschaftliche Experimente in Zukunft vorantreiben.

Außerdem ist eine gut funktionierende Methode, um die Dichte und unterschiedlichen Spezies von Weideparasiten auf der Weide feststellen zu können, auch praxisrelevant. Soll die Gesundheit und Produktivität von Rindern auch ohne „prophylaktische“ Bolusgabe eines Anthelminthikums nicht gefährdet werden, ist es wichtig zu wissen, wie hoch das Larvenvorkommen auf der Weide ist. Nur wenn die infektiöse MDS-Population auf der Weide bestimmt werden kann, kann vorhergesagt werden, wie groß die MDS Belastung für den Viehbestand ist und wie groß das Risiko einer Trichostrongylidose ist (Boa et al. 1998). Auch aus epidemiologischer Sicht ist es wichtig bestimmen zu können, wie sich die Anzahl der L3

Diskussion der Gras- und Erdwaschmethode

auf der Weide verhält (Martin et al. 1990). Martin et al. (1990) beschreiben, dass es zwei Möglichkeiten gibt, um die Anzahl parasitischer L3 auf Weideland zu bestimmen. Entweder mittels der Grasprobennahme oder durch die Verwendung von Tracer-Tieren, die mit der eigentlichen Herde auf der Weide grasen und dabei durch ihr den Herdentieren ähnliches Weideverhalten L3 natürlich aufnehmen. Die Tracertiere werden getötet und die Anzahl der adulten Parasitenstadien im Darm gezählt. Dieses Vorgehen ist natürlich sehr kosten- und zeitintensiv und auch tierschutzrechtlich fraglich, hat aber den Vorteil, dass die Weide über eine größere Zeitspanne „beprob“ wird. Andererseits reagiert jedes Tier anders auf Parasiten und es kann nicht davon ausgegangen werden, dass sich jede aufgenommene L3 zu einem adulten Stadium entwickelt hat. Die zwei Wochen, die die Tracertiere in der genannten Studie Zeit hatten L3 aufzunehmen, schienen jedenfalls nicht ausgereicht zu haben, denn in den Tracertieren wurde nur eine sehr geringe Anzahl adulter Würmer gefunden. Deshalb gehen die Autoren davon aus, dass die Weidebeprobung mit seiner Graswaschmethode genauer ist. Die in dieser Doktorarbeit beschriebene Graswaschmethode hat eine höhere Wiedergewinnungsrate und müsste demnach das L3 Vorkommen auf der Weide auch besser bestimmen können als die Methode, die im Versuch mit den Tracertieren verwendet wurde. Allerdings muss hier bedacht werden, dass auch das Probenvolumen an Gras pro Weide welches verwendet wird, einen Einfluß auf die Genauigkeit hat. Andererseits kann niemals das komplette Gras einer Weide untersucht werden, deshalb werden bei jedem bekannten Grasprobennahmeverfahren immer nur Stichproben untersucht. Die neu beschriebene Graswaschmethode ist auf kleine Proben ausgelegt, dies dürfte aber kein Problem darstellen, da bei einem für die Rindergesundheit relevanten, also hohen L3 Vorkommen, die L3 in den Stichproben auftauchen müssen. Die zusätzliche Probennahme von Bodenproben erhöht die Chance L3 zu finden, welche sich seit längerer Zeit oder auch bei kritischen Umweltbedingungen (Hitze, Trockenheit) auf der Weide aufhalten und beim nächsten Regen wieder auf das Gras wandern könnten. Die Graswaschmethode und die Erdwaschmethode wurden jeweils für eine Grasart (*L. perenne*) und Bodensorte (handelsübliche Gartenerde, OBI) getestet. *L. perenne* wurde ausgewählt, da es eine in Deutschland und Europa sehr häufig vorkommende Grasart ist. Dies wurde auch im Rahmen der Weidebeprobung dreier Betriebe an der Küste, der Heide und im Harz in Niedersachsen bestätigt (Hohlmann 2011). Aus diesem Grund dürfte die Graswaschmethode in der Praxis in Deutschland gut anwendbar sein. Handelsübliche Gartenerde wurde aus Gründen der einfachen Beschaffung verwendet, zusätzlich wurde der Boden für die Versuche wärmebehandelt. Dadurch wurde es nicht nur einfacher die L3 auszuzählen, weil das Vorkommen von Bodennematoden erheblich vermindert wurde, sondern es konnte auch die Gefahr ausgeschlossen werden, dass Bodennematoden Reste von abgestorbenen L3 auffressen und somit dem Auswertungsprozess entziehen. Allerdings zeigte sich beim Vergleich von Proben mit

Diskussion der Gras- und Erdwaschmethode

Bodennematoden und Proben ohne Bodennematoden, dass diese das Vorkommen von L3 auf Gras und im Boden und deren Fitness nicht beeinflussen. Diese zusätzliche Information ist wichtig, weil so die Ergebnisse des Experiments besser in die Praxis übertragen werden können, da auf jeder Weide natürlicherweise Bodennematoden sowohl im Boden als auch in großer Zahl auf dem Gras vorkommen.

Es ist bereits beschrieben worden, dass L3 auf dem Gras und im Boden je nach Temperatur und Feuchtigkeit mehrere Monate oder sogar länger überleben können (Boag et al. 1985). Schon seit Mitte des letzten Jahrhunderts ist das Wissen verbreitet, dass L3 in der Lage sind, sich selbstständig zwischen unterschiedlichen Höhen auf Grashalmen zu bewegen. Dies wurde auch in jüngerer Zeit wiederholt bestätigt (Crofton 1948; Saunders et al. 2000; Silangwa et al. 1964). Die Möglichkeit bis in den Boden zu wandern würde den MDS Larven einen Evolutionsvorteil verschaffen, denn einerseits müssen sie möglichst hoch auf einem Grashalm sitzen, um die Chance zu erhöhen vom Wirtstier aufgenommen zu werden, und andererseits sind sie in tieferen Grasschichten oder im Boden viel besser vor Austrocknung, zu hohen oder zu niedrigen Temperaturen und schädigender UV-Strahlung geschützt. Diese Faktoren sind dafür bekannt, die Lebensdauer von Trichostrongyliden L3 zu verkürzen. Der Umstand, dass ein großer Teil der L3 Population den Boden als Rückzugsort vor schädlichen Einflüssen nützen könnte, wurde bereits bei der Evaluierung der Graswaschmethode beobachtet. Hier waren die Wiedergewinnungsraten der L3 von Gras, welches mit Boden in Kontakt war, sehr viel geringer, als wenn das Gras separiert von Boden mit L3 inokuliert wurde (Demeler et al. 2012). Die Bodenstichproben des Gewächshausversuchs erhärteten diesen Verdacht zusätzlich (Knapp-Lawitzke et al. 2014). Ein weiterer Beweis konnte mit dem Klimakammerversuch erbracht werden, weil es erst mit dem hier verwendeten kleineren Bodenvolumen möglich war, den Boden komplett zu untersuchen. Unter Parasitologen war dieser Umstand lange Zeit nicht bekannt und die Meinung verbreitet, dass das L3 Vorkommen im Boden vernachlässigbar gering ist (Williams et al. 1973). Dies erklärt, warum auch in jüngerer Zeit bei Feldstudien häufig nur Gras aber keine Bodenproben untersucht werden (Fiel et al. 2012) und warum man sich in der Parasitologie im Gegensatz zu Verfahren für die Rückgewinnung von L3 vom Gras selten mit der Untersuchung von Bodenproben beschäftigt hat. Agrarwissenschaftler haben viele verschiedene Verfahren zur Bestimmung des Bodennematodenvorkommens entwickelt: Es gibt aktive Verfahren, bei denen die Nematoden aus eigener Kraft aus der Probe auswandern. Meistens wird die Probe hierfür über einem Sieb auf einem sogenannten Baermann-Trichter aufgebracht. Die Wiedergewinnungsrate der L3 kann beim aktiven Verfahren noch durch vorgeschaltetes Sieben verbessert werden, da dieses verhindert, dass zu viele und zu große Debrisanteile die Auswanderung der L3 behindern (Lišková et al. 2007; Moser et al. 2009; Viglierchio et al. 1983). Trotz dieser Verbesserungen kann nicht davon ausgegangen werden, dass es für alle beweglichen L3 möglich ist,

Diskussion der Gras- und Erdwaschmethode

auszuwandern. Zusätzlich können L3, die zwar leben, sich aber gerade in einer unbeweglichen oder kryptobiotischen Phase befinden, und tote, aber theoretisch noch identifizierbare L3, mit der aktiven Methode gar nicht gezählt werden. Deshalb beschreiben passive Methoden das gesamte Larvenartenspektrum im Boden besser, was schon von Freckman et al. (1975) festgestellt wurde. Passive Verfahren um L3 aus dem Boden zu gewinnen haben den Vorteil, dass auch unbewegliche Stadien gezählt werden können und weniger Verluste bei den beweglichen Stadien zu erwarten sind. Die passiven Verfahren beruhen auf der Trennung von L3 und Boden auf Grund der Größe oder Dichte: Bei der „reverse water flow and sieving“ Methode von Verschoor und De Goede (2000) werden beide Faktoren ausgenutzt. Bei Zentrifugations-Flotations Techniken werden nach vorhergehenden Siebschritten die L3 durch einen Zentrifugationsschritt in einer Flotationslösung von den Erdpartikeln getrennt, ähnlich wird auch bei der Zucker-Flotations-Siebe Technik vorgegangen (Freckman et al. 1975). Die während der Doktorarbeit entwickelte Erdwaschmethode hat den Vorteil, dass die verwendete gesättigte Zuckerlösung als Flotationsmedium im Gegensatz zur oftmals verwendeten Zinksulfat-Lösung (Zajac et al. 2002) nicht umwelt- und gesundheitsschädlich ist und daher nach dem letzten Sieben in den normalen Abfluss gespült werden kann. Der Oostenbrink-Elutriator verwendet nur Wasserdruck, um die Nematoden flotieren zu lassen. Allerdings muss die Probe, um eine gute Rückgewinnung von L3 zu erzielen, hierbei mehrere Tage gewaschen werden, was einen erheblichen Energiebedarf bedeutet. Bei der Oostenbrink-Elutriator Methode mittels eines Baumwollfilters wurden die Rückgewinnungsraten bestimmt (Verschoor et al. 2000). Bei einer Waschzeit der Proben von 24 Stunden werden nur 49 % der Nematoden rückgewonnen und nach drei Tagen Waschzeit liegt die Rückgewinnungsrate bei 82 %. Die Rückgewinnungsrate leidet auch, wenn die Probenvolumen 50 Gramm übersteigen. Das bedeutet, dass die entwickelte Erdwaschmethode für kleine Probenvolumen bis 100 Gramm zeitaufwand- und energietechnisch dem Oostenbrink-Elutriator überlegen ist. Der schmale Bereich der Schwankung der Rückgewinnungsrate der Erdwaschmethode von 60,8 – 88,6 % erleichtert die Hochrechnung auf das gesamte L3 Vorkommen im Boden. Je stärker die Rückgewinnung schwankt, desto weniger Aussagekraft hat die Interpretation von Faktoren, die das Larvenvorkommen beeinflussen, weil gerade kleinere Schwankungen auch dem Zufall der ungenauen Rückgewinnungsrate geschuldet sein können. Bei früher benutzten, passiven Methoden schwankt die Rückgewinnung zwischen 55 – 94 % (Durie 1959) oder wie oben erwähnt sogar zwischen 64 und 110 % (Young et al. 1980b). Dies zeigt, wie wichtig die Entwicklung einer passiven Rückgewinnungsmethode von parasitischen L3 aus dem Boden war. Aber auch eine insgesamt schlechte Rückgewinnungsrate kann den Einfluss von Umweltbedingungen auf die L3 im Boden verschleiern. Bspw. kommen Callinan et al. (1986) bei der Anwendung der Methode von Young et al. (1980b) auf eine durchschnittliche Rückgewinnungsrate von gerade 42 %. Bei so geringen Rückgewinnungsraten ist es sehr

Diskussion der Gras- und Erdwaschmethode

wahrscheinlich, dass durch Umweltfaktoren ausgelöste kleinere Veränderungen im L3 Vorkommen übersehen werden.

Diskussion des Gewächshausversuchs

6.3 Diskussion des Gewächshausversuchs

Der Gewächshausversuch fand in einer Kooperation mit der Fakultät für Agrarwissenschaften der Georg-August-Universität Göttingen im Rahmen des oben beschriebenen KLIFF Projektes statt und untersuchte die Auswirkungen von Trockenstress, Pflanzenzusammensetzung und Dauer auf das L3 Vorkommen auf Gras sowie im Boden. Der Versuch fand in über 22 Monate etablierten großen Pflanztöpfen statt, die in vorhergehenden Pflanzenwachstumsexperimenten benutzt worden waren, um den Einfluss von Trockenstress und Leguminosenanteil zu untersuchen (Küchenmeister et al. 2012a; Küchenmeister K et al. 2013; Küchenmeister et al. 2012b). Die gewonnenen Erkenntnisse konnten verwendet werden, um die Ergebnisse des Gewächshausversuchs mit den *C. oncophora* L3 besser zu interpretieren: Pflanzenmischungen mit und ohne Leguminosenanteil unterscheiden sich dadurch, dass Leguminosen die Fähigkeit zur Symbiose mit stickstofffixierenden Bakterien besitzen. Somit können sie selbst Nitrat erzeugen, was einen düngemittelähnlichen Effekt auf die anderen Pflanzen hat. Das dadurch verbesserte Wachstum der Grasmischung führt zu einer dichteren Pflanzendecke, die sowohl den Boden als auch die L3 besser vor Austrocknung schützt. Andererseits benötigen Pflanzenmischungen mit Leguminosenanteil mehr Wasser, was sich in einem früheren Einsetzen von Trockenstress äußert. Dass die Pflanzenart, die Form von Grashalmen und die Pflanzenzusammensetzung einen Einfluss auf das Wanderverhalten von trichostrongyloiden L3 haben können, wurde schon früher für eine Mischung aus *Haemonchus placei*, *C. oncophora* und *T. colubriformis* L3 von Silangwa et al. (1964) und für *Teladorsagia* und *Trichostrongylus* spp. von Callinan et al. (1986) beschrieben. Als Modellparasit für den Gewächshaus- und den Klimakammerversuch (Knapp-Lawitzke et al. 2014; Knapp-Lawitzke et al. 2016) wurde *C. oncophora* gewählt, da dieser bei praktisch jedem Befall mit Trichostrongyloiden in Deutschland in großer Menge vorkommt und auch in Ländern mit etwas wärmeren klimatischen Bedingungen – wie sie zukünftig in Deutschland auftreten könnten – bspw. in Spanien sehr häufig zu finden ist (Nogareda et al. 2006).

6.3.1 Beitrag des Gewächshausversuchs zum Fortschritt der Wissenschaft

Der Gewächshausversuch hat mit der Überprüfung des Einflusses von Pflanzenzusammensetzung und Trockenstress neue Erkenntnisse bezüglich des L3 Verhaltens auf der Weide liefern können. Obwohl es nur ein semi-kontrolliertes Experiment war, da die Temperatur und UV-Strahlung nicht wirklich regelbar waren und durch offene Fenster möglicherweise auch andere Störfaktoren eingebracht werden konnten, wurden statistisch signifikante Unterschiede bezüglich des Leguminosenanteils und des Einflusses

Diskussion des Gewächshausversuchs

von Trockenstress festgestellt. Es konnte bei allen Töpfen jedoch nur ein sehr geringer Anteil der ursprünglich aufgetragenen 10.000 L3 pro Topf wiedergefunden werden. Dies ist aber nicht verwunderlich, da nicht das komplette Bodenvolumen der Gewächshäustöpfe untersucht werden konnte. Es liegt die Vermutung nahe, dass ähnlich wie in Feldversuchen der größte Anteil der L3 in den Boden abgewandert oder mit dem Gießwasser „versickert“ ist (Gruner et al. 1982) und deshalb nicht erfaßt wurde, weil in Feldversuchen (Amaradasa et al. 2010) ähnlich geringe Wiedergewinnungsraten vorkommen. Auch wenn im Vergleich zur fast kompletten Untersuchung des Bewuchses nur Bodenstichproben untersucht werden konnten, zeigte sich deutlich, wie hoch der Anteil von L3 im Boden ist. Dies steht im starken Gegensatz zur Aussage von Williams et al. (1973), welche davon ausgehen, dass der Anteil der L3 Population im Boden vernachlässigbar gering ist. Ein weiteres Problem der Probennahme im Gewächshausversuch, welches für die geringe Rückgewinnung verantwortlich sein könnte, war, dass die Pflanzen in einer Höhe von drei Zentimetern abgeschnitten werden mussten, also der Grasbewuchs nur oberhalb von drei Zentimetern untersucht werden konnte. Dies war nötig, weil ein kürzerer Schnitt erneutes Pflanzenwachstum verhindert hätte. Für die Fakultät für Agrarwissenschaften der Georg-August-Universität Göttingen wäre dies nicht tragbar gewesen, weil zum Zeitpunkt des Gewächshausversuchs noch nicht klar war, ob die Pflanztöpfe auch noch weiterhin von Agrarwissenschaftlern für Versuche genutzt werden würden. Es wurde aber schon öfters beschrieben, dass der Großteil der L3 auf dem Gras im unteren Bereich der Pflanze sitzt (Amaradasa et al. 2010; Burggraaf et al. 2010; Callinan et al. 1986; Fernandez et al. 2001; Rose 1961), d.h. durch das Schneiden der Pflanztöpfe in einer Höhe von drei Zentimetern könnte ein nicht unerheblicher Anteil an der L3 Population verloren gegangen sein. Zusätzlich könnten beim Gießen der Töpfe L3 weggespült worden sein, entweder durch Spritzwasser direkt von der Pflanze oder durch Abflusslöcher im Boden der Pflanztöpfe. Trotz dieser Limitationen konnten statistisch signifikante Ergebnisse errechnet werden, welche den positiven Effekt von Leguminosen und den negativen Effekt von Dauer und Trockenstress auf das L3 Vorkommen auf dem Gras beschreiben. Gerade die Ergebnisse bezüglich Leguminosen sind interessant, da es unter Landwirten schon bekannt ist, dass bei vermehrtem Kleevorkommen auf der Weide auch ein stärkerer MDS-Befall zu erwarten ist. Dies wurde durch wissenschaftliche Versuche aber bis jetzt noch nicht belegt, da beim Einsatz von Tracertieren die kondensierten Tannine im Klee dafür sorgen, dass sich nicht viele adulte Parasiten im Darm der Tiere ansiedeln können. Dadurch entsteht der Eindruck, dass ein hoher Leguminosenanteil auf der Weide einen negativen Effekt auf das L3 Vorkommen hat. Der negative Einfluss von Trockenstress auf das L3 Vorkommen konnte durch das Experiment noch bestätigt werden. Einen negativen Effekt konnte man auch für die Dauer nachweisen, denn je länger das Experiment durchgeführt wurde, desto weniger L3 konnten auf dem Gras

Diskussion des Gewächshausversuchs

gefunden werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem sehr einfachen, da nur auf dem Zeitfaktor beruhenden, Modell von Grenfell et al. (1986).

6.4 Diskussion des Weideversuchs

Im Weideversuch konnte erfolgreich untersucht werden, wie sich regelmäßige, unterdosierte Entwurmungen auf die Resistenzbildung von *O. ostertagi* bei parasitennaiven Kälbern auswirken. Hierfür grasten insgesamt fünf Kälbergruppen nacheinander auf einer großen Weide, deren Parasitenbelastung mittels Gras- und Bodenprobennahmen überprüft wurde. Die Gras- und Bodenprobennahme fand in regelmäßigen Abständen statt. Das Larvenvorkommen nahm im Verlauf des Weideversuchs zu, was einer natürlichen Epidemiologie für MDS-Parasiten in Deutschland entspricht (Boch et al. 2006). Zusätzlich schwankte die Larvendichte auf der Weide mit den Wetterbedingungen. Der Umstand, dass sich bei trockeneren Wetterbedingungen weniger L3 auf dem Gras finden lassen, deckt sich mit den Beobachtungen des Gewächshaus- und Klimakammerversuchs und erklärt frühere Ergebnisse, bei denen in Sommern mit vielen trockenen Tagen weniger Parasiten auf dem Gras gefunden wurden (Agneessens et al. 1997; Eysker et al. 2005).

Die erste Kälbergruppe wurde oral mit einem für BZ teilresistenten *O. ostertagi* Isolat infiziert. Die nachfolgenden Kälbergruppen konnten sich alle erfolgreich natürlich beim Gras auf der durch die vorgehenden Gruppen kontaminierten Weiden infizieren. Alle Kälbergruppen wurden einmalig mit einer subtherapeutischen BZ-Dosis behandelt, welche über den Versuch hin erhöht wurde (von 35 % auf 65 % der therapeutischen Dosis).

Die Erhöhung der mit BZ-Resistenz korrelierten Allele in den aus Kotkulturen der Kälber gewonnenen Larven konnte im Weideversuch mittels Pyrosequenzierung überwacht werden. Mittels speziesspezifischer PCR war es möglich festzustellen, dass in jeder der Proben die Zielspezies vorkam und auch welche anderen Spezies vorhanden waren. Als Vorbereitung für die Pyrosequenzierung ist eine PCR, welche ausschließlich den Bereich des Codon 200 von *O. ostertagi* amplifiziert, nötig. Da der zu dieser PCR zugehörige Primer keine Kreuzreaktionen mit anderen Spezies zeigte, beschreiben die Ergebnisse des Weideversuchs ausschließlich den Anstieg der resistenzassoziierten Allele von *O. ostertagi*. Somit konnte für jede Kälbergruppe vor und nach Behandlung mit der subtherapeutischen BZ-Dosis das Verhältnis für BZ empfindliche Parasiten ohne SNP (TTC) und BZ-resistente Parasiten mit SNP (TAC) dargestellt werden. Der Anteil des TAC Alleles stieg im Verlauf des Experiments bei den Kälbergruppen, die sich beim Gras infizierten, von 15 % auf 55 % vor Behandlung und nach BZ-Behandlung sogar von 55 % auf 89 % an. Das bedeutet, dass nur vier subtherapeutische Behandlungen ausreichend waren, um den SNP – Anteil in der letzten Kälbergruppe auf 89 % zu heben. Dies ist ein extremer Anstieg für einen Feldversuch. In einem Versuch auf einem belgischen Milchviehbetrieb wurden die Kälber mit Maissilage gefüttert. Sie durften also im Gegensatz zum Weideversuch nicht grasen und konnten sich somit nicht mit weiteren Parasiten infizieren (Van Zeveren et al. 2007). Hier war es möglich, mittels subtherapeutischer

Diskussion des Weideversuchs

IVM Behandlungen nach nur zehn Generationswechseln einer ursprünglich für IVM empfindlichen *O. ostertagi* Population resistent zu machen. Die Resistenz war so stark ausgebildet, dass bei einer therapeutischen IVM Dosis die FECR sieben Tage nach Behandlung bei nur 57 % und 14 Tage nach Behandlung nur bei 65 % lag (Van Zeveren et al. 2007). Die innovative Benutzung von Pyrosequenzierung als Möglichkeit zum Monitoring der Veränderungen der Resistenz assoziierten Allele im Weideversuch konnte durchgeführt werden, da es sich um eine BZ-Resistenz handelte und die drei möglichen SNP, an denen BZ-Resistenzen bei *O. ostertagi* vorkommen können, bereits bekannt waren. Bei dem hier gewählten Isolat befand sich der SNP an Stelle des Codon 200 im β -Tubulin Typ 1. Der Einsatz der Pyrosequenzierung als sehr sensitives Werkzeug zum Resistenzmonitoring hat im Weideversuch sehr gut funktioniert. Sie konnte erfolgreich durchgeführt werden, obwohl sich in den Proben auch DNA von weiteren Weideparasiten wie *C. oncophora*, *H. contortus* und *T. colubriformis* befanden. Dadurch bestätigt der Weideversuch, dass die Pyrosequenzierung auch unter Bedingungen, wie sie auf normalen Rinderbetrieben mit Weidezugang zu finden sind, funktioniert. Somit empfiehlt sie sich als Methode, um Resistenzen auf Betrieben schon frühzeitig überwachen zu können. Und es gelang sehr viel besser als mit der Resistenzbeurteilung mittels FECRT, einer Methode, die in der Praxis am häufigsten angewendet wird, um Resistenzen festzustellen (Čerňanská et al. 2006; Hora et al. 2014; Kaplan et al. 2012; Schnyder et al. 2005). Wird eine Resistenz mittels FECRT vermutet, kann die Parasitenpopulation mittels Larval Migration Inhibition Assay (LMIA) oder EHA noch genauer auf AR untersucht werden. Es wurde schon häufig bestätigt, dass der FECRT nicht ausreicht, um Resistenzen festzustellen. Dies ist vor allem problematisch, weil niedrige Prozentsätze resistenter Allele bei Verwendung des FECRT meist übersehen werden (Coles et al. 1992; De Graef et al. 2012). Auch im Weideversuch zeigen die Ergebnisse von Pyrosequenzierung und FECR deutlich, dass die Eizahlzählung nicht ausreicht, um eine AR festzustellen. Sehr wahrscheinlich ist, dass die FECR im Weideversuch fälschlicherweise eine hohe Effizienz des BZ vermuten ließ, weil die Eizahlen der noch für BZ empfänglichen *C. oncophora*, *H. contortus* und *T. colubriformis*, die sich ja auch in den Proben befanden, stark nach unten gingen. Dies zeigt sich auch darin, dass nach Behandlung meist keine *C. oncophora*, *H. contortus* und *T. colubriformis* DNA in den Larvenkulturen mehr nachgewiesen werden konnte. Aber da nur wenig Labore *in vitro* Untersuchungen anbieten, ist der FECRT noch der „praktikable Goldstandard“ um Resistenzen auf Rinderbetrieben zu beweisen (Kaplan et al. 2012). *In vitro* Methoden wie das EHA und das LMIA sind zwar genauer als das FECRT, aber sehr zeit- und arbeitsintensiv. Dagegen ist die im Weideversuch angewendete Methode mit PCR und Pyrosequenzierung, bei der gleichzeitig bis zu 24 Proben untersucht werden können, schneller.

Diskussion des Weideversuchs

6.4.1 Beitrag des Weideversuchs zum Fortschritt der Wissenschaft

Der Weideversuch konnte den Anstieg der resistenten Allele bei *O. ostertagi* molekularbiologisch bestätigen. Außerdem zeigte er deutlich, dass der FECRT zu ungenau ist, wenn er als Resistenztest im Feldversuch eingesetzt wird, da durch die Reduktion der Wurmbürde der anderen, noch empfänglichen MDS immer noch starke MDS-Eizahlreduktionen möglich sind. Im Weideversuch wird auch klar, dass nur der 7 – 14 Tage nach Behandlung berechnete FECRT eine in Ansätzen ähnliche Entwicklungskurve wie die tatsächliche Resistenzentwicklung von *O. ostertagi* hat (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1 Vergleich FECRT und Anteil des mit Resistenz assoziierten SNP von *O. ostertagi* im Weideversuch vor Behandlung (v. B.) und nach Behandlung (n. B.)

	Kälbergruppe 2	Kälbergruppe 3	Kälbergruppe 4	Kälbergruppe 5
FECRT 1–3 Tage n. B.	66,2 %	84,7 %	93,9 %	67,2 %
FECRT 7–14 Tage n. B.	74,0 %	58,0 %	71,1 %	52,6 %
Anteil des mit Resistenz assoziierten SNP v. B.	15,40 %	23,80 %	27,40 %	62,88 %
Anteil des mit Resistenz assoziierten SNP n. B.	54,80 %	73,90%	79,20 %	88,20 %

Die Ergebnisse des Weideversuchs sollten Forscher, Tierärzte und Tierhalter aufrütteln, denn es zeigt sich sehr deutlich, wie schnell der Anteil resistenter Parasiten einer Population durch unterdosierte Anthelminthikadosen, wie sie in der Praxis häufig vorkommen oder sogar die Regel sind, in die Höhe getrieben werden kann. Außerdem wird klar, dass eine große Weide schon durch nur vier infizierte Tiere mit einem durchschnittlichen EpG von 132 derart kontaminiert werden kann, dass zwei naive Kälber nach nur 21 Tagen auf der kontaminierten Weide erste MDS-Eiausscheidungen zeigten und sich auch alle weiteren Kälbergruppen erfolgreich und mit immer höherem Anteil resistenter *O. ostertagi* infizieren konnten.

Diskussion des Klimakammerversuchs

6.5 Diskussion des Klimakammerversuchs

Die Veröffentlichung über Versuche mit Grastöpfchen und *C. oncophora* L3 in einer Klimakammer (Climate Chamber) wurde 2015 eingereicht, da die Versuche hierfür in den Jahren 2012 anfangen und erst 2014 abgeschlossen werden konnten.

Der Klimakammerversuch untersuchte detailgenauer als der Gewächshausversuch die Auswirkungen von Trockenstress, Temperatur, UV-Strahlung und Dauer auf das Larvenvorkommen und die Larvenkonstitution (Fitness) der Larven auf deutschem Weidelgras (*L. perenne*) und im Boden.

Beim Versuch mit der Klimakammer kam zusätzlich auch eine bis dahin nur zum Testen von AR verwendete Methode (Demeler 2005) zum Einsatz, mit der eine „Fitnessbewertung“ der Larven vom Gras und aus dem Boden möglich wurde. Mittels der Larvenfitness wurden auch feine Effekte von Trockenstress, höheren Temperaturen und Dauer auf die L3 im Boden entdeckt, die bei einer reinen Zählung und Bewertung der rückgewonnenen Larven unter dem Mikroskop nicht aufgefallen wären. Hierfür haben die rückgewonnenen Larven auf einem Sieb mit 28 µm Maschenweite 18 Stunden lang bei Raumtemperatur genügend Zeit durch das Sieb auszuwandern. Das Sieb ist permanent mit Wasser bedeckt, so dass die Larven nicht austrocknen können. Nach 18 Stunden wird das Sieb dann von oben und unten gespült, so dass keine Larve, die noch im Sieb hängt, übersehen wird und die gewanderten sowie nicht gewanderten Larven werden gezählt. Der relative Fitnessfaktor errechnet sich dann aus der Zahl der gewanderten Larven geteilt durch die Zahl der Gesamtlarvenanzahl, also der Summe der gewanderten und nicht gewanderten Larven, und wird in Prozent angegeben.

Der Klimakammerversuch ermöglichte einige offene Fragen, die durch den Gewächshausversuch nicht geklärt werden konnten oder erst aufgeworfen wurden, zu beantworten. Durch die genaue Steuerung der Klimakammer was Temperatur, Luftfeuchte und UV-Strahlung anging, konnte eine hohe Wiederholbarkeit des Experiments gewährleistet werden und gleichzeitig konnten die Effekte von höheren Temperaturen auf das L3 Vorkommen sowie die Kombination von höheren Temperaturen und Trockenstress untersucht werden. Die kleinen Pflanztöpfchen machten es möglich, das komplette Bodenvolumen zu untersuchen. Hierbei war auffällig, dass sich der Hauptanteil der L3 im Boden in den obersten zwei Zentimetern aufhielt. Hier ist ein guter Schutz vor Sonne und Austrocknung gegeben und die L3 verbraucht nicht zu viel Energie, wenn sie wieder auf das Gras will. Die Töpfchentiefe von zehn Zentimetern wurde von zwei wichtigen Faktoren bestimmt: einerseits hat *L. perenne* den größten Anteil seiner Wurzeln in dieser Tiefe, somit war die Töpfchentiefe ausreichend, um ein gutes Wachstum für den Grashalm zu gewährleisten. Gleichzeitig befinden sich auch die meisten Bodennematoden in einer Tiefe von null bis zehn Zentimetern (Smolik et al. 1983). Da die entwickelte Erdwaschmethode auf Methoden aus den Agrarwissenschaften aufbaut

Diskussion des Klimakammerversuchs

und Bodennematoden ähnliche Voraussetzungen wie L3 haben, was Beweglichkeit und Größe angeht, wurde auch das L3 Vorkommen bis in eine Tiefe von zehn Zentimetern untersucht. Tatsächlich fanden sich auch in der untersten Bodenschicht (sechs bis zehn Zentimeter) noch parasitische L3, der Anteil dieser L3 war aber so gering, dass er nie ein Zehntel der ursprünglich auf das Pflanztöpfchen aufgebrachten L3 überstieg.

6.5.1 Beitrag des Klimakammerversuchs zum Fortschritt der Wissenschaft

Die im Klimakammerversuch gewonnenen Ergebnisse könnten auch helfen, moderne Modelle zum Larvenvorkommen auf der Weide zu entwickeln, wie es bspw. im europäischen GLOWORM Projekt geschehen ist (Rose et al. 2015). Dieses Modell belegt, dass die jahreszeitlichen Variationen im Larvenvorkommen auf dem Gras durch die Bewegung der Larven zwischen Gras und Boden erklärt werden können. Im Vergleich dazu passten frühere Modelle, die nur die temperaturabhängige Mortalitätsrate beachteten, nicht zu Beobachtungen aus anderen Versuchen. In der Klimakammer war die Temperatur kontrollierbar. Dies war beim Gewächshausversuch mit L3 nicht möglich. Auch bei früheren Experimenten, die die temperaturabhängige Entwicklung von L3 in Kuhfladen untersucht haben, war keine Temperaturregulation realisierbar (Rossanigo et al. 1994). Deshalb sind die Ergebnisse des Klimakammerversuchs, welche die Auswirkungen der relativ kleinen Temperaturunterschiede und die Zusammenwirkung von höherer Temperatur und Trockenstress beschreiben, umso wichtiger. Der semi-kontrollierte Gewächshausversuch hat gezeigt, dass auch hier viele unkontrollierbare Störfaktoren, wie zu extreme Temperaturwerte, Luftzug, Ausschwemmung von Larven beim Gießen, Bodennematoden und andere Tiere, das L3 Vorkommen beeinflussen können. Dies legt den Verdacht nahe, dass der Einfluss von Störfaktoren in Feldexperimenten noch größer ist. Aus den genannten Gründen sind die Ergebnisse des Klimakammerversuchs besser für das Verständnis des L3 Verhaltens und für zukünftige Modelle über das Larvenvorkommen auf der Weide zu gebrauchen als Ergebnisse aus temperaturunregulierten Gewächshaus- oder Feldversuchen.

7 Gesamtdiskussion

7.1 Zusammenführung der Ergebnisse aus Gewächshaus- Klimakammer- und Weideversuch

Die Ergebnisse aus dem Gewächshaus- und dem Klimakammerversuch zeigen, dass die zukünftigen, heißeren und trockeneren Sommertage die Larvenpopulation auf der Weide verringern werden, da diese durch höhere Temperaturen und Trockenheit schneller absterben. Zu denselben Ergebnissen gelangt auch das GLOWORM-FL Simulationsmodell für zukünftige Wetterbedingungen in England. Auch hier werden für die Zukunft trockenere und heißere Sommertage erwartet, was zu einer erhöhten Mortalitätsrate für die L3 im Sommer führen wird (Rose et al. 2015). Das Modell von Rose et al. (2015) sagt auch voraus, dass in den zukünftigen mildereren Wintermonaten weniger L3 absterben werden und durch die insgesamt höheren Temperaturen und die dadurch gesteigerte Entwicklungsrate der L3 mehr Generationswechsel der Parasiten pro Jahr stattfinden werden. Ein für *O. ostertagi* entwickeltes Modell geht davon aus, dass bei vielen Treibhausgasemissionen in den Jahren 2070 – 2100 die L3 sich nun an 347 Tagen im Jahr anstatt 216 Tagen, wie es in den Jahren 1969 – 1999 war, entwickeln können. Gleichzeitig wird sich aber die Mortalitätsrate zwischen Mai und November für *O. ostertagi* signifikant erhöhen, wodurch sich auch die Anzahl der L3, die sich noch im Faeces befinden oder schon in den Boden ausgewandert sind, um so den Winter zu überstehen, verringern könnte. Dies bedeutet also, dass mehr Generationswechsel im Jahr möglich sind und gleichzeitig das resistenzverlangsamende Refugium auf der Weide kleiner wird.

Es zeigt sich bei der Kombination dieser Ergebnisse mit denen des Weideversuchs, wie groß die Gefahr einer schnellen Verbreitung von AR in Deutschland ist. Denn je mehr Generationswechsel der Parasiten stattfinden können, umso schneller können sich bei regelmäßiger und unterdosierter Entwurmung auch resistente Gene vervielfältigen.

Der Gewächshausversuch zeigt auch, dass vermehrter Kleeanbau auf den Weiden eine Alternative zum arbeitsaufwendigen TST oder TT-Management sein könnte, welches ja auch ein größeres Refugium für die Parasiten, allerdings im Wirtstier, erhalten soll.

Wenn die Tierhalter keine selektive Behandlung einsetzen können oder wollen, weil die Methoden der Überprüfung (Fahrenkrog 2013) noch zu aufwändig sind, könnte das Refugium anstatt in unbehandelten Tieren auch durch vermehrten Kleeanbau außerhalb des Wirtes auf der Weide vergrößert werden. Da die Ergebnisse aus Gewächshausversuch und Klimakammerversuch zeigen, dass das Refugium auf der Weide in Zukunft durch die klimawandelbedingten Änderungen der Wetterbedingungen kleiner wird, wäre ein durch mehr Kleegehalt vergrößertes Refugium auf der Weide sehr wichtig, um die Entwicklung von AR abzubremsen. Die Ergebnisse von Frank und Kai Küchenmeister (Küchenmeister et al. 2014;

Gesamtdiskussion

Küchenmeister et al. 2012a; Küchenmeister K et al. 2013; Küchenmeister et al. 2012b) und die des Gewächshaus- und des Klimakammerversuchs machen aber auch deutlich, dass es extrem wichtig ist, die zukünftige Trockenstressgefahr der Weide richtig zu beurteilen, da durch vermehrten Kleegehalt auf der Weide diese auch anfälliger für Trockenstress wird. Somit wäre Kleeanbau auf Weiden, die zukünftig zu geringe Niederschlagsmengen erwarten oder nicht zusätzlich bewässert werden können, keine Möglichkeit das Refugium für parasitische L3 zu vergrößern.

Der Klimawandel ist präsent und sehr wahrscheinlich vom Menschen erzeugt, auch wenn große Firmen dies verschleiern wollen (Cook et al. 2013). Die Ergebnisse zeigen, dass der Klimawandel, der in Deutschland mit höheren Temperaturen, weniger Niederschlag und insgesamt extremeren Wetterbedingungen, wie länger andauernden Trockenzeiten und Tagen mit extremer Hitze einhergehen wird, einen direkten Einfluss auf das Larvenvorkommen von Weideparasiten auf der Weide hat. Zwar bietet der Boden ein Refugium, welches den L3 etwas Schutz vor Wärme und Austrocknung bieten kann (Knapp-Lawitzke et al. 2014), aber auch hier leidet die Fitness der *C. oncophora* Larven unter den neuen Wetterbedingungen (Knapp-Lawitzke et al. 2016). Das Larvenvorkommen auf der Weide, das als „Verdünnung“ der resistenten Allele in der Larvenpopulation gegen Bildung von AR wirken kann, wird also kleiner (Martin et al. 1981; van Wyk 2001). Allerdings sind auch extreme Wetterbedingungen nicht in der Lage, das Larvenvorkommen auf der Weide komplett zu eliminieren, wie ein Bericht aus Zentral Kenia zeigt (Waruiru et al. 1998). Genauso wenig scheint der Mensch in der Lage zu sein, Parasiten komplett zu beseitigen. 1963 sagte Professor Skrjabin auf der ersten WAAVP Tagung in Hannover, dass er an eine helminthenfreie Zukunft glaubt. Dabei dachte er nicht als Einziger, dass es möglich sei durch Forschung dieses Ziel zu erreichen (Pearce et al. 2013). Dass dies wahrscheinlich Wunschdenken bleiben wird, ist am vergeblichen Kampf der Menschheit gegen Bakterien mittels Antibiotika, bei denen sich ebenfalls die Bakterienresistenzen weiter entwickeln, zu sehen. Wie bei der Analyse der Anzahl der Berichte von Antibiotikaresistenzen festzustellen ist, scheinen sie sich auch immer schneller weiterzuentwickeln (Brandt et al. 2014). Da Nematoden schon lange vor den Wirbeltieren, die sie jetzt als MDS befallen, unseren Planeten besiedelt haben (Boyle et al. 2014), mussten sie sich immer auf neue Umweltbedingungen bzw. Wirte einstellen. Dass sie das konnten, beweist ihre enorme Anpassungsfähigkeit. Diese Anpassungsfähigkeit spiegelt sich auch in den Berichten über AR wieder. Ähnlich wie bei den Antibiotikaresistenzen scheint es auch gegen neuere Anthelminthika immer schneller Fälle von ersten Resistenzen zu geben (Scott et al. 2013).

Schon Anfang der Neunzigerjahre hat Williams et al. (1993) Berichte über besonders schwere Ostertagiosefälle in Südamerika zitiert. Dies kann natürlich an den Haltungssystemen liegen, die anders als in Deutschland sind. Falls aber die wärmeren Wetterbedingungen verantwortlich

Gesamtdiskussion

sein sollten, wäre dies ein Hinweis dafür, dass der Klimawandel alleine ausreichen könnte, um zu ernsteren Ostertagiosefällen in Deutschland zu führen. Durch die Problematik der AR würde dieses Problem natürlich noch weiter verschärft.

7.2 Parasiten sind sehr anpassungsfähig

Eine besondere Anpassungsfähigkeit von magendarmparasitischen Nematoden ist die im Kapitel 3 „Nematoden“ beschriebene Hypobiose. Der genaue Mechanismus, an dem der Parasit erkennt, wann es der richtige Zeitpunkt ist um die Hypobiose zu beenden, ist jedoch immer noch unbekannt. Es ist bereits erwiesen, dass MDS ihre Hypobiose häufig beenden, wenn das Immunsystem des Wirtstieres, bspw. während Trächtigkeit oder Laktation, unterdrückt wird. Besonders starke Fälle von massenhaft die Hypobiose beendenden Parasiten treten, wie im Kapitel 3 „Nematoden“ beschrieben, häufig Ende des Winters auf (Boch et al. 2006). Möglicherweise könnte es damit zusammenhängen, dass die Leistungsfähigkeit des Immunsystems des Wirtes auch von der Jahreszeit abhängig ist. Bei Menschen aus Europa und Ozeanien konnte bewiesen werden, dass das Immunsystem in den Wintermonaten proinflammatorischer reagiert als in den Sommermonaten (Dopico et al. 2015). Auch außerhalb des Wirtes beherrschen die Trichostrongyliden effektive Anpassungsstrategien. Die L3 kann sich außerhalb des Wirtes bei zu niedrigen Temperaturen bewegungslos einrollen und schont dadurch ihre begrenzten Energiereserven so gut, dass sie mehrere Jahre überleben kann.

7.3 Neues Verbraucherbewusstsein bezüglich Medikamentenrückständen

In den letzten Jahren hat sich das Verbraucherverhalten in Deutschland und auch in anderen europäischen Ländern geändert (Morgan et al. 2013). Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass die Menschen in den Industrieländern anfangen, sich besser über die Herkunft und möglichen Belastungen ihrer Nahrung aufzuklären. Gleichzeitig führen Berichte über z.B. das Vorhandensein von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Schweine- (O'Brien et al. 2012) oder in Geflügelfleisch (Feßler et al. 2011) dazu, dass sich die Verbraucher mehr mit ihren tierischen Nahrungsmitteln auseinandersetzen. Resistente Bakterien im Fleisch werden häufig darauf zurückgeführt, dass in der Tierhaltung zu viele Antibiotika verwendet werden. Es wird befürchtet, dass dies zu unbehandelbaren bakteriellen Infektionen beim Menschen führen könnte. Allerdings werden die Bakterien im Fleisch durch ausreichendes Kochen zerstört (Phillips et al. 2004). Interessant ist auch, zu wissen, dass in der Humanmedizin fast neunzehnmal häufiger sogenannte „Reserveantibiotika“ als in der

Gesamtdiskussion

Tierhaltung eingesetzt werden (Held 30.03.2015). Ähnlich wie bei den Antibiotikaresistenzen könnten sich auch AR in der Humanmedizin verbreiten. Es wurde bspw. über erste IVM-Resistenzen von *Onchocerca volvulus* berichtet, einer Filarienart, deren Befall beim Menschen seit 1987 mit IVM behandelt wird (Osei-Atweneboana et al. 2007). Obwohl es zum jetzigen Zeitpunkt dank EU-Richtlinien und Kontrollen eher unwahrscheinlich ist, dass über Fleisch Abbauprodukte von Anthelminthika in schädigenden Mengen in den menschlichen Körper gelangen (Cooper et al. 2012), könnte sich eine Reduzierung von anthelminthischen Behandlungen auch positiv auf den Endverbraucher auswirken. Dies gilt vor allem für Milchkühe, bei denen manche Tierhalter auch verbotenerweise während der Laktation anthelminthische Behandlungen durchführen lassen (Imperiale et al. 2011).

Es wünschen sich auch immer mehr Konsumenten biologisch hergestellte Nahrungsmittel. Deutschland ist sogar einer der größten Märkte für „Bioprodukte“ (Doward 2014; Huebner 2009). Die Verbraucher vertrauen hierbei auf Bio-Siegel wie das der EU-Verordnung. Diese setzt fest, dass der „artgerechteste“ Ort für die Rinderhaltung in der Weidesaison die Weide ist, welche Zugang zu Schatten und Wasser haben muss. Nur eine ungünstige Ortslage oder Flurzersplitterung erlauben, dass statt Weidehaltung im Sommer ein Laufhof genutzt werden darf (Neuerburg 2011). Dies bedeutet natürlich, dass jedes Bio-Rind, das nicht auf einem trockengelegten Laufhof gehalten wird, mit MDS in Kontakt kommt, weil diese deutschlandweit vorkommen und sich Rinder beim Grasens ganz natürlich mit ihnen infizieren. Die Behandlung von parasitären Infektionen ist in der EU-Bio-Verordnung erlaubt. Die dadurch entstehenden Wartezeiten auf Fleisch und Milch hätten aber durch eine reine Laufstallhaltung, bei der die Rinder nicht mit Weideparasiten in Kontakt kommen, verhindert werden können. Ein Nichtbehandeln stärker befallener Tiere ist nicht nur mit Leistungseinbußen für den Halter verbunden, sondern auch mit Schäden und Leiden für die Tiere und somit nicht mit §1 des Tierschutzgesetzes konform.

7.3.1 Möglichkeiten durch reine Stallhaltung die Anthelminthikagabehäufigkeit bei Rindern zu verringern

Eine Möglichkeit parasitär bedingte Gastroenteritis und somit den Bedarf an Anthelminthika von vorneherein auszuschließen wären moderne Laufställe, bei denen die Tiere nicht mit MDS oder anderen Weideparasiten wie bspw. Leberegel in Kontakt kommen. Da wie eingangs erwähnt die Verbraucher immer mehr Biofleisch fordern, müssten hierfür allerdings die Gesetze der EU-Bio-Norm für die Haltung von Rindern geändert werden. Anbetracht der Tatsache, dass es der natürlicheren Haltung entspricht, dass Rinder den ganzen Tag grasen können, ist dies auch für eine sinnvolle Landnutzung unerlässlich. Auf Gebirgsweiden ist es bspw. gar nicht möglich, Silage oder Mais für die Rindermast anzubauen. Auch beim Ernten

Gesamtdiskussion

von Getreide mit modernen Maschinen werden viele Wildtiere wie Rehe oder Hasen überfahren oder zerstückelt. Deshalb trifft auch hier die Weidehaltung eher den „Bio-Gedanken“, der mit Umwelt- und Tierschutz einhergeht. Zusätzlich wird am Geschmack des Fleisches und der Milch erkenntlich, ob das Tier mit frischem Gras und im Winter mit Heu oder ganzjährig mit parasitenfreier Silage oder Pellets gefüttert wurde. Das Konzept der Laufstallhaltung könnte aber noch weitere Vorteile bringen: bspw. sind die Tiere hier auch vor Kälte und Hitze besser geschützt als auf der Weide, denn der Stall kann geheizt oder gekühlt werden. Gerade die Kühlungsmöglichkeit im Laufstall, deren Effekt an besonders warmen Tagen auch durch Besprühen der Rinder mit Wasser gesteigert werden kann, ist ein wichtiger und tierschutzrelevanter Aspekt, wenn man an die Klimaerwärmung denkt.

7.3.2 Nachhaltige Parasitenkontrolle durch besseres Weidemanagement

Nachhaltigere Lösungen, um die Parasitenbürde im Tier möglichst klein zu halten, könnten bspw. durch einen Grasschnitt vor dem ersten Weidegang geschehen. Dadurch würde ein Teil der MDS, die sich über den Winter entwickelt oder diesen überlebt haben, entfernt. Man kann auch die Immunität von älteren Tieren ausnutzen: Stehen Kälber nicht alleine auf einer parasitenverseuchten Weide, sondern mit ihren mehr Grünfutter fressenden und gegen *C. oncophora* schon immunen Muttertieren, so wird ein Großteil der Parasiten von den Mutterkühen wegfressen. Da Kälber in der Mutterkuhhaltung gleichzeitig durch den erhöhten Milchkonsum weniger Gras fressen müssen, um ihren Energiebedarf zu decken, wären sie erheblich weniger MDS ausgesetzt.

Durch kluges und nicht nur auf Gewinnmaximierung zielendes Management wie TST und TT sind weniger Entwurmungen nötig. Dadurch kann auch der Selektionsdruck für die Parasiten herabgesetzt werden. Allerdings muss noch viel geforscht werden, um die Anwendung von TST und TT praktikabler zu gestalten, da der Body Condition Score als Indikator nicht ausreicht (Höglund et al. 2013). Auch eine Beprobung der EpG-Werte aller Tiere ist für die Tierhalter mit den jetzigen Methoden weitaus aufwendiger, als wenn er seine Rinder metaphylaktisch entwurmt.

Stehen dem Landwirt ausreichend Weidefläche zu Verfügung, könnte er auch die Parasitenbürde senken, indem er seine Tiere alle zwei Wochen, und somit vor Beginn der Präpatenz, umweidet. Aber selbst bei längerem Brachliegen der Weide wird dadurch nicht verhindert, dass die Rinder mit L3 in Kontakt kommen. Denn L3 können einerseits sehr lange überleben und andererseits auch durch Wildwiederkäuer verbreitet werden (Chintoan-Uta et al. 2014; Rehbein et al. 2001; Rehbein et al. 2002).

Gesamtdiskussion

Manche Tierhalter behandeln ihre Weiden auch mit Kalkstickstoff, weil dieser eine abtötende Wirkung auf Unkräuter, tierische Schädlinge und Weideparasiten haben soll (AlzChemAG 2015; Hohlmann 2011).

7.3.3 „Alternative“ Methoden zur MDS-Kontrolle

7.3.3.1 Durch Regenwürmer (*Lumbricidae*) oder Mistkäfer

Grønvold (1987) denkt, dass Regenwürmer, Mistkäfer und andere koprophage Organismen eine wichtige Rolle spielen, was die Epidemiologie von L3 auf der Weide angeht, da diese L3 fressen und die schützende Kuhfladenstruktur zerstören. Grønvolds Experiment belegt diese These, da auf dem Gras um Kuhfladen, die vor Regenwürmern mittels eines Siebes geschützt waren, tatsächlich mehr L3 gefunden wurden. Weil auf jeder natürlichen Weide in Europa Regenwürmer vorkommen, stellt dieses Ergebnis aber keinen Lösungsansatz im Kampf gegen den MDS-Befall dar.

7.3.3.2 Durch Schweine auf der Rinderweide

Fernandez et al. (2001) hat in einem Experiment nachgestellt, wie sich die Haltung von Rindern und Schweinen auf einer Weide auf das Überleben von *O. ostertagi* auswirkt. Die Idee, Rinder und nasenberingte Säue gleichzeitig grasen zu lassen, wurde auch für die Haltung auf biologischen Landwirtschaftsbetrieben vorgeschlagen, da die Beringung der Schweine ihr natürliches Wühlverhalten unterdrückt und so die Grasnarbe erhalten bleibt (Thamsborg et al. 1999). Da Schweine im Gegensatz zu Rindern näher an den Kuhfladen grasen, fressen sie schon aus dem Faeces ausgewanderte L3 auf. Gleichzeitig trocknen die noch im Faeces verbliebenden L3 leichter aus, da die Larven durch das kürzere Gras in der unmittelbaren Umgebung weniger vor Sonnenstrahlung und Verdunstung geschützt sind. Außerdem ist es möglich, dass die Schweine den Kuhfladen zusätzlich zerstören: durch das Aufbrechen der vor Austrocknung schützenden Kruste sterben auch L3, die sich noch im Faeces befinden, früher ab.

7.3.3.3 Durch Pilze

Eine noch nicht etablierte Möglichkeit, die Parasitenbelastung auf der Weide einzudämmen, könnte das Füttern der Tiere mit *Duddingtonia flagrans* sein. Dies ist ein Pilz, dessen Sporen im Kot Hyphen bilden. Die MDS-Larven verfangen sich in deren Mycel und sterben ab, und somit sollten weniger L3 auf die Weide gelangen. Diese Theorie wurde in Versuchen mit Schafparasiten getestet. Allerdings ließ sich hier keine geringere Parasitendichte auf der

Gesamtdiskussion

Weide, auf der die über neun Wochen mit 500 000 *D. flagrans* Sporen pro Kilogramm Körpergewicht behandelten Mutterschafe standen, feststellen. Dies könnte aber auch an der Methode der Grasprobennahme liegen, denn in den Kotkulturen der mit *D. flagrans* behandelten Tiere fanden sich deutlich weniger L3. Das gleiche galt für die Wurmbürde der Tracerlämmer, die auf den Weiden der behandelten Tiere standen. Da aber alle Versuchslämmer eine ernsthafte Haemonchose entwickelten (Eysker et al. 2006), reichte die *D. flagrans* Sporengabe in diesem Versuch also nicht aus, um die Parasitenbürde derart einzuschränken, dass auf eine Anthelminthikagabe verzichtet werden konnte.

7.3.3.4 Durch vermehrten Kleeanbau

Eine Lösungsmöglichkeit wäre, Weiden mit mehr Klee zu versehen. Zum einen wirken die Tannine im Klee negativ auf die Parasiten im Darm des Wirtstieres (Marley et al. 2006; Novobilský et al. 2011) und entsprechen somit einer natürlichen sanften Entwurmung. Gleichzeitig würde das Larvenvorkommen auf dem Gras und im Boden besser erhalten bleiben, da Klee die L3 besser vor Umwelteinflüssen schützen kann, wie die Ergebnisse des Gewächshausversuchs zeigen (Knapp-Lawitzke et al. 2014). Durch mehr Klee auf der Weide würde also ein besserer Verdünnungseffekt der resistenzbildenden Allele unter den L3 auf der Weide stattfinden, da der Selektionsdruck gesenkt werden würde. Dadurch könnten die Weidetiere noch länger mit „alten“ Anthelminthika wie z.B. BZ entwurmt werden.

Die Studie von Marley et al. (2006) kommt andererseits zu dem Ergebnis, dass sich L3 des vor allem Schafe befallenden MDS *C. curticei* lieber auf *L. perenne* (dt. Weidelgras) anstatt auf Hornklee oder der gemeinen Wegwarte aufhalten. Seine Folgerungen stehen nicht nur im Gegensatz zu den Ergebnissen des Gewächshausversuchs, sondern auch zu denen des Experiments von Ramírez-Restrepo et al. (2005). Bei letztgenanntem Versuch grasten Lämmer entweder auf *Lotus corniculatus* (Hornklee) oder einer Weide, die aus *L. perenne* und *T. repens* bestand. Die Kälbergruppe auf der Hornkleeweide hatte höhere FEC-Werte. Dies spricht dafür, dass sie sich auch mit mehr L3 infizieren konnte. Gleichzeitig führte der Hornklee aber zu einer besseren Gewichtszunahme der Lämmer. Ramírez-Restrepo vermutet hier, dass dieser Effekt an den Bindefähigkeiten der CT liegt, welche die Proteinversorgung erhöhen. In Ramírez-Restrepos Studie hatten die Lämmer, die auf Hornklee gegrast hatten, geringere Wurmbürden von *H. contortus*, *Cooperia*, *Teladorsagia* und *Nematodirus* spp., aber erstaunlicherweise höhere Wurmzahlen von *Trichostrongylus* spp., *Chabertia ovina*, *Oesophagostomum* spp. und *Trichuris ovis*. Ramírez-Restrepo schließt mit der Vermutung, dass auf trockenen Weiden Hornklee die Zunahme entwöhnter Lämmern steigert und gleichzeitig auch weniger Entwurmungen nötig sind, um die MDS unter Kontrolle zu halten.

Gesamtdiskussion

Der Vorteil an den natürlich vorkommenden Tanninen besteht auch darin, dass eine Resistenzbildung in den letzten Jahrhunderten nicht stattgefunden haben kann, da sonst heute keine Wirkung der Tannine auf MDS möglich wäre. Klee ist seit dem 11. Jahrhundert in Deutschland bekannt. Die Heilige Hildegard berichtet über die Wirkungen von Wiesenklee in ihrer Physika, dies wird im Lehrbuch der biologischen Heilmittel, Band 3, S 2727 (Madaus 1976) erwähnt. Auch in England wird seit dem 17. Jahrhundert vom systematischen Kleeanbau für Futterland und Wiesen berichtet (Lane 1980). Aber auch davor gab es schon Klee in Europa. Medicus (1829) berichtet in seinem Buch „Zur Geschichte des künstlichen Futterbaues oder des Anbaues der vorzüglichsten Futterkräuter, Wiesenklee, Luzerne, Esper, Wecke und Spergel“ sogar, dass *Trifolium* und die ihm zugesagten Heilkräfte schon zu Zeiten des Kaisers Marcus Aurelius bekannt waren. Es bietet sich die Vermutung an, dass auch in nächster Zukunft keine Resistenz gegen die Tannine im Klee bei den MDS entstehen wird. Jedenfalls wird dies nicht passieren, solange die Tannindosis nicht künstlich überhöht wird, da dies zu einem unnatürlich hohen Resistenzdruck führen könnte. Eine Klee beinhaltende Fütterung könnte demzufolge dazu führen, die Wurmbelastung bei Rindern auf einem so geringen Level zu halten, dass weniger oder gar keine Entwurmung mit chemisch hergestellten Anthelminthika mehr nötig ist. Diese Überlegung müsste aber noch dringend weiter untersucht werden, da sich die meisten Studien zur Wirkung von Tanninen, welche bspw. bei der Fütterung von Esparsette hochkonzentriert sind, auf Schafe konzentrieren (Werne et al. 2013). Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass kondensierte Tannine (CT) die Produktionsrate von Wiederkäuern verbessern können, da sie einen positiven Einfluss auf die Proteinverdauung und die Gesundheit der Tiere haben. Dies geschieht durch ihre Bindungsfähigkeit an Proteine, welche deshalb im Rumen weniger stark zersetzt werden. Gleichzeitig werden trotzdem genügend mikrobielle Proteine gebildet. Im Dünndarm kann so die Absorption von essentiellen Aminosäuren erhöht werden. Es wird vermutet, dass die Kühe dadurch mehr Milch geben bzw. Schafe ein besseres Wollwachstum haben. Dies funktionierte laut Review aber nur bei Tanninen aus Horn- und Süßklee. Beim Füttern von Sumpfhornklee oder Esparsette fiel keine höhere Absorption von essenziellen Aminosäuren im Dünndarm auf. Dies könnte an einer anderen biochemischen Struktur der Tannine liegen. Bei einer zu hohen CT-Zufuhr verringert sich die Futteraufnahme und die Verdaulichkeit wird schlechter, deshalb leiden auch das Wachstum und die Wollproduktion (Min et al. 2003).

In vitro Studien mit *Oesophagostomum dentatum*, einem Knötchenwurm der als adultes Stadium auf der Schleimhaut des Zäkums und Kolons von Schweinen in Stall- und Weidehaltung zu finden ist (Boch et al. 2006), zeigen, dass CT sowohl auf die freilebenden Stadien als auch auf die L4, die präadulten und die adulten Stadien im Schwein wirken. Das Schlupfverhalten von L3 zu L4 und die Bewegungsfähigkeit der Adulten werden verhindert. Auch die Kutikula und Hypodermis der Adulten wird je nach CT-Konzentration geschädigt.

Gesamtdiskussion

Eine Kontrolle mit CT, die durch Polyvinylpolypyrrolidone blockiert wurden, hatte keinen Effekt auf *O. dentatum*. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass CT für die Wirkung verantwortlich sind (Williams et al. 2014).

Allerdings muss bei der Saat von Klee darauf geachtet werden, dass Weiden mit mehr Kleegehalt auch insgesamt anfälliger für Trockenstress sind, da Klee im Vergleich zu Gras mehr Wasser verbraucht. Und deshalb sollte dies nicht in Gegenden angewandt werden, die von sehr langen Trockenzeiten betroffen sind und in denen auch keine künstliche Bewässerung möglich ist. Der zusätzliche Kleegehalt wirkt sich nicht nur positiv auf den Metabolismus der Wiederkäuer aus. Auch der weitere Weidebewuchs profitiert von der Fähigkeit des Klees, Stickstoff binden zu können, da er so wie ein natürlicher Dünger wirkt (Küchenmeister et al. 2012a; Küchenmeister et al. 2012b).

7.4 Modelle zur Kontrolle der Parasitenbürde

In England wurde ein neues Modell entwickelt, welches zur Errechnung des Larvenvorkommens auf der Weide genutzt werden kann (Rose et al. 2015). Dieses Modell basiert im Gegensatz zu früheren Modellen auf größeren Datensätzen, um die Entwicklungs- und Überlebenszeiten und somit die Gesamtpopulation der L3 auf der Weide und folglich die Befallsstärke der Wirtstiere berechnen zu können. Auch die Ergebnisse des Gewächshaus- und des Klimakammerversuchs könnten helfen, den Tierhaltern in Zukunft eine bessere Möglichkeit zur Bestimmung des Infektionsdruckes von Weideparasiten zu geben. Allerdings sind noch weitere Untersuchungen zu anderen Temperaturen, Feuchtigkeitswerten und Parasitenarten nötig, um ein Modell erstellen zu können, das genauere Vorhersagen treffen kann. Das ideale Modell müsste mit verschiedenen Parasitenarten, Wetterbedingungen, Besatzdichten, Alter und Haltungsformen der Rinder sowie deren EpG-Werten arbeiten können. Weil die Entwicklungs- und Überlebenszeit der Parasiten hauptsächlich von Temperatur und Feuchtigkeit abhängt und dieses sogenannte Mikroklima selbst in einem kleinen Land wie England oder Deutschland abhängig von den geographischen Gegebenheiten eines Betriebes, wie beispielsweise Höhenlage und Nähe zum Meer, schon stark variieren kann, wäre es auch wichtig diese Faktoren einzubinden. Ein mit genügend Daten gespeistes Modell könnte sogar die Genauigkeit einer Weidebeprobung mit Gras- und Bodenproben übertreffen, was den Infektionsdruck auf der Weide und den Wurmbefall der Rinder angeht. Dies liegt daran, dass eine Weidebeprobung immer auf Stichproben und Hochrechnungen beruht. Dagegen sollte ein gutes Modell einen Gesamtüberblick über das Larvenvorkommen auf der Weide sowie die erwartete Wurmbürde im Tier geben können. Die schon beschriebenen Tracertiere könnten sich zur Verifizierung der Modelle eignen und wären, sobald das Modell genau genug arbeitet, überflüssig, was ganz im Sinne des

Gesamtdiskussion

Tierschutzes wäre. Für den Tierhalter wäre ein ausgereiftes Modell kostengünstiger als häufige Weidebeprobungen oder der Einsatz von Tracertieren, wenn er den Infektionsdruck auf der Weide bestimmen will. Idealerweise sollte so ein Modell mittels aktueller EpG-Werte der Rinder die Weidekontamination und den späteren Wurmbefall der Rinder im nächsten Jahr voraussagen können. Funktioniert dies zuverlässig, könnte dieses Modell auch helfen, den idealen Entwurmungszeitpunkt zu bestimmen. Dies könnte im Idealfall dazu führen, dass weniger metaphylaktisch und somit insgesamt seltener entwurmt werden müsste, was einerseits eine Kostenersparnis für den Tierhalter und gleichzeitig eine Verringerung der Gefahr von AR-Entwicklungen bewirken würde. Werden die Ergebnisse aus dem Gewächshaus- und dem Klimakammerversuch bedacht, wird deutlich, dass ein gutes Modell, um die Weidekontamination bestimmen zu können, zusätzlich die Art des Weidebewuchses und die Bodenbedingungen beachten muss. Die Ergebnisse aus dem Gewächshausversuch bezüglich Leguminosenanteil und Trockenstress, sowie die Ergebnisse aus dem Klimakammerversuch bezüglich Trockenstress und Temperatur könnten helfen, Modelle, die die Überlebensparameter der L3 von *C. oncophora* beschreiben, zu verbessern. Sie zeigen außerdem auf, worauf bei der Generierung von weiteren Daten z.B. für *O. ostertagi* oder *H. contortus* geachtet werden muss.

Zusammenfassung

8 Zusammenfassungen

8.1 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden erfolgreich mögliche Auswirkungen des Klimawandels auf das Verhalten und Überleben von freilebenden Stadien des Weideparasiten *Cooperia oncophora* untersucht. Zusätzlich wurden eventuelle Folgen auf die Entwicklung von AR im Weideversuch dargestellt. Die Effekte des Klimawandels sind in Deutschland schon spürbar und werden sich in Zukunft immer stärker auf die Rinderhaltung auswirken. Zum einen werden sich die Folgen über Hitzestress und Trockenheit direkt auf das Tier auswirken und zum anderen auch indirekt über die Futterproduktion und ihre Effekte auf die Rinderparasiten. Die wichtigsten und in der Doktorarbeit untersuchten Magendarmstrongyliiden (MDS) des Rindes sind *C. oncophora* und *O. ostertagi*. Diese wirken sich schädlich auf das Wohlbefinden, die Gesundheit und die Leistung von Milchkühen und Mastkälbern aus. MDS verbringen einen Großteil ihres Lebenszykluses auf der Weide und sind dort den Umweltbedingungen ausgesetzt. Die Ergebnisse bestätigen, dass sich höhere Temperaturen und länger andauernde Trockenheit negativ auf das Überleben und die Fitness der L3 auswirken. In den letzten Jahren häufen sich die Berichte über AR bei MDS und es konnte bewiesen werden, dass sich ein verringertes Refugium und somit ein erhöhter Selektionsdruck beschleunigend auf die Bildung von AR auswirkt. Ob die Auswirkungen des Klimawandels in Deutschland zu einem höheren Selektionsdruck von MDS führen könnten, wurde in einem Gewächshaus- und einem Klimakammerversuch untersucht. Hierfür wurden zwei neue Methoden entwickelt, um L3 von Gras- und Bodenproben wiederzugewinnen. Beide Methoden erzielten eine höhere Rückgewinnungsrate mit einer geringeren Streuung als frühere Methoden und konnten außerdem schnell und ohne den Einsatz umweltschädlicher Substanzen durchgeführt werden. Mittels dieser Methoden konnte im Gewächshausversuch der negative Einfluss von Trockenstress auf das Larvenvorkommen von *C. oncophora* auf Gras bestätigt werden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass sich ein hoher Leguminosenanteil positiv auf das L3 Vorkommen auswirkt. Der Gewächshausversuch legte außerdem den Verdacht nahe, dass sich ein großer Anteil der L3 Population im Boden aufhält. Diese These konnte im Klimakammerversuch bestätigt werden. In diesem Versuch konnte außerdem der negative Einfluss von höheren Temperaturen auf die L3 Fitness von L3 auf Gras und im Boden nachgewiesen werden. Des Weiteren stellte sich heraus, dass sich die Kombination von hohen Temperaturen und länger andauerndem Trockenstress besonders negativ auf das L3 Vorkommen und die L3 Fitness auswirkt. Die Entwicklung einer BZ-Resistenz wurde mittels eines schon teilresistenten *O. ostertagi* Isolates in einem Weideversuch untersucht. Obwohl dies kein Laborexperiment war und die Tiere sich beim Grasens auch mit *C. oncophora*, *H. contortus* und *T. colubriformis* infizierten, konnte der Anteil resistenter *O. ostertagi* nach nur

Zusammenfassung

fünf subtherapeutischen Behandlungen stark gesteigert werden. Subtherapeutische Behandlungen kommen in der Praxis häufig vor und stellen eines der Hauptprobleme zur Verbreitung von AR dar. Mittels Pyrosequenzierung konnte der Anstieg der mit Resistenz assoziierten Allele in der *O. ostertagi* Population genau nachverfolgt werden. Es zeigte sich deutlich, dass der in der Praxis hauptsächlich verwendete Eizahlreduktionstest (FECRT) zu ungenau ist, um Resistenzen frühzeitig zu entdecken. Dies liegt zum einen daran, dass man mittels FECRT keine Speziesunterscheidung bei den MDS-Eiern machen kann, und zum anderen die Reduzierung der Eizahl im Kot auch stark vom Tag der Beprobung abhängt. Alle Experimente zeigen, dass sich die deutschen Rinderhalter auf die Resistenzproblematik einstellen und ihr Entwurmungsmanagement dringend anpassen müssen, weil der Klimawandel diese Problematik noch verschärfen wird. Eine zukunftssträchtige Möglichkeit zur Bestimmung des MDS-Infektionsdrucks auf der Weide stellen Modelle dar. Für solche detailgenauen Modelle könnten die Daten aus dem Gewächshaus- und Klimakammerversuch wichtig sein. Allerdings müssten dazu noch weitere Experimente durchgeführt werden. Noch wenig erforscht sind bspw. die Überlebenszeiten und die Fitness von L3 nach den Wintermonaten auf der Weide und ob Unterschiede in der Umweltempfindlichkeit mittels eines Klimakammerversuchs zwischen resistenten oder für Anthelminthika noch empfänglichen L3 nachgewiesen werden können.

Summary

8.2 Summary and outlook

“Examination of the possible impact of climate change on the occurrence of gastrointestinal trichostrongyles of cattle and their development of anthelmintic resistance”

This dissertation successfully investigated the possible impact of climate change on the behaviour and survival of the parasite *Cooperia oncophora*. Additionally, influences on the development of anthelmintic resistance (AR) in trichostrongyles were assessed in a field experiment. In Germany effects of a changing climate are already evident and their impact on cattle industry will increase. They can be divided in direct effects such as heat and drought stress or indirect effects which comprise the fodder production and affect cattle parasites. *C. oncophora* and *O. ostertagi* are the most important gastrointestinal parasites of cattle in Germany and were therefore in the focus of the described work. They impact the well-being, health and the performance of dairy cows and beef stock.

Gastrointestinal parasites spend most of their life cycle outside the host on pasture and there they are exposed to environmental conditions. The results confirm that higher temperatures and long lasting drought stress effect negatively the survival and fitness of the third and infectious larval stage (L3). During the last years the reports about AR in gastrointestinal parasites increased. It could be shown that a reduced refugium leads to a higher selection pressure which accelerates the development of AR. In a greenhouse- and a climate chamber experiment was investigated if the effects of a future climate change in Germany will lead to a higher selection pressure of GI parasites. For this purpose two new methods were developed to recover L3 from herbage and soil samples. Both methods showed a higher recovery with a smaller variance than previously used methods and they were feasible fast and without the use of hazardous substances. The greenhouse experiment proved the negative influence of drought stress on the occurrence of *C. oncophora* L3 on herbage while a higher legume content has a positive effect. The greenhouse experiment raised the suspicion that a big part of the L3 population is located in soil. This hypothesis was confirmed in the climate chamber experiment. In this experiment it was also shown how higher temperatures affect negatively the fitness of L3 on herbage and in soil and that the combination of higher temperatures and long lasting drought stress has an even stronger impact on L3 fitness and occurrence. The development of a resistance against BZ was examined using a partly resistant *O. ostertagi* isolate in a field experiment. Although this was not under laboratory conditions and calves also infected themselves by grazing with *C. oncophora*, *H. contortus* and *T. colubriformis* the part of resistant *O. ostertagi* could be increased by only five sub-therapeutic treatments. Sub-

Summary

therapeutic treatments are common in practice and they are one of the main reasons for the increase of anthelmintic resistance. Using pyrosequencing the increase of the alleles associated with resistance could be exactly monitored. It was shown that the faecal egg count reduction test (FECRT), which is mainly used in the field to detect AR, is not accurate enough for an early detection of AR, because FECRT allows no species differentiation, and additionally the number of eggs is also dependent on the sampling date. All experiments show that it is important for German livestock farmers to adapt their anthelmintic treatment management since climate change will possibly increase the AR problem. A possibility to estimate the infection pressure of MDS on pasture may lay in the development of models. For detailed models the obtained data from the greenhouse and the climate chamber experiment could be important, but more experiments should be performed to generate larger data sets. For example the survival and fitness of L3 after the winter months on pasture and also if there are differences between the sensitivity against environmental conditions between anthelmintic susceptible or resistant L3 are poorly examined.

9 Literaturverzeichnis

- Agneessens J, Dorny P, Hollanders W, Claerebout E, Vercruyse J (1997) Epidemiological observations on gastrointestinal nematode infections in grazing cow-calf pairs in Belgium. *Vet Parasitol* 69(1-2):65-75
- AlzChemAG (2015) In: Seibel, U. <http://www.kalkstickstoff.de/de/wirkung/weideparasiten>
- Amaradasa BS, Lane RA, Manage A (2010) Vertical migration of *Haemonchus contortus* infective larvae on *Cynodon dactylon* and *Paspalum notatum* pastures in response to climatic conditions. *Vet Parasitol* 170(1-2):78-87
- Andrews SJ (2000) The efficacy of levamisole, and a mixture of oxfendazole and levamisole, against the arrested stages of benzimidazole-resistant *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* in sheep. *Vet Parasitol* 88(1-2):139-46
- Anziani OS, Suarez V, Guglielmone AA, Warnke O, Grande H, Coles GC (2004) Resistance to benzimidazole and macrocyclic lactone anthelmintics in cattle nematodes in Argentina. *Vet Parasitol* 122(4):303-6
- Anziani OS, Zimmermann G, Guglielmone AA, Vazquez R, Suarez V (2001) Avermectin resistance in *Cooperia pectinata* in cattle in Argentina. *Vet Rec* 149(2):58-9
- Armour J, et al. (1987) Pathophysiological and parasitological studies on *Cooperia oncophora* infections in calves. *Res Vet Sci* 42(3):373-81
- Barda BD, et al. (2013) Mini-FLOTAC, an Innovative Direct Diagnostic Technique for Intestinal Parasitic Infections: Experience from the Field. *PLoS Negl Trop Dis* 7(8):e2344
- Becerra-Nava R, Alonso-Díaz MA, Fernández-Salas A, Quiroz RH (2014) First report of cattle farms with gastrointestinal nematodes resistant to levamisole in Mexico. *Vet Parasitol* 204(3-4):285-90
- Belz JU (2013) Länderübergreifende Analyse des Juni-Hochwassers 2013. vol BfG-1797. Deutscher Wetterdienst, Koblenz, p 69
- Bissolli P, K. Friedrich, J. Rapp, M. Ziese (2010) Hochwasser im östlichen Mitteleuropa im Mai 2010. Deutscher Wetterdienst Geschäftsbereich Klima und Umwelt
- BMEL (2014) Landwirtschaft verstehen Fakten und Hintergründe. In: Landwirtschaft BfEu (ed). Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL)
- Boa ME, Thamsborg SM, Kyvsgaard NC, Kassuku AA (1998) Comparison of two techniques used for quantification of ovine gastrointestinal nematode larvae in herbage. *Acta Vet Scand* 39(1):141-4
- Boag B, Thomas RJ (1985) The effect of temperature on the survival of infective larvae of nematodes. *J Parasitol* 71(3):383-4
- Boch J, Schnieder T, Supperer R, Bauer C (2006) Veterinärmedizinische Parasitologie. Parey
- Bohmanova J, Misztal I, Cole JB (2007) Temperature-humidity indices as indicators of milk production losses due to heat stress. *J Dairy Sci* 90(4):1947-56
- Boller BC (1985) Photosynthesis of white clover leaves as influenced by canopy position, leaf age, and temperature. *Annal of Botany* 56:19-27
- Bosco A, Rinaldi L, Maurelli MP, Musella V, Coles GC, Cringoli G (2014) The comparison of FLOTAC, FECPAK and McMaster techniques for nematode egg counts in cattle. *Acta Parasitol* 59(4):625-8
- Boyle RA, et al. (2014) Stabilization of the coupled oxygen and phosphorus cycles by the evolution of bioturbation. *Nature Geosci* advance online publication
- Brandt C, et al. (2014) The bigger picture: The history of antibiotics and antimicrobial resistance displayed by scientometric data. *Int J Antimicrob Ag* 44(5):424-430
- Brozeit HE, Wieners KA (1976) Einsatz von Kalkstickstoff auf Weideflächen zur Bekämpfung des Magen- und Darmwurmbefalls bei Rindern - Ergebnisse eines 4jährigen Feldversuchs. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 83(Heft 7, Sonderdruck):327-330
- Burggraaf VT, Boom CJ, Sheath GW, Brooky AR (2010) The effect of rotational grazing by either calves, cows, lambs or ewes on the removal of herbage contaminated with gastro-intestinal parasite larvae around cattle faecal pats. *New Zeal J Agr Res* 52:289-297
- Callinan AP, Westcott JM (1986) Vertical distribution of trichostrongylid larvae on herbage and in soil. *Int J Parasitol* 16(3):241-4
- Carlsson AM, et al. (2012) Disease transmission in an extreme environment: Nematode parasites infect reindeer during the Arctic winter. *Int J Parasitol* 42(8):789-795
- Čerňanská D, Várady M, Čorba J (2006) A survey on anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in the Slovak Republic. *Vet Parasitol* 135(1):39-45
- Charlier J, Demeler J, Höglund J, von Samson-Himmelstjerna G, Dorny P, Vercruyse J (2010) *Ostertagia ostertagi* in first-season grazing cattle in Belgium, Germany and Sweden: general levels of infection and related management practices. *Vet Parasitol* 171(1-2):91-8

Literaturverzeichnis

- Charlier J, Höglund J, von Samson-Himmelstjerna G, Dorny P, Vercruyse J (2009) Gastrointestinal nematode infections in adult dairy cattle: impact on production, diagnosis and control. *Vet Parasitol* 164(1):70-9
- Charlier J, Van der Voorta M, Hogeveen H, Vercruyse J (2012) ParaCalc®—A novel tool to evaluate the economic importance of worm infections on the dairy farm. *Vet Parasitol* 184(2-4):204-211
- Chintoan-Uta C, Morgan ER, Skuce PJ, Coles GC (2014) Wild deer as potential vectors of anthelmintic-resistant abomasal nematodes between cattle and sheep farms, vol 281,
- Chmielewski F-M, Müller A, Bruns E (2004) Climate changes and trends in phenology of fruit trees and field crops in Germany, 1961–2000. *Agr Forest Meteorol* 121(1–2):69-78
- Chylinski C, Lherminé E, Coquille M, Cabaret J (2014) Desiccation tolerance of gastrointestinal nematode third-stage larvae: exploring the effects on survival and fitness. *Parasitol Res* 113(8):2789-2796
- Claerebout E, Vercruyse J (2000) The immune response and the evaluation of acquired immunity against gastrointestinal nematodes in cattle: a review. *Parasitology* 120 Suppl:S25-42
- CliniPharm (2012) In: Institut für Veterinärpharmakologie und -toxikologie. <http://vptserver1.uzh.ch/indexcpt.htm>
- Coles GC, et al. (1992) World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 44(1–2):35-44
- Cook J, et al. (2013) Quantifying the consensus on anthropogenic global warming in the scientific literature. *Environ Res Lett* 8(2):024024
- Coop RL, Kyriazakis I (1999) Nutrition-parasite interaction. *Vet Parasitol* 84(3-4):187-204
- Cooper K, Kennedy DG, Danaher M (2012) ProSafeBeef and anthelmintic drug residues—a case study in collaborative application of multi-analyte mass spectrometry to enhance consumer safety. *Anal Bioanal Chem* 404(6-7):1623-1630
- Coppock CE (1985) Energy Nutrition and Metabolism of the Lactating Dairy Cow. *J Dairy Sci* 68(12):3403-3410
- Cringoli G, Rinaldi L, Maurelli MP, Utzinger J (2010) FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. *Nature Protocols* 5(3):503-515
- Crofton HD (1948) The ecology of immature phases of trichostrongyle nematodes; the vertical distribution of infective larvae of *Trichostrongylus retortaeformis* in relation to their habitat. *Parasitology* 39(1-2):17-25
- Czajka C, et al. (2014) Stable Transmission of *Dirofilaria repens* Nematodes, Northern Germany. *Emerg Infect Dis* 20(2):329-331
- Dauguschies A (2014) Veterinärparasitologie heute: aktuelle Probleme, neues Wissen, moderne Optionen: Tagung der DVG-Fachgruppe "Parasitologie und Parasitäre Krankheiten"; Leipzig, 30. Juni bis 2. Juli 2014. DVG-Service
- Davidson JL, Milthorpe FL (1965) The effect of temperature on the growth of cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.). *Ann Bot London* 29:407-417
- De Graef J, et al. (2012) Assessing resistance against macrocyclic lactones in gastro-intestinal nematodes in cattle using the faecal egg count reduction test and the controlled efficacy test. *Vet Parasitol* 189(2-4):378-82
- Demeler J (2005) The Physiological Site of Action and the Site of Resistance to the Macrocyclic Lactone Anthelmintics in Sheep Parasitic Trichostrongyloid Nematodes. University of Veterinary Medicine Hannover
- Demeler J, Knapp F, Corte GM, Katzschke O, Steininger K, Samson-Himmelstjerna G (2012) Recovery of strongylid third-stage larvae from herbage samples: standardisation of a laboratory method and its application in the field. *Parasitol Res* 110(3):1159-64
- Demeler J, et al. (2013) Phylogenetic characterization of beta-tubulins and development of pyrosequencing assays for benzimidazole resistance in cattle nematodes. *PLoS One* 8(8):e70212
- Deplazes P, Eckert J, von Samson-Himmelstjerna G, Zahner H (2012) Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. Enke
- Donald AD, Waller PJ, Dobson RJ, Axelsen A (1980) The effect of selection with levamisole on benzimidazole resistance in *Ostertagia* spp. of sheep. *Int J Parasitol* 10(5-6):381-9
- Dopico XC, et al. (2015) Widespread seasonal gene expression reveals annual differences in human immunity and physiology. *Nat Commun* 6
- Dorny P, Claerebout E, Vercruyse J, Hilderson H, Huntley JF (1997) The influence of a *Cooperia oncophora* priming on a concurrent challenge with *Ostertagia ostertagi* and *C. oncophora* in calves. *Vet Parasitol* 70(1-3):143-51

Literaturverzeichnis

- Doward J (2014) Organic food back in vogue as sales increase. the Guardian, <http://www.theguardian.com/environment/2014/feb/09/organic-produce-sales-increase>
- Durie PH (1959) A new technique for the recovery of infective strongyle larvae from soil and pasture. J Helminthol 33:189-96
- Dusenbery D (1989) A simple animal can use a complex stimulus pattern to find a location: Nematode thermotaxis in soil. Biol Cybern 60(6):431-437
- Easterling DR, Meehl GA, Parmesan C, Changnon SA, Karl TR, Mearns LO (2000) Climate Extremes: Observations, Modeling, and Impacts. Science 289(5487):2068-2074
- Edmonds MD, Johnson EG, Edmonds JD (2010) Anthelmintic resistance of *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora* to macrocyclic lactones in cattle from the western United States. Vet Parasitol 170(3-4):224-9
- Egwang TG, Slocombe JO (1982) Evaluation of the Cornell-Wisconsin centrifugal flotation technique for recovering trichostrongylid eggs from bovine feces. Can J Comp Med 46(2):133-7
- Eysker M (1997) Some aspects of inhibited development of trichostrongylids in ruminants. Vet Parasitol 72(3-4):265-283
- Eysker M, Bakker N, Kooyman FN, Ploeger HW (2005) The possibilities and limitations of evasive grazing as a control measure for parasitic gastroenteritis in small ruminants in temperate climates. Vet Parasitol 129(1-2):95-104
- Eysker M, et al. (2006) The impact of daily *Duddingtonia flagrans* application to lactating ewes on gastrointestinal nematode infections in their lambs in the Netherlands. Vet Parasitol 141(1-2):91-100
- Fahrenkrog J (2013) Optimierung der Parasitenbekämpfung bei Weidehaltung von Rindern. mbv, Mensch-und-Buch-Verlag
- Feldman DR, Collins WD, Gero PJ, Torn MS, Mlawer EJ, Shippert TR (2015) Observational determination of surface radiative forcing by CO₂ from 2000 to 2010. Nature advance online publication
- Fernandez S, Sarkunas M, Roepstorff A (2001) Survival of infective *Ostertagia ostertagi* larvae on pasture plots under different simulated grazing conditions. Vet Parasitol 96(4):291-9
- Feßler AT, et al. (2011) Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Food and Food Products of Poultry Origin in Germany. Appl Environ Microb 77(20):7151-7157
- Fiel CA, Fernández AS, Rodríguez EM, Fusé LA, Steffan PE (2012) Observations on the free-living stages of cattle gastrointestinal nematodes. Vet Parasitol 187(1-2):217-26
- Fiel CA, Saumell CA, Steffan PE, Rodríguez EM (2001) Resistance of *Cooperia* to ivermectin treatments in grazing cattle of the Humid Pampa, Argentina. Vet Parasitol 97(3):211-7
- Fox NJ, White PC, McClean CJ, Marion G, Evans A, Hutchings MR (2011) Predicting impacts of climate change on *Fasciola hepatica* risk. PLoS One 6(1):e16126
- Freckman DW, Mankau R, Ferris H (1975) Nematode community structure in desert soils: nematode recovery. J Nematol 7(4):343-6
- Gasser RB, Newton SE (2000) Genomic and genetic research on bursate nematodes: significance, implications and prospects. Int J Parasitol 30(4):509-534
- Gauly M, et al. (2013) Future consequences and challenges for dairy cow production systems arising from climate change in Central Europe - a review. Animal 7(5):843-59
- Ghisi M, Kaminsky R, Mäser P (2007) Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. Vet Parasitol 144(3-4):313-20
- Godber OF, et al. (2015) A comparison of the FECPAK and Mini-FLOTAC faecal egg counting techniques. Vet Parasitol 207(3-4):342-345
- Gordon HM, Whitlock HV (1939) A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. J Counc Sci Ind Res 12:50 - 52
- Gray JS, Dautel H, Estrada-Peña A, Kahl O, Lindgren E (2009) Effects of Climate Change on Ticks and Tick-Borne Diseases in Europe. Interdiscip Perspect Infect Dis 2009:593232
- Grenfell BT, Smith G, Anderson RM (1986) Maximum-likelihood estimates of the mortality and migration rates of the infective larvae of *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora*. Parasitology 92 (Pt 3):643-52
- Grønvold J (1987) Field experiment on the ability of earthworms (Lumbricidae) to reduce the transmission of infective larvae of *Cooperia oncophora* (Trichostrongylidae) from cow pats to grass. J Parasitol 73(6):1133-7
- Gruner L, Mauleon H, Sauve C (1982) Migrations of trichostrongyle infective larvae experiments with ovine parasites in soil. Ann Rech Vet 13(1):51-9

Literaturverzeichnis

- Haberlandt U, Belli A, Hölscher J (2010) Trends in beobachteten Zeitreihen von Temperatur und Niederschlag in Niedersachsen. *Hydrol Wasserbewirtsch* 54:28-36
- Harder A (2002) Chemotherapeutic approaches to nematodes: current knowledge and outlook. *Parasitol Res* 88(3):272-7
- Held J (30.03.2015) Verbrauch an "Reserveantibiotika": Humanmedizin 300 - Tiermedizin 15,8 Tonnen.
- Henriksen SA, Jørgensen RJ, Nansen P, Sejrsen KR, Brolund Larsen J, Klausen S (1976) Ostertagiasis in calves. I. The effect of control measures on infection levels and body weight gains during the grazing season in Denmark. *Vet Parasitol* 2(3):259-272
- Hoar BM, Ruckstuhl K, Kutz S (2012) Development and availability of the free-living stages of *Ostertagia gruehneri*, an abomasal parasite of barren-ground caribou (*Rangifer tarandus groenlandicus*), on the Canadian tundra. *Parasitology* 139(8):1093-1100
- Höglund J, Dahlström F, Sollenberg S, Hessle A (2013) Weight gain-based targeted selective treatments (TST) of gastrointestinal nematodes in first-season grazing cattle. *Vet Parasitol* 196(3-4):358-365
- Höglund J, Gustafsson K, Ljungström BL, 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(1-2):60-8
- Hohlmann B (2011) Weidebeprobung für KLIFF (Klimafolgenforschung in Niedersachsen). In: Knapp F (ed).
- Hora F, Narcisa M, Corina B, Illie M, Darabus G (2014) The efficacy of the product Albendazole 10% of gastrointestinal nematode parasitism in sheep tested. *Medicamental Veterinar / Veterinary Drug* 8:61-64
- Hsu WH (1980) Toxicity and drug interactions of levamisole. *J Am Vet Med Assoc* 176(10 Spec No):1166-9
- Huebner K (2009) A Taste for Organic Food. <http://ourworld.unu.edu/en/a-taste-for-organic-food>. Our World
- Humbert JF, Cabaret J, Elard L, Leignel V, Silvestre A (2001) Molecular approaches to studying benzimidazole resistance in trichostrongylid nematode parasites of small ruminants. *Vet Parasitol* 101(3-4):405-14
- Huston MA, et al. (2000) No Consistent Effect of Plant Diversity on Productivity. *Science* 289(5483):1255
- Imperiale F, et al. (2011) Residual concentrations of the flukicidal compound triclabendazole in dairy cows' milk and cheese. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 28(4):438-45
- Jackson F, Coop RL (2000) The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitology* 120 Suppl:S95-107
- Jackson R, et al. (2006) Anthelmintic resistance and management of nematode parasites on beef cattle-rearing farms in the North Island of New Zealand. *N Z Vet J* 54(6):289-96
- Jacob D, Bülow, K., Kotova, L., Moseley, C., Petersen, J., Rechid, D. (2012) Regionale Klimaprojektionen für Europa und Deutschland: Ensemble-Simulationen für die Klimafolgenforschung CSC Report 6, Climate Service Center, Germany. Climate Service Center (CSC), Fischertwiete 1, 20095 Hamburg
- Jozef Vercruyse, Johannes Charlier, Pierre Dorny, Claerebout E (2006) Diagnosis of helminth infections in cattle: Were we wrong in the past? Paper presented at the XXIV World Buiatrics Congress,
- Kadzere CT, Murphy MR, Silanikove N, Maltz E (2002) Heat stress in lactating dairy cows: a review. *Livest Prod Sci* 77(1):59-91
- Kanobana K, Ploeger HW, Eysker M, Vervelde L (2004) Individual variation and effect of priming dose level on establishment, growth and fecundity of *Cooperia oncophora* in re-infected calves. *Parasitology* 128(Pt 1):99-109
- Kaplan RM, Vidyashankar AN (2012) An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. *Vet Parasitol* 186(1-2):70-8
- Kendall PE, Webster JR (2009) Season and physiological status affects the circadian body temperature rhythm of dairy cows. *Livest Sci* 125(2-3):155-160
- Kenyon F, et al. (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(1):3-11
- Kloosterman A, Albers GA, van den Brink R (1984) Negative interactions between *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora* in calves. *Vet Parasitol* 15(2):135-50
- Knapp-Lawitzke F, Krücken J, Ramünke S, von Samson-Himmelstjerna G, Demeler J (2015) Rapid selection for β -tubulin alleles in codon 200 conferring benzimidazole resistance in an *Ostertagia ostertagi* isolate on pasture. *Vet Parasitol* 209(1-2):84-92
- Knapp-Lawitzke F, Küchenmeister F, Küchenmeister K, von Samson-Himmelstjerna G, Demeler J (2014) Assessment of the impact of plant species composition and drought stress on survival of strongylid third-stage larvae in a greenhouse experiment. *Parasitol Res* 113(11):4123-31
- Knapp-Lawitzke F, Von Samson-Himmelstjerna G, Demeler J (2016) Elevated temperatures and long drought periods have a negative impact on survival and fitness of strongylid third stage larvae. *Int J Parasitol*

Literaturverzeichnis

- Knox MR, et al. (2012) Novel approaches for the control of helminth parasites of livestock VI: summary of discussions and conclusions. *Vet Parasitol* 186(1-2):143-9
- Kotze AC, et al. (2014) Recent advances in candidate-gene and whole-genome approaches to the discovery of anthelmintic resistance markers and the description of drug/receptor interactions. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 3:164-184
- Küchenmeister F, Küchenmeister K, Kayser M, Wrage-Mönnig N, Isselstein J (2014) Effects of Drought Stress and Sward Botanical Composition on the Nutritive Value of Grassland Herbage. *Int J Agr Biol*(16):715-722
- Küchenmeister F, Küchenmeister K, Wrage N, Kayser M, Isselstein J (2012a) Yield and yield stability in mixtures of productive grassland species: Does species number or functional group composition matter? *Grassl Sci* 58(2):94-100
- Küchenmeister K, Küchenmeister F, Kayser M, Wrage-Mönnig N, J I (2013) Influence of drought stress on the nutritive value of perennial forage legumes. *Int J Plant Prod* 7(4):693–710.
- Küchenmeister K, Küchenmeister F, Wrage N, Kayser M, Isselstein J (2012b) Establishment and Early Yield Development of Five Possible Alternatives to *Trifolium repens* as a Grassland Legume. *J Agric Sci* 4(8)
- Kutz SJ, Hoberg EP, Polley L, Jenkins EJ (2005) Global warming is changing the dynamics of Arctic host-parasite systems. *Proc Biol Sci* 272(1581):2571-6
- Kwa MSG, Veenstra JG, Roos MH (1994) Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in β -tubulin isotype 1. *Mol Biochem Parasitol* 63(2):299-303
- Lane C (1980) The Development of Pastures and Meadows during the Sixteenth and Seventeenth Centuries. *Agr Hist Rev* 28(1):18-30
- Leathwick DM (2013) The influence of temperature on the development and survival of the pre-infective free-living stages of nematode parasites of sheep. *N Z Vet J* 61(1):32-40
- Leignel V, Silvestre A, Humbert JF, Cabaret J (2010) Alternation of anthelmintic treatments: a molecular evaluation for benzimidazole resistance in nematodes. *Vet Parasitol* 172(1-2):80-8
- Lettini SE, Sukhdeo MVK (2006) Anhydrobiosis increases survival of trichostrongyle nematodes. *J Parasitol* 92(5):1002-1009
- Leveck B, et al. (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(1-2):194-9
- Leveck B, et al. (2011) Monitoring drug efficacy against gastrointestinal nematodes when faecal egg counts are low: do the analytic sensitivity and the formula matter? *Parasitol Res* 109(3):953-7
- Lišková M, Renco M (2007) Communities of free living and plant parasitic nematodes in hop gardens in Slovakia. *Helminthologia* 44,2:80-86
- Madaus G (1976) Lehrbuch der biologischen Heilmittel. Olms
- Margolis RL, Wilson L (1998) Microtubule treadmilling: what goes around comes around. *Bioessays* 20(10):830-6
- Marley CL, Cook R, Barrett J, Keatinge R, Lampkin NH (2006) The effects of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and chicory (*Cichorium intybus*) when compared with perennial ryegrass (*Lolium perenne*) on ovine gastrointestinal parasite development, survival and migration. *Vet Parasitol* 138(3-4):280-90
- Martin PJ, Anderson N, Jarrett RG (1989) Detecting benzimidazole resistance with faecal egg count reduction tests and *in vitro* assays. *Aust Vet J* 66(8):236-40
- Martin PJ, Le Jambre LF, Claxton JH (1981) The impact of refugia on the development of thiabendazole resistance in *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol* 11(1):35-41
- Martin RR, Beveridge I, Pullman AL, Brown TH (1990) A modified technique for the estimation of the number of infective nematode larvae present on pasture, and its application in the field under South Australian conditions. *Vet Parasitol* 37(2):133-43
- McDonnell T (2015) Obama on Climate Change: "No Challenge Poses a Greater Threat to Future Generations". <http://www.motherjones.com/environment/2015/01/obama-climate-change-state-union>, Mother Jones
- Medicus LW (1829) Zur Geschichte des künstlichen Futterbaues oder des Anbaues der vorzüglichsten Futterkräuter, Wiesenklees, Luzerne, Esper, Wecke und Spergel. Bayerische Staatsbibliothek, <https://books.google.de/books?id=gQJPAAAAcAAJ>
- Mejía ME, Fernández Igartúa BM, Schmidt EE, Cabaret J (2003) Multispecies and multiple anthelmintic resistance on cattle nematodes in a farm in Argentina: the beginning of high resistance? *Vet Res* 34(4):461-7
- Mendelsohn R, Nordhaus WD, Shaw D (1994) The Impact of Global Warming on Agriculture: A Ricardian Analysis. *Am Econ Rev* 84(4):753-771
- Mes TH (2003) Technical variability and required sample size of helminth egg isolation procedures. *Vet Parasitol* 115(4):311-20

Literaturverzeichnis

- Michel JF, Lancaster MB, Hong C (1975) Arrested development of *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora*. Effect of temperature at the free-living third stage. *J Comp Pathol* 85(1):133-8
- Milošević NP, Dimova VB, Perišić-Janjić NU (2013) RP TLC data in correlation studies with in silico pharmacokinetic properties of benzimidazole and benzotriazole derivatives. *Euro J of Pharm Sci* 49(1):10-17
- Min BR, Barry TN, Attwood GT, McNabb WC (2003) The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Anim Feed Sci Tech* 106(1-4):3-19
- Mirams G (2015) Techion Group Ltd Technology in Action. In. <http://www.techiongroup.co.nz/>
- Molento MB, Depner RA, Mello MHA (2006) Suppressive treatment of abamectin against *Dictyocaulus viviparus* and the occurrence of resistance in first-grazing-season calves. *Vet Parasitol* 141(3-4):373-376
- Moore JF (1978) Occurrence of Trichostrongylid Nematodes in Cattle Slurry. *Irish J Agr Res* 17(3):255-266
- Morgan E, et al. (2013) Global Change and Helminth Infections in Grazing Ruminants in Europe: Impacts, Trends and Sustainable Solutions. *Agriculture* 3(3):484-502
- Moser T, Frankenbach S (2009) Methodological adaptation for nematodes extration in forest soils of the southern Mata Atlântica. *Pesqui Agropecu Bras* 44:975-980
- Nansen P, Jørgensen RJ, Hansen JW, Sejrsen K (1978) Some factors influencing the exposure of grazing cattle to trichostrongyle infection. *Vet Sci Commun* 2(1):193-205
- Nardone A, Lacetera N, Bernabucci U, Ronchi B (1997) Composition of Colostrum from Dairy Heifers Exposed to High Air Temperatures During Late Pregnancy and the Early Postpartum Period. *J Dairy Sci* 80(5):838-844
- Neuerburg W (2011) EU-Verordnung Ökologischer Landbau. In: Ministerium für Klimaschutz U, Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen (ed). Düsseldorf
- Nieuwhof GJ, Bishop SC (2005) Costs of the major endemic diseases of sheep in Great Britain and the potential benefits of reduction in disease impact. *Anim Sci* 81(01):23-29
- Nogales E (2000) Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem* 69:277-302
- Nogareda C, Mezo M, Uriarte J, Lloveras J, Cordero del Campillo M (2006) Dynamics of infestation of cattle and pasture by gastrointestinal nematodes in an Atlantic temperate environment. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 53(9):439-44
- Novobilský A, Mueller-Harvey I, Thamsborg SM (2011) Condensed tannins act against cattle nematodes. *Vet Parasitol* 182(2-4):213-20
- O'Brien AM, et al. (2012) MRSA in conventional and alternative retail pork products. *PLoS One* 7(1):e30092
- O'Connor LJ, Kahn LP, Walkden-Brown SW (2008) Interaction between the effects of evaporation rate and amount of simulated rainfall on development of the free-living stages of *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 155(3-4):223-34
- O'Connor LJ, Walkden-Brown SW, Kahn LP (2006) Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. *Vet Parasitol* 142(1-2):1-15
- Ortiz P, et al. (2014) Oxfendazole flukicidal activity in pigs. *Acta Tropica* 136(0):10-13
- Osei-Atweneboana MY, Eng JK, Boakye DA, Gyapong JO, Prichard RK (2007) Prevalence and intensity of *Onchocerca volvulus* infection and efficacy of ivermectin in endemic communities in Ghana: a two-phase epidemiological study. *Lancet* 369(9578):2021-9
- Pandey VS (1972) Effect of Temperature on Survival of the Free-Living Stages of *Ostertagia ostertagi*. *J Parasitol* 58(6):1042-1046
- Papadopoulos E, Himonas C, Coles GC (2001) Drought and flock isolation may enhance the development of anthelmintic resistance in nematodes. *Vet Parasitol* 97(4):253-9
- Pearce R, Yeadon L (2013) WAAVP 50th Anniversary Commemorative Book. Shernacre Enterprise Limited, Worcestershire, UK
- Persson L (1974) Studies on the survival of eggs and infective larvae of *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora* in herbage. *Zbl Vet Med B* 21(10):787-98
- Phillips I, et al. (2004) Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J Antimicrob Chemother* 53(1):28-52
- Ploeger HW, Kloosterman A, Rietveld FW (1995) Acquired immunity against *Cooperia* spp. and *Ostertagia* spp. in calves: effect of level of exposure and timing of the midsummer increase. *Vet Parasitol* 58(1-2):61-74
- Podstatzky L (2012) Einsatz von Düngemitteln und ihre Wirkung auf Parasitenstadien. Paper presented at the Parasitologische Fachtagung für biologische Landwirtschaft 2012, 1 – 3,
- Ramírez-Restrepo CA, Barry TN, Pomroy WE, López-Villalobos N, McNabb WC, Kemp PD (2005) Use of *Lotus corniculatus* containing condensed tannins to increase summer lamb growth under commercial dryland farming conditions with minimal anthelmintic drench input. *Anim Feed Sci Tech* 122(3-4):197-217

Literaturverzeichnis

- Rehbein S, Lutz W, Visser M, Winter R (2001) Beiträge zur Kenntnis der Parasitenfauna des Wildes in Nordrhein-Westfalen. 2. Der Endoparasitenbefall des Damwildes. *Z Jagdwiss* 47(1):1-16
- Rehbein S, Lutz W, Visser M, Winter R (2002) Beiträge zur Kenntnis der Parasitenfauna des Wildes in Nordrhein-Westfalen. 3. Der Endoparasitenbefall des Rotwildes. *Z Jagdwiss* 48(2):69-93
- Rendell DK (2010) Anthelmintic resistance in cattle nematodes on 13 south-west Victorian properties. *Aust Vet J* 88(12):504-509
- Reuder J, Dameris M, Koepke P (2001) Future UV radiation in Central Europe modelled from ozone scenarios. *J Photochem Photobiol B* 61(3):94-105
- Rignot E, Mougnot J, Morlighem M, Seroussi H, Scheuchl B (2014) Widespread, rapid grounding line retreat of Pine Island, Thwaites, Smith, and Kohler glaciers, West Antarctica, from 1992 to 2011. *Geophys Res Lett* 41(10):3502-3509
- Robinson MW, McFerran N, Trudgett A, Hoey L, Fairweather I (2004) A possible model of benzimidazole binding to beta-tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement. *J Mol Graph Model* 23(3):275-84
- Roessig J, Woodley C, Cech J, Jr., Hansen L (2004) Effects of global climate change on marine and estuarine fishes and fisheries. *Rev Fish Biol Fisher* 14(2):251-275
- Roos MH (1997) The role of drugs in the control of parasitic nematode infections: must we do without? *Parasitology* 114 Suppl:S137-44
- Rose H, Wang T, van Dijk J, Morgan E (2015) GLOWORM-FL: A simulation model of the effects of climate and climate change on the free-living stages of gastro-intestinal nematode parasites of ruminants. *Ecol Model* 297(0):232-245
- Rose JH (1961) Some observations on the free-living stages of *Ostertagia ostertagi*, a stomach worm of cattle. *Parasitology* 51:295-307
- Rossanigo CE, Gruner L (1994) Relative effect of temperature and moisture on the development of strongyle eggs to infective larvae in bovine pats in Argentina. *Vet Parasitol* 55(4):317-25
- Rubel F, Brugger K, Dautel H, Kahl o, Leverenz S (2014) A new map of geo-referenced hard tick locations in Germany. Paper presented at the Workshop on Ticks and Tick-borne Diseases, , At Berlin, Germany,
- Rudolf B, J. Rapp (2003) The Century Flood of the River Elbe in August 2002: Synoptic Weather Development and Climatological Aspects Quarterly Report of the Operational NWP-Models of the Deutscher Wetterdienst, Special Topic July 2003. Deutscher Wetterdienst
- Rudolf B., H. M (2006) Das Frühjahrshochwasser der Elbe 2006 aus hydrometeorologischer Sicht. vol Interner Bericht. DWD, Abt. Hydrometeorologie
- Saberi M, Davari A, Pouzesh H, Shahriari A (2013) Effect of different levels of salinity and temperature on seeds germination characteristics of two range Species under laboratory condition. *Intl J Agri Crop Sci* 2013/5(14):1553-1559
- Sanchez J, Dohoo I, Carrier J, DesCôteaux L (2004) A meta-analysis of the milk-production response after anthelmintic treatment in naturally infected adult dairy cows. *Prev Vet Med* 63(3-4):237-56
- Santos MC, Silva BF, Amarante AFT (2012) Environmental factors influencing the transmission of *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 188(3-4):277-284
- Sargison N, Wilson D, Scott P (2009) Relative inefficacy of pour-on macrocyclic lactone anthelmintic treatments against *Cooperia species* in Highland calves. *Vet Rec* 164(19):603-4
- Saunders LM, Tompkins DM, Hudson PJ (2000) Spatial aggregation and temporal migration of free-living stages of the parasitic nematode *Trichostrongylus tenuis*. *Funct Ecol* 14(4):468-473
- Schmidt J (1998) Effects of benzimidazole anthelmintics as microtubule-active drugs on the synthesis and transport of surface glycoconjugates in *Hymenolepis microstoma*, *Echinostoma caproni*, and *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res* 84(5):362-368
- Schnyder M, Torgerson PR, Schönmann M, Kohler L, Hertzberg H (2005) Multiple anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus* isolated from South African Boer goats in Switzerland. *Vet Parasitol* 128(3-4):285-90
- Schüller LK, Burfeind O, Heuwieser W (2013) Short communication: Comparison of ambient temperature, relative humidity, and temperature-humidity index between on-farm measurements and official meteorological data. *J Dairy Sci* 96(12):7731-8
- Schüller LK, Burfeind O, Heuwieser W (2014) Impact of heat stress on conception rate of dairy cows in the moderate climate considering different temperature-humidity index thresholds, periods relative to breeding, and heat load indices. *Theriogenology* 81(8):1050-1057
- Scott I, Pomroy WE, Kenyon PR, Smith G, Adlington B, Moss A (2013) Lack of efficacy of monepantel against *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet Parasitol* 198(1-2):166-171
- Semenza JC, Menne B (2009) Climate change and infectious diseases in Europe. *Lancet Infect Dis* 9(6):365-375

Literaturverzeichnis

- Shorb DA (1943) Survival on Grass Plots of Eggs and Preinfective Larvae of the Common Sheep Stomach Worm, *Haemonchus contortus*. J Parasitol 29(4):284-289
- Silangwa SM, Todd AC (1964) Vertical migration of trichostrongylid larvae on grasses. Parasitol Res 50:278-285
- Silvestre A, Cabaret J (2002) Mutation in position 167 of isotype 1 beta-tubulin gene of Trichostrongylid nematodes: role in benzimidazole resistance? Mol Biochem Parasitol 120(2):297-300
- Smith G (1994) Population biology of the parasitic phase of trichostrongylid nematode parasites of cattle and sheep. Int J Parasitol 24(2):167-78
- Smolik JD, Dodd JL (1983) Effect of Water and Nitrogen, and Grazing on Nematodes in a Shortgrass Prairie. J Range Manage 36(6):744-748
- Smolik JD, Lewis JK (1982) Effect of Range Condition on Density and Biomass of Nematodes in a Mixed Prairie Ecosystem. J Range Manage 35(5):657-663
- Solomon S (2007) Climate change 2007 : the physical science basis : contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge; New York
- Soutello RG, Seno MC, Amarante AF (2007) Anthelmintic resistance in cattle nematodes in northwestern Sao Paulo State, Brazil. Vet Parasitol 148(3-4):360-4
- Stromberg BE, et al. (2012) *Cooperia punctata*: effect on cattle productivity? Vet Parasitol 183(3-4):284-91
- Suarez VH, Cristel SL (2007) Anthelmintic resistance in cattle nematode in the western Pampeana Region of Argentina. Vet Parasitol 144(1-2):111-7
- Sutherland IA, Leathwick DM (2011) Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue? Trends Parasitol 27(4):176-81
- Taalas P, et al. (2000) The impact of greenhouse gases and halogenated species on future solar UV radiation doses. Geophys Res Lett 27(8):1127-1130
- Takagi H, Block E (1986) Effects of feeding coumaphos to dairy cows at various stages of lactation on subclinical parasite infection and milk production. Can J of Anim Sci 66(1):141-150
- Taubert A (2013) Aktuelle Erkenntnisse aus der Veterinärparasitologie : [Tagung der] DVG-Fachgruppe "Parasitologie und Parasitäre Krankheiten" ; Gießen, 8. bis 10. Juli 2013. DVG
- Thamsborg SM, Roepstorff A, Larsen M (1999) Integrated and biological control of parasites in organic and conventional production systems. Vet Parasitol 84(3-4):169-86
- Todd KS, Jr., Levine ND, Boatman PA (1976) Effect of temperature on survival of free-living stages of *Haemonchus contortus*. Am J Vet Res 37(8):991-2
- Turner A (2012) The Indian Monsoon in a Changing Climate. <http://www.rmets.org>. Royal Meteorological Society
- UN (2012) World population projected to reach 9.6 billion by 2050 with most growth in developing regions, especially Africa – says UN. In: Affairs UDoEaS (ed). UN Press Release
- van Dijk J, de Louw MD, Kalis LP, Morgan ER (2009) Ultraviolet light increases mortality of nematode larvae and can explain patterns of larval availability at pasture. Int J Parasitol 39(10):1151-6
- van Dijk J, Morgan ER (2008) The influence of temperature on the development, hatching and survival of *Nematodirus battus* larvae. Parasitology 135(2):269-83
- van Dijk J, Morgan ER (2011) The influence of water on the migration of infective trichostrongyloid larvae onto grass. Parasitology 138(6):780-8
- van Dijk J, Sargison ND, Kenyon F, Skuce PJ (2010) Climate change and infectious disease: helminthological challenges to farmed ruminants in temperate regions. Animal 4(3):377-92
- van Wyk JA (2001) Refugia--overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. Onderstepoort J Vet Res 68(1):55-67
- van Wyk JA, Mayhew E (2013) Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: a practical lab guide. Onderstepoort J Vet Res 80(1):539
- Van Zeveren AM, Casaert S, Alvinerie M, Geldhof P, Claerebout E, Vercruysse J (2007) Experimental selection for ivermectin resistance in *Ostertagia ostertagi* in cattle. Vet Parasitol 150(1-2):104-110
- Verschave SH, Vercruysse J, Claerebout E, Rose H, Morgan ER, Charlier J (2014) The parasitic phase of *Ostertagia ostertagi*: quantification of the main life history traits through systematic review and meta-analysis. Int J Parasitol 44(14):1091-104
- Verschoor BC, De Goede RGM (2000) The nematode extraction efficiency of the Oostenbrink elutriator-cottonwool filter method with special reference to nematode body size and life strategy. Nematology 2(3):325-342
- Vigliierchio DR, Schmitt RV (1983) On the methodology of nematode extraction from field samples: baermann funnel modifications. J Nematol 15(3):438-44

Literaturverzeichnis

- von Samson-Himmelstjerna G, et al. (2009) Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes. *Parasitol Res* 105(3):825-34
- vTI (23.03.2015) Anthelminthika Rinder 2014. In: Johann Heinrich von Thünen-Institut(vTI). <http://www.weide-parasiten.de/index.php?id=7694>
- Waghorn TS, et al. (2006) Prevalence of anthelmintic resistance on 62 beef cattle farms in the North Island of New Zealand. *N Z Vet J* 54(6):278-82
- Walker RS, Miller JE, Monlezun CJ, LaMay D, Navarre C, Ensley D (2013) Gastrointestinal nematode infection and performance of weaned stocker calves in response to anthelmintic control strategies. *Vet Parasitol* 197(1-2):152-9
- Waruiru RM, Munyua WK, Thamsborg SM, Nansen P, Bøgh HO, Gathuma JM (1998) Development and survival of infective larvae of gastrointestinal nematodes of cattle on pasture in central Kenya. *Vet Sci Commun* 22(5):315-23
- Werne S, et al. (2013) Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) and faba bean (*Vicia faba*) on the periparturient rise in ewes infected with gastrointestinal nematodes. *Small Rumin Res* 113(2-3):454-460
- Williams AR, Ropiak HM, Fryganas C, Desrues O, Mueller-Harvey I, Thamsborg SM (2014) Assessment of the anthelmintic activity of medicinal plant extracts and purified condensed tannins against free-living and parasitic stages of *Oesophagostomum dentatum*. *Parasit Vectors* 7(1):518
- Williams JC, Bilkovich FR (1973) Distribution of *Ostertagia ostertagi* infective larvae on pasture herbage. *Am J Vet Res* 34(10):1337-44
- Williams JC, Knox JW, Loyacano AF (1993) Epidemiology of *Ostertagia ostertagi* in weaner-yearling cattle. *Vet Parasitol* 46(1-4):313-24
- Wilson J.R., C.W. F (1971) Temperature influences on the growth, digestibility, and carbohydrate composition of two tropical grasses, *Panicum maximum* var. *Trichoglume* and *Setaria sphacelata*, and two cultivars of the temperate grass *Lolium perenne*. *Aust J agric Res* 22:563-71
- Wolstenholme AJ, Fairweather I, Prichard R, von Samson-Himmelstjerna G, Sangster NC (2004) Drug resistance in veterinary helminths. *Trends Parasitol* 20(10):469-476
- Yazwinski TA, et al. (2009) Effectiveness evaluation of several cattle anthelmintics via the fecal egg count reduction test. *Parasitol Res* 105(1):71-6
- Young RR, Anderson N, Overend D, Tweedie RL, Malafant KW, Preston GA (1980a) The effect of temperature on times to hatching of eggs of the nematode *Ostertagia circumcincta*. *Parasitology* 81(Pt 3):477-91
- Young RR, Trajstman AC (1980b) A rapid technique for the recovery of strongyloid infective larvae from pasture and soil samples. *Parasitology* 80(3):425-31
- Zajac AM, Johnson J, King SE (2002) Evaluation of the Importance of Centrifugation as a Component of Zinc Sulfate Fecal Flotation Examinations. *J Am Anim Hosp Assoc* 38(3):221-224

Anhang

10 Anhang

10.1 Spezies-spezifische Primer

Parasitenspezies	Primerart	Primersequenz
<i>T. colubriformis</i>	Vorwärtsprimer	CTTACGTCTGGTTCAGGGTTGTT
	Rückwärtsprimer	ACTGAAATGGGAATCATCACAATATTT
<i>H. contortus</i>	Vorwärtsprimer	CCATATACTACAATGTGGCTAAATTTTC
	Rückwärtsprimer	TACAAATGATAAAAGAACATCGTCGC
<i>C. oncophora</i>	Vorwärtsprimer	ATGGCATTGTCTACATCTGTTT
	Rückwärtsprimer	ATACAAATGATAACGAATACTACTATCTCCA
<i>O. ostertagi</i>	Vorwärtsprimer	TAACATTGTTAACGTTACTGAATGATACTG
	Rückwärtsprimer	ATATAAATGATACATCGAATATACAATAC

Pyrosequenzierungsprimer

Spezies und Region	Primerart	Primersequenz
<i>O. ostertagi</i>	Vorwärtsprimer	CGTTGTTGAGCCCTACAACGCC
Codon 200	Rückwärtsprimer	Biotin-CGAAGATCAGCATTCAACTGC

10.2 Veröffentlichungen in weiteren Medien

Auswirkungen des Klimawandels auf den Selektionsdruck von Weideparasiten

Abstract des Vortrages im Tagungsband (S.32) der .DVG Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft Fachgruppe Parasitologie und parasitäre Krankheiten, 02.-04. Juli 2012, Hannover,

Artikel über obiges Abstract In der Tierärztlichen Praxis Großtiere 4/2012 © Schattauer 2012 (<http://tpg.schattauer.de/de/startseite.html> Tierärztliche Praxis Großtiere 4/2012; www.tieraerztliche-praxis.de on 2014-11-28 | ID: 1000450659 | IP: 160.45.190.198)

Anhang

Klimakammer-Versuch zur Erforschung der Auswirkungen des Klimawandels auf Weideparasiten

Abstract des Vortrages im Tagungsband (S.55) der DVG Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft Fachgruppe Parasitologie und parasitäre Krankheiten, 08-10. Juli 2013, Gießen, (Taubert 2013)

Effects of climate change regarding survival and selection pressure of cattle parasites on pasture

Abstract des Vortrages auf Seite 118 und 119 der WAAVP-Abstract-PDF der 24th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) 25-29 August, Perth, Australien,

Investigation of climatic effects on cattle parasites in an incubator-experiment

Abstract von Oral poster presentation auf der International Conference for Climate Change and Regional Response – Impacts and adaptation strategies for public, commercial and private actors (CCRR-2013), 27-29 Mai 2013, Dresden,

http://www.regklam.de/fileadmin/ccrr-2013/abstracts/YRF_CCRR2013_abstracts.pdf

Selektion von Benzimidazol-Resistenten Genotypen durch subtherapeutische Behandlungen bei Kälbern auf der Weide

Abstract des Vortrages im Tagungsband (S.58) der DVG Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft Fachgruppe Parasitologie und parasitäre Krankheiten, 30. Juni bis 2 Juli 2014 in Leipzig (Daughschies 2014).

Zusätzlich Artikel über obiges Abstract unter der Rubrik „Kälber auf der Weide“ mit dem Titel „Selektion von Benzimidazol-resistenten Genotypen durch subtherapeutische Behandlungen“ im Kongress-Magazin für Fortbildungen in der Medizin, der KompaktVET der DVG-Fachgruppe Parasitologie und parasitäre Krankheiten (Leipzig) Nr. 3 Juni 2014

Anpassungsstrategien an den Klimawandel

Video von KLIFF (Klimafolgenforschung in Niedersachsen) zum Forschungsthema Tierproduktion, veröffentlicht am 15.07.2014.

Beschreibung auf youtube.com: Welche konkreten Auswirkungen wird der Klimawandel auf regionaler Ebene haben und wie lassen sich die daraus resultierenden Probleme bewältigen? Im Rahmen des vom Niedersächsischen Ministerium für Wissenschaft und Kultur geförderten Forschungsverbundes KLIFF arbeiten Wissenschaftler aus den Disziplinen Agrar- und Forstwissenschaften, Biologie, Geographie, Ingenieurwissenschaften, Meeresforschung, Meteorologie, Raumplanung, Sozialwissenschaften und Wirtschaftswissenschaften zusammen, um Antworten auf diese Fragen zu finden. <http://www.kliff-niedersachsen.de>

Leitung KLIFF-TIERPRODUKTION : Matthias Gauly

Koordination: Martin Potthoff; Forschungs- und Studienzentrum für Landwirtschaft und Umwelt; Georg-August-Universität Göttingen

Anhang

Mitarbeit: H. Bollwein, C. Brandt, G. Breves, K. Brügemann, O. Calisici, S. Dänicke, J. Demeler, T. Gorniak, H. Hansen, J. Isselstein, F. Knapp-Lawitzke, S. König, F. Küchenmeister, K. Küchenmeister, C. Lindig, M. Lohölter, R. Manderscheid, M. Martinsohn, U. Meyer, H. Nieberg, B. Rehberg, B. Schröder, G. von Samson-Himmelstjerna, N. Wrage, C. Wrenzycki
Gesamtkoordination, Redaktion: Stella Aspelmeier

Realisation: Walter Stickan

Sektion Waldökosystemforschung; Zentrum für Biodiversität und Nachhaltige Landnutzung;
Georg-August-Universität Göttingen (<http://www.youtube.com/watch?v=Sy1IKeDjWUo>)

Anhang

10.3 Vorträge von 2011 bis 2015

„Untersuchung möglicher Unterschiede und populationsgenetischer Effekte von Anthelminthikabehandlungen auf trockenen und feuchten Weidestandorten“ 16.12. 2011
09:45-10:30: Vortrag im Rahmen des „Parasitologischen Kolloquium“ mit ATF-Stunden
Anerkennung, Veranstalter: Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin, FU Berlin

„Erfassung und Kontrolle von steigenden Gesundheitsrisiken durch parasitäre Infektionserreger bei Rindern als Folge globaler Veränderungen“ 26.01.2012: Vortrag in Hannover: zu Teilprojekt 2.3 , Vortrag im Rahmen von KLIFF (Klimafolgenforschung in Niedersachsen, gefördert vom Niedersächsischen Ministerium für Wissenschaft und Kultur)

Tracer Farms, Greenhouse Experiment, Recovery of strongylid third-stage larvae from grass and soil“ 22.02. 2012: Vortrag im Rahmen des EU-Projektes „GLOWORM“ (KBBE 2011.1.3-04, No 288975) Berlin Work Package 2

„Grass and Larvae“ 09.05.2012: Vortrag im Rahmen des EU-Projektes „GLOWORM“ (KBBE 2011.1.3-04, No 288975) Liverpool Work Package 2

„Auswirkungen des Klimawandels auf den Selektionsdruck von Weideparasiten“ 02.07.2012: Vortrag auf der DVG Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft Fachgruppe Parasitologie und parasitäre Krankheiten in Hannover

„Klimakammer-Versuch zur Erforschung der Auswirkungen des Klimawandels auf Weideparasiten“ 09.07.2013: Vortrag auf der DVG Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft Fachgruppe Parasitologie und parasitäre Krankheiten in Gießen

Anhang

„Effects of climate change regarding survival and selection pressure of cattle parasites on pasture“ 26.08.2013 Vortrag auf der 24th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) in Perth, Australien


„Untersuchung von freilebenden Stadien von Weideparasiten (L3): Klimakammer-Versuch zur Festlegung von Überlebensparametern und Weideversuch zur Überprüfung populationsgenetischer Effekte von Anthelminthikabehandlungen“ 22.11. 2013 09:00-09:45 Vortrag im Rahmen des „Parasitologischen Kolloquium“ mit ATF-Stunden Anerkennung, Veranstalter: Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin, FU Berlin

„Selektion von Benzimidazol-Resistenten Genotypen durch subtherapeutische Behandlungen bei Kälbern auf der Weide“ 01.07.2014 Vortrag auf der DVG Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft Fachgruppe Parasitologie und parasitäre Krankheiten in Leipzig


„Selektion von Benzimidazol (BZ)-resistenten Genotypen durch subtherapeutische Behandlungen bei Kälber auf der Weide und epidemiologische Untersuchungen zum Vorkommen von BZ-Resistenz bei Schafen in Europa“ 31.10.2014: 09:00-09:45 Uhr: Vortrag im Rahmen des „Parasitologischen Kolloquium“ mit ATF-Stunden Anerkennung, Veranstalter: Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin, FU Berlin

“Impact of climate change and subtherapeutic treatment on the development of anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle” Abstract wurde akzeptiert, so dass ein Vortrag auf der 25. International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) in Liverpool, UK gehalten werden kann

10.4 Poster



KLIFF - Klimafolgenforschung in Niedersachsen



Tierproduktion TP 2.3

Teilstudie II: Untersuchung möglicher Unterschiede und populationsgenetischer Effekte von Anthelminthikabehandlungen auf trockenen und feuchten Weidestandorten

F. KNAPP, J. DEMELER, G. VON SAMSON-HIMMELSTJERNA




Abb.1

Allgemeines:
Weideparasitosen haben große Auswirkungen auf die Tiergesundheit und die Leistungsfähigkeit von Rindern. Die Infektion mit den bedeutendsten Weideparasiten geschieht über ihre an Graspflanzen angehefteten (Abb.1) bzw. in der Erde befindlichen Larvenstadien. Aus diesem Grund wird praktische jedes Weiderind im Laufe seines Lebens infiziert. Die Entwicklung vom Wurmei bis zum infektiösen dritten Larvenstadium der Parasiten ist stark von den Umweltbedingungen abhängig. Es wird allgemein angenommen, dass heiße und trockene Sommer die Parasitenpopulation reduzieren, was zu einem erhöhten Selektionsdruck führt. Dieser Klimafolgenaspekt verschärft das Problem der Resistenzbildung von Weideparasiten gegen Anthelminthika. Angesichts der aktuellen Klimaveränderung gewinnt eine nachhaltige Anthelminthikabehandlung an immer größerer Bedeutung.

Ziele des Teilprojektes II:

- 1) Entwicklung einer Graswaschmethode, um Larven von Grünlandflächen zurückzugewinnen, sowie Identifizierung von Überlebensparametern freilebender Parasitenstadien.
- 2) Untersuchung der Zusammensetzung des Grünlandes auf Weideflächen und dessen Einfluß auf das Überleben von Larven.
- 3) Experimentelle Infektion der Versuchstierherden auf den Tracer-Betrieben mit *Cooperia oncophora*.
- 4) Ermittlung der Allelfrequenz bestimmter mit Anthelminthika-Resistenz korrelierender SNPs mittels Pyrosequencing.
- 5) Erfassung der populationsgenetischen Struktur mittels Microsatellitenmarkeranalyse in der Amplified-Fragment-Length-Polymorphism (Fingerprinting-) Methode.

Erste Ergebnisse:

- Es konnte eine Graswaschmethode entwickelt und erfolgreich validiert werden. Dabei stellte sich heraus, daß nach 24 h Inkubationszeit auf dem Gras eine Einweichzeit von 4 h zu einem besseren Ergebnis führt als nur 2 h.
- Wurden die Larven nur auf Gras (in einem Glas) inkubiert, konnten im Mittel 85-96 % der Larven wiedergewonnen werden. Wurden die Larven auf Gras in einem Pflanztopf inkubiert, betrug die Wiedergewinnungsrate lediglich 7-18 %. Dies läßt darauf schließen, daß sich nur ein kleiner Anteil der Population auf dem Gras befindet, während sich der weitaus größere Anteil wahrscheinlich in der Erde aufhält. Dies ist besonders bei der Schätzung der Gesamtkontamination zu berücksichtigen.

Ausblick:

- Mittels der entwickelten Graswaschmethode soll im Gewächshausversuch mit Pflanzkübeln (aus TP 2.1) der Einfluß der wichtigen Überlebensparameter (Temperatur, Feuchte & Pflanzenzusammensetzung) ermittelt werden.
- Untersuchung der Verteilung der Larven zwischen Erde und Gras in Abhängigkeit der o.g. Parameter.
- Beprobung der Weideflächen und Ermittlung der Kontamination mit Larven.
- Untersuchung der bei den monatlichen Beprobungen der Versuchstiere gewonnenen Larven auf o.g. SNPs (Pyrosequencing) und Erfassung der populationsgenetischen Struktur.

Laufzeit:

- 2009 – 2012 Erhebung und Auswertung der Daten zu klimabedingten Saisondynamiken
- 2011 – 2014 Untersuchung von Resistenzentwicklungen in Abhängigkeit vom Klima

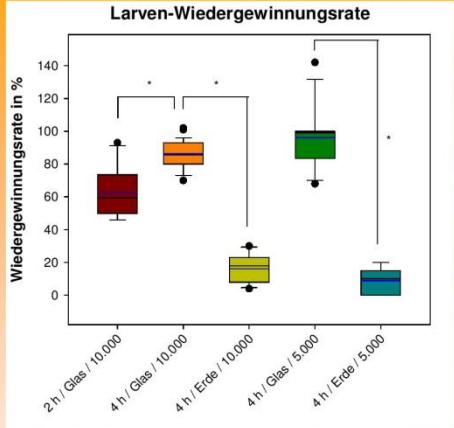



Abb.2: Die Stunden (2 & 4 h) geben die Einweichzeit nach 24-stündiger Inkubation an. Die Larven wurden entweder auf das Gras in einem Glas (Glas) oder auf die noch verwurzelte Pflanze (Erde) aufgebracht. Verglichen wurde die Wiedergewinnungsraten von 10.000 eingesetzten Larven (Plots 1, 2 & 3) und 5.000 Larven (Plots 4 & 5). * p < 0,001



Niedersächsisches Ministerium
für Wissenschaft und Kultur

Kontakt: Freie Universität Berlin, Fachbereich Veterinärmedizin
Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin
gvsamson@vetmed.fu-berlin.de

Erfassung und Kontrolle von steigenden Gesundheitsrisiken durch parasitäre Infektionserreger bei Rindern als Folge globaler Veränderungen

Christina Brandt, Friederike Knapp-Lawitzke, Georg von Samson-Himmelstjerna, Janina Demeler
Freie Universität Berlin, Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin

Allgemeines: Weideparasitosen, die zum Beispiel durch Leberegel (F.h.), Lungenwürmer (D.v.) und Magen-Darm-Parasiten (C.o. und O.o.) verursacht werden, können einen großen Einfluss auf die Tiergesundheit und Produktivität des Rindes haben. Der Klimawandel verändert auch die Umweltbedingungen für freilebende Parasitenstadien und Zwischenwirte und somit die Infektionsgefahr für den Endwirt Rind.

Teilprojekt 2.3.1:

Zur besseren Kalkulierbarkeit dieses Risikos wurden unter anderem von 2009 bis 2011 mehrmals jährlich Tankmilchproben von über 300 Betrieben aus klimatisch verschiedenen Regionen serologisch auf AK gegen die oben genannten Parasiten untersucht. Dabei wurden durchgängig sehr niedrige Prävalenzen für D.v.-Infektionen ermittelt (max.3,3%, 95%CI: 0,6-9%, im Sommer 2011 in der Küstenregion), die Seroprävalenz für O.o. lag im Jahresdurchschnitt zwischen 46,9% (35,2-59,0%) 2011 in der Harzregion und 86,0% (75,2-92,1%) 2009 in der Küstenregion. Die niedrigste Prävalenz (Jahresdurchschnitt) von F.h.-Infektionen wurde 2009 in der Heide region gefunden - 37,4 % (28,9-46,6%), die höchste 2011 in der Harzregion: 65,6% (54,0-75,3). Die ermittelten Werte wurden interregional (Je Probensammelzeitpunkt) und intraregional (alle Termine zwischen 2009 und 2011) auf signifikante Unterschiede hin untersucht. Für den D.v.-ELISA konnten diese Berechnungen aufgrund der niedrigen Ergebnisse nicht durchgeführt werden.

Trotz der 135 Vergleiche je ELISA (O. o., F. h.) konnten nur wenige sinnvolle signifikante Unterschiede gefunden werden, die meisten davon wurden in der Küstenregion ermittelt. Z.B. war die F.h.-Prävalenz vom Herbst 2010 (60,7%; 49,7-70,9%) innerhalb der Küstenregion signifikant verschieden zu der vom Frühjahr 2011 (33,0%; 23,3-43,8%; $p < 0,001$) und gleichzeitig zu der Prävalenz Herbst/2010 in der Heide region (35,7%; 26,2-43,7%; $p < 0,01$) und der Harzregion (27,8%; 17,9-39,6%; $p < 0,01$).

Bei den Prävalenzen für O.o.-Infektionen unterschieden sich beispielsweise im Herbst 2009 die Küstenregion (95,4%; 87,1-99,0%) und die Heide region (54,1%; 45,3-62,7%; $p < 0,01$) bzw. die Harzregion signifikant (53,4%; 41,4-65,2%; $p < 0,05$), außerdem war die Prävalenz innerhalb der Küstenregion zu diesem Zeitpunkt sign. verschieden zu den Herbstprävalenzen der Jahre 2010 (41,6%; 31,2-52,5%; $p < 0,001$) und 2011 (52,3%; 41,4-63,1%; $p < 0,01$). In Zusammenarbeit mit dem FLI Wusterhausen und AVIA-GIS werden mit Hilfe der gesammelten Daten parasitenspezifische Karten zur Vorhersage zukünftiger Verbreitungsgebiete erstellt.

Des Weiteren wurden Jungtiere eines Hofes je Region untersucht. Hier konnte unter anderem die negative Korrelation zwischen BCS und EpG (=Parasiteneier pro Gramm Kot) bestätigt werden.

Teilprojekt 2.3.2:

Die Auswirkung der vorhergesagten wärmeren und trockeneren Sommer in Niedersachsen auf Magen-Darm-Parasiten wie *Cooperia oncophora* und *Ostertagia ostertagi* wurden im Gewächshausversuch 2011 (in Zusammenarbeit mit Teilprojekt 2.1 und 2.5) und einem Inkubatorversuch 2012 untersucht. Sollten die neuen Bedingungen den dritte Larvenstadien (L3), die sich außerhalb des Wirtes befinden, schaden, führt dies zu einem verminderten Refugium und dadurch zu einem erhöhten Selektionsdruck, wodurch die Gefahr einer schnelleren Bildung von Anthelmintikaresistenzen gegeben ist. Seit Sommer 2013 läuft ein Weideversuch zur Erforschung der Auswirkungen frequenter Anthelmintikabehandlungen auf Weideparasiten. Der Anteil bezimidazolresistenter Parasiten wird mittels PCR und Pyrosequencing überprüft, zusätzlich werden Rinder und Weide regelmäßig beprobt (EpG, Gras- und Bodenproben der Weide).

Ergebnisse:

- Die Weiden aus TP 2.3.1 wurden regelmäßig auf infektiöse L3 untersucht, morphologisch waren infektiöse Parasiten nachweisbar, auf Weiden die gekalkt wurden bedeutend weniger als auf ungekalkten Weiden.
- Die statistische Analyse des Gewächshaus-Versuchs belegt, dass sich Leguminosen positiv ($p = 0,3 \cdot 10^{-5}$) und Trockenstress negativ ($p = 0,1 \cdot 10^{-3}$) auf das Larvenvorkommen auf Gras auswirken.
- Beim Inkubator-Experiment mit zwei mit Trockenstress kombinierten Temperaturprofilen (Frühlings- und Sommertag in Niedersachsen) konnte festgestellt werden, dass Trockenstress die „Fitness“ der sich im Boden befindenden Larven negativ beeinflusst ($p = 0,0001$) und sich bei höheren Temperaturen mehr Larven im Boden befinden ($p = 0,000$ im linearen Modell)

Laufzeit:

- 2009 – 2012 Erhebung und Auswertung der Daten zu klimabedingten Saisondynamiken
- 2011 – 2014 Untersuchung von Resistenzentwicklungen in Abhängigkeit vom Klima



Abb 1: Lage der Betriebe der Tankmilchproben

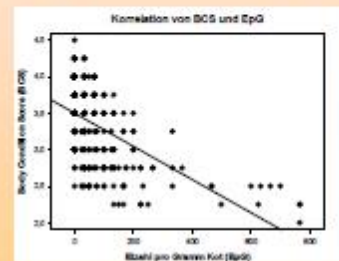


Abb 2: Negative Korrelation zwischen BCS und EpG der Jungtiere der Tracerbetriebe



Abb 3: Magendamparasiten des Rindes befinden sich nur während der letzten Entwicklungsstadien im Wirt und sind daher den Wetterbedingungen ausgesetzt



Abb 4 links: Gewächshaus-Versuch mit insgesamt 80 Grastöpfen in Zusammenarbeit mit der Fakultät für Agrarwissenschaften der Georg-August-Universität in Göttingen. Abb 5 rechts: Inkubatorversuch mit 56 kleineren Versuchstöpfchen



Abb 6: Kälber des Weideversuchs 2013

Kontakt:

Sprecher: Prof. Dr. Dr. Matthias Gauly
Georg-August-Universität Göttingen
Koordination: Dr. Martin Pothhoff
Am Vogelsang 6, 37075 Göttingen

Posterpräsentation: Prof. von Samson-Himmelstjerna
Freie Universität Berlin
Autor Poster: Friederike Knapp-Lawitzke
Tel +49 30 833 62314
Fax+49 30 838 62323



Email: friederike.knapp-lawitzke@fu-berlin.de

<http://www.vetmed.fu-berlin.de/einrichtungen/institute/we13/profil/index.html>

Anhang

Die Veröffentlichung

http://www.regklam.de/fileadmin/ccrr-2013/abstracts/YRF_CCRR2013_abstract_Demeler_investigation.pdf

ist in der Onlineversion nicht enthalten.

10.5 Publikationsverzeichnis

Demeler J, **Knapp F**, Corte GM, Katschke O, Steininger K, Samson-Himmelstjerna G
Recovery of strongylid third-stage larvae from herbage samples: standardisation of a
laboratory method and its application in the field.
2012, Parasitology Research 110:1159-1164

Knapp-Lawitzke F, von Samson-Himmelstjerna G, Demeler J
Rapid method for recovery of strongylid third stage larvae of parasitic nematodes from small
soil samples.
2014, Experimental parasitology 142:91-4 doi:10.1016/j.exppara.2014.04.006

Knapp-Lawitzke F, Kuchenmeister F, Kuchenmeister K, von Samson-Himmelstjerna G,
Demeler J
Assessment of the impact of plant species composition and drought stress on survival of
strongylid third-stage larvae in a greenhouse experiment.
2014, Parasitology Research 113:4123-4131

Knapp-Lawitzke F, Krücken J, Ramünke S, von Samson-Himmelstjerna G, Demeler J
Rapid selection for β -tubulin alleles in codon 200 conferring benzimidazole resistance in an
Ostertagia ostertagi isolate on pasture.
2015, Veterinary Parasitology 209:84-92

Knapp-Lawitzke F, von Samson-Himmelstjerna G, Demeler J
Elevated temperatures and long drought periods have a negative impact on survival and
fitness of strongylid third stage larvae.
2016, International Journal for Parasitology, doi:10.1016/j.ijpara.2015.10.006

Danksagungen

11 Danksagungen

Ich danke meinem Mann Daniel für das Korrekturlesen, den Umzug nach Berlin und dass du mich immer unterstützt hast – ohne Dich wäre diese Doktorarbeit nie entstanden!

Ich danke meinen Eltern für das erneute Korrekturlesen, ihre Ermunterung mich schon als Kind von der Natur und Tieren faszinieren zu lassen und dass ihr während dem Studium und der Doktorarbeit immer für mich da wart.

Ich danke all den Tierpflegern die „meine Kälber“ so liebevoll betreut haben, dass sie innerhalb kürzester Zeit zahm waren und sich leicht beproben ließen.

Großen Dank gilt den ParaDocs, das Gemeinschaftsgefühl und die gegenseitige Hilfsbereitschaft hätte besser nicht sein können!

Ich danke Oliver Katzschke für die Hilfe bei der doch sehr eintönigen Erdwaschung der Gewächshausproben – mit Dir ging es schneller und lustiger war es auch!

Ich danke Sabrina Ramünke, für die Freundschaft, Hilfe und Deine geniale Expertise in so ziemlich allen Laborbereichen.

Danke, PD Jürgen Krücken für die Hilfe im molekularbiologischen und so ziemlich jedem anderen wissenschaftlichen Bereich.

Danke Prof. von Samson- Himmelstjerna, für die Möglichkeit am Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin forschen und arbeiten zu können.

Ganz besonders danke ich meiner Betreuerin Prof. Janina Demeler ohne deren große Unterstützung so schöne Dinge wie Vortragsreisen nach Australien oder die Chance eine kumulative Dissertation zu schreiben nicht möglich gewesen wären.

Erklärung

12 Eidesstattliche Erklärung

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

Berlin, den 14.08.2015

Friederike Knapp-Lawitzke