Aus dem Department für Pathobiologie

der Veterinärmedizinischen Universität Wien

(Departmentsprecher: Univ.Prof. Dr.rer.nat. Armin Saalmüller)

Institut für Parasitologie

(Leiterin: Univ.Prof. Dr.med.vet. Anja Joachim)

Metaphylaktische Behandlung natürlich infizierter Hundewelpen gegen Darmparasiten, insbesondere Kokzidien

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt und eingereicht von

Barbara-Anna Rauscher

Zur Erlangung des akademischen Grades

MAGISTER MEDICINAE VETERINARIAE

Wien, im Mai 2013

Betreuerin: Univ.Prof. Dr.med.vet. Anja Joachim

BegutachterIn: Univ.Prof. Dr.med.vet. Anja Joachim

Univ.Prof. Dr.med.vet. Johann Thalhammer

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung und Fragestellung

Kokzidien sind wichtige Durchfallerreger von Hundewelpen, die bei starkem Befall auch zu Entwicklungsstörungen führen können. Sie kommen weltweit vor und haben die größten Auswirkungen auf Welpen im Alter von der 3.-4. Lebenswoche (TENTER u. DEPLAZES, 2006). Beim Hund unterscheidet man zwischen folgenden Isosporaarten: *Isospora canis*, *Isospora ohioensis* und *Isospora burrowsi*. Weiters wird in der Literatur auch noch *Isospora neorivolta* beschrieben, deren Validität aber nicht gesichert ist (TENTER u. DEPLAZES, 2006).

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen eines zugelassenen Arzneimittels auf parasitologische, mikrobiologische und gesundheitliche Parameter bei Welpen in ausgewählten Zuchtstätten unter Feldbedingungen zu untersuchen. Dabei wurde das Gesamtprojekt „Hundekokzidien und Gut Health" in 4 Teilprojekte unterteilt.

Frau Alexandra Ali beschäftigte sich mit der Epidemiologie. Hierfür wurden wöchentlich koproskopische Voruntersuchungen von 50 unbehandelten Würfen, in der 3.-8. Lebenswoche, vor allem auf Kokzidienbefall, durchgeführt.

Der vorliegende Teil in der Behandlungsstudie versuchte die Frage zu klären, ob eine metaphylaktische Behandlung von Welpen mit Emodepsid und Toltrazuril die Ausscheidung von Kokzidien verringert.

Frau Manuela Stejskal untersuchte die Auswirkung der Behandlung auf die Darmflora. In weiterer Folge sollte die Frage geklärt werden, ob die Welpengesundheit durch die Behandlung verbessert werden kann (STEJSKAL, 2012).

In der Studie von Frau Martina Konecny wurde untersucht, ob die Darmflora der Hündin einen Einfluss auf die Scheidenflora hat, bzw. ob ein direkter Zusammenhang mit der Welpengesundheit vorliegt (KONECNY, 2012).

2. Literaturübersicht

2.1. *Isospora* spp. des Hundes

2.1.1. Morphologie der diagnostischen Stadien

Die Oozysten der drei kaninen *Isospora*-Arten des Hundes sind glattwandig, farblos und ohne Mikropyle. Die Form ist kugelig bis ovoid (TENTER u. DEPLAZES, 2006). Nach Sporulation in der Außenwelt besitzen die Oozysten zwei Sporozysten mit jeweils vier Sporozoiten (ECKERT et al., 2008). In Tabelle 1 sind die Größenangeben der Oozysten und Sporozysten angegeben. Nur *I. canis* ist deutlich von den anderen beiden durch die Oozystengröße unterscheidbar. Daher zählt man *I. ohioensis* und *I. burrowsi* zusammen und nennt sie *I. ohioensis*–Komplex (LINDSAY et al., 1997). Die Präpatenz beträgt 10-12 Tage für *I. canis* und für *I. ohioensis*–Komplex wurden 5-6 Tage beschrieben (BUEHL et al., 2006).

Tab. 1: Größenangabe der Oozysten und Sporozysten der Isosporaspezies beim Hund

Art	**Oozystengröße [µm]**	**Sporozystengröße [µm]**	**Literatur**
I. canis	34-40 x 28-32	18-21 x 15-18	LINDSAY et al., 1997
	36-44 x 29-31	24 x 20	TENTER u. DEPLAZES, 2006
I. ohioensis	19-27 x 18-23	15-19 x 10-13	LINDSAY et al., 1997
	19-27 x 15-25	17 x 12	TENTER u. DEPLAZES, 2006
I. burrowsi	17-22 x 16-19	12-16 x 8-12	LINDSAY et al., 1997
	16-23 x 15-22	14 x 10	TENTER u. DEPLAZES, 2006

2.1.2. Entwicklung

Die Entwicklung kann in eine direkte oder indirekte, durch Aufnahme eines Zwischenwirtes, unterteilt werden (TENTER u. DEPLAZES, 2006).

Die im Zwischenwirt wird auch als fakultativ indirekte Entwicklung (ECKERT et al., 2008) bezeichnet. Maus, Ratte, Hamster, Hund und Katze können als Stapelwirte fungieren (BOCH et al., 1981). Nach Aufnahme von sporulierten Oozysten werden die Sporozoiten freigesetzt und befallen im paratenischen Wirt das extraintestinale Gewebe, wie Mesenteriallymphknoten, Milz, Leber, Lunge und Skelettmuskulatur, aber auch die Peyersche Platten im Darm. Die Sporozoiten dringen in die Zellen ein und bleiben in einer parasitophoren Vakuole, ohne sich zu teilen. Diese Ruhestadien werden Dormozoiten genannt. Diese bleiben im paratenischen Wirt mindestens zwei Jahre infektiös und können selbst nach dessen Tod noch einige Wochen überleben. Die Gewebszysten sind nur für spezifische Endwirte infektiös, nicht für andere paratenische Wirte, die Präpatenz kann verkürzt sein (ECKERT et al., 2008; LINDSAY et al., 1997).

Der Endwirt nimmt den Erreger oral in Form von sporulierten Oozysten in der Umwelt oder durch Verzehr eines Stapelwirtes auf. Im Dünndarm erfolgt dann die Exzystierung, und in weiterer Folge kommt es, je nach Isosporaart, zum Befall der Epithelzellen oder Zellen der Lamina propria des Dünndarms, Zäkums oder Kolons. In Form einer Endodyogenie oder einer Endopolygenie findet die ungeschlechtliche Vermehrung statt (TENTER u. DEPLAZES, 2006). Danach kommt es zur geschlechtlichen Entwicklung, der Gamogonie, aus der die Oozysten entstehen und mittels Kot in die Umwelt ausgeschieden werden (ECKERT et al., 2008).

Im Freien entwickeln sich durch Sporogonie die infektiösen Sporozoiten. Dieser Vorgang ist abhängig von Luftfeuchtigkeit, Temperatur und Sauerstoffgehalt (LINDSAY et al., 1997). Die Entwicklung von Sporonten bis zu den Sporozoiten dauert bei günstigen Temperaturen etwa zwei Tage (ECKERT et al., 2008).

2.1.3. Pathogenese und Pathologie

Wie im Kapitel 2.1.2 Entwicklung beschrieben, dringen die exzystierten Sporozoiten in die Darmwand ein. Es kommt zu Entzündungsreaktionen und dadurch zu einem Verlust der Funktionsfähigkeit des betroffenen Darmabschnittes (ROMMEL et al., 1992).

Katarrhalische bis hämorrhagische Enteritiden können durch eine Isosporainfektion verursacht werden. In leichten Fällen ist die Darmschleimhaut verdickt und mit Petechien durchsetzt. In schweren Fällen kommt es zu einer hämorrhagischen Enteritis im Jejunum und Ileum. Histologisch sieht man eine Desquamation an den Villusspitzen. Die Lieberkühnschen Krypten sind mit abgeschilferten Zellen, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten angefüllt (TENTER u. DEPLAZES, 2006).

2.1.4. Klinische Symptomatik

Klinische Symptome werden am häufigsten bei Welpen in der 3.-4. Lebenswoche beobachtet, die eine Infektion mit *I. canis* durchmachen (TENTER u. DEPLAZES, 2006). Eine Infektion mit Kokzidien kann eine weite Bandbreite von klinischen Symptomen zur Folge haben. Ein asymptomatischer Verlauf oder milde Symptome, wie Gewichtsverlust und Durchfall, bis hin zum Tod, wurden beschrieben (DAUGSCHIES et al., 2000; SEELIGER, 1999). Gering- bis mittelgradige Infektionen verlaufen auch bei jungen Hunden inapparent. Bei einem höheren Infektionsdruck können dünnbreiiger Kot, Fieber und Inappetenz auftreten. Diese klingen jedoch nach einer Woche wieder ab (ROMMEL et al., 1992).

Bei stärkeren Befall des Darmepithels und durch die Reproduktion der Kokzidien treten folgende Symptome auf: wässrige Diarrhö, der manchmal blutig sein kann, Vomitus, abdominaler Schmerz und Inappetenz (DUBEY, 1978 a,b).

Bei der Studie von BUEHL et al (2006) zu Einsendungen von Kotproben an das Institut für Parasitologie der Vetmeduni Vienna zeigten, dass alle Tiere, die mit *I. ohioensis* und 86% der Tiere, die mit *I. canis* infiziert waren, Durchfall hatten. Der Großteil der Tiere hatte eine nichthämorrhargische Diarrhö, es kam jedoch auch blutiger Durchfall vor.

2.1.5. Diagnostik

Die Koproskopie ist laut LINDSAY et al (1997) das Mittel der Wahl, um eine Infektion mit Kokzidien zu identifizieren. Von Bedeutung sind auch die klinische Symptomatik, die Anamnese und das Ausschließen oder Identifizieren anderer pathogener Erreger. Für die Diagnose von Oozysten werden das Flotationsverfahren und für die quantitative Bestimmung McMaster-Verfahren angewendet. Das Prinzip der Flotationsmethode beruht darauf, dass sich nach Suspension der Kotprobe mit einer Flotationsflüssigkeit, die ein bekanntes spezifisches Gewicht hat, die leichteren Parasitenteile nach oben steigen und sich dort anreichern. Es können verschiedene Flotationslösungen, wie NaCl, $NaNO_3$, $ZnSO_4$ x $7H_2O$, $ZnCl_2$, ein Gemisch aus NaCl und $ZnCl_2$ oder Sheather`s Zuckerlösung, verwendet werden (BAUER, 2006). Bei LINDSAY et al (1997) wird die Verwendung von Sheather`s Zuckerlösung empfohlen.

Im modifizierten McMaster- Verfahren wird eine definierte Menge an Kot und Flotationsflüssigkeit in einer McMaster Zählkammer durch Flotation angereichert und ausgezählt. Die Angabe erfolgt als Oozystenzahl pro Gramm Kot (OpG) (BAUER, 2006).

2.1.6. Therapie und Prophylaxe

Verschiedene Autoren (ECKERT et al., 2008; TENTER u. DEPLAZES, 2006) empfehlen Toltrazuril, welches eine kokzidiozide Wirkung hat, oder Trimethroprim-Sulfonamid-Kombinationspräparate (kokzidiostatisch) zur Behandlung der Isosporainfektion bei Hunden. Sulfonamide hemmen die Folsäuresynthese und steigern in Verbindung mit Trimethroprim die Synthesehemmung (SCHOLTYSIK u. STEUBER, 2007). LINDSAY et al. (1997) berichten von einer Elimination der Oozystenausscheidung nach Behandlung mit Sulfadimethoxin in einer Dosierung von 50 mg/kg Körpergewicht (orale Eingabe über 10-14 Tage). Auf die Wirksamkeit und den Wirkmechanismus von Toltrazuril wird in Kapitel 2.3. detailliert eingegangen.

Als prophylaktische Maßnahmen sind spezielle Hygienemaßnahmen, Desinfektion mit kresolhaltigen Desinfektionsmitteln, Schutz vor Nagetieren und keine Verfütterung von rohem Fleisch oder Organen zu nennen (ECKERT et al., 2008). GASDA (2009) zeigte, dass eine Desinfektion mit Neopredisan® oder Remedor® ab einer Einwirkzeit von 4 Stunden eine Wirksamkeit von über 90% auf die Oozysten von *Isospora* hatte.

2.2. *Toxocara canis*

2.2.1. Morphologie

T. canis ist der Erreger der Toxocarose des Hundes und anderer Kaniden und einer der häufigsten und wichtigsten Spulwürmer (BUEHL et al., 2006; EPE, 2011). Er gehört zu der Familie der Ascarididae. Die adulten Nematoden sind 10-18 cm lang, je nach Geschlecht (ECKERT et al., 2008) Der Zervikalflügel der adulten Würmer ist grob gestreift, 2-2,5 mm lang und die maximale Breite beträgt 0,2 mm. Er besitzt einen Ösophagus, gefolgt vom Ventrikulus und dem Darm. Die Männchen besitzen am Hinterende einen fingerförmigen Fortsatz und zwei Spikula in verschiedener Länge (750 µm und 950 µm). Die Weibchen haben die Vulva am Ende des ersten Körperdrittels (DEPLAZES, 2006).

2.2.2. Entwicklung und Infektionswege

Die geschlechtsreifen Stadien leben im Dünndarm (EPE, 2011). Die ungefurchten Eier, die vom adulten weiblichen Wurm produziert werden, werden mit dem Kot ausgeschieden und sind vorerst nicht infektionsfähig. Erst nach der Entwicklung zur dritten Larve werden sie infektiös. Die Dauer ist abhängig von klimatischen Konditionen und reicht von drei Wochen bis zu mehreren Monaten (EPE, 2009).

Es werden verschiedene Infektionswege beschrieben: orale Aufnahme von infektiösen Eiern, Übertragung der Larven diaplazentar, transmammär oder durch einen paratenischen Wirt (STOYE, 1979; BOSSE u. STOYE, 1981). Es gibt verschiedene Wanderwege, die vom Alter und Immunstatus des Endwirtes und der Anzahl und Art der Aufnahme der infektiösen Eier oder Larven abhängig sind. Daher kommt es auch zu unterschiedlichen Präpatenzen von drei Wochen bei pränataler Infektion und sechs Wochen bei oraler Infektion (PARSONS, 1987). Der tracheale Wanderweg kommt hauptsächlich bei Welpen oder jungen Hunden vor und führt über Leber, Lunge, Trachea und Ösophagus. Die Larven werden schließlich ab geschluckt und entwickeln sich im Dünndarm zu den adulten Stadien (EPE, 2011). Der somatische Wanderweg kommt vorwiegend bei älteren Hunden vor. Nach passiver hämatogener Streuung werden periphere Organe wie Muskulatur, Niere, Leber und zentrales Nervensystem besiedelt (Hypobiose). Wenn der somatische Wanderweg bei einem Muttertier stattgefunden hat, wird durch pränatale oder galaktogene Infektion die nächste Wirtsgeneration möglich (EPE, 2011).

2.2.3. Pathogenese und Pathologie

Durch die Wanderung der Larven können multiple, punktförmige Blutungen, Nekrosen und Granulome in Leber und Lunge festgestellt werden. Bei massivem Befall wurden Augenveränderungen in Form einer granulomatösen Retinitis und Chorioretinitis beschrieben. Der Darm zeigt eine Hypertrophie der Tunica muscularis, Zottenatrophie und Kryptenhyperplasie. Eine Infektion von älteren Hunden verläuft meist inapparent (ECKERT et al., 2008).

2.2.4. Klinische Symptomatik

Katarrhalische Enteritis, selten Diarrhoe und Vomitus, Dehydratation, Anämie, Anorexie und ein aufgetriebenes trommelförmiges Abdomen werden als klinische Symptome beschrieben (EPE, 2011).

2.2.5. Diagnostik

Wie auch beim Nachweis der Kokzidien, werden Spulwurmeier als kugelige, dickschalige und golfballähnliche Gebilde mittels Flotationsverfahren nachgewiesen. Weiters können auch erwachsene Spulwürmer mit dem Kot ausgeschieden oder erbrochen und so identifiziert werden (ECKERT et al., 2008).

2.2.6. Therapie und Prophylaxe

Zur Behandlung von *T.canis*-Infektionen werden folgende Pharmaka als hochwirksam beschrieben: Benzimidazole (insbesondere Fenbendazol, Flubendazol und Mebendazol), Pyrimidine (wie Pyrantel-Base), makrozyklische Laktone (Selamectin, Milbemycinoxim und Moxidectin) sowie ein Depsipeptid (Emodepsid) (DEPLAZES, 2006).

2.3. Emodepsid/Toltrazuril-Suspension

Die Emodepsid/Toltrazuril Suspension ist eine Kombination von zwei Arzneimitteln, die bereits erfolgreich als Antiparasitika in der Veterinärmedizin eingesetzt wird (ALTREUTHER et al., 2011a, b). Emodepsid ist ein semi-synthetisches Derivat von PF1022A, welches ein Fermentationsprodukt von den Pilz *Mycelia sterilia* PF1022 ist. Emodepside binden an die präsynaptischen Latrophilin-Rezeptoren von Nematoden (HARDER et al., 2005).

Toltrazuril gehört zu den symmetrischen Triazinonderivaten. Alle intrazellulären Stadien der Schizogonie und der geschlechtlichen Gamogonie bei Kokzidien sind empfindlich gegenüber dem Wirkstoff. Nach Ausbildung der Oozystenwand ist er allerdings unwirksam. Es wird vermutet, dass der maßgebliche Wirkungsmechanismus die Hemmung von Enzymen der parasitären Atmungskette, aber auch die Störung der nukleären Pyrimidinsynthese ist (SCHOLTYSIK u. STEUBER, 2007). BUEHL et al. (2006), SEELIGER (1999) und BODE (1999) berichten über Behandlungserfolge mit Toltrazuril gegen Kokzidien bei Hunden.

In der Feldstudie von BODE (1999) wurden 100 *Isospora* spp. ausscheidende Würfe mit Toltrazuril (10 mg/kg Körpergewicht) behandelt. In 99 Fällen schieden die Tiere bereits einen Tag nach der Behandlung keine Oozysten mehr aus. Bei einem Wurf wurde einen Tag nach der Behandlung noch Oozysten nachgewiesen, eine Woche nach Toltrazurilgabe war auch dieser Wurf negativ.

In der Studie von BUEHL et al. (2006) wurden fünf experimentell infizierte Welpen, die bereits Oozysten auschieden, mit 20 mg/kg Körpergewicht Toltrazuril behandelt. Einen Tag nach der Behandlung konnten bei drei Tieren keine Oozysten mehr nachgewiesen werden.

SEELIGER (1999) verabreichte 20 mg/kg Körpergewicht Toltrazuril an 45 natürlich infizierte Welpen, die am Tag der Applikation bereits Oozysten ausschieden. Zwei Tage nach der Behandlung konnte nur noch bei drei Welpen Oozysten nachgewiesen werden.

Emodepsid/Toltrazuril Suspension ist für Welpen ab zwei Wochen mit einer Mischinfektion von Rundwürmern und Kokzidien (*T. canis*, *Unicaria stenocephala, Ancylostma caninum*, *I. ohioenis*- Komplex, *I. canis*) zugelassen (SCHIMMEL et al., 2011).

3. Publikation

Das Manuskript „Control of canine endoparasites, especially *Isospora* spp., with Procox® in naturally infected puppies: parasitological, bacteriological and health parameters"

von Barbara A. Rauscher, Sabine Schäfer-Somi, Monika Ehling-Schulz, Karin Möstl, Stefanie Handl, Barbara Hinney, Joachim Spergser, Roland Schaper und Anja Joachim

wurde am 13.11.2012 bei BMC Veterinary Research eingereicht.

Eigenanteil von B.A. Rauscher an dieser Arbeit:

1.) Literaturrecherche vor Beginn der Feldstudie
2.) Beteiligung an der Erstellung des Konzepts
3.) Probensammlung und Datenverarbeitung des Projekts im Zeitraum von Juni 2011 – November 2011
4.) Beteiligung an der Erstellung und Verfassung des vorliegenden Manuskriptes

Control of canine endoparasites, especially *Isospora* spp., with Procox® in naturally infected puppies: parasitological, bacteriological and health parameters*

Barbara A. Rauscher[1], Sabine Schäfer-Somi[2], Monika Ehling-Schulz[3], Karin Möstl[4], Stefanie Handl[5], Barbara Hinney[6], Joachim Spergser[7], Roland Schaper[8], Anja Joachim[9§]

[1] Institute of Parasitology, Department of Pathobiology, University of Veterinary Medicine Vienna, Email: Barbara.Rauscher@vetmeduni.ac.at

[2] Centre for Artificial Insemination and Embryo Transfer, Department for Small Animals and Horses, University of Veterinary Medicine Vienna, Email: Sabine.Schaefer@vetmeduni.ac.at

[3] Functional Microbiology, IBMH, Department of Pathobiology, University of Veterinary Medicine Vienna, Email: monika.ehling-schulz@vetmeduni.ac.at

[4] Institute of Virology, Department of Pathobiology, University of Veterinary Medicine Vienna, Email: Karin.Moestl@vetmeduni.ac.at

[5] Institute of Animal Nutrition, Department for Farm Animals and Veterinary Public Health, University of Veterinary Medicine Vienna, Email: Stefanie.Handl@vetmeduni.ac.at

[6] Institute of Parasitology, Department of Pathobiology, University of Veterinary Medicine Vienna, Email: Barbara.Hinney@vetmeduni.ac.at

[7] Clinical Microbiology and Infection Biology, IBMH, Department of Pathobiology, University of Veterinary Medicine Vienna, Email: Joachim.Spergser@vetmeduni.ac.at

[8] Bayer Animal Health GmbH, Germany; Email: roland.schaper@bayer.com

[9] Institute of Parasitology, Department of Pathobiology, University of Veterinary Medicine Vienna, Email: Anja.Joachim@vetmeduni.ac.at

[§] Corresponding author: Prof. Dr. Anja Joachim, Institute of Parasitology, Department of Pathobiology, University of Veterinary Medicine Vienna, Veterinaerplatz 1, A-1210 Vienna, Austria. Email: Anja.Joachim@vetmeduni.ac.at, Phone: +43 1 250772200

For submission to BMC Veterinary Research

---

[*] Parts of the Results were published in Diploma Theses at the Vetmeduni Vienna 2012 (M. Stejskal, "Untersuchung der Auswirkung von Procox® auf die Darmflora von Welpen" and M.S. Konecny, "Auswirkungen der Darmflora gravider Hündinnen auf die Scheidenflora und auf die Welpengesundheit")

Abstract

Background: Puppies in the first weeks of age are frequently affected by intestinal parasites that may impair growth and animal health. Treatment should reduce both parasite burden and environmental contamination to prevent reinfection. We therefore tested the effect of a metaphylactic treatment with Procox® (Bayer, emodepside/toltrazuril suspension for dogs) on parasitological, microbiological and health parameters. Two groups were treated either with 0.5 ml suspension/kg of body weight (0.45 mg emodepside and 9 mg toltrazuril/kg of body weight) in the 3rd, 5th and 7th week of life (w.o.l.) (Procox® group; n= 28) or with a control anthelminthic (Dewormed Control group; n=26). Animals were surveyed weekly from the 3rd w.o.l. by coproscopy and clinical examination. Faecal samples were examined microbiologically from the 4th to the 8th w.o.l. and faecal inflammatory markers canine calprotectin and canine S100A12 were measured in the 8th w.o.l. Specific antibody titres were evaluated in serum samples from five litters before and after vaccination against canine distemper virus and canine parvovirus 2.

Results: The prevalence of *Isospora*-positive animals increased to 67% in the Dewormed Control group (n=15 puppies from four parasite-positive litters), while in the Procox® group (n=15 puppies) it was less than 34% with significantly lower excretion ($p<0.01$). Procox® was easily applied and effective; adverse effects did not occur. The level of seroconversion or titre increase upon vaccination was higher in parasite-free animals (91%) compared to Procox®-treated puppies (30%) and the Control animals (10%). Animals from parasite-free litters showed significantly different excretion patterns for haemolytic *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens*, while there was no difference between Procox®-treated and Control animals. In some animals kept under poor hygienic conditions diarrhoea was noted in association with *C. perfringens, E. coli* or *Salmonella.* Concentrations of inflammatory markers in the faeces did not significantly differ between the Procox® and the Control group.

Discussion: Adequate control of parasitic and bacterial infections in suckling puppies requires both antiparasitic treatment and hygiene. Even when parasites do not cause overt effects treatment is recommended in cases with a history of parasite infections.

Keywords: dog, emodepside, gut health, *Isospora,* toltrazuril, *Toxocara*, vaccination

Background

Coccidia are important intestinal pathogens of puppies and heavy infections can lead to impaired development and poor health. Canine intestinal coccidia belong to the genus *Isospora* and include *Isospora canis*, the more pathogenic species, and the *Isospora ohioensis*-complex embracing several species (*Isospora ohioensis*, *Isospora burrowsi* and *Isospora neorivolta*) that have morphologically indistinguishable oocysts [1]. Infections occur worldwide and are usually most prevalent in dogs younger than 4 months [2]. They take place by ingestion of sporulated oocysts from the environment. Although transmission via paratenic hosts has been described [3], in young puppies, the infection via ingestion of such hosts is unlikely to play a role in the epidemiology of the infection. Invasion of the intestinal epithelium and reproduction of the parasite induces enteritis with diarrhoea (sometimes haemorrhagic), abdominal pain, anorexia and vomiting [4][5]. Heavy infections can be lethal due to dehydration. After the endogenous development of *Isospora* is completed, oocysts are excreted with the faeces and sporulate in the environment within a few days [1]. Prepatent periods are 10-12 days for *I. canis* and 6-7 days for *I. ohioensis*-complex [2].

Besides coccidia, nematodes are common in puppies, the most frequent one being *Toxocara canis* [2]**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**. The eggs are not infectious upon excretion with the faeces but require temperature-dependent development of three weeks to several months [6]. Infection can take place via ingestion of infective eggs containing L3 larvae, prenatal or transmammary transmission from the dam to the offspring or by ingestion of paratenic hosts [7]. In puppies, the most common migration route is via liver, lung, trachea and oesophagus to the small intestines, while in older dogs the somatic route with haematogenous dissemination into the inner organs followed by hypobiosis is the most common. In pregnant dams reactivation of somatic hypobiotic larvae and transplacental and transmammary transmission occurs. Enteritis, rarely associated with diarrhoea or vomitus, as well as dehydration, anaemia, anorexia, and bloated abdomen have been described in clinical canine toxocarosis [6].

Procox® (emodepside/toltrazuril suspension for dogs) is a combination of two drugs registered for the treatment of parasitic infections in animals [8][8]. Emodepside is a semi-synthetic derivate of PF1022A, a fungal fermentation product from *Mycelia sterilia* PF1022 which binds to presynaptic latrophilin receptors in nematodes [9]. Toltrazuril is a symmetric triazinone derivate which acts on all intracellular stages of coccidia except the oocyst. It is assumed that the primary mode of action is inhibition of enzymes of the respiratory chain but pyrimidine synthesis is also affected [10]. Several authors have described the successful application of toltrazuril in the control of canine coccidosis [12][13][14][2]. Procox® is registered for puppies of two weeks or older with a mixed infection of nematodes and coccidia (*T. canis*, *Uncinaria stenocephala, Ancylostoma caninum*, *I. ohioenis*-complex, *I. canis*; [15]).

While an interaction of coccidia with *Clostridium (C.) perfringens* has been described for suckling piglets [16] virtually nothing is known about the interaction between the protozoa and the gastrointestinal flora or the influence of antiparasitic treatment in puppies. Similarly, it is frequently postulated by veterinary clinicians that parasitic infections have an influence on the immune status and the immune response to vaccination and therefore deworming before vaccination is recommended; however, no data are available to test this hypothesis. The most important canine anti-viral vaccinations are used to control canine distemper virus and canine parvovirus 2 infections [17]; however, any interactions between maternal antibodies, intestinal parasites (especially nematodes) and the immune system have not been described for young puppies.

The aims of this study were (a) to evaluate the effect of Procox® application in naturally infected puppies from the 3rd week of life (w.o.l.) on the excretion of *Isospora* oocysts and nematode eggs and on and clinical parameters from the 3rd to the 8th w.o.l.; (b) to evaluate the influence of patent infections on the development of antibody titres after vaccination against parvovirus and distemper virus; (c) to determine the concentration of intestinal inflammation markers in the faeces of puppies with parasitic infections under different treatment schemes; (d) to evaluate possible differences between puppies of different parasitological status and treatment scheme on the composition of the intestinal flora.

Results and discussion

Parasitological and clinical examination

54 puppies from seven litters were included in the study, and 272 faecal samples could be obtained during the examination period, 141 from Procox®-treated puppies, 131 from the Dewormed Control

group (Table 1). Overall, 38 samples (14.0%) contained oocysts of *Isospora* (all *I. ohioensis*-complex) and 12 (4.4%) eggs of *T. canis* (Table 2). In four litters, puppies excreted oocysts or eggs during the first visit and were included in the study (litters A, B, E, and G). The remaining three litters were used as a parasite-free group for the bacteriological and serological examinations.

Consequently, for the comparison of the treatment regimes, 30 puppies from the positive litters were available, 15 in the Procox® group and 15 in the Dewormed Control group which were treated with Banminth® or Drontal® (Table 1).

In the Procox® group 9/70 (12.9%) samples were positive for *Isospora* oocysts, and high excretion intensities were not observed. Oocyst excretion was detected from the 5th w.o.l. until the end of the study. The highest excretion was 18,500 OPG, the average in the positive samples was 2,167 OPG. In the Dewormed Control group 29/69 (42%) samples were positive, with excretion from the 3rd to the 8th w.o.l. 12 samples (17%) were highly positive (Table 2). The highest observed excretion was 95,250 OPG, the average in the positive samples was 10,510 OPG (Fig. 1). Nine puppies excreted oocysts more than once, eight of which were in the Dewormed Control group. Three puppies that excreted oocysts prior to treatment were negative one week after treatment. The excretion prevalence for *Isospora* was significantly reduced (p=0.000) in the Procox® group compared to the Control.

Isospora was already detected at high prevalence rates at the first visits in the 3rd w.o.l. Similarly, Buehl et al. [2] described patent infections in dogs of that age in high rates, indicating that many puppies had become infected during the 2nd w.o.l. when they were still in the litter box. Other authors describe a much later onset of infection in the 4th to the 6th w.o.l. [12][13]. A re-occurrence of excretion was described by Buehl and co-authors [2] in untreated animals and could also be noted in the present study during the 6th to 8th w.o.l., indicating that immunity is not sterile or requires repeated infections for complete protection against re-infection. In the Procox®-treated puppies re-shedding also occurred after some weeks, although in lower numbers, and the maximum excretion rate was 33% in the 8th w.o.l., compared to the untreated Control group with a maximum prevalence of 67%. *I. ohioensis*-complex has been described to re-occur after treatment [8], supporting the hypothesis of incomplete immunity. Nevertheless, Procox® effectively suppressed the shedding of oocysts one week after application, as described before by Altreuther et al. [8].

Overall, both the extensity and intensity of oocyst excretion in treated puppies could be reduced significantly with the applied treatment scheme. Repeated treatment was chosen to combat infections that take place at any time in the first weeks of life, as control in an early phase of infection is essential for efficacy [2][13]. Clinical coccidiosis was not observed, probably due to the absence of the more pathogenic *I. canis* in the examined litters.

Toxocara was detected in one animal in the Procox® group in the 3rd w.o.l. (day of first treatment/sampling) but no more after that. By contrast, in the Dewormed Control group eggs were detected from the 3rd to the 6th w.o.l. in 11/69 samples (15.9%); six samples (8.7%) were highly positive. Mixed infections with *Isospora* and *Toxocara* were detected in four samples from four puppies in the Dewormed Control group.

Contrary to the coccidia, nematodes did not re-appear in the Procox® group during the examination period due to repeated treatment within the prepatent period, indicating a high efficacy of emopdepside against *Toxocara* [17][19]. Despite treatment with Banminth® or Drontal® some animals in the Dewormed Control group still excreted eggs until the 6th w.o.l. The treatment schemes of the Control group varied between litters with treatment starting at 3 or 5 w.o.l; this could be the reason for egg shedding in this group.

Weekly weight gain was very variable due to breed differences; there were no differences in weight gain from the 3rd to the 8th week between the Procox®-treated animals and the Dewormed Control group (data not shown).

Diarrhoea was present in litter A (two animals from the Dewormed Control group in the 4th w.o.l. and three control animals and one Procox®-treated puppy in the 6th w.o.l.) and in all animals from litter G (5th w.o.l.). Softer faeces were observed in all puppies from litter C (which was free of parasites during the observation period). These changes in faecal consistency were associated with the presence of *C. perfringens* in all cases. In litter A *Salmonella* and haemolytic *E. coli* could be found in some cases.

The body temperature was in the normal range without differences between the different groups (details not shown).

All administered drugs were well tolerated; adverse effects of treatment, such as salivation or emesis, were not observed. Procox® was applied by the researchers involved in this study and side effects were neither observed nor reported by the owners. It can be concluded that it is suitable and effective for the control of both *Isospora* and *Toxocara* in puppies from the 3rd w.o.l.

The dog breeders were aware of the impact of *Toxocara* infections and treated puppies routinely with Drontal® or Banminth® if they were in the Dewormed Control group. This explains why no overt clinical toxocarosis was seen in the involved litters. According to the owners, clinical coccidiosis was not considered a major health problem and the incidence of oocyst shedding was not very high, probably because the examined litters all belonged to small private breeders with mostly a high hygiene standard and a small number of litters reared at the same time. Large, commercial breeders seem to have a higher prevalence for *Isospora* (e.g. [2]) since more susceptible young animals are present simultaneously.

<u>Serum titre development upon vaccination</u>

Before vaccination at six (litter F eight) weeks of age most puppies were negative or had low to moderate titres (maternal antibodies) in the range of <1:80 (negative) to 1:320 against CDV and <1:8 (negative) to 1:512 against CPV2 with no noticeable differences between the treatment groups (data not shown). Two weeks after vaccination, 30% of the Procox®-treated puppies, 10% of the Dewormed Control animals and 91% of the parasite-free animals seroconverted or exhibited significant rises in titres against CDV and 40%, 50% and 91% against CPV2, respectively.

The evaluation of specific antibodies against CDV or CPV2 in three parasite-positive and two negative litters showed that seroconversion or significant titre increase occurred mostly in the parasite-free animals while no obvious differences could be noted in puppies from parasitized litters, irrespective of treatment. Since animals were observed by litter for this part of the study, this effect could be due to the low pre-vaccination titres in the two parasite-free litters. A difference between the Procox® and the Control groups was not observed, probably because both groups received anthelmintic treatment and infections were subclinical. Initially high pre-vaccination titres indicate that maternal antibodies prevail for several weeks. Since they can interfere with active immunisation, pre-vaccination titre testing is indicated [20].

<u>Microbiota</u>

The animals were divided into four groups, namely Procox®-treated from parasite-positive litters, A, B, E and G (*parasites+ Procox*), Control animals from parasite-positive litters (*parasites+ Control*), and the same groups from parasite-free litters C, D, and F (*parasites- Procox*® and *parasites- Control*), to test for possible effects of the parasitological status and different antiparasitic treatment schemes on the shedding of bacterial pathogens commonly associated with canine diarrhoea. For each sampling date, 6-15 animals were available for each group from week 4 to 8 of life (the 3rd w.o.l. was omitted because too few data were available).

Haemolytic *E. coli* was present at all sampling dates in all groups except for the 5th w.o.l. in the *parasites+ Control* group. While there were no differences in relation to Procox®-treatment, the excretion of haemolytic *E. coli* was significantly increased in the parasite-free groups during the 4th and 5th w.o.l. and significantly decreased in the 8th w.o.l. ($p=0.003$; 0.033 und 0.013, respectively) compared to the parasite infected groups; the total excretion was not different between the parasitized and the parasite-free groups (Fig. 2a).

C. perfringens was detected in all groups throughout the study without differences in relation to Procox®-treatment. In the 5th w.o.l. parasite-free groups excreted significantly fewer *C. perfringens* ($p<0.001$) and in the 8th w.o.l. significantly more ($p=0.039$) (Fig. 2b).

Overall, intensities and extensities of excretion were similar between the groups for *E. coli* and *C. perfringens*.

Salmonella enterica serovar Typhimurium (1,4,5,12:i:1,2 U277) was detected through enrichment in one animal each of the *parasites+ Procox* and the *parasites+ Control* group from litter A the 4th w.o.l., two animals (litter F) from the *parasite- Procox* group in the 6th w.o.l. and one from the *parasite- Control* group (litter F) in the 8th w.o.l.

Campylobacter jejuni was not detected in any sample.

Gut health in puppies can be expected to be influenced by many factors including maternal antibodies, maternal flora, hygiene, feed composition, bacterial, viral as well as parasitic agents and individual immunological status. In this study, a number of those factors and the potential influence of parasite infection were investigated under field conditions. These effects cannot easily be dissected in a field trial, and one may mask the other. Irrespective of the antiparasitic treatment, parasite-free litters shed higher amounts of haemolytic *E. coli* and less *C. perfringens* during the early stage of life than parasitized litters. Profound differences in the dynamics of shedding patterns for *E. coli* and *C. perfringens* were noted between parasitized and parasite-free litters, both of which can lead to enteric or systemic disease during intestinal flora imbalances. In some cases diarrhoea occurred together with high excretion of *C. perfringens*, and occasionally haemolytic *E. coli* and *S. enterica* was seen in diseased animals. Generally, there was a strong litter effect on the excretion pattern of pathogenic bacteria that may at least partially be explained by differences in maternal flora, hygiene, food composition and the general immunological status of the litters. Feed composition and immunity strongly influence the gut flora of young puppies [21], which could mask potential effects of antiparasitic treatment.

Although commonly considered as normal constituents of the canine gut flora [22], haemolytic *E. coli* (ETEC, NTEC) and *C. perfringen*s (enterotoxigenic type A and beta2-toxin producing strains) have been frequently incriminated as cause of diarrhoea in dogs [23][24][25]. In addition, both bacteria are well known for their zoonotic potential and shedding dogs may pose a risk for zoonotic transmission. *S. enterica* serovar Typhimurium (1,4,5,12:i:1,2 U277), a serovar associated with salmonellosis in wild-living birds [26], was occasionally isolated from non-diarrhoeic puppies underscoring the lack of an association between the isolation of *Salmonella* and clinical diarrhoea. However, as *Salmonella* organisms have strong zoonotic implications, risk of transmission to people has to be minimized by implementing appropriate hygienic strategies in the household [24]). The application of probiotics is supposed to support the undisturbed development of the gut flora in young puppies in the first w.o.l. and reduce the number of pathogenic bacteria, although until now studies have only been carried out in adult dogs [27][28]. This study also implies that the presence of parasites may influence the composition of the gut flora in puppies. More refined methods for detection of mixed bacterial flora in puppies might elucidate the association between the presence of certain microbial pathogens and clinical disease.

Faecal inflammatory markers

The median concentration of canine calprotectin in the pooled faeces from the puppies taken at the 8th w.o.l. was 0.7 µg/g (range: 0.04-7.68 µg/g) in the Procox® group and 1.96 µg/g (range: 0.11-8.92 µg/g) in the Dewormed Control group. The median concentration of S100A12 in the same samples was 48.7 ng/g (range: 5.7-363.5 ng/g) in the Procox® group and 95.4 ng/g (range: 5.7-203.9 ng/g) in the Dewormed Control group. No significant difference between animals treated with Procox® and controls was found for either marker (p=0.456 and 0.701, respectively).

Although the mean values of both markers were reduced in the Procox®-treated group compared to the Dewormed Control group, significant differences were not seen in the faecal concentration of the inflammatory markers canine calprotectin and canine S100A12. The values of the faecal calprotectin concentration and S100A12 concentration were all within the published reference intervals for adult dogs of <2.9-137.5 µg/g and 24-745 ng/g, respectively (reference intervals for puppies are currently not available). To our knowledge, there is only one other study reporting canine calprotectin in puppy faeces, which was within the same order of magnitude [28]. In contrast to Grellet el al. [29], we did not find a significant difference between puppies positive or negative for *Isospora,* neither in calprotectin concentration nor in S100A12 concentration (p=0.950 and 0.560, respectively; data not shown). Since none of the dogs showed clinical symptoms, infestation with *Isospora* sp. did obviously not cause clinically relevant intestinal inflammation. This is supported by the lack of correlation between *Isospora* infections and diarrhoea.

Conclusions

In this study the antiparasitic efficacy of a combination product containing emodepside against roundworms and toltrazuril against coccidia was demonstrated under the conditions of a field trial. The potential influence of such an antiparasitic treatment regime on shedding of pathogenic bacteria was studied. In addition inflammatory markers and the development of serum antibody titre development following vaccination (CDV and CPV2) were investigated.

Treatment against parasites significantly reduced the prevalences of *Toxocara* and *Isospora* in comparison to the controls. The data obtained for the microbiota, inflammation markers and serum antibodies showed some positive influence of the tested treatment regimen; however, they could not prove significant differences in relation to treatment. Under field conditions there may be too many factors influencing the investigated parameters. Further studies under controlled experimental conditions are required to further analyse a potential influence of parasitic infections on those parameters.

Adequate control of parasitic and bacterial infections in suckling puppies requires both antiparasitic treatment and hygiene. Even in litters or breeding units where parasites do not cause overt effects treatment is recommended in cases with a history of parasite infection and/or parasitological diagnosis.

Methods

Animals and treatment

A total of 54 puppies from 7 litters of different breeds (Table 1) from eastern Austria were examined from June to November 2011. The litters were kept with the bitch (indoor or outdoor) and animals were identified individually via microchip or collar. At each sampling (3rd to 8th w.o.l.) the bitches and their litters underwent a clinical examination. Individual body weight was determined weekly for litters D, E and F (for litter description, see Table 1).

Puppies were randomly assigned to two groups. One half of the puppies from each litter was treated with Procox® (Procox® group), whilst the other half was treated with Banminth® or Drontal® (Dewormed Control group). The Procox® group (n=28) received an oral dose of 0.5 ml Procox®/kg body weight, corresponding to 0.45 mg/emodepside and 9 mg toltrazuril /kg body weight in the 3rd, 5th and 7th w.o.l. The Control group (n=26) received either Drontal® (5 mg praziquantel and 57.5 mg pyrantel embonate/kg body weight) or Banminth® (5 mg pyrantelpamoate /kg body weight) according to the manufacturers' recommendations (Table 1) at the same time except for two litters where the animals of the Control group received the first anthelminthic treatment in the 5th w.o.l. (Table 1).

Parasitology

Faecal samples from individual puppies were taken weekly from the 3rd to the 8th w.o.l. and examined by flotation (sugar solution, specific gravity: 1.28) and, if positive for coccidia, by McMaster counting (lower detection limit: 50 oocysts per gram of faeces, OPG; flotation with zinc sulphate solution, specific gravity: 1.3.) Results were graded into negative (-), low grade (+), medium grade (++) and high grade (+++).

Serology

Puppies were vaccinated s.c. twice with a vaccine against canine parvovirus 2 (CPV2), canine distemper virus (CDV), canine adenovirus and canine leptospirosis (Virbagen canis SHPPi/L; Virbac, Vienna, Austria). Serum samples were obtained as paired samples immediately before vaccination in the 6th w.o.l. (8th w.o.l. for litter F) and 2 weeks after that at the follow-up vaccination. Samples obtained from litters B, E and G were divided into samples from the Procox® (n=10) and the Control (n=10) group and the samples from the parasite-free litters D and F were defined as samples from parasite-free puppies (n=11) (Table 1). Serum samples were examined for specific antibodies (IgG) against canine distemper virus (CDV) using an indirect immunofluorescence test (MegaScreen FLUO C.DV-IgG®, MegaCor, Hörbranz, Austria) according to the manufacturer's instructions. Antibody titres against canine parvovirus 2 (CPV2) were determined by haemagglutination inhibition test as described by Schoder et al. [30].

Bacteriology

Bacteriological examination of faecal samples was carried out from the 3rd to the 8th w.o.l. (for details on the samples available see Table 1; only litters with data sets from all puppies on that day were included), focussing on bacteria commonly associated with canine diarrhoea, i.e. haemolytic *E. coli*, *C. perfringens*, *Campylobacter jejuni*, and *Salmonella enterica*. Samples were collected and either processed immediately or stored at -80 °C until further analysis.

Faecal samples were streaked on Columbia blood agar, MacConkey agar, and Campylobacter selective agar (CCDA) and incubated for 24-48 h at 37°C under aerobic (Columbia blood agar, MacConkey agar), microaerophilic (CCDA) or anaerobic (Columbia blood agar) conditions. For the isolation of *Salmonella*, samples were inoculated into Selenite-cysteine broth, incubated at 42°C for 24 h, and subsequently passaged onto xylose-lysine-desoxycholate (XLD) agar (37°C, 24 h). Species identification of the isolated bacteria was performed using standard bacteriological techniques. Relative numbers of bacteria present on agar plates were determined using semi-quantitation (low, moderate, high; see section Parasitology) on streak area.

Faecal inflammatory markers

Pooled faecal samples from the 8th w.o.l. were taken for the measurement of canine calprotectin and canine S100A12 which was performed at the Gastrointestinal Laboratory, Texas A&M University (College Station, TX) using validated radioimmunoassays [31][32].

Statistical evaluation

Statistical evaluations were made in Microsoft Excel 2003 and SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, USA).

Samples were evaluated for normal distribution using the Kolmogorov-Smirnov-test. Since data were not normally distributed, the Mann-Whitney-U-test was chosen for comparison between groups. Significance levels were set at $p<0.05$.

Ethical approval

All procedures involving dogs were conducted with the owners' informed consent and approved by the institutional ethics committee and the national authorities (Federal Minstery of Science and Research: GZ 68.205/ 0081-II/3b/2011) according to § 8ff of the Austrian Law for Animal Experiments (Tierversuchsgesetz – TVG).

Abbreviations: *T. canis: Toxocara canis*, *E. coli: Escherichia coli, C. perfringens: Clostridium perfringens*, *S. enterica: Salmonella enterica, I. canis: Isospora canis, I. ohioensis: Isospora ohioensis*, OPG: oocysts per gramme of faeces; w.o.l.: week of life, spp.: species (plural)

Competing interests:

This study was financially supported by Bayer Animal Health, Germany. Bayer Animal Health are the marketing authorisation holder for Procox® and Drontal®. RS is employed by the sponsor. The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions:

BAR carried out the clinical examinations and wrote the corresponding sections in the Results, Discussion and Methods sections. SSS participated in outlining the general concept and the clinical analyses. MES and JS jointly analysed the bacteriological data and wrote the respective chapters. KM conducted and analysed the serological investigations. SH handled the faecal inflammation marker analysis. BH carried out the parasitological examinations and the corresponding statistical analysis. RS participated in the planning of the study and the writing of the manuscript. AJ lead the planning of the trial, supervised and coordinated the laboratory analyses and wrote the Introduction and the Conclusion.

Acknowledgements:

The authors thank Muna Latif for excellent technical assistance with the serological examinations.

References

[1] Lindsay DS, Dubey JP, Blagburn BL: **Biology of *Isospora* spp. from humans, nonhuman primates, and domestic animals.** Clin Microbiol Rev 1997, **10**:19-34.

[2] Buehl IE, Prosl H, Mundt HC, Tichy AG, Joachim A: **Canine isosporosis – Epidemiology of field and experimental infections.** J Vet Med B, 2006, **53**:482-487.

[3] Dubey JP, Mehlhorn H: **Extraintestinal stages of *Isospora ohioensis* from dogs in mice.** J Parasitol 1978, **64**: 689-695.

[4] Dubey JP: **Life-cycle of *Isospora ohioensis* in dogs**. Parasitology, 1978, **77**:1-11.

[5] Dubey JP: **Pathogenicity of *Isospora ohioensis* infection in dogs**. J Am Vet Med Assoc 1978, **173**:192-197.

[6] Epe C: **Intestinal nematodes: biology and control**. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2009, **39**:1091-1107.

[7] Stoye M: **Spul- und Hakenwürmer des Hundes – Entwicklung, Epizootiologie, Bekämpfung**. Berl Münch Tierärztl Wschr 1979, **96**:109-111.

[8] Altreuther G, Gasda N, Adler K, Hellmann K, Thurieau H, Schimmel A, Hutchens D, Krieger KJ: **Field evaluations of the efficacy and safety of emodepside plus toltrazuril (Procox® Oral Suspension for Dogs) against naturally acquired nematode and *Isospora* spp. infections in dogs**. Parasitol Res 2011, **109**:21-28.

[9] Altreuther G, Gasda N, Schroeder I, Joachim A, Settje T, Schimmel A, Hutchens D, Krieger KJ: **Efficacy of emodepside plus toltrazuril suspension (Procox® oral suspension for dogs) against prepatent and patent infection with *Isospora canis* and *Isospora ohioensis*-complex in dogs**. Parasitol Res 2011, **109**:9-20.

[10] Harder A, Holden-Dye L, Walker R, Wunderlich F: **Mechanisms of action of emodepside**. Parasitol Res 2005, **97**:1-10.

[11] Scholtysik G, Steuber S: **Antiparasitäre Chemotherapie**. In *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. Enke Verlag, Stuttgart; 2002:401-456.

[12] Bode K: **Endoparasitenbefall in kommerziellen Hundezuchten unter besonderer Berücksichtigung der Isosporose**. Dr. med. vet. Dissertation. Tierärztliche Hochschule Hannover; 1999.

[13] Seeliger U: **Feldstudie zur Epidemiologie und Bekämpfung der Isosporose des Hundes**. Dr. med. vet. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover; 1999.

[14] Daugschies A, Mundt HC, Letkova V: **Toltrazuril treatment of cystoisosporosis in dogs under experimental and field conditions**. Parasitol Res 2000, **86**:797-799.

[15] Schimmel A, Schroeder I, Altreuther G, Settje T, Charles S, Wolken S, Kok DJ, Ketzis J, Young D, Hutchens D, Krieger KJ: **Efficacy of emodepside plus toltrazuril, Procox® oral suspension for dogs against *Toxocara canis*, *Uncinaria stenocephala* and *Ancylostoma caninum* in dogs**. Parasitol Res 2011, **109**:1-8.

[16] Mengel H, Krüger M, Krüger MU, Westphal B, Swidsinski A, Schwarz S, Mundt HC, Dittmar K, Daugschies A: **Necrotic enteritis due to simultaneous infection with *Isospora suis* and clostridia in newborn piglets and its prevention by early treatment with toltrazuril**. Parasitol Res 2012, **110**:1347-1355.

[17] Carmichael LE 1999: **Canine viral vaccines at a turning point – a personal perspective**. Adv Vet. Med **41**:289-307.

[18] Altreuther A, Radeloff I, LeSueur C, Schimmel A, Krieger K: **Field evaluation of the efficacy and safety of emodepside plus praziquantel tablets (Profender® tablets for dogs) against naturally acquired nematode and cestode infections in dogs**. Parasitol Res 2009, **105**:23-29.

[19] Altreuther G, Schimmel A, Schroeder I, Bach T, Charles S, Kok D, Kraemer F, Wolken S, Young D, Krieger K: **Efficacy of emodepside plus praziquantel tablets (Profender® tablets for dogs) against mature and immature infections with *Toxocara canis* and *Toxascaris leonina* in dogs**. Parasitol Res 2009, **105**: 1-8.

[20] Day MJ, Horzinek MC, Schultz RD (eds.): **WSAVA guidelines for the vaccination of dogs and cats**. J Small Anim Pract 2010, **51**:1-32.

[21] Zentek J, Marquart B, Pietrzak T, Ballèvre O, Rochat R: **Dietary effects on bifidobacteria and *Clostridium perfringens* in the canine intestinal tract**. J Anim Physiol Nutr 2003, **87**:397-407.

[22] Kil DY, Swanson KS: **Companion animals symposium: Role of microbes in canine and feline health**. J Anim Sci 2011, **89**:1498-1505.

[23] Prada J, Baljer G, de Rycke J, Steinrück H, Zimmermann S, Stephan R, Beutin L: **Characteristics of alpha-hemolytic strains of *Escherichia coli* isolated from dogs with gastroenteritis.** Vet Microbiol 1991, **29**:59-73.

[24] Starcic M, Johnson JR, Stell AL, van der Goot J, Hendriks HG, van Vorstenbosch C, van Dijk L, Gaastra W: **Haemolytic *Escherichia coli* isolated from dogs with diarrhea have characteristics of both uropathogenic and necrotoxigenic strains**. Vet Microbiol 2002, **85**:361-377.

[25] Marks SL, Rankin SC, Byrne BA, Weese JS: **Enteropathogenic bacteria in dogs and cats: diagnosis, epidemiology, treatment, and control**. J Vet Med Int Med 2011, **25**:1195-1208.

[26] Refsum T, Handeland K, Baggesen DL, Holstad G, Kapperud G: ***Salmonellae* in avian wildlife in Norway from 1969 to 2000**. Appl Env Microbiol 2002 **68**:5595-5599.

[27] Baillon MLA, Marshall-Jones ZV, Butterwick RF: **Effects of probiotic *Lactobacillus acidophilus* strain DSM13241 in healthy adult dogs**. Am J Vet Res 2004 **65**:338-343.

[28] Sherman PM, Johnson-Henry KC, Yeung HP, Ngo PS, Goulet J, Tompkins TA: **Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized t84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements**. Inf Immun 2005, **73**:5183-5188.

[29] Grellet A, Heilmann RM, Suchodolski JS, Feugier A, Casseleux G, Biourge V, Bickel T, Plack B, Grandjean D, Steiner JM: **Evaluation of canine calprotectin in feces from a large group of puppies**. J Vet Med Int Med 2010, **24**:s1553.

[30] Schoder D, Benetka V, Sommerfeld-Stur I, Kopf N, Weissenbacher E, Pallan C, Walk K, Möstl K: **Untersuchungen zum Antikörper-Status gegen Hundestaupe-Virus und Canines Parvovirus-2 bei Hunden in Niederösterreich und Wien nach unterschiedlichen Impfintervallen**. Vet Med Austria / Wien Tierärztl Mschr 2006, **93**:176-182.

[31] Heilmann RM, Suchodolski JS, Steiner JM: **Development and analytic validation of a radioimmunoassay for the quantification of canine calprotectin in serum and feces from dogs**. Am J Vet Res 2008, **69**:845-53.

[32] Heilmann RM, Lanerie DJ, Ruaux CG, Grützner N, Suchodolski JS, Steiner JM: **Development and analytic validation of an immunoassay for the quantification of canine calprotectin in serum and feces and its variability in serum from healthy dogs**. Vet Immunol Immunopathol 2011, **144**:200-209.

Table 1. Description of litters in the study. B=Banminth®, D=Drontal®. In bold: litters that were positive at least once during the first sampling and therefore included in the efficacy evaluation. Serum samples were obtained as paired samples before vaccination in the 6th/8th w.o.l. and two weeks after that.

Litter number (breed)	N puppies Procox®/Control	N faecal samples Procox®/Control						N serum samples Procox®/Control
	Week of life	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	
A (English Setter)	**5/5 (B*)**	**5/2**	**5/5$**	**4/3**	**2/4**	**5/2$**	**2/5$**	**not done**
B (Malinois)	**4/4 (D)**	**2/4**	**3/4**	**4/4**	**4/4$**	**4/4$**	**4/4$**	**4/4**
C (Austrl. Sheperd)	4/4 (B)	4/4	4/4$	4/4$	4/4$	4/4	4/4	n.d.
D (Gronendael)	4/3 (B)	2/3$	4/3$	4/3$	4/3$	4/3$	4/3$	4/3
E (Malinois)	**3/3 (D)**	**0/0**	**3/3$**	**3/3$**	**3/3$**	**0/0**	**3/3$**	**3/3**
F (Berner Sennen)	5/4 (B*)	5/4$	5/4$	0/0	5/4$	5/4$	5/4$	3/1
G (Border Collie)	**3/3 (B)**	**2/2**	**3/3**	**3/2$**	**3/2$**	**0/0$**	**3/3$**	**3/3**
TOTAL	*28/26*	*20/19*	*27/26*	*22/19*	*25/24*	*22/17*	*25/26*	*17/14*

*first treatment: 5th w.o.l.; $: bacteriological examination

Table 2. Excretion intensity (semi-quantitative) in the puppies of the positive litters (n=15 in the Procox® group, n=15 in the Control group). N=number of samples; *in brackets: percentage when n >0*

Weeks of life		3	4	5	6	7	8
			Isospora				
Procox®	N=70 (weeks 3-8)	N=9	N=14	N=14	N=12	N=9	N=12
negative	61 *(87.1)*	9 *(100)*	14 (100)	12 *(85.7)*	10 *(83.3)*	8 *(88.9)*	8 *(66.7)*
Low	6 *(8.6)*	0	0	2 *(14.3)*	1 *(8.3)*	0	3 *(25.0)*
medium	3 *(4.3)*	0	0	0	1 *(8.3)*	1 *(11.1)*	1 *(8.33)*
High	0	0	0	0	0	0	0
Control	N=69 (weeks 3-8)	N=8	N=15	N=12	N=13	N=6	N=15
negative	40 *(58.0)*	7 *(87.5)*	11 *(73.3)*	5 *(41.7)*	8 *(61.5)*	2 *(33.3)*	7 *(46.7)*
Low	20 *(29.0)*	1 *(12.5)*	2 *(13.3)*	6 *(50.0)*	4 *(30.8)*	4 *(66.7)*	3 *(20.0)*
medium	4 *(5.9)*	0	0	0	1 *(7.7)*	0	3 *(20.0)*
High	5 *(7.2)*	0	2 *(13.3)*	1 *(8.3)*	0	0	2 *(13.3)*
			Toxocara				
Procox®	N=70 (weeks 3-8)	N=9	N=14	N=14	N=12	N=9	N=12
negative	69 *(98.6)*	8 *(88.9)*	14 *(100)*	14 *(100)*	12 *(100)*	9 *(100)*	12 *(100)*
Low	1 *(1.4)*	1 *(11.1)*	0	0	0	0	0
medium	0	0	0	0	0	0	0
High	0	0	0	0	0	0	0
Control	N=69 (weeks 3-8)	N=8	N=15	N=12	N=13	N=6	N=15
negative	58 *(84.1)*	6 *(75)*	11 *(73.3)*	9 *(75.0)*	11 *(84.6)*	6 *(100)*	15 *(100)*
Low	3 *(4.3)*	1 *(12.5)*	0	2 *(16.7)*	0	0	0
medium	2 *(2.9)*	1 *(12.5)*	1 *(6.7)*	0	0	0	0
High	6 (8.7)	0	3 (20.0)	1 *(8.3)*	2 *(15.4)*	0	0

Figure Captions

Fig. 1: Individual OPG (oocysts per gram of faeces) values of McMaster positive animals in the Control group (black squares) and the Procox® group (white triangles).

Figure 2: Excretion patterns (average excretion intensities) for haemolytic *E. coli* (a) and *C. perfringens* (b). *parasites+*: animals from litters where parasites were detected; *parasites-*: animals from parasitized litters; each divided into a Control and a Procox®-group. Intensity is given as relative intensity (0=negative, 1=low, 2=medium, 3=high)

Rauscher et al., canine coccidiosis

Figure 1

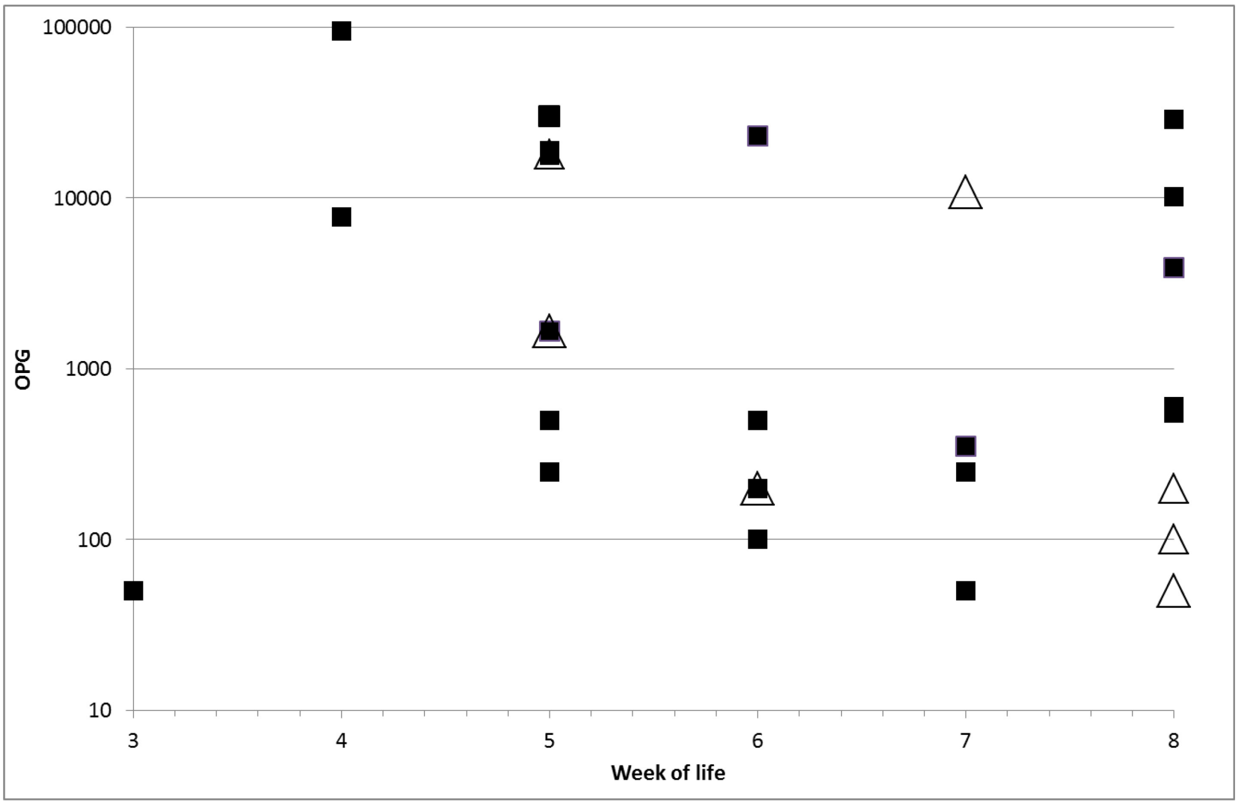
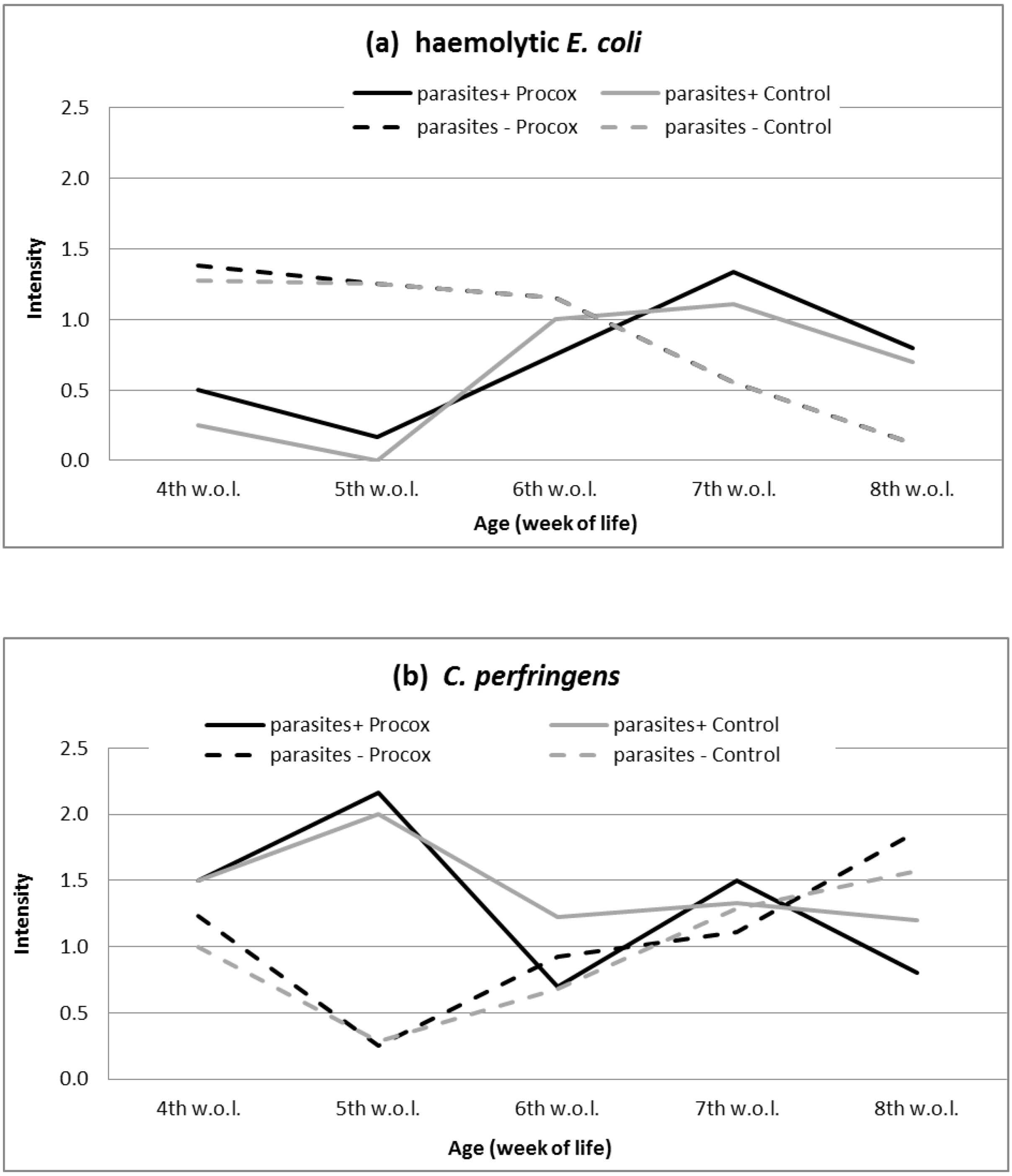


Figure 2


(a) haemolytic E. coli
parasites+ Procox
parasites+ Control
parasites - Procox
parasites - Control
Intensity
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
4th w.o.l.
5th w.o.l.
6th w.o.l.
7th w.o.l.
8th w.o.l.
Age (week of life)
(b) C. perfringens
parasites+ Procox
parasites+ Control
parasites - Procox
parasites - Control
Intensity
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
4th w.o.l.
5th w.o.l.
6th w.o.l.
7th w.o.l.
8th w.o.l.
Age (week of life)

4. Diskussion

Die Wirksamkeit des Präparates Procox® Orale Suspension für Hunde gegen Kokzidien mit den Wirkstoffen Emodepsid und Toltrazuril wurden unter Feldbedingungen getestet. Dazu wurden sieben Würfe untersucht, wobei vier Würfe mindestens einmal Kokzidien ausschieden und daher für die Auswertungen herangezogen wurden. 15 Welpen bekamen in der 3., 5. und 7. Lebenswoche Procox® in folgender Dosierung: 0,5 ml/kg Körpergewicht, entsprechend 0,45 mg Emodepsid/kg Körpergewicht und 9 mg Toltrazuril/kg Körpergewicht, oral appliziert. 15 weitere Welpen dienten als Kontrolltiere, die in der 3., 5. und 7. Lebenswoche mit Banminth® oder Drontal® behandelt wurden. Eine wöchentliche klinische Untersuchung sowie die Entnahme von Kotproben dienten als Kontrolle.

In der dritten Lebenswoche konnte *Isospora* mit einer hohen Prävalenz nachgewiesen werden. Bereits BUEHL et al. (2006) beschrieben patente Infektionen in Welpen diesen Alters, das heißt, dass die Infektion bereits in der zweiten Lebenswoche, also noch in der Wurfbox, stattgefunden hatte. In weiteren Studien wurden erste patente Infektionen zwischen der 4. und der 6. Lebenswoche nachgewiesen (BODE, 1999; SEELIGER, 1999). BUEHL et al. (2006) beschrieben eine erneute Ausscheidung von Oozysten bei unbehandelten Welpen. Das konnte in der vorliegenden Studie bestätigt werden, hier trat eine erneute Exkretion in der 6.-8. Lebenswoche auf. Daraus erschließt sich, dass die Immunität gegen *Isospora* nicht steril ist und eine wiederholte Infektion nötig ist, um einen vollständigen Schutz zu gewährleisten. Die mit Procox® behandelten Welpen schieden nach einigen Wochen wiederholt Oozysten aus, jedoch in geringerer Anzahl als die Kontrollen. Die maximale Exkretionsrate in der 8. Lebenswoche betrug 33 %; in der Kontrollgruppe war die maximale Prävalenz 67 %. Das bestätigt die Ergebnisse von ALTREUTHER et al. (2011 a,b).

Die Präparate wurden gut vertragen, Nebenwirkungen wurden nicht festgestellt. Es zeigte sich, dass eine Woche nach der Medikation keine Oozysten mehr ausgeschieden wurden. Auch das stimmt mit den Untersuchungen von ALTREUTHER et al. (2011 a,b) überein. SEELIGER (1999) konnte nach einmaliger oraler Gabe von 20 mg Toltrazuril/kg Körpergewicht in der 6. Lebenswoche bei Welpen, die nachweislich mit *Isospora* spp. infiziert waren, eine verringerte Oozystenausscheidung beobachten. In unseren Untersuchungen schied ein Welpe der Behandlungsgruppe über den gesamten Zeitraum zweimal Oozysten aus, in der Kontrollgruppe waren es acht Welpen. Die Wirksamkeit, von Procox® wird dadurch bestätigt. Insgesamt wurde die Extensität und Intensität der Exkretion von Oozysten mit dem oben genannten Behandlungsschema reduziert.

Toxocara wurde bei einem Tier in der 3. Lebenswoche (erste Tag der Probenentnahme und Behandlung) in der Procox®- Gruppe nachgewiesen. Im Vergleich zu Isospora war *Toxocara* weniger prävalent. Nach der Medikation waren die Kotproben durchgehend negativ. Im Gegensatz dazu wurden in der entwurmten Kontrollgruppe Spulwurmeier bis zur 6. Lebenswoche ausgeschieden. Der Behandlungsplan der Kontrollgruppen variierte. Entweder wurde in der 3. oder in der 5. Lebenswoche begonnen, mit den oben genannten Pharmaka zu entwurmen. Das könnte die Eierausscheidung erklären. Auch gab es keine wiederholte Exkretion von Nematodeneiern in der Behandlungsgruppe, was zum einen auf die recht lange Präpatenz von *Toxocara*, andererseits auf die hohe Wirksamkeit von Emodepisd zurückzuführen ist (ALTREUTHER et al., 2009 a,b). In einer Feldstudie von ALTREUTHER et al. (2009 a,b) wurden 162 Hunde mit Emodepsid plus Praziquantel (Profender® Tabletten für Hunde), behandelt und eine Reduktion der Eiausscheidungen von 99,9 % festgestellt, was die gute Wirksamkeit von Emodepsid auf Spulwürmer bestätigt.

Zusammenfassend kann Procox® zur Behandlung von Welpen gegen Kokzidien und Spulwürmer in der 3., 5. und 7. Lebenswoche empfohlen werden, da es die Ausscheidung von Eiern bzw. Oozysten effektiv reduziert und somit die Kontamination der Umgebung nachhaltig vermindert. Da die Tiere in der vorliegenden Studie nicht klinisch erkrankt waren lässt sich zum Einfluss der Behandlung auf die Welpengesundheit keine direkte Aussage treffen. Sowohl *Isospora* wie auch *Toxocara* sind jedoch als potentielle Krankheitserreger beschrieben worden, so dass eine Reduktion der Infektion jedenfalls das Risiko einer parasitenassoziierten Erkrankung verringert.

5. Zusammenfassung

In dieser Studie wurde die Wirkung von Procox® (Emodepsid/Toltrazuril Suspension für Hunde) gegen intestianle Parasiten, insbesondere *Isospora ohioensis*-Komplex, untersucht. Zwei Gruppen, eine Behandlungs- und eine Kontrollgruppe zu je 15 Welpen, wurden ab der 3. Lebenswoche wöchentlich klinisch und koproskopisch überwacht. Behandlungen erfolgten in der 3., 5. und 7. Lebenswoche mit folgender Dosierung: 0,5 ml/kg Körpergewicht, entsprechend 0,45 mg Emodepsid und 9 mg Toltrazuril/kg Körpergewicht. Die Kontrollgruppen erhielten entweder Banminth® in der Dosierung 5 mg Pyrantel pro kg Körpergewicht oder Drontal® in der Dosierung von 5 mg Praziquantel pro kg Körpergewicht und 57,5 mg Pyrantelembonat pro kg Körpergewicht. Die Wirksamkeit wurde durch die Identifikation von Kokzidienoozysten und Spulwurmeiern mittels Flotations- und McMaster-Methode überprüft. Es zeigte sich, dass der Anteil von Kokzidien-positiven Tieren in der Kontrollgruppe bis auf 67 % anstieg, während in der Behandlungsgruppe die Prävalenz unter 34 % blieb. Die höchste Prävalenz der *Toxocara*- positiven Tiere in der Kontrollgruppe betrug 27 %. In der Behandlungsgruppe schied ein Tier, 11 %, in der 3. LW, noch vor der ersten Behandlung, Spulwurmeier aus. In den folgenden Wochen waren alle mit Procox® behandelten Tiere negativ. Es traten keine unerwünschten Arzneimittelwirkungen auf und die Verabreichung erfolgte ohne Probleme.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass Procox® eine gute Wirksamkeit gegen *I. ohioensis*-Komplex und *T. canis* hat und daher für die metaphylaktische und therapeutische Parasitenbekämpfung bei Welpen ab der 3. Lebenswoche zu empfehlen ist.

6. Extended Summary

Barbara- Anna Rauscher: Metaphylactic treatment of naturally infected puppies against intestinal parasites, especially coccidia.

6.1. Introduction

Isospora spp. and *Toxocara canis* are important intestinal pathogens of puppies. Both can cause diarrhoea and vomitus and a heavy infection can lead to impaired development and poor health. The aim of this study was to investigate the effect of Procox®, a combination of emodepside and toltrazuril, on parasite infections, especially *Isospora*, in naturally infected puppies between the 3rd and 8th week of life. Parasitological parameters were registered and evaluated.

6.2. Materials and Methods

54 puppies from 7 litters of different breeds from eastern Austria were examined. The puppies were randomly assigned to two groups. The Procox® group received an oral dose (0.5 ml per kg body weight, corresponding to 0.45 mg emodepside and 9 mg toltrazuril per kg body weight) in the 3rd, 5th and 7th week of life. The Control group received either Drontal® (5 mg praziquantel and 57.5 mg pyrantel embonate per kg of body weight) in the same interval as Procox® or Banminth® (5 mg pyrantel base per kg of body weight) in the 5th and 7th week of life. Faecal samples and clinical parameters from individual puppies were examined weekly from the 3rd to the 8th week of life. Faecal examination was done by flotation and, if positive for coccidia, by McMaster counting.

6.3. Results

54 puppies from seven litters were included in the study, and 272 samples could be obtained during the examination period. Overall, 51 samples (19%) were positive for parasites; 38 contained oocysts of *Isospora* (all *I. ohioensis*-complex) and 19 for eggs of *T. canis*. In four litters puppies excreted oocysts or eggs during the first visit and were included in the study. Consequently, for the comparison of the treatment regimes, 30 puppies from the positive litters were available, 15 in the Procox® group and 15 in the control group.

In the Procox® group 9/70 (12.9%) of all samples were positive for *Isospora* oocysts, and high excretion intensities were not observed. Oocyst excretion was observed from the 5th week of life. The highest excretion was 18500 OPG, the average 2167 OPG. In the Control group 29/69 (42.0%) of all samples were positive, with excretion from the 3rd to the 8th week of life. 14 samples (18.0%) were highly positive. The highest observed excretion was 95 250 OPG, the average 10 510 OPG. Nine puppies excreted oocysts more than once, eight of which were in the Control group. Three puppies that excreted oocysts prior to treatment were negative one week after treatment.

Toxocara was detected in one animal in the Procox® group in the 3rd week of life, but not anymore after that. In the Control group eggs were detected from the 3rd to the 6th week of life in 11/69 samples (15.9%). Six samples (8.7%) were highly positive.

Mixed infections with *Isospora* and *Toxocara* were detected in four samples from four puppies in the Control group.

Diarrhoea or other signs of clinical coccidiosis or toxocarosis were not observed. All administered drugs were well tolerated; adverse effects of treatment, such as salivation or vomitus, were not observed.

6.4. <u>Discussion</u>

Isospora could already be detected at high prevalence rates at the first visits in the 3rd week of life. Patent infections in puppies of that age in high rates have been described precisely, indicating that many puppies had become infected during the 2nd week of life when they were still in the litter box. In earlier studies a re-occurrence of excretion has been described in untreated animals and could also be noted in the present study during the 6th to 8th week of life, indicating that immunity is not sterile or requires repeated infections for complete protection against re-infection. In the Procox®-treated puppies re-shedding also occurred after some weeks, although in lower numbers, and the maximum excretion rate was 33% in the 8th week of life, compared to the untreated Control group with a maximum prevalence of 67%.

Procox® effectively suppressed the shedding of oocysts during the first week after application, as described before. Overall, both the extensity and intensity of oocyst excretion in treated puppies could be reduced significantly with the applied treatment scheme. *Toxocara* was less prevalent than *Isospora*, it was detected before treatment in the Procox®

group but was absent during the following five weeks, demonstrating the high efficacy of emodepside against this nematode. Some animals in the Control group still excreted eggs until the 6^{th} week of life. The treatment schemes of the Control group varied between litters; this could be the reason for egg shedding in this group. In contrast to the coccidia, nematodes did not re-appear in the Procox® group during the examination period, either because of the long prepatent period or because stable immunity was induced.

7. Literaturverzeichnis

ALTREUTHER, G., GASDA, N., SCHROEDER, I., JOACHIM, A., SETTJE, T., SCHIMMEL, A., HUTCHENS, D., KRIEGER, K. J. (2011a): Efficacy of emodepside plus toltrazuril suspension (Procox® oral suspension for dogs) against prepatent and patent infection with *Isospora canis* and *Isospora ohioensis*-complex in dogs. Parasitology Research **109**, 9-20.

ALTREUTHER, G., GASDA, N., ADLER, K., HELLMANN, K., THURIEAU, H., SCHIMMEL, A., HUTCHENS, D., KRIEGER, K.J. (2011b): Field evaluations of the efficacy and safety of emodepside plus toltrazuril (Procox® oral suspension for dogs) against naturally acquired nematode and *Isospora* spp. infections in dogs. Parasitology Research **109**, 21-28.

ALTREUTHER, G., RADELOFF, I., LESUEUR, C., SCHIMMEL, A., KRIEGER, K. (2009a): Field evaluation of the efficacy and safety of emodepside plus praziquantel Tablets (Profender® tablets for dogs) against naturally acquired nematode and cestode infections in dogs. Parasitology Research **105**, 23-29.

ALTREUTHER, G., SCHIMMEL, A., SCHROEDER, I., BACH, T., CHARLES, S., KOK, D., KRAEMER, F., WOLKEN, S., YOUNG, D., KRIEGER K. (2009b): Efficacy of emodepside plus praziquantel tablets (Profender® tablets for dogs) against mature and immature infections with *Toxocara canis* and *Toxascaris leonine* in dogs. Parasitology Research **105**, 1-8.

BAUER, C. (2006): Untersuchungsmethoden. In: SCHNIEDER, T.: Veterinärmedizinische Parasitologie. 6. Aufl. Parey, Stuttgart, S. 84-104.

BOCH, J., GÖBEL, E., HEINE, J., ERBER, M. (1981): Isosporainfektionen bei Hund und Katze. Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift **94**, 384-391.

BODE, K. (1999): Endoparasitenbefall in kommerziellen Hundezuchten unter besonderer Berücksichtigung der Isosporose. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.

BOSSE, M. u. STOYE, M. (1981): Zur Wirkung verschiedener Benzimidazolcarbamate auf somatische Larven von *Ancylostoma caninum* ERCOLANI 1859 (Ancylostomidae) und *Toxocara canis* WERNER 1782 (Anisakidae). 2. Untersuchungen an der graviden Hündin. Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B **28**, 265-279.

BUEHL, I.E., PROSL, H., MUNDT, H.C., TICHY, A.G., JOACHIM, A. (2006): Canine isosporosis – Epidemiology of field and experimental infections. Journal of Veterinary Medicine Series B **53**, 482-487.

DAUGSCHIES, A., MUNDT, H.-C., LETKOVA, V.(2000): Toltrazuril treatment of cystoisosporosis in dogs under experimental and field conditions. Parasitology Research **86**, 797-799.

DEPLAZES, P. (2006): Helminthosen von Hund und Katze. In: SCHNIEDER, T.: Veterinärmedizinische Parasitologie. 6. Auflage, Paul Parey, Stuttgart, S. 444-518.

DUBEY, J. P. (1978a): Life-cycle of *Isospora ohioensis* in dogs. Parasitology **77**, 1-11.

DUBEY, J. P. (1978b): Pathogenicity of *Isospora ohioensis* infection in dogs. Journal of the American Veterinary Medical Association **173**, 192-197.

ECKERT, J., FRIEDHOFF, K.T., ZAHNER, H., DEPLAZES, P. (2008): Parasiten und Parasitosen, Lehrbuch der Parasitologie in der Tiermedizin, 2. Auflage, Enke, Stuttgart, S. 30-141.

EPE, C. (2011) Helminthen bei Hund und Katze. Kleintierpraxis **56**, 136-156.

EPE, C. (2009) Intestinal Nematodes: Biology and Control. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice **39**, 1091-1107.

GASDA, N. (2009) Verhinderung und Bekämpfung der Kontaminierung der Umwelt mit Oozysten von *Isospora* spp. (Apikomplexa, Coccidia); Wirksamkeit und Verträglichkeit einer neuen kokzidioziden Suspension für Hunde und die Möglichkeit der Desinfektion. Dissertation, Universität Bonn.

HARDER, A., HOLDEN-DYEV, L., WALKER, R., WUNDERLICH, F. (2005): Mechanisms of action of emodepside. Parasitology Research **97**, 1-10.

KONECNY, M. S. (2012): Auswirkungen der Darmflora gravider Hündinnen auf die Scheidenflora und auf die Welpengesundheit. Diplomarbeit, Veterinärmedizinische Universität Wien.

LINDSAY, D.S., DUBEY, J.P., BLAGBURN, B.L. (1997): Biology of *Isospora* spp. from humans, nonhuman primates, and domestic animals. Clinical Microbiology Reviews **10**, 19-34.

PARSONS, J. C. (1987): Ascarid infections of cats and dogs. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice **17**, 1307-1339.

ROMMEL, M., ECKERT, J., KUTZER, E. (1992): Parasitosen von Hund und Katze. In: SCHNIEDER, T.: Veterinärmedizinische Parasitologie, 4. Auflage, Paul Parey, Berlin, 518-627.

SCHIMMEL, A., SCHROEDER, I., ALTREUTHER, G., SETTJE, T., CHARLES, S., WOLKEN, S., KOK, D.J., KETZIS, J., YOUNG, D., HUTSCHENS, D., KRIEGER, K.J. (2011):

Efficacy of emodepside plus toltrazuril (Procox® oral suspension for dogs) against *Toxocara canis*, *Uncinaria stenocephala* and *Ancylostoma caninum* in dogs. Parasitology Research **109**, 1-8.

SCHOLTYSIK, G. u. STEUBER S. (2007): Antiparasitäre Chemotherapie. In: FREY, H.H. u. LÖSCHER, W.: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin, 2. Auflage, Enke, Stuttgart, S. 401-457.

SEELIGER, U. (1999): Feldstudie zur Epidemiologie und Bekämpfung der Isosporose des Hundes. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.

STEJSKAL, M. (2012): Untersuchung der Auswirkung von Procox® auf die Darmflora von Welpen. Diplomarbeit, Veterinärmedizinische Universität Wien.

STOYE, M. (1979): Spul- und Hakenwürmer des Hundes - Entwicklung, Epizootiologie, Bekämpfung. Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift **96**, 109-111.

TENTER, A.M., DEPLAZES, P. (2006): Protozoeninfektionen von Hund und Katze – Isosporose. In: SCHNIEDER, T.: Veterinärmedizinische Parasitologie, 6. Auflage, Paul Parey, Stuttgart, S. 421-425.

8. Abbildungs-/ Tabellenverzeichnis

Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei allen Menschen bedanken die mir ermöglicht und geholfen haben, dieses Studium mit all seinen Höhen und Tiefen zu absolvieren.

Zu allererst möchte ich mich bei Prof. Anja Joachim bedanken, die mir überaus geduldig mit Rat und Tat zur Seite stand. Man kann sich keinen besseren Betreuer wünschen, Danke!

Außerdem gilt mein Dank auch an Prof. Sabine Schäfer- Somi, für die hilfreiche Unterstützung mit Züchter und Co.

Weiters Danke an die Co-Autoren, sowie an meine 3 Kolleginnen und Mitdiplomandinnen, Alexandra Ali, Martina Konecny und Manuela Stejskal.

Ganz besonders möchte ich meinen Lebenspartner, Christoph, danken, der mich von Anfang bis Ende dieses Studiums begleitet hat und mich in jeglicher Hinsicht unterstützt hat. Mich durch gute und schlechte Zeiten begleitet und mir bei all meinen Entscheidungen geholfen und unterstützt und diese auch respektiert hat. Danke!

Natürlich auch Danke an meine Eltern und Freunde, die mir das Leben erst lebenswert machen. Liebe Bianca, danke!