

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Untersuchungsziel

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Erfassung der Helminthenfauna des Marderhundes (*Nyctereutes procyonoides*) im Land Brandenburg. Neben dem Verdauungs- wurden auch der Respirationstrakt, die ableitenden Harnwege und die Muskulatur untersucht.

Mögliche Beziehungen des Parasitenstatus zu Alter, Geschlecht der Wirte sowie der Helminthen untereinander sollten bei der Auswertung im Mittelpunkt stehen.

Nach ersten Funden von *T. spiralis* in diesem Untersuchungsmaterial verlagerte sich der Schwerpunkt der Erhebungen auf diesen Zoonoseerreger und die Untersuchungen wurden auf das angrenzende Land Mecklenburg–Vorpommern ausgedehnt. Dabei wurden auch vom Rotfuchs stammende Proben aus dem gleichen Untersuchungsgebiet einbezogen.

3.2. Untersuchungsmaterial

In enger Zusammenarbeit mit Tierpräparatoren, Naturschutz International e.V., dem Institut für Holzwirtschaft der Bundesforschungsanstalt für Forstwirtschaft in Eberswalde, dem Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt in Frankfurt/Oder, dem Institut für Forstbotanik und Forstzoologie der TU Dresden und der Vogelschutzstation Buckow bei Nennhausen (Brandenburg) wurden Tierkörper, innere Organe von Marderhunden, Zwerchfell- und Serumproben sichergestellt und bei –20°C eingefroren.

Zur Untersuchung auf Helminthen kamen 86 Marderhundkerne, zusätzlich 225 Muskelproben von Marderhunden, sowie 123 Muskelproben von Rotfüchsen. Außerdem lagen insgesamt 220 Serumproben von Marderhunden vor.

Die untersuchten Marderhundkerne stammten überwiegend aus dem nordöstlichen Teil Brandenburgs und zwar aus den Kreisen Uckermark, Märkisch-Oderland, Barnim und Oberhavel, die untersuchten Zwerchfellproben wurden aus Mecklenburg-Vorpommern bezogen.

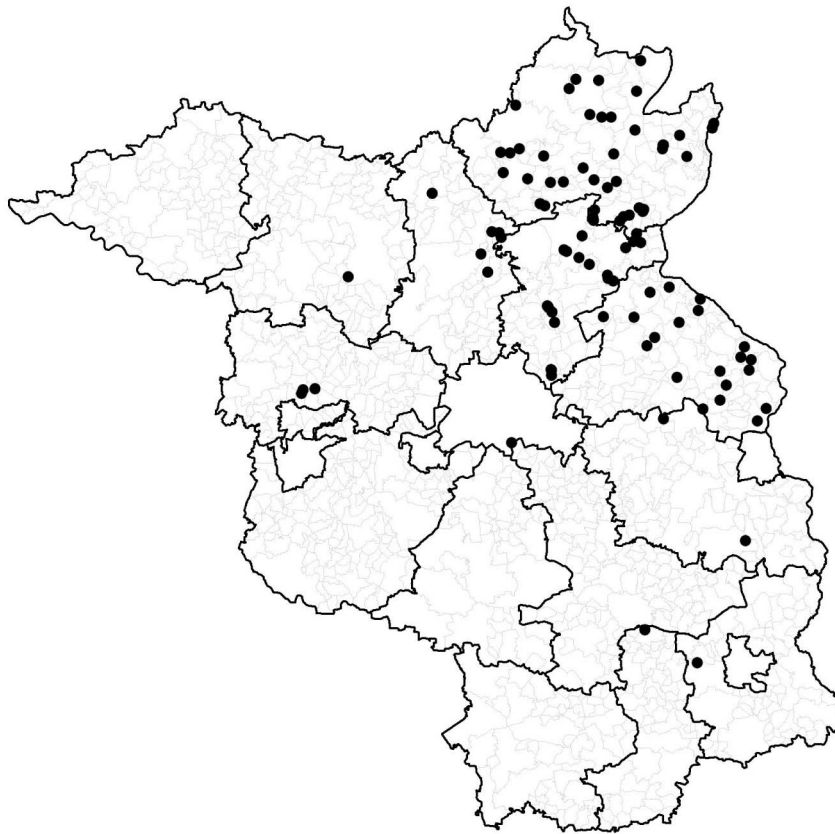


Abb.7: Geographische Herkunft des Untersuchungsmaterials

Die Mehrzahl der 86 Marderhunde wurden durch Jäger erlegt, in vier Fällen handelte es sich um Unfallwild, ein Marderhund wurde erschlagen, ein Tier wurde vom Hund totgebissen und eine Fähe aus einem Fuchsbau ausgegraben. Bei einem Tier war die Todesursache eine intravitale Femurfraktur. Weitere Besonderheiten waren der abgeheilte Amputationsstumpf einer Hinterextremität eines Tieres und ein albinotischer Marderhund ohne Grannenhaare.

Soweit erfassbar, lagen Angaben über Erlegedatum, Herkunft, Geschlecht und das Alter der Tiere vor, die Körpermaße und -massen wurden vor dem Abbalgen ermittelt. Bei 7 Marderhunden lagen keine Angaben über die Herkunft vor.

Die eigenen Untersuchungen an den Tierkernen fanden im Zeitraum von März 1998 bis September 2000 statt, wobei die ersten Erlegedaten schon von 1997 datierten.

Eine grobe Alterseinteilung des Untersuchungsmaterials erfolgte nach Habermehl (1985) in Anlehnung an die Kriterien beim Fuchs durch die Beurteilung von Zahnwechsel und Zahnabnutzungserscheinungen in drei Altersklassen:

- Altersgruppe 1: juvenile (bis 4 Monate)
- Altersgruppe 2: subadulte (bis ca. 1 Jahr)
- Altersgruppe 3: adulte (älter als 1 Jahr)

Die Geschlechtsbestimmung erfolgte anhand der inneren und äußeren Geschlechtsorgane.

3.3. Untersuchungsmethoden

3.3.1. Parasitologische Sektion

Die Untersuchung erfolgte mittels vollständiger parasitologischer Sektion der inneren Organe. Die bei -20°C gefrorenen Tierkörper wurden bei 4°C Raumtemperatur über einen Zeitraum von 24 Stunden langsam aufgetaut. Ergänzend sei bemerkt, dass nach dem erstmaligen Nachweis von *Echinococcus multilocularis* alle weiteren Proben (Därme) mindestens über einen Zeitraum von 8 Tagen bei -80°C tiefgefroren wurden. Dies geschah aus Sicherheitsgründen zum Schutz der Untersuchenden.

Der Darm wurde, nachdem er vom Mesenterium getrennt und das letzte Drittel des Ileums nach Abbinden abgetrennt worden war, mit Leitungswasser gespült und anschließend eröffnet. Das aufgefangene Spülwasser verblieb für jeweils 20 Minuten in Bechergläsern mit einem Volumen von 1000 ml und wurde anschließend dekantiert. Bei starker Trübung mussten die Bechergläser erneut gefüllt und dekantiert, bis der Überstand fast klar war. Das Sediment wurde in eine Petrischale ($\varnothing 100\text{ mm}$) überführt, unter dem Stereomikroskop mit 10-40-facher Vergrößerung auf schwarzem Grund durchgemustert. Die Sensitivität zum Aufspüren von *E. multilocularis* liegt dabei bei 85% (Deplazes & Eckert 1996). Der abgetrennte Ileumabschnitt wurde zur Überprüfung der Diagnose auf Darmechinococcose bei -80°C tiefgefroren und an das Institut für Epidemiologische Diagnostik in Wusterhausen geschickt. Dort wurden tiefe Geschabsel der Darmschleimhaut entnommen und unter dem Lichtmikroskop untersucht.

Die Untersuchung der Enddarmkotproben erfolgte mit Sedimentations- und Flotationsverfahren. Beide Verfahren dienen der diagnostischen Sicherheit, da hiermit neben den Geschlechtsprodukten der parasitären Helminthen auch intestinale Protozoen (Kokzidien) nachgewiesen werden können.

Der Respirationstrakt wurde entlang der Trachea und der Bronchien geöffnet. Soweit Lungenparasiten nicht bereits makroskopisch sichtbar waren, erfolgte die Entnahme von Schleimhautgeschabseln mit 18x18 mm großen Deckgläschen und deren mikroskopische Begutachtung (100-400-fache Vergrößerung) zum Nachweis von Helmintheneiern bzw. -larven. Harnblase und Nierenbecken wurden eröffnet und der Urin in einer Petrischale aufgefangen und das Sediment unter dem Stereomikroskop begutachtet. Zur Erhöhung der diagnostischen Sicherheit erfolgte auch die Entnahme von Geschabseln von Nierenbecken und Harnblasenschleimhaut.

Zur Untersuchung auf Leberegel wurde zunächst das Sediment der Gallenspülflüssigkeit makroskopisch auf Trematoden und mikroskopisch auf deren Eier begutachtet. Anschliessend erfolgte die Untersuchung der Leber. Nach Eröffnung der Gallengänge wurde das Organ in einer Schale mit Leitungswasser überschichtet, die Gallengänge mechanisch massiert und das entstandene Sediment unter dem Stereomikroskop begutachtet. Zumeist mussten aber mehrere Sedimentationsschritte vorangehen, um den Blutfarbstoff aus den Proben auszuwaschen.

3.3.1.1. Untersuchung der Kotproben

Die Untersuchung der Enddarmkotproben erfolgte nach einem kombinierten Sedimentations-Flotationsverfahren. Mit Leitungswasser homogenisierte Proben von ca. 5 g wurden über ein Sieb (Maschenweite von 250 µm) in ein 250 ml Becherglas gespült, wo sie 30 Minuten sedimentierten. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und ein Teil des Sedimentes mit einer gesättigten Zink-Sulfat-Lösung in ein Zentrifugenröhrchen gegeben. Nach der 3- minütigen Zentrifugation bei 2800 U/min konnte mithilfe einer Drahtöse 3 Tropfen von der Oberfläche des Zentrifugats abgenommen und mikroskopisch untersucht werden. Außerdem wurde zusätzlich zum Nachweis von Trematodeneiern das

restliche Sediment mit Methylenblau-Lösung angefärbt und im Mikroskop durchgemustert.

3.3.1.2. Differenzierung und Quantifizierung der gefundenen Helminthen

Die im Sediment der Spülfüssigkeiten enthaltenen Parasiten wurden mittels Präpariernadel isoliert, in physiologischer Na-Cl-Lösung gespült, bestimmt, nach Arten ausgezählt und in 70%igem Alkohol mit 5% Glycerin fixiert. Bei Trematoden und Cestoden erfolgte eine Färbung in Milchsäurekarmin. Nematoden wurden in Laktophenol aufgehellt. Die Differenzierung erfolgte unter dem Stereomikroskop bei 10-40-facher, im Falle der Eidiagnose bei bis zu 400-facher Vergrößerung. Die Artbestimmung erfolgte nach morphologischen Kriterien.

Bei einigen Marderhunden war der Befall mit Trematoden so stark, dass eine Auszählung anhand von Stichproben erfolgen musste. Bei den gefundenen Zestoden fehlten häufig die Skolices, auch war die Strobila oft in mehrere Teile zerteilt, so dass die Bestimmung der Zestoden, insbesondere der *Mesocestoides* spp. erschwert war. Bei den Nematoden wurden die Spulwürmer zusätzlich anhand der Morphologie der Eier weiblicher Exemplare differenziert. Dazu musste der Uterus unter dem Stereomikroskop präpariert, die reifen Eier aus den Endstücken mit einer Pipette entnommen auf einen Objektträger überführt und unter dem Lichtmikroskop bestimmt werden.

Für ausgewählte Exemplare der Helminthen wurden die Artdiagnose mit Hilfe einer rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung verifiziert.

3.3.2. Untersuchung auf Trichinen

Für die Untersuchung wurden bei den vollständig vorliegenden Tierkörperkernen aus fünf gut durchbluteten Muskelgruppen (Zwerchfell, Kaumuskulatur, Zunge, Vorder- und Hinterlauf-Muskulatur) Proben entnommen. In allen anderen Fällen standen lediglich Zwerchfellproben zur Verfügung. Pro Marderhund wurde je Muskelgruppe eine Probe von ca. 10 g entnommen.

Die Aufbereitung erfolgte zunächst in 10-er Pools mittels Digestionsmethode in künstlichem Magensaft (jeweils 2 g pro Muskelgruppe oder entsprechend 10 g

pro Tier). Bei positivem Befund wurden nun von den betroffenen Tieren der jeweiligen 10-er Gruppe einzeln mit Hilfe des Kompressoriums und der Trichinoskopie die positiven Muskelproben isoliert. Diese mussten dann wiederum die einzeln der Digestionsmethode unterzogen werden. Dabei konnte gleichzeitig die Larvendichte je Gramm Muskulatur ermittelt werden.

Die Nachweisgrenze von Trichinen mit der Digestionsmethode liegt bei Schlachtschweinen bei 4-5 Larven pro Gramm Muskulatur und für die Kompressoriumsmethode bei 14-16 Larven pro Gramm Muskulatur (Köhler 1981).

Die isolierten Larven wurden zur Speziesdeterminierung mittels PCR an das Trichinenreferenzzentrum nach Rom, Italien geschickt.

3.3.2.1. Trichinoskopie

Ein kleines Stück Muskulatur wurde aus jeder Muskelgruppe (Kaumuskulatur, Zunge, Zwerchfell, Muskulatur aus Vorder- und Hinterextremität) entnommen und in insgesamt 56 haferkorngroße Stückchen zerteilt, auf Glas-Kompressorien verbracht und die Quetschpräparate in einem Trichinoskop betrachtet und auf Larven untersucht.

3.3.2.2. Verdauungsmethode der Muskelproben

Die Untersuchung der Muskelproben erfolgt in Anlehnung an das bei der Trichinenuntersuchung des Schweines gebräuchlichen Magnetührverfahren (Allgemeine Verwaltungsvorschrift zum Fleischhygienegesetz, VwVFIHG 1986). Das Prinzip der Verdauungsverfahren beruht auf einer Auflösung des Muskelgewebes inklusive der die Larve umgebenden Kapsel durch Zugabe von Pepsin und Salzsäure, so dass die *Trichinella* Larven freigesetzt werden. Der Nachweis dieser Larven erfolgt unter dem Mikroskop.

Zur Untersuchung kamen pro Tier jeweils 2 g von 5 verschiedenen Muskelgruppen (insgesamt 10g pro Tier). In den Fällen, wo nur das Diaphragma vorlag, wurde nur eine 10g Probe der Zwerchfellmuskulatur verwendet. Ein Pool von jeweils 10 Tieren wurde in 100g Portionen untersucht. Die Sammelprobe wurde mit Hilfe einer Moulinette zerkleinert, in ein 3l Becherglas umgefüllt und

mit 2l 46-48°C warmen Wasser, 10g Pepsin (30.000 U/g) und 10 ml rauchender Salzsäure (37%) aufgefüllt. Die künstliche Verdauung der Ansätze erfolgte auf der Heizplatte eines Magnetrührers 45 Minuten bei konstanter Temperatur (46-48°C) unter kräftigem Rühren. Anschließend wurde der Inhalt durch ein Sieb (Maschenweite 200 µm) in einen Scheidetrichter umgefüllt und nach einer Sedimentationsdauer von 30 Minuten ca. 40 ml des Bodensatzes in ein Zentrifugenglas abgelassen. Nach erneuter Sedimentation von 10 Minuten konnten die überstehenden 30 ml der Flüssigkeit mit einer Wasserstrahlpumpe abpipettiert werden. Der ca. 10 ml umfassende Bodensatz wurde in eine Petrischale mit gitterförmig unterteiltem Boden umgefüllt, das Zentrifugenglas mit etwas warmen Wasser nachgespült und die Spülflüssigkeit in die Petrischalen umgefüllt. Die Begutachtung des Inhaltes der Petrischale erfolgte durch rasterartige gründliche Durchmusterung unter dem Mikroskop bei 20-40-facher Vergrößerung.

3.3.2.3. Serologische Untersuchung auf *Trichinella* spp.

Während die Nachweisgrenze der Verdauungsmethode bei 4-5 Larven pro Gramm Muskulatur liegt, kann mit dem ELISA ein Nachweis bei weniger als 0,01 Larven pro Gramm Muskulatur gelingen (Van Knapen 1989).

Die Seren der untersuchten Marderhunde wurden mittels des Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) Tests auf Antikörper gegen *Trichinella*-Antigen untersucht. Dazu kam ein am BgVV (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin) hergestellter Test zur Anwendung. Dieser Testkit basiert auf einem E/S-Antigen (exkretorisch-sekretorisches Antigen), das aus Stoffwechselmetaboliten von in vitro kultivierten Muskellarven besteht.

Die Untersuchung erfolgte nach folgendem Testprinzip nach Nöckler et al. (1995):

- Waschung der mit jeweils mit 50 µl *Trichinella* E/S-Antigen pro Vertiefung vorbeschichteten Mikrotiterplatten (Zulassungs-Nr.: BgVV 152) wurden mit Aqua dest. und danach drei mal mit einer PBS-T (Phosphate buffered saline/Tween 20) Pufferlösung (pH 7,3-7,4) zur Blockierung freier Bindungsstellen der Festphase.

- Auftragung der Negativ- und Positiv-Kontroll-Seren sowie die Feldseren in Verdünnungen im Verhältnis 1:100 mit PBS-T jeweils mit 50 µl pro Vertiefung in Zweifach- oder Vierfach-Bestimmung. Die Kontroll-Seren stammten vom einem experimentell mit *T. spiralis* infizierten Fuchs bzw. von einem trichinenfreiem Kontrolltier (0,5 ml lyophilisiert).
- Inkubation der Mikrotiterplatten bei 37°C 30 Minuten lang
- Waschung der Platten mit Aqua dest. und drei mal mit PBS-T jeweils fünf Minuten
- Als Konjugat diente Anti-Hund:IgG (vorverdünnt 1:10) vom Kaninchen (Fa. Sigma). Dieses wurde in einer Endverdünnung von 1:1000 in PBS-T in einer Menge von 50 µl pro Vertiefung eingefüllt.
- Inkubation der Mikrotiterplatten bei 37°C 30 Minuten lang
- Waschung der Platten mit Aqua dest. und drei mal mit PBS-T jeweils fünf Minuten gewaschen, abschließend wurde nochmals mit Aqua dest. gewaschen und die Flüssigkeit abgesaugt.
- Das Substrat wurde hergestellt aus 2,2-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazoline 6- Sulfonic acid) diammonium (ABTS) (Fa. Sigma) und kurz vor dem Beschicken zugegebenen Wasserstoffperoxid (30%, 1:100 vorverdünnt).
- Beschickung der Platten mit je 50 µl Substrat pro Vertiefung
- Die Messung der Intensität der Farbreaktion erfolgte in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 405 nm nach einer Inkubation bei Zimmertemperatur von 15-30 Minuten.

Die Auswertung der ELISA- Messergebnisse erfolgte mit Hilfe der Referenzstandardmethode. Als interner Referenzwert diente der mittlere Extinktionswert des Trichinella-Positiv-Kontroll-Serums PK, das auf jeder Mikrotiterplatte zusammen mit dem Negativ-Kontroll-Serum NK mitgeführt wurde. Während PK und NK in vierfachem Ansatz bestimmt wurden, erfolgte die Untersuchung der Feldseren FS in zweifachem Ansatz. Zur Ermittlung des plattenspezifischen Blanks wurden zwei Vertiefungen nur mit PBS-T ohne Serum beschichtet.

Für jede Serumprobe wurde aus der Differenz des photometrisch gemessenen absoluten Serum-Extinktionswertes E_a und der Eigenextinktion der Mikrotiterplatte E_{blank} der relative Extinktionswert E_r bestimmt. Aus dem

Quotienten des relativen Extinktionswertes des Feldserums Er_{FS} und des relativen Extinktionswertes des Trichinella-Positiv-Kontroll-Serums Er_{PK1} errechnete sich der Index des Feldserums I_{FS} wie folgt:

$$\text{Index des Feldserums } (I_{FS}) = \frac{Er_{FS}}{Er_{PK1}} \times 100$$

Die Auswertung der Serumextinktionswerte erfolgte, wenn der relative Extinktionswert des Trichinella-Positiv-Kontrollserums Er_{PK1} einen Wert von 1,50 bis 1,60 erreicht hatte. Unter diesen Voraussetzungen konnten die untersuchten Feldseren anhand ihrer berechneten Indices wie folgt beurteilt werden:

„Trichinella-negativ“: (-)	$I_{FS} < 8$
„Trichinella-fraglich“: (?)	$8 \leq I_{FS} < 14$
„Trichinella-positiv“ : (+)	$14 \leq I_{FS} < 50$
(+ +)	$50 \leq I_{FS} < 70$
(+ + +)	$70 \leq I_{FS}$.

3.3.3. Untersuchung auf *Echinococcus multilocularis*

Das bei der parasitologischen Sektion abgetrennte letzte Drittel des Ileums wurde zur Absicherung der Untersuchungsergebnisse und der Erhöhung der Nachweisgrenze an das Institut für Epidemiologische Diagnostik der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Wusterhausen/Dosse gesendet. Dies geschah auch aus Gründen der Sicherheit der Untersuchenden. Dort wurden die Ileumabschnitte mit Hilfe von tiefen Schleimhautgeschabseln untersucht.