

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

**Untersuchungen zur Wirksamkeit von
Neopredisan 135–1 an Dauerstadien von
Aspiculuris tetraptera und *Trichuris muris***

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

vorgelegt von
Kathrin Hunklinger
Tierärztin
aus La Tronche/Frankreich

Berlin 2007

Journal-Nr.: 3173

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. L. Brunnenberg
Erster Gutachter: Prof. Dr. E. Schein
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Dr. Th. Hiepe
Dritter Gutachter: Prof. Dr. G. Schlenker

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Aspicularis tetraptera, Trichuris muris, disinfectants, nematoda, oocysts,
cresols, antiprotozoal agents, disinfection

Tag der Promotion: 22.2.2008

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86664-495-3

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2007

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

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

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

This document is protected by copyright law.

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

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© **mbv** 2008

Nordendstr. 75 - 13156 Berlin – 030-45494866
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturaufstellung	3
2.1	<i>Aspicularis tetraptera</i>	3
2.1.1	Entwicklungszyklus	3
2.2	<i>Syphacia obvelata</i>	6
2.2.1	Entwicklungszyklus	6
2.3	<i>Trichuris muris</i>	8
2.3.1	Entwicklungszyklus	8
2.4	Widerstandsfähigkeit der Eier	10
2.5	Symptome der Infektion	12
2.6	Einfluss auf Untersuchungsergebnisse	13
2.7	Bekämpfungsmöglichkeiten	14
2.7.1	Bekämpfung der Infektion durch verschiedene Haltungsformen	14
2.7.2	Parasitennachweis	15
2.7.3	Bekämpfung der endogenen Entwicklungsstadien	15
2.7.4	Bekämpfung der exogenen Entwicklungsstadien	17
3	Material und Methode	23
3.1	Getestetes Mittel	23
3.2	Infektion der Wirtsmäuse	24
3.3	Gewinnung der Dauerstadien	25
3.4	Suspensionsversuch	25

3.5	Ermittlung des Desinfektionserfolges	26
4	Ergebnisse	29
4.1	Suspensionsversuche mit Eiern von <i>Trichuris muris</i> :	29
4.1.1	1%ige Anwendungskonzentration	29
4.1.2	2%ige Anwendungskonzentration	29
4.1.3	Infektionsversuch an 12 Balb/c Mäusen mit Eiern von <i>Trichuris muris</i> des 2. Versuches mit Neopredisan 135-1 in einer Konzentration von 2%	33
4.2	Infektionsversuche mit Eiern von <i>Aspicularis tetraptera</i>	33
5	Diskussion	35
5.1	Besprechung der Methoden	35
5.1.1	Infektion der Mäuse	35
5.1.2	Suspensionsversuch	37
5.1.3	Ermittlung des Desinfektionserfolges	40
5.2	Besprechung der Ergebnisse	42
5.2.1	<i>Trichuris muris</i>	42
5.2.2	<i>Aspicularis tetraptera</i>	49
5.2.3	Schlussfolgerung	50
6	Zusammenfassung	51
7	Literaturverzeichnis	53

1. Einleitung

Labornager sind die am häufigsten für Versuchsvorhaben verwendeten Tiere. Offensichtlich erkrankte Tiere sind für experimentelle Vorhaben ungeeignet, da sie im Versuchsverlauf andere Reaktionen zeigen als Gesunde. Auch augenscheinlich gesunde Tiere, die latent mit Krankheitskeimen belastet sind, sollten nicht für Versuchsvorhaben verwendet werden. Die durch das Experiment hervorgerufene Belastung der Tiere könnte durch diese Erreger bedingte Erkrankungen zum Ausbruch bringen. Die Beanspruchung der Versuchstiere durch das Experiment kann dazu führen, dass fakultativ pathogene Erreger pathologische Prozesse hervorrufen.

Auch ohne eine Symptomatik zu erzeugen wirken sich Infektionserreger auf die Physiologie ihrer Wirte aus. Somit werden Versuchsergebnisse beeinflusst und deren Interpretation erschwert. Da die Bedeutung von Erregern als Einflussgröße auf Experimente schon lange bekannt ist, wurde bereits 1971 ein Symposium zu dieser Problematik abgehalten (PAKES S. P., BENIRSCHKE K, 1971). Die Verwendung von Versuchstieren, welche frei von unerwünschten Mikroorganismen sind, ist somit eine wichtige Voraussetzung um aussagekräftige und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

Es muss davon ausgegangen werden, dass die meisten nicht hinter Barrieren gehaltenen Mäuse und Ratten mit Nematoden infiziert sind. Allerdings schließt auch Barrierenhaltung einen Befall nicht völlig aus. Die Bekämpfung der im Wirt lebenden Larvenstadien und der adulten Würmer erfolgt durch die Gabe verschiedener Antihelminthika. Die Infektion allerdings verbreitet sich durch Dauerstadien, welche eine hohe Widerstandsfähigkeit gegen Umwelteinflüsse aufweisen, aus. Diese Widerstandsfähigkeit beruht auf der Eischale, welche den Embryo umhüllt. Ihre Aufgabe ist es, den Keim während der Passage durch den Wirt und während seiner Entwicklungszeit in der Umwelt zu schützen. Somit bleibt der Einsatz von Medikamenten bei der Tilgung einer Infektion ohne nachhaltigen Erfolg, wenn die Hygiene und somit die Bekämpfung der Dauerstadien vernachlässigt wird. Deshalb ist die Reinigung und Desinfektion der Umgebung der Tiere von immenser Wichtigkeit.

Die Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG) hat Vorschriften zur Prüfung von Desinfektionsmitteln erstellt. Genügt ein Desinfektionsmittel den dort gestellten Anforderungen, so wird es in die von der DVG herausgegebenen Desinfektionsmittellisten für den Bereich Lebensmittel und / oder Tierhaltung aufgenommen. In den Desinfektionsmittelrichtlinien werden genaue Angaben über den Ablauf

der Desinfektionsmittelprüfung und über die Auswertung der gewonnenen Ergebnisse gemacht. Als Testobjekt für antiparasitär wirkende Substanzen dienen im Bezug auf die Wirksamkeit gegen Wurmeier die Dauerstadien des Schweinespulwurms *Ascaris suum*. Die Beurteilung der Wirksamkeit eines Desinfektionsmittels wird nach erfolgter Desinfektion und anschließender Bebrütung der Eier anhand der Embryonierungsrate ermittelt. Diese Ergebnisse werden ohne weitere Untersuchungen auf die Wurmarten anderer Tieren übertragen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Desinfektionsmittel Neopredisan 135-1, welches sich bereits an Askarideneiern gut als wirksam erwiesen hat, auf seine Wirkung gegen Dauerstadien von Nematoden bei Labornagern getestet. Die Richtlinien der DVG dienen als Leitfaden, mussten aber modifiziert werden, da sich durch die Verwendung von *Aspicularis tetraptera*- und *Trichuris muris*-Eiern ein abgeänderter Versuchsablauf bedingte.

2. Literaturlaufstellung

Helminthen sind bei Labornagern weit verbreitet. Zu den am häufigsten vorkommenden Arten zählen *Aspiculuris tetraptera*, *Syphacia obvelata* und *Trichuris muris*.

2.1 *Aspiculuris tetraptera*

2.1.1 Entwicklungszyklus

A. tetraptera ist ein Nematode und gehört zur Familie der Oxyuren. Die Entwicklung von *A. tetraptera* ist nicht von einem Zwischenwirt abhängig und erfolgt über vier Larvenstadien (ANYA, 1966 b). Der Wurm ist getrennt geschlechtlich. Die männlichen Tiere haben einen einfachen Chromosomensatz und entwickeln sich somit aus unbefruchteten Eiern, die weiblichen Tiere hingegen besitzen einen doppelten Chromosomensatz und gehen aus befruchteten Eiern hervor (ADAMSON, 1984). *A. tetraptera* wird im Dünndarm- und Dickdarm von Mäusen, Ratten und anderen Nagetieren gefunden. Bei Labormäusen ist er ein häufig anzutreffender Parasit. Die Mäuse infizieren sich durch kontaminiertes Futter und Koprophagie (ANDERSON, 2000). HSÜ (1951) verbrachte embryonierte Eier in die Anal- und Vaginalregion von Mäusen, welche negativ auf *A. tetraptera* getestet worden waren. Die Mäuse wurden getötet und ihre Organe untersucht. Im Darmtrakt fand er Larven von *A. tetraptera* und wertete dies als Beweis einer Retroinfektion. NEUSER (1974 a) kam zu entgegengesetzten Schlüssen. Im Rahmen seiner Versuche zum Lebenszyklus von *A. tetraptera* infizierte er Mäuse mit embryonierten Eiern und tötete die Tiere ab dem 25. Lebens- tag des Wurmes zu verschiedenen Zeitpunkten. Die im Rahmen der Sektion gefunde- nen Würmer wurden gezählt und vermessen. Er fand keine Larvenstadien und stellte somit keine Neuinfektionen fest und schloss eine Retroinfektion mit Sicherheit aus. ANYA (1966 b) infizierte Mäuse per os. Er beobachtete den Schlupf der Larven im un- teren Abschnitt des Dünndarms oder im Blinddarm innerhalb von zwei Stunden p.i. Nach der Häutung dringen die Larven des zweiten Larvenstadiums in die Kolonkryp- ten ein, entwickeln sich dort zur Larve III weiter und wandern dann zurück in das Darmlumen. Hier erfolgt die Reifung zu adulten Tieren, die ihren typischen Sitz nach NEUSER (1974 a) 0,5 bis 2 cm hinter dem Ostium caecocolicum haben. Laut PHILI- POT (1924) können männliche und weibliche Tiere nach 8 bis 10 Tagen unterschieden werden, adulte Charakteristika werden zwischen dem 14. und 18. Tag ausgebildet.

Nach ANYA (1966 b) hat der männliche Wurm seine Entwicklung 20 Tagen p.i., der weibliche Wurm 23 Tage p.i. abgeschlossen und beginnt am darauf folgenden Tag mit der Eiablage. Die Weibchen verlassen ihren Sitz im Kolon zur Eiablage nicht. Der Absatz erfolgt periodisch, eine dreitägige Eiablagephase und eine Ruhephase von 10 Tagen wechseln sich ab. Dies erfolgt fünf mal und so legen die Weibchen im Laufe ihres Lebens ungefähr 370 bis 400 Eier (NEUSER, 1974 b). Um den 40. Lebens- tag haben die Würmer ihre maximale Größe erreicht; die männlichen Tiere messen nun 3 mm, die weiblichen Tiere 4,5 mm. Die adulten Männchen sind 0,1 mm, die Weibchen je nach Anzahl der im Geschlechtstrakt befindlichen Eier 0,12 bis 0,18 mm dick. Die Zahl der Weibchen übertrifft immer die der Männchen. Die mittlere Lebenszeit der Männchen beträgt ca. 65 Tage, weibliche Tiere werden ca. 90 Tage alt (NEUSER, 1974 a).

Oxyuren sind Nahrungskonkurrenten ihres Wirtes.

Nach MATHIES (1959) sind Mäuse als Wirte für *A. tetraptera* geeigneter als Ratten. Die Empfänglichkeit für *A. tetraptera* ist unter anderem geschlechtsbestimmt. Männliche Mäuse sind empfänglicher als weibliche Mäuse. Am empfänglichsten sind nach NEUSER (1974 a) männliche Tiere im Alter von 21 bis 25 Tagen. Bei den Männchen ist die Resistenz altersabhängig, so beschreibt TAFFS (1976) eine Altersresistenz in Abhängigkeit der physiologischen Zunahme der Schleimproduktion des Darmes. Weibliche Tiere werden während des ersten Östrus resistent. NEUSER (1974 a) fand bei vielen trächtigen oder laktierenden Mäuseweibchen des Stammes AMZ eine starke natürliche Infektion. Die zellvermittelte Immunantwort ist während der Trächtigkeit herabgesetzt und die Würmer können sich etablieren (ALEXANDER, STIMSON, 1988). Schon EATON (1972) beobachtete, dass manche Laborstämme empfänglicher für eine Oxyureninfektion sind als andere. NEUSER (1974 a) untersuchte NMRI-Mäuse und swiss-Mäuse hinsichtlich ihrer Empfänglichkeit und hierbei zeigten sich die NMRI-Mäuse resistenter gegen eine Infektion. DEROTHE et al. (1997) fanden heraus, dass Laborstämme resistenter als Wildstämme sind und erklärten diese Entwicklung durch den höheren Infektionsdruck in Gefangenschaft. Es erfolgten Versuche an 16 Labor- und 6 Wildstämmen. Die Wildstämme zeigten durchgängig höhere Wurmbürden als die Laborstämme, wobei es auch innerhalb der Laborstämme Unterschiede hinsichtlich der Empfänglichkeit gab. Nur bei vier der insgesamt 22 untersuchten Stämme war der Befall der männlichen Tiere signifikant höher als der der weiblichen Tiere. In verschiedenen Wirt-Parasit Beziehungen werden männliche Sexulhormone als einer der Hauptgründe dafür angesehen, dass die Stärke der Immunantwort niedrig ist und sich eine akute oder chronische Infektion manifestieren kann. Diese Studie spricht allerdings dafür, dass die Abstammung einen höheren Einfluss auf die Empfänglichkeit als das Geschlecht ausübt.

Da Oxyureneier sehr leicht und klebrig sind, können sie mit dem Staub verbreitet werden und weite Bereiche der Umgebung kontaminieren (HOAG, 1961; BAKER, 1998). Die Ausbreitung in einem Luftraum von 45 m³ dauert etwa 10 bis 20 Tage (MAESS, KUNSTÝR, 1981). Die Eier können über einen lange Zeitraum bei Raumtemperatur überleben (BAKER, 1998).

Die Eier sind ellipsoid, 70 bis 98 μm lang und 30 bis 50 μm breit (THIENPONT, 1990). Das Ei wird durch fünf Hüllen geschützt. Die drei innersten Schichten werden von der Eizelle gebildet, die äußeren beiden Hüllen hingegen durch das Uterusepithel. Die innere Lipidschicht ist 40 nm dick und enthält außer Lipiden auch Proteine. Die innere Lipidhülle von *A. tetraptera* ist dünn, der weitaus größere Anteil der Lipidfraktion wird von den Uterinschichten gestellt. Die Lipide der Schale sind hauptsächlich für deren Undurchdringlichkeit verantwortlich. Auf die innere Lipidschicht folgt eine Chitinschicht. Bei den meisten Nematoden besteht die Chitinhülle aus Chitin und Proteinen. Nicht so bei den Oxyuren, bei *A. tetraptera* kann kein Proteinanteil nachgewiesen werden. Die Chitinschicht ist 1,7 μm dick und trägt vor allem zur Formstabilität bei. Darauf folgt die Vitellinschicht aus Lipoproteinen, welche durch die Vitellinmembran der Oocyte gebildet wird. Zu Beginn der Schalenbildung ist sie 46 nm dick, nach Abschluß der Schalenbildung ist sie kräftiger ausgebildet. Nun folgen zwei Schichten, die von den Uteruszellen gebildet werden und aus Phospholipiden und Proteinen bestehen. Die innere Schicht ist von einem Hohlraumssystem durchzogen, welches sich über die äußere Schicht zur Umgebung öffnet. Bei *A. tetraptera* stehen diese Hohlräume miteinander in Verbindung. Die innere Uterinschicht misst ca. 1 μm , die äußere ist 13 nm dick. Die beiden vom Uterus gebildeten Schichten sind mit ihren Poren maßgeblich an der Regelung des Wasserhaushaltes beteiligt (WHARTON, 1979, 1980). Das Ei ist gedeckelt, der Deckel liegt seitlich des Eipols. In diesem Bereich ist die Eischale modifiziert.

Es werden nur entwicklungsfähige Eier abgelegt, ein derartiges Ei ist in Abb. 2.1a dargestellt. Die Eier sind farblos, wenn sie direkt aus graviden Weibchen gewonnen werden und braun bei Gewinnung aus dem Kot. Sie gelangen in Kotpellets eingeschlossen in die Umwelt und befinden sie sich zu diesem Zeitpunkt meist im 64-Zell-Stadium. Aus diesen Eiern entwickeln sich nach 10 tägiger Bebrütung in vitro Eier mit infektiösen Larven (NEUSER, 1974 a). PHILIPOT (1924) beschreibt eine schnelle Entwicklung der Eier in der Umwelt und beobachtete embryonale Bewegung in den Eiern nach 68 h bei 22 °C und schon nach 20 Stunden bei 27 °C. Abb. 2.2b zeigt ein Ei nach dreitägigem Aufenthalt in der Umwelt bei Raumtemperatur. Nach fünf bis sieben Tagen bei einer Temperatur von 25 °C sind die Eier für Mäuse infektiös. Die Entwicklung der Dauerstadien ist abhängig von Feuchtigkeit, Sauerstoff

und einem geeigneten Temperaturbereich von 20 °C bis 30 °C. Höhere Temperaturen führen zu einer Reduktion der Anzahl infektionstüchtiger Eier (ANYA, 1965).



Abb. 2.1: a) Unembryoniertes Ei von *Aspicularis tetraptera*, gewonnen aus frischem Mäusekot. b) Embryoniertes Ei von *Aspicularis tetraptera*, gewonnen aus drei Tage altem Mäusekot.

2.2 *Syphacia obvelata*

2.2.1 Entwicklungszyklus

S. obvelata gehört wie *A. tetraptera* zu den Oxyuren. Die Entwicklung erfolgt wie bei *A. tetraptera* einfach und direkt. Der Wurm ist getrennt geschlechtlich, die männlichen Tiere haben einen haploiden Chromosomensatz. Die Weibchen hingegen besitzen einen diploiden Chromosomensatz (ADAMSON, 1984). *S. obvelata* wird häufig im Blinddarm, seltener im Dickdarm von Labor- und Wildmäusen gefunden und kommt auch gelegentlich bei Ratten, Gerbils und Hamstern vor (HUSSEY, 1957). *S. obvelata* kann zwischen verschiedenen Nagetieren übertragen werden (KELLOG, 1982). Auch der Mensch ist empfänglich. Wirtstiere infizieren sich überwiegend durch orale Aufnahme embryonierter Eier aus der Umwelt oder der Perianalregion (CHAN, 1952; MAESS, KUNSTÝR, 1981). CHAN versuchte Mäuse mit inokulierten Eiern und

Larven in den Anus zu infizieren. Da dies nicht gelang, hielt er eine Retroinfektion für unwahrscheinlich. Andere Autoren wiederum gehen von einer Retroinfektion aus (ANYA, 1965; KELLOGG, WAGNER, 1982).

Die Larven schlüpfen nach etwa einer Stunde im Dünndarm und sind nach zwei Stunden im Blinddarm angekommen. Innerhalb von zwei Tagen können die meisten Larven im Blinddarm angetroffen und Häutung beobachtet werden. 48 Stunden p.i. sind die Larven geschlechtlich differenziert, die männlichen Tiere sind nach 96 Stunden geschlechtsreif und nach 120 Stunden ausgewachsen (CHAN, KOPILOF, 1958 a). Die adulten Männchen sind 1,1 bis 1,5 mm lang und 0,12 bis 0,14 mm breit, die weiblichen Tiere messen 3,4 bis 5,8 mm, bei einer Breite von 0,24 bis 0,40 mm (FLYNN, 1973). Nach fünf Tagen werden die Weibchen befruchtet, danach sterben die männlichen Tiere. Nach neun bis zehn Tagen ist die überwiegende Anzahl der weiblichen Würmer tragend. Die graviden Weibchen wandern während eines Zeitraums von drei Tagen zum Anus und beginnen nach zwölf Tagen mit der Eiablage in der Perianalregion. Hierbei werden im Durchschnitt 300 Eier abgesetzt. Die Weibchen sterben nach der Eiablage, sie werden maximal 15 Tage alt; somit sind innerhalb von 16 Tagen die meisten Wirtstiere frei von Würmern (CHAN, KOPILOF, 1958 a).

Die Empfänglichkeit der Wirtstiere ist altersabhängig. Bei vier bis fünf Wochen alten Nagetieren ist die Infektionsrate am höchsten (KELLOGG, WAGNER 1982). Eine Altersresistenz wird auch von PANTER (1969) und CHAN (1952) beschrieben. Männliche Tiere zeigen einen höheren Befall als weibliche (MATHIES, 1954). Auch bei *S. obvelata* gibt es Unterschiede hinsichtlich der Empfänglichkeit der verschiedenen Laborstämme. Es werden spezifische Antikörper gebildet (SATO, 1995).

Die Eier von *S. obvelata* können ebenso wie die Eier von *A. tetraptera* mit dem Staub verbreitet werden. Bei Raumtemperatur überleben auch sie lange Zeit (BAKER, 1998).

Die Eier sind auf einer Seite abgeflacht, manchmal sogar konkav. Sie sind 118 bis 153 μm lang und 33 bis 55 μm breit (FLYNN, 1973; THIENPONT, 1990). Der Aufbau der Eischale ist bei allen Oxyuren sehr ähnlich. Die Schale ist auf der gewölbten Seite dicker als auf der abgeflachten Seite. Allerdings besteht das Hohlraumssystem im Gegensatz zu *A. tetraptera* aus einzelnen Hohlräumen, welche ebenfalls mit der Umgebung verbunden sind. Die Eier sind klebrig und haften aneinander und an Substraten (WHARTON, 1979, 1980). Das Ei wird gewöhnlich mit einer Morula ausgeschieden. Die Zeit, welche zur Erlangungen der Infektiosität benötigt wird, ist abhängig von Feuchtigkeit, Sauerstoff und der Umgebungstemperatur. Bei einer Temperatur von 37°C sind die Eier nach drei bis fünf Stunden infektiös, bei Raumtemperatur benötigen sie etwa 20 Stunden (ANYA, 1965; CHAN, KOPILOF 1958 a). Abb. 2.2 zeigt

ein aus dem Kot gewonnenes Ei von *S. obvelata* nach einem Tag Aufenthalt in der Umwelt bei Raumtemperatur.



Abb. 2.2: Embryoniertes *Syphacia obvelata* Ei, gewonnen aus Mäusekot.

2.3 *Trichuris muris*

2.3.1 Entwicklungszyklus

Auch die Entwicklung von *T. muris* erfolgt einfach und direkt. Der Wurm ist getrennt geschlechtlich. Er ist ein weltweit verbreiteter Parasit bei Mäusen, Ratten und anderen Nagetieren (ANDERSON, 2000). Das Ei, welches das erste Larvenstadium enthält, wird vom Wirt aus der Umwelt aufgenommen. Nach 30 bis 60 Minuten schlüpft die Larve I (HÜTTEMANN, 2004). 2,5 Stunden p.i. kann man Eier und freie Larven im Jejunum und Ileum finden (FAHMY, 1954). Nach sechs Stunden sind die Larven im Blinddarm angekommen, dort penetrieren sie das Kryptenepithel. Neun bis zehn Tage p.i. erfolgt die erste Häutung. Nach der zweiten Häutung am 20 oder 21 Tag p.i. ist das Geschlecht erkennbar. Die männlichen Tiere häuten sich nach 25 Tagen, die weiblichen nach 28 bis 30 Tagen. Die letzte Häutung erfolgt bei den Männchen 28 Tage p.i., bei den Weibchen nach 32 bis 34 Tagen (PANESAR, 1989). Die adulten Männchen sind ca. 26 bis 30 mm lang, die Weibchen sind mit 32 bis 38 mm etwas größer, ihre Vorderenden sind dünn und fadenförmig, die Hinterenden dick. Der Eiabsatz erfolgt ab dem 35 Tag kontinuierlich mit dem Kot der Wirtstiere (PIKE, 1969). Es werden von jedem Weibchen mehrere tausend Eier pro Tag abgesetzt, je weniger Würmer vorhanden sind, desto mehr Eier setzt das Einzeltier ab (HÜTTEMANN, 2004). Die Lebensdauer im Wirt beträgt 76 bis 100 Tage (ANDERSON, 2000).

Trichuren wird eine Ernährung von Wirtsblut zugeschrieben. In ihrer 2004 vorgelegten Dissertation macht HÜTTEMANN andere Annahmen. Sie führte licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Entwicklungsstadien von *T. muris* durch und konnte keine partikulären Bestandteile in den Därmen der untersuchten

Würmer nachweisen. Bei *T. muris* ist weder die Mundöffnung noch der After gut ausgebildet. Im Rahmen ihrer Untersuchungen fand sie Drüsen, welche Sekret nach außen abgeben. Sie stellt die Vermutung an, dass es sich bei dem Sekret um lytische Enzyme handelt, welche extern die Nahrung verdauen. Im Zusammenspiel mit den Bacillarzellen, die die extern vorverdaute Nahrung resorbieren könnten, wäre die Ernährung des Wurms gewährleistet. Sie kommt zu dem Schluss, dass *T. muris* wahrscheinlich von niedermolekularen Stoffen aus dem Wirtsdarm lebt (HÜTTEMANN, 2004).

Im Hinblick auf den Befall mit *T. muris* existieren empfängliche und weniger empfängliche Mäusestämme. Auch innerhalb eines unempfindlichen Stammes kommen Individuen vor, welche *T. muris* nicht abstoßen können (ELSE, DESCHOOLMESTER, 2003). Wenn der Wurm abgestoßen wird, erfolgt dies zwischen 16 und 19 Tag p.i. Die Befallstärke ist zudem abhängig vom Vorkommen anderer Helminthen (WAKELIN, 1967). Ist ein Wirt von *A. tetraptera* und *S. obvelata* befallen, so ist die Empfänglichkeit für *T. muris* herabgesetzt. Auch existiert ein Antagonismus zwischen *T. muris* und *A. tetraptera*. Liegt eine Mischinfektion vor, so reduziert sich Anzahl beider Parasiten im Gegensatz zur Einzelinfektion (KEELING, 1961).

Die Eier haben Zitronenform. Sie besitzen deutlich hervorstehende, durchsichtige Polpfropfen, ihre Seitenwände sind leicht gewölbt. Die Eier sind mittelgroß, sie sind 67 bis 70 μm lang und 31 bis 34 μm breit. Die dicke Schale hat eine glatte Oberfläche (THIENPONT, 1990). Angehörige der Gattung *Trichuris* haben Eischalen, welche aus drei Hüllen aufgebaut sind; die bei den Oxyuren vom Uterusepithel gebildeten Schichten fehlen. Somit besteht die Schale aus einer Vitellinschicht, einer mittleren chitinhaltigen Schicht und einer inneren Lipoproteinschicht. Die Chitinhülle ist helicoidal aufgebaut und enthält Proteine welche die Strukturstärke der Wand verbessern. Kovalente Bindungen zwischen Chitin- und Proteinanteil erhöhen die Resistenz gegen chemische Einflüsse. Der Chitinanteil ist hoch. Die Eischale durchläuft einen Gerbprozess, welcher die Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischen und chemischen Einflüssen steigert (WHARTON, 1980, 1983).

Die Eier werden unsegmentiert ausgeschieden und embryonieren außerhalb des Endwirtes. Abb. 2.3a zeigt ein Ei von *T. muris* nach Ausscheidung durch den Wirt bei Raumtemperatur. Alle in dieser Doktorarbeit verwendeten Aufnahmen wurden im Rahmen der Versuchsreihe angefertigt.

Die Pronuclei fusionieren bei 30 °C nach 24 bis 30 Stunden (ANDERSON, 2000). FAHMY (1954) beobachtete eine erste Abgrenzung der Larve nach 22 Tagen bei einer Temperatur zwischen 25 und 26 °C, nach 30 bis 31 Tagen waren sie voll embryoniert. Sinken die Temperaturen, so erhöht sich die Zeit, welche zum Erreichen

der Infektiosität gebraucht wird. WAKELIN (1969) inkubierte Eier bei 16 bis 20 °C und fand voll entwickelte Larven nach 43 Tagen, allerdings ging er davon aus, dass bis zu 63 Tagen verstreichen müssen bis die Eier für den Wirt infektiös werden. Auf Abb. 2.3b sieht man ein embryoniertes Ei nach 34 Tagen Aufenthalt in der Umwelt bei Raumtemperatur.



Abb. 2.3: a) Unembryoniertes Ei von *Trichuris muris* gewonnen aus Mäusekot. b) Embryoniertes Ei von *Trichuris muris* nach 34 tägiger Aufbewahrung bei Raumtemperatur.

2.4 Widerstandsfähigkeit der Eier

Die Widerstandsfähigkeit der Dauerstadien und deren langes Überleben in der Umwelt beruht auf der Eischale. Diese schützt den Keim effektiv vor gefährlichen Umgebungseinflüssen.

Die Hauptaufgabe der Eischale besteht in der Einschränkung der Permeabilität, welche bei den verschiedenen Helmintheneiern variiert. Die Eischale ist für die meisten Substanzen mit Ausnahme von Gasen und lipidlöslichen Substanzen undurchdringlich. Hierfür ist hauptsächlich der Lipidgehalt verantwortlich, der die Schale weitgehend impermeabel für Chemikalien werden lässt. Anorganische Verbindungen drin-

gen auch in hohen Konzentrationen meist nicht zum Keim vor, allerdings können fettlösliche Verbindungen wie Phenolderivate die Lipidschicht überwinden. Moleküle mit kleinem Molekülvolumen und geringer Polarität durchdringen die Lipidschicht leichter als andere. Versuche an *T. muris*-Eiern, durchgeführt von GHIGLIETTI (1995) unter Verwendung einer alkalischen Lösung mit einem pH-Wert von 11,2 zeigten bei einer Temperatur von 22 °C eine Abnahme der Entwicklungsfähigkeit in Abhängigkeit von der Zeit. So waren nach sieben Tagen noch 82 % der Eier fähig sich weiter zu entwickeln, nach 21 Tagen nur noch 3 %. Mit zunehmender Temperatur sinkt die Zeit, die zur Inaktivierung der Eier benötigt wird. 2 % ige Peressigsäure, die eine sehr gute Wirkung gegen Bakterien, Viren und Pilze hat, inaktiviert nach 30 Minuten Einwirkzeit nur einen geringen Prozentsatz an *Syphacia muris* Dauerstadien (VAN DER GULDEN, 1972).

Die mittlere Schicht ist durch ihren Chitingehalt sehr stabil. Sie hat die Aufgabe den Embryo gegen mechanische Einflüsse zu schützen. Durch den Gerbprozess in der Chitinschicht entsteht Sklerotin, welches nur durch höher konzentrierte Natriumhypochloritlösung aufgelöst werden kann.

Hohe Temperaturen werden von Oxyureneiern schlechter toleriert als tiefe, es kommt bei 55 °C zur Koagulation der Proteine (ENIGK, 1979). Eine Temperatur von 100 °C über einen Zeitraum von 30 Minuten zerstört 100 % der Eier von *S. muris* (DIX et al., 2004). Die Eier sämtlicher Spulwürmer werden im Wasserbad vernichtet, so z.B. bei 50 °C innerhalb von zwei Stunden. Noch schneller geschieht dies bei trockener Hitze, bei 50 °C halbiert sich die Zeit auf eine Stunde. Embryonierte Eier zeigen sich gegen hohe Temperaturen empfindlicher als unreife. Spulwurmeier können niedrige Temperaturen lange Zeit überdauern, selbst gegenüber Temperaturen unter dem Gefrierpunkt sind sie sehr resistent (ENIGK, 1979). Dies trägt maßgeblich zu ihrer Verbreitung bei. Die Widerstandsfähigkeit sinkt, wenn die Eier aufgetaut und wieder eingefroren werden (JETTMAR und EXNER, 1951). Tiefgefrieren führt zu einer schnellen Vernichtung der Dauerstadien, bei -78 °C sind die Eier nach 30 Minuten abgestorben.

Austrocknung ist eine der größten Gefahren für die Eier während ihres Verweilens in der Umwelt. Die Widerstandsfähigkeit gegen Trockenheit ist nur mäßig ausgebildet, die Lipide in der Vitellinmembran bieten Schutz, allerdings ist dieser bei starker Trockenheit nicht ausreichend. Der Wasserverlust nimmt bei steigender Umgebungstemperatur zu. Mit Polpfropfen ausgestattete Eier sind relativ empfindlich, so sind nach fünf Tagen bei 77 % relativer Feuchtigkeit 84 % aller *Trichuris*-Eier tot, nach elf Tagen sind alle vernichtet.

Gegen UV–Strahlen zeigen sich die Eier nur mäßig resistent, wobei pigmentierte Eier widerstandsfähiger sind als unpigmentierte. Eine 1 bis 2 mm dicke Erd- oder Kot-schicht reicht aus, um die Eier gegen Sonnenstrahlen mit einem UV–Strahlenbereich von 321 nm zu schützen (ENIGK, 1979). Sauerstoffabschluss führt zu einem Entwicklungsstillstand der Eier. Bei ansonsten guten Umweltbedingungen führt wiedereinsetzende Sauerstoffzufuhr zu einer Weiterentwicklung der Eier (LÜNSMANN, 1972).

2.5 Symptome der Infektion

Bei Mäusen ist die Ausprägung einer Oxyureninfektion abhängig von Alter, Geschlecht und Immunstatus des Wirts, sowie dem Stamm, welchem dieser angehört, wobei innerhalb eines Stammes männliche Tiere stärker befallen sind als weibliche Tiere. In durchseuchten Beständen haben frisch abgesetzte Tiere die höchsten Wurmbürden, da die Befallsrate der Tiere mit zunehmendem Alter abnimmt. Tiere die Laborstämmen angehören, scheinen resistenter zu sein als Wildtiere, aber auch innerhalb der Laborstämme existieren Unterschiede hinsichtlich der Empfänglichkeit. Oft verläuft die Infektion subklinisch (BAKER, 2003). Hochgradiger Befall mit Oxyuren führt zu Beunruhigung der Tiere. Verminderte Wachstumsraten und Gewichtsverlust sind bei stark mit Oxyuren infizierten Tieren beschrieben worden, ebenso Enteritis und Verstopfung (TAFFS, 1976). Versuche an experimentell mit *S. muris* infizierten Ratten zeigten, dass diese Tiere im Vergleich mit nicht infizierten Ratten langsamer wuchsen und auch nicht das gleiche Endgewicht wie die Tiere der parasitenfreien Kontrollgruppe erreichten (WAGNER, 1988).

Durch die Penetration der Darmwand infolge des Parasitenbefalls kommt es zu granulomatösen Entzündungen der Mukosa (MULLINK, 1970). Das tiefe Einbohren der Larven von *T. muris* in die Schleimhaut kann katharrhalische bis hämorrhagische Dickdarmentzündungen hervorrufen, die sich als schleimig–blutige Durchfälle äußern. Die Nematodeninfektion verändert die Darmmotilität, die Kontraktilität steigt in befallenen Bereichen und sinkt in parasitenfreien Gebieten des Darmes (MAHIDA, 2003). Einige Autoren gehen von einer Beteiligung von *S. obvelata* durch Irritation der Schleimhaut an der Entstehung von Mastdarmvorfällen bei der Maus aus (HOAG, 1961; BIENIEK, 1976; MULLINK, 1970).

Der Befall mit Nematoden kann zur Ausbildung eines rauen Haarkleides führen.

2.6 Einfluss auf Untersuchungsergebnisse

Daten, die mit Hilfe von Tieren gewonnen werden, welche offensichtlich Krankheitssymptome zeigen, dürfen verständlicherweise nur mit Vorsicht verwertet werden. Verursacht ein Erreger keine klinischen Symptome, bleibt er häufig unerkannt und kann somit experimentelle Ergebnisse beeinflussen, ohne dass dies entdeckt wird. Erreger können sich auf ihre Wirte auf vielfältige Weise auswirken. Pflanzenschwämme und Peitschenwürmer verursachen bei endemischem Verlauf keine oder sehr mild verlaufende Erkrankungen. Das Auftreten von klinischen Symptomen kann durch Belastungen, welche durch das Experiment verursacht werden, gefördert werden. Bei verschiedenen Labortierstämmen verlaufen die Infektionen unterschiedlich, besonders bei immundefizienten Tieren sind stärkere Auswirkungen zu erwarten. Unabhängig von ihren pathogenen Eigenschaften wirkt sich eine Infektion auf die Physiologie der Tiere aus und führt zu Veränderung verschiedenster körpereigener Parameter. Dies kann die Ergebnisse von Tierversuchen beeinflussen.

Der Befall von Versuchstieren mit Helminthen kann zu verändertem Verhalten führen. Die Weibchen von *Syphacia ssp.* verursachen durch ihre Auswanderung zur Eiablage Juckreiz, welcher die Tiere beunruhigt. MCNAIR and TIMMONS (1977) beschreiben eine Abnahme der Bewegungsaktivität bei mit *S. obvelata* infizierten Mäusen. Somit sind die befallenen Tiere für Verhaltensstudien unbrauchbar.

Laut TAFFS (1976) können Nematoden bakterielle und virale Infektionen übertragen oder deren Angehen fördern. Versuche, in denen das Wachstum der Tiere beobachtet wird, werden durch Helmintheninfektionen beeinflusst, da sich der Wurmbefall auf die Entwicklung der Tiere auswirkt (WAGNER, 1988).

Darüberhinaus wirkt sich der Oxyurenbefall auf den Verdauungsapparat der Wirtstiere aus. So nimmt während einer Infektion bei den untersuchten Ratten der Elektrolyt- und Wassertransport signifikant ab (LÜBCKE et al., 1992). Verdauungsvorgänge können beeinflusst, die Kotkonsistenz verändert werden.

Der Befall mit *S. obvelata* verringert das Auftreten bestimmter Arthritiden bei Ratten (PEARSON and TAYLOR, 1975).

Weiterhin wirkt sich der Helminthenbefall auf das Immunsystem aus. Die Infektion mit *S. obvelata* führt zu einer Zunahme der B- und T-Lymphozyten in Milz und Lymphknoten (BEATTIE et al 1981). Die Reaktion auf Umweltreize wird modifiziert, so zeigen mit Oxyuren infizierte Tiere eine andere Antikörperbildung auf nichtparasitische Antigenstimulation als parasitenfreie Tiere. SATO (1995) kommt deshalb zu der Annahme, dass auch Infektionen ohne klinische Anzeichen das Immunsystem modulieren und somit experimentelle Ergebnisse beeinflussen können.

2.7 Bekämpfungsmöglichkeiten

Es ist sinnvoller einen Nematodenbefall zu verhüten, als diesen zu bekämpfen. Hygienische Maßnahmen wie Barrierenhaltung können Infektionen vorbeugen. Prinzipiell spricht sich die Gesellschaft für Versuchstierkunde gegen prophylaktische oder therapeutische Medikamentengaben bei kleinen Versuchstieren aus, da die Eliminierung der Erreger meist unvollständig und unzuverlässig ist. Auch wird eine bestehende Infektion während der Behandlungsphase verdeckt. Das mikroökologische Gleichgewicht des Tieres wird gestört und das Wachstum unerwünschter Keime kann hierdurch gefördert werden. Weiterhin besteht die Gefahr der Resistenzbildung und des Auftretens von Nebenwirkungen, welche negativen Einfluss auf das Tier und/oder auf das Experiment nehmen können. Allerdings spricht sich die GV-Solas (Gesellschaft für Versuchstierkunde – Society for Laboratory Animal Science (GV-SOLAS).htm) für Prophylaxe und Therapie aus, wenn Zuchttiere seltener Versuchstierstämme betroffen sind und ohne diese die Stammerhaltung nicht möglich wäre.

Die Kontrolle oder Eliminierung von Wurminfektionen in Labortierhaltungen ist deshalb so aufwendig, da Anthelminthika zwar die adulten Stadien bekämpfen aber keinen Einfluss auf die Dauerstadien haben, welche lange Zeit in der Umgebung überleben können. Somit besteht die Gefahr, dass sich die Tiere erneut infizieren.

2.7.1 Bekämpfung der Infektion durch verschiedene Haltungsformen

In der Versuchstierhaltung existieren verschiedene Haltungssysteme, die sich durch ihre verschiedenen hygienischen Bedingungen unterscheiden. Aus ihnen gehen aus mikrobiologischer Sicht unterschiedliche Tiere hervor.

Das **offene System** oder konventionelle System verfügt über keine aufwendigen technischen und hygienischen Sicherheitsvorkehrungen gegen das Einschleppen von Infektionen, daher ist der hygienische Status der aus diesen Systemen hervorgehenden Tieren nicht definiert. Eine Standardisierung der physikalischen Umwelt der Tiere muss gewährleistet sein.

Im **geschlossenen System**, auch Barrieren- oder SPF-System, existieren zusätzlich zu den Einrichtungen des offenen Systems hygienische Barrieren. Diese schirmen die Haltungseinheit gegen die mikrobiologisch unkontrollierte Umgebung streng ab um das Einschleppen von Krankheitserregern zu verhindern. Alle Versorgungsgüter werden sterilisiert, das Personal kann diesen Bereich nur unter Benutzung von Luft- oder Wasserduschen betreten. Die in dieser Haltungsform gezüchteten Tiere werden SPF-Tiere genannt. Dies sind spezifiziert **pathogenfreie Tiere**, d.h., die abwesenden Pathogene können genau definiert werden.

Das *Isolatorsystem* besteht aus geschlossenen Behältnissen mit keimdichten Ein- und Auslässen für die Luft, langarmigen Handschuhen und sterilisierbaren Schleusen. In ihnen können gnotobiotische Versuchstiere gehalten und gezüchtet werden. Diese Tiere sind entweder völlig frei von Keimen und Kleinstlebewesen oder ihre Besiedlung ist vollständig bekannt.

Es muss davon ausgegangen werden, dass fast alle nicht hinter Barrieren gehaltenen Mäuse und Ratten mit Oxyuren infiziert sind. HASSLINGER und WIETHE (1987) untersuchten stichprobenartig sieben konventionelle Haltungen namenhafter Züchter in Deutschland. In diesen Beständen waren 0 % bis 94,7 % der Mäuse mit *A. tetraptera* und 0 % bis 69,7 % mit *S. obvelata* infiziert. Bei den untersuchten Ratten konnten Befallsraten bis 48,6 % bei *A. tetraptera* und bis zu 94,9 % bei *S. muris* festgestellt werden. Bei hinter Barrieren gehaltenen Mäusen fanden sie keine Oxyuren. Untersuchungen in brasilianischen Tierhaltungen offenen Systems im Jahr 2002 zeigten einen Befall von bis zu 91,5 % mit *S. obvelata* und 8,5 % mit *A. tetraptera*. Der höhere Befall mit *S. obvelata* wurde auf den kürzeren Entwicklungszyklus zurückgeführt, welcher eine hohe Durchseuchung in kurzer Zeit erlaubt (BAZZANO et al., 2002).

2.7.2 Parasitennachweis

Das Freisein von unerwünschten Mikroorganismen und damit die Eignung für spezifische Experimente kann nur durch umfassende mikrobiologische Untersuchungen vor und während des Experiments gewährleistet werden. Der Nachweis von *S. obvelata* kann auf verschiedene Weise erfolgen. Nach FLYNN (1973) erfolgt der sicherste Nachweis mittels Sektion. Am lebenden Tier können Eier aus der Perianalgegend mittels eines Tesafilmstreifens abgenommen werden. Durch die besondere Form der Eiablage ist der Nachweis der Eier im Kot mittels Flotationsmethode mit Zinkchlorid-Natriumchlorid-Lösung am unsichersten. Der Befall mit *A. tetraptera* und *T. muris* lässt sich zuverlässiger als der Befall mit *S. obvelata* per Flotationsmethode nachweisen. Allerdings ist auch hier ein Nachweis durch Sektion sicherer.

2.7.3 Bekämpfung der endogenen Entwicklungsstadien

Zur Bekämpfung der larvalen und adulten Stadien im Wirtstier werden Anthelminthika eingesetzt. Eine Behandlung des Einzeltieres per os oder über spot-on Präparate ist auf Grund des hohen Arbeitsaufwandes selten realisierbar, somit erfolgt die Applikation zumeist über das Trinkwasser. Die Medikamentengabe kann auf unterschiedliche Weise erfolgen, es werden sowohl Behandlungszyklen als auch Medikamentendauergaben über Wochen beschrieben.

KLEMENT (1996) verabreichte mit *S. obvelata* befallenen Tieren Ivermectin über das Trinkwasser. Er behandelte die Tiere für die Dauer von vier Tagen, danach folgte eine Behandlungspause von drei Tagen. Während eines Behandlungszyklus erhielten Ratten 2,9 mg /kg pro Tag und Mäuse 4,0 mg /kg pro Tag. Nach zwei dieser Zyklen war von zehn Ratten noch ein Tier und vier von fünf Mäusen infiziert. Dehnte er die Behandlung auf drei Durchgänge aus, erniedrigte sich die Anzahl der infizierten Ratten auf eine Ratte von 40 und eine von fünf Mäusen. Eine weitere Erhöhung der Behandlungen eliminierte alle Oxyuren.

LIPMANN (1994) beschreibt verschiedene Bekämpfungsansätze. Er führte Behandlungen mit 2,1 mg Piperazinsulfatlösung / ml Trinkwasser und 0,007 mg Ivermectinlösung / ml Trinkwasser durch. Piperazin wurde eine Woche eingegeben, dann folgte eine einwöchige Pause. Dies wurde zwei- bis viermal durchgeführt. Ivermectin wurde über einen Zeitraum von 21 Tagen verabreicht. Bei alleiniger Behandlung mit einem dieser Mittel wurden nach Ablauf mehrere Monate wieder Oxyuren entdeckt. Tiere, welche erst zwei Wochen mit Piperazin und im Anschluss zwei Wochen mit Ivermectin behandelt wurden, waren auch nach 12 Monaten noch frei von Würmern. Man muss allerdings beachten, dass Ivermectin bei Neugeborenen und Jungtieren oder entsprechend prädisponierten transgenen Mäusen die Blut-Hirn-Schranke durchdringen und zu Todesfällen führen kann.

Die Gesellschaft für Versuchstierkunde beschreibt eine Behandlung der Tiere mittels Ivermectin als Spraylösung. Hierbei werden die Tiere während drei aufeinanderfolgenden Wochen einmal wöchentlich mit einer Spraylösung aus einem Teil 1% iger Ivermectinlösung und 10 Teilen Wasser jeweils beim Umsetzen in einen frischen Käfig besprüht. Bei diesem Verfahren bleiben die Tiere sechs Monate oxyurenfrei.

ZENNER (1998) beschreibt die Tilgung von *S. obvelata*, *S. muris* und *A. tetraptera* aus einer Zuchtkolonie. Es wurde 2,1 mg Piperazinsulfatlösung / ml Trinkwasser und 0,007 mg Ivermectinlösung / ml Trinkwasser verabreicht und ein Hygienemanagement durchgeführt. Zwei Wochen wurde Piperazin verabreicht, gefolgt von einer zweiwöchigen Verabreichung von Ivermectin, auf die dann wieder zwei Wochen andauernde Behandlung mit Piperazin folgte. Am 35. Tag nach Behandlungsbeginn wurden Käfige, das gesamte Zubehör sowie die Räume gereinigt und desinfiziert, teilweise wurden Tiere in andere Räume umgesetzt. Auch nach einer Überwachung von bis zu 14 Monaten konnten nach diesem Management keine Oxyuren festgestellt werden.

Die Bekämpfung von *T. muris* wurde ebenfalls ausgiebig untersucht. So beschreibt RAJASEKARIAH (1991) Versuche mit Oxantel, Mebendazol und weiteren Arzneimitteln. Oxantel zeigt hierbei die besten Ergebnisse, es eliminiert sowohl präadulte als auch adulte Stadien bei einer einmaligen Gabe von 6,25 mg/ kg KG komplett.

2.7.4 Bekämpfung der exogenen Entwicklungsstadien

Eine effektive Bekämpfung der Infektion ist durch die Kombination von Anthelminthikagabe mit der Reinigung und Desinfektion des Zubehörs und der Tierräume möglich. Auf diesen Sachverhalt wird von mehreren Autoren hingewiesen (NICKLAS, 1984; ZENNER, 1994). Der Hygiene, besonders der Entfernung und Zerstörung der Dauerformen ist besondere Aufmerksamkeit zu widmen. Arzneimittelgabe kann Hygiene nicht ersetzen.

Hygienische Maßnahmen sind Reinigung und Desinfektion.

Reinigung

Mikroorganismen sind immer an Trägersubstanzen angelagert, d.h., sie sind an Staub, Kot, Blut, Harn oder ähnliches gebunden (STRAUCH, BÖHM 2002). Deshalb arbeiten Reinigung und Desinfektion Hand in Hand. Vor jeder Desinfektion muss eine gründliche mechanische Vorreinigung erfolgen. Diese bewirkt, dass im Schmutz enthaltene Keime entfernt werden und die auf den Flächen zurückbleibenden Keime dem Desinfektionsmitteln leichter zugänglich sind. Den Umweltbedingungen unmittelbar ausgesetzt sterben viele Bakterien ohne umhüllende Schmutzschicht ab. Verbleibender Schmutz hat einen negativen Einfluss auf die Desinfektionswirkung, da Desinfektionsmittel gebunden wird (METZLER, 2002). Unter Schmutz bleiben Wurm-
eier monatelang invasionstüchtig (SCHREIER, SPECK, 1966). Durchfeuchtung der Hüllen macht Eier für Desinfektionsmittel besser zugänglich (ENIGK, 1947). Wird nach einer Nassreinigung eine Desinfektion durchgeführt, muss auf eine vollständige Trocknung geachtet werden, da es sonst zur Verdünnung des Desinfektionsmittels kommt.

Desinfektion

Die Gesellschaft für Versuchstierhaltung hält folgende Definition der Desinfektion nach REBER (1972) für zutreffend:

„Desinfektion ist eine gezielte Maßnahme mit dem Zweck, bestimmte Mikroorganismen und Parasiten durch Eingriffe in deren Struktur oder Stoffwechsel unabhängig von ihrem Funktionszustand unschädlich zu machen.“

Bei Desinfektionsmaßnahmen handelt es sich um selektive Maßnahmen, die nicht zwingend alle Keime erfassen müssen. Dies ist das Ziel der Sterilisation.

Desinfektion kann durch physikalische oder chemische Verfahren (Desinfektionsmittel) erfolgen. Bei den meisten physikalischen Verfahren sind die Übergänge zur Ste-

rilisation fließend. Physikalische Maßnahmen sind zum Beispiel Bestrahlung mit UV-Licht, Einwirkung von sehr hohen oder sehr tiefen Temperaturen und Filtration.

Alle Anforderungen, die an ein ideales Desinfektionsmittel zu stellen wären, können von ein und derselben Substanz nicht erfüllt werden.

Anforderungen:

- breites Wirkungsspektrum oder hohe selektive Wirkung gegen Mikroorganismen
- rasche und irreversible Schädigung der Erreger bei der Gebrauchskonzentration
- geringer Wirkungsverlust durch Milieueinflüsse (Eiweiß, Kot, pH-Wert)
- gleichbleibende Zusammensetzung (Lagerfähigkeit des Konzentrats, Stabilität der Gebrauchslösung, Wasserlöslichkeit)
- Unschädlichkeit für Mensch und Tier
- Unschädlichkeit für tierische Lebensmittel
- Umweltverträglichkeit
- Materialverträglichkeit
- gute Anwendungseigenschaften (Netzfähigkeit, Reinigungseffekt)
- Wirtschaftlichkeit

(METZLER 2002)

WERNER (2002) teilt Desinfektionsmittel in folgende Stoffgruppen ein:

1. Oxidationsmittel: Ihre Wirkung beruht hauptsächlich auf der Freisetzung von atomarem Sauerstoff. Es kommt zu Gerinnung der Zellmembran und zum Eindringen des Desinfektionsmittels in die Erregerzelle. Dort werden Enzymsynthesen verändert. Alle Verbindungen dieser Gruppe sind bakteriostatisch bzw. bakterizid. Einige Verbindungen dieses Types zeigen viruzide, sporozide oder antimykotische Effekte. Sie sind temperaturunabhängig, da Sauerstoff sehr reaktionsfreudig ist. Diese Reaktionsfreudigkeit führt allerdings auch zu einem großen Eiweißfehler. Als Eiweißfehler bezeichnet man einen Aktivitätsverlust des Desinfektionsmittels, wenn es mit Proteinen in Berührung kommt.

2. Halogene und halogenabspaltende Verbindungen: Sie führen zu Eiweißdenaturierung der Erregerzellmembran. Im Zellinneren wird die Proteinsynthese durch Enzymblockade (Bindung an SH-Gruppen) verändert. Gebräuchlich sind chlor- oder jodhaltige Verbindungen. Chlorabspaltende Präparate zeigen konzentrationsabhängig bakterizide, viruzide und in geringem Maße sporozide Effekte. Bestimmte Parasitenformen wie Protozoen werden geschädigt. Sie sind schleimhautreizend und korrosiv. Entscheidend für ihre Wirksamkeit ist die Menge an freiem Chlor. In Gegenwart organischer Substanzen nimmt die Wirksamkeit merklich ab (Eiweißfehler). Jodhaltige Verbindungen wirken rasch und haben ein weites Spektrum, welches neben Bakterien, Mykobakterien und Sporen auch Viren umfasst.

3. Aldehyde: Aldehyde sind sehr reaktionsfreudige Verbindungen. Durch Oxidation entstehen die entsprechenden Carbonsäuren, durch Reduktion die dazugehörigen Alkohole. Aldehyde reagieren mit den Aminogruppen von Eiweißen. Der Membranstoffwechsel wird gestört, die intrazelluläre Eiweißsynthese wird beeinflusst. Verschiedene Aldehyde haben verschieden ausgeprägte desinfizierende Eigenschaften. Vor allem bei Formaldehyd ist die bakterizide, viruzide, sporozide und fungizide Wirkung gut ausgeprägt. Parasitäre Dauerstadien werden nicht beeinflusst. Die Wirkung der Aldehyde ist stark von der Temperatur abhängig. Sie sollten bei 20 °C oder höheren Temperaturen eingesetzt werden. Bei 10 °C ist ihre Wirkung eingeschränkt, bei 0 °C sind sie praktisch unwirksam. Sie bedürfen relativ langer Einwirkzeiten. Aldehyde können zu Hautreizungen führen, ihre mutagene und kanzerogene Wirkung wird immer wieder diskutiert, allerdings sind keine gesicherten Daten vorhanden.

4. Alkalien: Freigesetzte OH-Gruppen reagieren mit den Zellmembranen der Erreger, deren Eiweißbestandteile quellen und lösen sich teilweise auf. Somit wird das Zellinnere zugänglich. Dort vorhandene Proteine werden denaturiert, so dass der Zelltod eintritt. Der Eiweißfehler ist deutlich ausgeprägt.

5. Säuren: Säuren lösen einen pH-Schock aus. Proteine werden denaturiert. Dadurch kommt es zu Membrannekrosen und somit zum Zelltod. Säuren zeigen bakterizide und teilweise fungizide Wirkung bei starkem Eiweißfehler.

6. Alkohole: Alkohole sind lipidlöslich, somit membrangängig und führen so zu Zellmembranschäden. Im Inneren angekommen, entfalten sie ihren eiweißkoagulierenden Effekt. Ihre Wirkung hängt von Einwirkungsdauer und Konzentration ab. Langkettige und höhermolekulare Verbindungen sind wirksamer als kurzkettige und niedermolekulare Verbindungen. Vegetative Mikroorganismen, auch Mycobakterien werden abgetötet, doch gegen Sporen sind Alkohole nicht wirksam. Unter praktischen Bedingungen wirken sich ihre hydrophoben Eigenschaften sowie ihre leichte Entflammbarkeit negativ auf ihre Einsatzmöglichkeiten aus.

7. Phenole und Phenolderivate: Phenol wird kaum mehr eingesetzt, da es zu Haut- und Schleimhautreizungen führt und warmblütertoxisch ist. Phenolderivate werden zur Tuberkuloseprophylaxe und antiparasitären Vorbeuge genutzt. Sie sind lipidlöslich, führen so zur Schädigung der Zellmembran und zeigen somit ein gutes Eindringungsvermögen. Im Zellinneren greifen sie in den Eiweißstoffwechsel ein. Sie wirken bakterizid, teilweise viruzid, antimykotisch und antiparasitär. Sie zeigen den geringsten Eiweißfehler aller Stoffgruppen.

8. Schwermetallverbindungen: Schwermetalle sind Protoplasmagifte. Ihre Ionen inaktivieren SH-Gruppen. Der Aminosäureaufbau wird gestört und somit der Proteinaufbau der Zelle verändert. Enzymaktivität wird verhindert, Eiweiße werden gefällt.

9. Detergentien: Es werden strukturell sehr unterschiedliche Substanzen in dieser Gruppe zusammengefasst. Alle haben grenzflächenaktive Anteile. Sie weisen eine gute Netzwerkwirkung auf und dringen somit tief ein. Sie wirken durch Ionenadsorption auf der Zellmembran, wodurch die Membrandurchlässigkeit erhöht wird. Stark lipoidhaltige Membranen wirken sich negativ auf die Tensidwirkung aus. Sie entfalten eine bakterizide Wirkung vor, allem bei gram+ Erregern, zum Teil auch sporizide und antimykotische Wirkung. Ihre viruzide Wirkung ist auf behüllte Viren beschränkt.

10. Farbstoffe: Für Desinfektionszwecke genutzte Farbstoffe durchdringen die Zellmembran und binden intrazellulär meist an funktionelle Gruppen. Diese Eigenschaften sind sowohl für ihre farbgebenden Effekte als auch für ihre Eignung als Desinfektionsmittel verantwortlich.

Verschiedene Faktoren nehmen Einfluss auf den Desinfektionserfolg. Hemmend wirken sich keimhüllende Stoffe wie Schmutz, Kot, Blut aus. Ungünstige Keimunterlagen wie rissige Flächen oder zu glatte Flächen, an denen das Desinfektionsmittel zu

schnell abläuft, beeinflussen den Desinfektionserfolg ebenfalls negativ. Poröse, saugfähige Materialien benötigen mehr Desinfektionsmittel und eine intensivere Desinfektion. Niedrige Raumtemperaturen setzen die Wirkung herab. Allgemein gilt, dass bei 10 °C doppelt so lange Einwirkzeiten notwendig sind wie bei 20 °C (Durchführungsbestimmungen des Ministeriums für Gesundheit und Konsumentenschutz GZ 39.505/6-III/A/4b/96). Hohe Feuchtigkeit verdünnt oder neutralisiert das Desinfektionsmittel. Umgekehrt führt die vorherige Trocknung der zu desinfizierenden Bereiche, Heraufsetzen der Temperatur und eine der Desinfektion vorausgehende gründliche mechanische Reinigung zu einer Erhöhung des Desinfektionserfolges.

Gründe für ein Versagen von Desinfektionsmassnahmen:

- durch unzureichende Reinigung erreicht das Desinfektionsmittel die Keime nicht oder wird inaktiviert
- Unempfindlichkeit der Keime gegenüber dem Desinfektionsmittel
- falsche Zubereitung oder Einsatz des Desinfektionsmittels: Konzentration, Temperatur, pH-Wert, ...
- Inaktivierung des Desinfektionsmittels durch Reinigungsmittelrückstände
- Reinfektion von außen: Tierzukaufe, Futter, ...

3. Material und Methode

3.1 Getestetes Mittel

In dieser Arbeit wurde das Breitbanddesinfektionsmittel Neopredisan 135-1 der Fa. Menno Chemie-Vertriebsgesellschaft m.b.H. getestet. Es besteht zu 25–30 % aus p-Chlor-m-kresol, zu 20–25 % aus Propan-1-ol und zu 10–15 % aus Propan-2-ol. Die Desinfektionswirkung basiert auf dem Wirkstoff Preventol CMK (p-Chlor-m-kresol). Neopredisan 135-1 ist ein von der DVG zugelassenes Desinfektionsmittel gegen Endoparasiten und Mykobakterien. Es ist klar, in den verwendeten Konzentrationen gut mit Wasser mischbar und hat einen leicht stechenden Geruch.

Kresole sind Alkylphenole. Phenole und Phenolderivate werden als Oberflächendesinfektionsmittel in Stallungen und in der Kommunalhygiene eingesetzt. Ihre abtötende Wirkung auf Bakterien und parasitäre Dauerstadien ist schon lange bekannt. Phenol verfügt über einen charakteristischen Geruch, der auch schon bei sehr geringen Konzentrationen bemerkbar ist. Auch bei Phenolderivaten ist er noch stark ausgeprägt, wodurch die Anwendungsbereiche einschränkt werden.

Kresole gehören zu den antiseptisch wirkungsvollsten Alkylphenolverbindungen. Bereits 1959 testeten PAVLOV et al. o-Kresole auf ihre Wirksamkeit gegen Askariden-eier. Die Versuche ergaben, dass eine 1 %ige Kresollösung nach 2,5 Stunden Einwirkzeit nicht embryonierte Eier zu 100 % abtötet. Mit ansteigender Konzentration sinkt die zur Abtötung benötigte Zeit, so werden bei einer Konzentration von 4 % nur noch fünf Minuten Einwirkzeit benötigt um das gleiche Resultat zu erzielen. Auch embryonierte Eier wurden durch o-Kresol geschädigt, nach erfolgter Desinfektion war keine larvale Bewegung mehr feststellbar.

Kresole zeigen eine hohe Oberflächenaktivität und gute Lipoidlöslichkeit. Ihr Nachteil besteht in einer geringen Wasserlöslichkeit. Durch die Halogensubstitution wird die bakterizide, viruzide und fungizide Wirkung heraufgesetzt (FREY, LÖSCHER, 2002). Besonders effektiv sind phenolische Mittel im sauren Bereich, da sie dann undissoziiert vorliegen. Alkylreste fördern die Lipophilie. Werden Halogene in Phenol eingeführt, so ist deren Desinfektionswirkung in 3-Stellung zur Hydroxylgruppe von Phenol am ausgeprägtesten. Phenole wirken durch Proteindenaturierung. Hydroxylgruppen der Phenole reagieren mit Aminogruppen im Protein und führen so zu Eiweißfällung. Phenolen sind im Vergleich mit anderen Stoffgruppen schwer durch Umwelteinflüsse in ihrer Wirksamkeit herabzusetzen. Sie sind weitgehend unemp-

findlich gegen organische Substanzen (Durchführungsbestimmungen des Ministeriums für Gesundheit und Konsumentenschutz GZ 39.505/6-III/A/4b/96). Mit einem Siedepunkt von 228 °C gehört p-Chlor-m-kresol zu den mittel bis schwer flüchtigen Substanzen.

3.2 Infektion der Wirtsmäuse

Für die Desinfektionsversuche wurden Dauerstadien von *A. tetraptera* und *T. muris* verwendet.

Um die Dauerstadien zu gewinnen wurden weiblichen Balb/c Mäusen per os mit embryonierten Eiern infiziert. Die embryonierten Eier von *T. muris* stellte freundlicherweise Prof. Dr. Mehlhorn zur Verfügung. Die Eikonkonzentration pro ml Flüssigkeit wurde vor der Infektion der Mäuse bestimmt. Hierfür wurden die Eier in zwölf 10 µl-Portionen bei 100-facher Vergrößerung unter einem Lichtmikroskop gezählt. Die Probe mit der geringsten und die mit der höchsten Anzahl wurde nicht gewertet und aus den verbliebenen zehn Werten der Mittelwert gebildet. Dann wurde der Eigehalt pro ml ermittelt.

Die Eier von *A. tetraptera* wurden aus dem Kot von auf natürlichem Weg infizierten Mäusen isoliert. Der Kot wurde gesammelt und über Nacht mit Leitungswasser eingeweicht, dann wurde er in einem Mörser unter Verwendung von gesättigter Zinkchlorid-Kochsalz-Lösung zerkleinert, gesiebt und zehn Minuten bei 2800 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 30 µm geseiht und der Inhalt des Siebes wurde mehrfach mit Leitungswasser gewaschen. Der im Sieb verbliebene Rückstand wurde mit etwas Leitungswasser in eine Glaspetrischale mit einem Durchmesser von ca. 5 cm gefüllt, welche acht Tage bei Raumtemperatur aufgestellt wurde. Während dieser Zeit wurde die Eisuspension dreimal pro Woche mit einer Pasteurpipette belüftet. Dann wurde der Überstand abpipettiert, das Sediment mit der geringen verbliebenen Menge Wasser aufgemischt und die Eikonkonzentration nach oben genannter Methode bestimmt.

Die Infektionsdosis betrug sowohl bei den Tieren die *A. tetraptera* erhielten als auch bei den Mäusen, welche mit *T. muris* infiziert wurden, ca. 300 Eier pro Maus. Die Mäuse waren zum Zeitpunkt der Infektion zwischen 3 und 16 Wochen alt. Die Mäuse wurden konventionell in Gruppen in Käfigen auf Kleintierstreu gehalten. Zweimal pro Woche wurden die Tiere in neue Käfige umgesetzt. Sie bekamen das pellettierte Standardfutter Altrumin 1324 zu fressen und Wasser ad libitum zu trinken. Den Mäusen wurde zweimal wöchentlich 2 mg Prednisolon/kg KG s.c. in die Kniefalte verabreicht.

3.3 Gewinnung der Dauerstadien

Der Kot wurde zweimal pro Woche gesammelt. Einmal wöchentlich wurden die Eier aus dem Kot gewonnen, in der Zwischenzeit wurde der Kot im Kühlschrank aufbewahrt. Die Fäzes wurde vor der Gewinnung der Eier über Nacht in Leitungswasser eingeweicht um das Zerkleinern zu erleichtern.

Am folgenden Tag wurde der Kot in einem Mörser mit gesättigter Zinkchlorid–Natriumchlorid–Lösung zerkleinert und durch ein Teesieb gegossen. Die Flüssigkeit wurde in Zentrifugengläser überführt und zehn Minuten bei 2800 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Auch hier wurde der Überstand in ein Sieb mit einer Maschenweite von $30\ \mu\text{m}$ gegossen und mehrfach mit Leitungswasser gewaschen. Das so gewonnene Material wurde in Zentrifugengläser gegeben und 25 Minuten bei 2800 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Sediment mit Leitungswasser aufgemischt. Die Anzahl der gewonnenen Eier wurde mit der oben schon beschriebenen Methode bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Flüssigkeit in Spitzröhrchen gefüllt. Diese wurden im Kühlschrank gelagert und die Suspension wurde dreimal pro Woche mittels einer Pasteurpipette belüftet.

3.4 Suspensionsversuch

Die Prüfung des Desinfektionsmittels Neopredisan 135–1 erfolgte im Suspensionsverfahren. Als Leitlinie dienten die Richtlinien der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft zur Prüfung von Desinfektionsmitteln an Spulwurmeiern im Suspensionstest.

Die Konzentration der Eispension wurde durch oben beschriebene Auszählung der Eier bestimmt. Die Eikonzentration der verschiedenen Versuche war unterschiedlich. Sie bewegte sich bei den Versuchen mit *T. muris*-Eiern in einem Bereich von 2500 bis 3500 Eiern pro Ansatz. Bei den Versuchen mit *A. tetraptera* wurden ungefähr 1000 Eier pro Ansatz verwendet.

Für den Suspensionstest wurde Neopredisan 135–1 unmittelbar vor dem Versuch angesetzt. Dreimal erfolgten die Versuche an den *T. muris*-Dauerstadien mit einer Anwendungskonzentration von 2%. Hierzu wurden 0,4 ml Neopredisan 135–1 mit 10 ml Leitungswasser gemischt und somit eine Konzentration der Desinfektionslösung von 4% erreicht. Durch die Zugabe der gleichen Menge an Eispension im Test reduzierte sich die Konzentration um die Hälfte. Einmal fand der Versuch an den *T. muris*-Eiern mit einer Anwendungskonzentration von 1% statt. Dafür wurden 0,2 ml Desinfektionsmittel mit 10 ml Wasser gemischt und somit eine Konzentration von 2% erreicht. Damit betrug die Endkonzentration 1%.

Die Versuche an den *A. tetraptera*-Dauerstadien erfolgten einmal mit einer Endkonzentration von 2 % und einmal mit einer Endkonzentration von 1 %.

Als Gefäße wurden Glaspetrischalen mit einem Durchmesser von 2 cm verwendet. Pro geprüfter Einwirkzeit wurde ein Doppelansatz gebildet. In jedem Versuch gab es zwei Kontrollansätze bestehend aus 0,5 ml Suspension und 0,5 ml Leitungswasser. Die Einwirkzeiten betragen bei den Versuchen mit *T. muris*-Dauerstadien immer 30, 60, 90, 120 und 180 Minuten.

Bei den Versuch mit Aspicuriseiern mit 2 %iger Endkonzentration betragen die Zeiten ebenfalls 30, 60, 90, 120 und 180 Minuten, bei dem Versuch mit 1 %iger Endkonzentration 60, 90 und 120 Minuten.

In jede Schale wurden 0,5 ml der Desinfektionslösung gegeben. Zum Start der Desinfektionsreaktion wurde die gleiche Menge Eisuspension hinzugefügt. Während des Versuches standen die Ansätze auf einem Wipptisch der Marke Heidolph, der die Flüssigkeiten in stetiger schwacher Bewegung hielt. Nach den vorgegebenen Einwirkzeiten wurde der Inhalt jeder Petrischale in ein Becherglas mit ca. 1200 ml Fassungsvermögen überführt, die Petrischalen wurden mit einem scharfen Wasserstrahl ausgespült und die so gewonnene Flüssigkeit ebenfalls in dem Becherglas aufgefangen. Dann wurde das Glas mit Leitungswasser auf 1000 ml aufgefüllt und die Flüssigkeit mit einem Glasstab umgerührt. Nach 24 stündiger Sedimentation bei Raumtemperatur wurde der Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe bis auf ca. 30 ml abgesaugt. Das Sediment jedes Ansatzes wurde resuspendiert und in Zellkulturplatten mit sechs Vertiefungen der Fa. Greiner überführt. Die Platten wurden bei Zimmertemperatur gelagert und dreimal pro Woche mittels einer Pasteurpipette belüftet.

Die Lagerdauer betrug bei *T. muris* 34 bis 37 und bei *A. tetraptera* 8 Tage.

3.5 Ermittlung des Desinfektionserfolges

Trichuris muris:

Der Überstand wurde abpipettiert und das Sediment aufgemischt. Mit einer Impföse wurde etwas von dieser Flüssigkeit auf einen Objektträger überführt, mit einem Deckgläschen abgedeckt und bei 400 facher Vergrößerung jeweils 50 Eier pro Vertiefung ausgezählt. Eier in denen die Larven deutlich sichtbar entwickelt waren, wurden als embryoniert gewertet. Nicht embryonierte Eier, blasig degenerierte Eier und Eier mit plump erscheinenden, larvenähnlichen Gebilden wurden als nicht embryoniert bewertet.

Der Prozentsatz der embryonierten Eier (abs. ER [%] \equiv absolute Embryonierungsrate in Prozent) wurde errechnet und der Mittelwert der Doppelansätze gebildet. Die relative Embryonierungsrate (rel. ER [%]) wurde nach folgender, in den Richtlinien angegebenen Formel ausgedrückt:

$$\text{rel. ER [\%]} = \frac{100 \times \text{abs. ER X [\%]}}{\text{abs. ER Kontrolle [\%]}}$$

Die Wirksamkeit (Wi [%]) des Desinfektionsmittels wurde gemäß der Richtlinien im Grad der Entwicklungshemmung ausgedrückt und ergibt sich aus der Differenz zu 100:

$$\text{Wirksamkeit [\%]} = 100 - \text{rel. ER [\%]}$$

Mit den *Trichuris*-Eiern des zweiten Desinfektionsversuches mit einer Anwendungskonzentration von 2% wurde am Tag der mikroskopischen Bestimmung des Desinfektionserfolges jeweils eine Maus pro Ansatz mittels Knopfkanüle infiziert.

Der Kot dieser Tiere wurde vor deren Infektion mit den „desinfizierten“ Eiern mittels Flotationsmethode auf etwaige Eiausscheidung untersucht. In keiner Probe konnten Eier nachgewiesen werden. Als Flotationslösung wurde gesättigte Zinkchlorid-Kochsalz-Lösung verwendet. Die Zentrifugation erfolgte drei Minuten lang mit 2800 Umdrehungen / Minute.

Die Anzahl der desinfizierten Eiern wurde durch eingangs beschriebene Zählung bestimmt und der Eigehalt durch anschließende Verdünnung der Suspension mit Leitungswasser eingestellt. Direkt vor der Infektion wurde die Eier enthaltende Flüssigkeit gut aufgemischt. Die Infektionsdosis betrug pro Tier etwa 450 Eier. Nach erfolgter Infektion wurden die Mäuse einzeln gehalten. Die Tiere bekamen zweimal wöchentlich 2 mg Prednisolon / kg KG s.c. in die Kniefalte gespritzt. Während der folgenden 30 Tage wurden die Tiere einmal wöchentlich mittels Flotationsmethode beprobt. Ab dem 30 Tag p.i. wurde der Kot der Tiere fünfmal wöchentlich mittels Flotationsmethode untersucht. Dies erfolgte bis sieben Tage nach den ersten positiven Befunden der Kontrollgruppe. Konnten zu diesem Zeitpunkt keine Eier im Kot nachgewiesen werden wurden die Tiere als frei von Trichuren gewertet. Danach wurde der Versuch beendet.

Aspicularis tetraptera:

Nach acht Tagen Embryonierungszeit bei Raumtemperatur wurden je eine Maus pro Desinfektions- und Kontrollansatz mit der „desinfizierten“ Eiesuspension per Knopfkanüle infiziert. Die Mäuse wurden vor der Infektion mittels Flotationsmethode auf

das Vorhandensein von Wurmeiern im Kot untersucht. Jede Maus erhielt eine Dosis von ca. 250 Eiern. Während der ersten 21 Tage p.i. wurde der Kot der Tiere wöchentlich untersucht. Ab dem 23 Tage p.i. wurde der Kot fünfmal wöchentlich gesammelt und per Flotation mit gesättigter Zinkchlorid–Natriumchlorid–Lösung untersucht. Die Beprobung wurde sieben Tage nach dem ersten Nachweis von Eiern im Kot der Mäuse der Kontrollgruppe weitergeführt. Konnten dann immer noch keine Eier nachgewiesen werden, wurden die Mäuse als nicht infiziert gewertet.

4. Ergebnisse

4.1 Suspensionsversuche mit Eiern von *Trichuris muris*:

4.1.1 1%ige Anwendungskonzentration

Tabelle 4.1 stellt die Ergebnisse des Versuches mit einer Endkonzentration von 1% dar. Die nicht mit Desinfektionsmittel behandelten Eier der Kontrollgruppen erreichten eine Embryonierungsrate von 85,7%. Die mit einer 1%igen Neopredisanlösung „desinfizierten“ Eier erreichen diese Rate nicht, der Anteil der sich weiterentwickelnden Eier nimmt mit zunehmender Dauer der Desinfektionszeit ab. Abbildung 4.1 zeigt alle für diesen Versuch ermittelten Werte als Kurve. Die Kurven der beiden Embryonierungsraten in diesem Versuch zeigen einen flacheren Verlauf als die der drei Versuchsansätzen mit 2%iger Desinfektionsmittellösung.

	Kontrolle	30 Min.	60 Min.	90 Min.	120 Min.	180 Min.
abs. ER [%]	85,67	73,00	32,00	13,34	0,67	0,00
rel. ER [%]	--	85,21	37,35	15,57	0,78	0,00
Wi. [%]	--	14,79	62,65	84,43	99,22	100,00

Tab. 4.1: Desinfektionsversuch an Eiern von *T. muris* mit Neopredisan 135-1 in einer Anwendungskonzentration von 1%, 37. Tag nach erfolgter Desinfektion. abs. ER = absolute Embryonierungsrate, rel. ER = relative Embryonierungsrate, Wi = Wirksamkeit

4.1.2 2%ige Anwendungskonzentration

In Tabelle 4.2 werden die Ergebnisse des 1. Versuchsansatz mit Neopredisan 135-1 in einer Anwendungskonzentration von 2% dargestellt.

	Kontrolle	30 Min.	60 Min.	90 Min.	120 Min.	180 Min.
abs. ER [%]	93,33	81,50	72,83	22,17	1,84	0,34
rel. ER [%]	--	87,35	78,06	23,76	1,97	0,36
Wi. [%]	--	12,65	21,94	76,24	98,03	99,64

Tab. 4.2: Versuchsansatz Nr. 1 an *T. muris*- Dauerstadien mit Neopredisan 135-1 in einer Anwendungskonzentration von 2%, 34. Tag nach erfolgter Desinfektion.

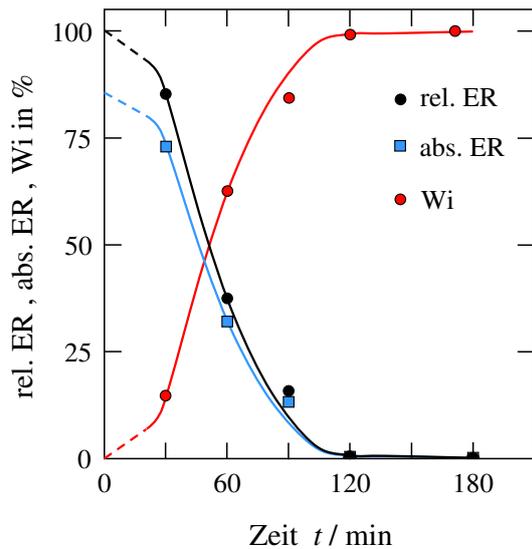


Abb. 4.1: Werte der relativen Embryonierungsrate, absoluten Embryonierungsrate und Wirksamkeit in Abhängigkeit von der Einwirkzeit. Desinfektionsversuch an Dauerstadien von *T. muris* mit Neopredisan 135–1 in einer Anwendungskonzentration von 1%, 37. Tag nach erfolgter Desinfektion.

Die Eier der Kontrollgruppe zeigen nach 34 Tagen Lagerung bei Raumtemperatur mit regelmäßiger Belüftung eine Embryonierungsrate von 93,33%. Die mit Neopredisan 135–1 in einer Konzentration von 2% behandelten Eier zeigen geringere Embryonierungsrate. Bei einer Erhöhung der Einwirkzeit von 60 zu 90 Minuten ist der größte Abfall der Entwicklungsraten erkennbar. Dies bedingt das deutliche Absinken der Embryonierungsrate nach einer Einwirkzeit von 90 Minuten. Mit zunehmender Dauer der Exposition sinkt die Anzahl der embryonierten Eier bis auf 0,3% nach 180 Minuten Desinfektionsdauer deutlich ab. Auch bei Versuchsansatz 2 und 3 ist der Unterschied zwischen 60 und 90 minütiger Einwirkzeit am größten wie aus Tabelle 4.3 und 4.4 ersichtlich ist.

	Kontrolle	30 Min.	60 Min.	90 Min.	120 Min.	180 Min.
abs. ER [%]	90,67	86,67	56,67	15,67	0,34	0,00
rel. ER [%]	--	95,59	62,50	17,28	0,37	0,00
Wi. [%]	--	4,41	37,50	82,72	99,63	100,00

Tab. 4.3: Versuchsansatz Nr. 2 an Dauerstadien von *T. muris* mit Neopredisan 135–1 in einer Anwendungskonzentration von 2%, 35. Tag nach erfolgter Desinfektion.

Abbildung 4.2 stellt alle für Versuchsansatz 1 ermittelten Werte dar. Als Wert der absoluten Embryonierungsrate zum Zeitpunkt $t=0$ wird die absolute Embryonierungsrate des Kontrollansatzes verwendet. Daraus resultiert eine relative Embryonierungsrate von 100% zu Beginn der Desinfektionsreaktionen. Der deutliche Abfall der abs. ER zwischen 60 und 90 minütiger Einwirkzeit sowie der daraus resultierende Abfall der rel. ER ist gut zu erkennen.

	Kontrolle	30 Min.	60 Min.	90 Min.	120 Min.	180 Min.
abs. ER [%]	94,17	83,84	71,67	21,67	1,50	0,17
rel. ER [%]	--	89,03	76,11	23,01	1,59	0,18
Wi. [%]	--	10,97	23,89	76,99	98,41	99,82

Tab. 4.4: Versuchsansatz Nr.3 an Eiern von *T. muris* mit Neopredisan 135-1 mit einer Anwendungskonzentration von 2%, 34. Tag nach erfolgter Desinfektion.

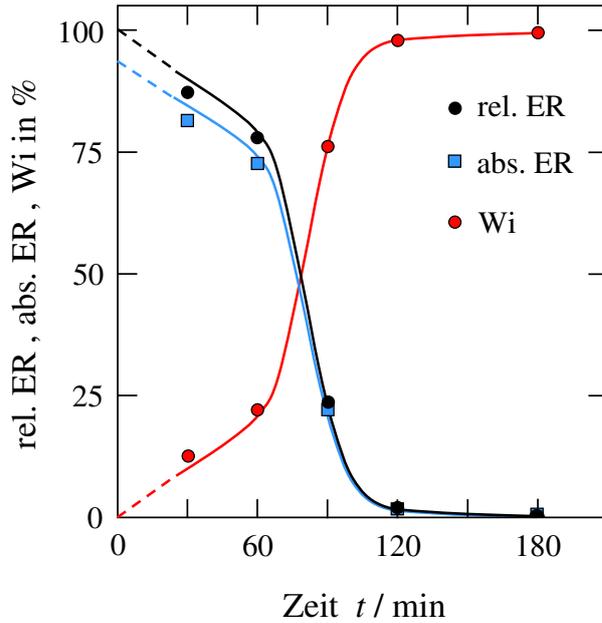


Abb. 4.2: Versuchsansatz Nr.1 an Eiern von *T. muris* mit Neopredisan 135-1 in einer Anwendungskonzentration von 2%. Werte der relativen Embryonierungsraten, absoluten Embryonierungsraten und Wirksamkeit, 34. Tag nach erfolgter Desinfektion.

Tabelle 4.5 zeigt die absoluten Embryonierungsraten aller mit einer Anwendungskonzentration von 2% durchgeführten Suspensionsversuche im Vergleich. Den selben Sachverhalt stellt auch Abbildung 4.3 dar. Alle Kurven zeigen einen ähnlichen Verlauf.

	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
abs. ER Kontrolle[%]	93,30	90,67	94,17
abs. ER 30 min.[%]	81,50	86,67	83,84
abs. ER 60 min.[%]	72,83	56,67	71,67
abs. ER 90 min.[%]	22,17	15,67	21,67
abs. ER 120 min.[%]	1,84	0,34	1,50
abs. ER 180 min.[%]	0,34	0,00	0,17

Tab. 4.5: Versuchsansätze mit Dauerstadien von *T. muris* und Neopredisan 135-1 mit einer Anwendungskonzentration von 2%.

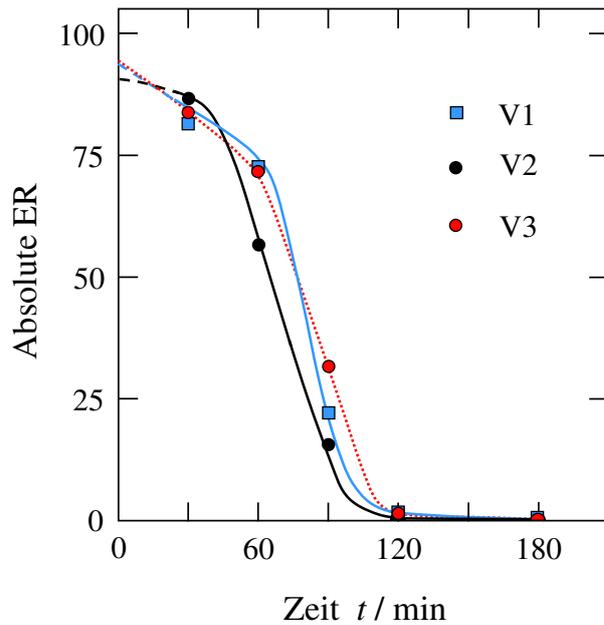


Abb. 4.3: Absolute Embryonierungsrate in Abhängigkeit von der Einwirkzeit bei allen Versuche mit Neopredisan 135–1 mit einer Konzentration von 2%.

Tabelle 4.6 zeigt die Wirksamkeit [%] nach den für die Beurteilung wichtigen 120 Minuten und nach 180 Minuten bei allen Versuchen mit einer Anwendungskonzentration von 2% im Vergleich. Die Ergebnisse der drei Versuche weichen kaum voneinander ab.

	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Wi [%] 120 Min.	98,03	99,63	98,41
Wi [%] 180 Min.	99,64	100,00	99,82

Tab. 4.6: Desinfektionsversuche an Dauerstadien von *T. muris* mit Neopredisan 135–1 mit einer Anwendungskonzentration von 2%.

4.1.3 Infektionsversuch an 12 Balb / c Mäusen mit Eiern von *Trichuris muris* des 2. Versuches mit Neopredisan 135–1 in einer Konzentration von 2 %

Bei den wöchentlichen Kotuntersuchungen der ersten 30 Tage p.i. konnten bei keiner Maus Eier nachgewiesen werden. Am 47. Tag p.i. wurden sowohl im Kot der Tiere der Kontrollgruppe als auch im Kot der Tiere, welche die 30 Minuten „desinfizierten“ Eier erhielten, *T. muris*-Dauerstadien nachgewiesen. Im Kot der Tiere der anderen Gruppen wurden keine Eier nachgewiesen, obwohl ein Teil der Eier nach erfolgter Desinfektion eine Larve enthielt. Auch bei der letzten Kotuntersuchung 54 Tage p.i. wurden keine Eier bei diesen Mäusen gefunden. Somit wurden die Tiere, die mit Eiern infiziert wurden, welche 60, 90, 120 oder 180 Minuten mit Neopredisan 135–1 desinfiziert wurden als nicht befallen gewertet.

4.2 Infektionsversuche mit Eiern von *Aspiculuris tetraptera*

Der Desinfektionserfolg wurde aufgrund der schnellen Weiterentwicklung der Eier in der Umwelt nicht wie bei den Versuchen mit *T. muris*-Dauerstadien durch die Embryonierungsraten bestimmt. Es erfolgte ein Infektionsversuch von Mäusen mit „desinfizierten“ Eiern.

Die Daten beider Versuche sind in Tabelle 4.7 dargestellt.

Kotuntersuchung	Kontr.	30 Min	60 Min.	90 Min.	120 Min.	180 Min.
Neopredisan 135–1, 2 %	pos	pos	neg	neg	neg	neg
Neopredisan 135–1, 1 %	pos	--	pos	pos	pos	--

Tab. 4.7: Desinfektionsversuche an *A. tetraptera* Dauerstadien mit Neopredisan 135–1. Das Zeichen -- deutet an, dass für diese Desinfektionsdauer kein Versuch durchgeführt wurde.

Bei den regelmäßigen Kotuntersuchungen konnten bei den Tieren, die die Eier des Desinfektionsversuches an *A. tetraptera*-Eiern mit einer 2 % igen Lösung von Neopredisan 135–1 erhielten, bis einschließlich Tag 26 p.i. keine Eier nachgewiesen werden. Am 27 Tag p.i. wurde bei den Mäusen der Kontrollgruppe und den Tieren, welche die Eier erhielten, die dem Desinfektionsmittel 30 Minuten ausgesetzt waren, Eier im Kot gefunden. Alle anderen Tiere blieben bis zum 34 Tag p.i. negativ. Dann wurde der Versuch beendet. Die bis dahin unauffälligen Tiere wurden als nicht infiziert gewertet.

Alle Tiere, die im zweiten Versuch mit einer 1%igen Neopredisan 135-1 Konzentration „desinfizierten“ Eier erhielten, blieben bis einschließlich 48 Tage p.i. unauffällig. Am 49. Tag konnten bei einem Tier der Kontrollgruppe *A. tetraptera*-Eier nachgewiesen werden. Vier Tage später wurden Dauerstadien im Kot aller Tiere gefunden.

5. Diskussion

5.1 Besprechung der Methoden

5.1.1 Infektion der Mäuse

Die für die Versuche benötigten Wurmeier wurden durch Infektion von Mäusen erzeugt. Erste Infektionsversuche erfolgten an jungen NMRI und Balb / c Mäusen. Bei den NMRI Mäusen konnte keine Infektion gesetzt werden, bei den Balb / c Mäusen gelang dies nur bei einem Teil der Tiere. Bei den anderen Tieren konnten ebenfalls keine Eier im Kot nachgewiesen werden.

Mehrere Autoren beschreiben Schwierigkeiten bei der Etablierung einer Infektion mit *T. muris* (CAMPBELL 1963, KEELING 1961). Es erfolgt eine Abstoßung der Würmer im Verlauf der ersten drei oder vier Wochen der Infektion als Reaktion auf die larvalen Stadien (WAKELIN, 1969). Hierfür ist die T-Zellantwort der Mesenteriallymphknoten bestimmend. Der Infektionsverlauf ist abhängig von der Dominanz der T-Zelltypen. Es werden verschiedene Subtypen von T-Zellen unterschieden; für die Abstoßung der Larven sind vor allem CD4-Rezeptor tragende Zellen verantwortlich. Die Rolle der CD4+ T-Zellen ist ausführlich beschrieben, es werden Th1-Zellen und ihre Sekrete IL-2, IFN- γ und Lymphotoxin, sowie Th2-Zellen und deren Produkte IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13, sowie regulierende T-Zellen unterschieden. Resistente Stämme oder Individuen zeigen typischerweise eine ausgeprägte Th2-Antwort. Diese Individuen stoßen die Würmer am 18 Tag p.i. ab. Empfängliche Stämme zeigen eine ausgeprägte Th1-Antwort, der Cytokinpiegel ist niedrig bei einem hohen Gehalt von IFN- γ , welches die Differenzierung zu Th2-Zellen hemmt. Empfängliche Tiere zeigen also eine Immunantwort, aber die Art der Antwort ist nicht geeignet die Würmer abzustößen. Die Infektion bleibt bestehen. Es existiert auch die Möglichkeit einer kombinierten Th1- und Th2-Antwort. Hierbei werden einige oder alle Würmer zwischen dem 21 und 28 Tag p.i. ausgetrieben. Hierfür ist die Th1-Antwort entscheidend. Helmintheninfektionen verursachen zudem einen Anstieg von Mastzellen, eosinophilen Granulozyten und Antikörpern. Durch Interleukine der Th2-Zellen angeregte B-Zellen und von diesen produzierte Antikörpern spielen ebenfalls eine bedeutende Rolle (BLACKWELL, ELSE, 2001; ELSE, DESCHOOLMASTER, 2003; JOHNSTON et al, 2005).

MATHIES (1959) experimentierte mit *A. tetraoptera*. Er unterdrückte die Immunantwort durch Kortisongaben. Drei bis sieben Wochen alte männliche und weib-

liche Albinomäuse erhielten jeweils 500 embryonierte Eier. 50% der Tiere wurde 75 mg/kg KG Kortison für insgesamt elf Tage p.i. verabreicht. Dann erfolgte die Tötung der Tiere und eine Untersuchung des Darmkonvolutes. Er fand einen signifikanten Anstieg der Wurmbürde bei behandelten Tieren. Der Effekt war umso ausgeprägter je jünger die Tiere waren.

CAMPBELL (1963) infizierte fünf Wochen alte Albinomäusen mit je 200 Eiern von *T. muris*. Ein Teil der Tiere erhielt am Tag vor der Infektion Kortison. Behandelte wie unbehandelte Tiere, die nach zwei oder drei Wochen getötet und untersucht wurden, beherbergten larvale Stadien. Im Durchschnitt hatten sich 35% der verabreichten Eier weiterentwickelt. Die mit Kortison behandelten Tiere zeigten etwas höhere Wurmbürden als die unbehandelten Wirte. Von den unbehandelten Mäusen, welche am 37 Tag p.i. getötet wurden, hatten die Tiere alle oder einen Teil der Würmer abgestoßen. Tiere, denen Kortison verabreicht worden war, beherbergten deutlich mehr Würmer als unbehandelte.

WAKLIN (1970) verabreichte Mäusen Kortison während einer Erstinfektion mit *T. muris*. Er tat dies an zwei Tagen und unterdrückte somit die Immunantwort. Er wählte verschiedene Tage für die Kortisongaben aus und kam zu dem Schluss, dass die Immunantwort und somit die Abstoßung der Larven am effektivsten unterdrückt wird, wenn die Kortisongabe an Tag 14 und 15 p.i. erfolgt.

In Versuchen mit *Nippostrongylus brasiliensis* an Ratten wurde die Immunantwort und somit die Abstoßung des Wurms erfolgreich durch Prednisolongaben unterdrückt.

Kortison und Prednisolon gehören zu den Glukokortikoiden. Somit wirken sie über intrazelluläre Rezeptorbindung, welche die Genexpression und daraus resultierend die Proteinsynthese modifiziert. Dies führt dazu, dass glukokortikoide Effekte erst nach einer Latenzzeit auftreten und über das Verschwinden des Glukokortikoids aus der Blutbahn hinaus anhalten.

Glukokortikoide haben unter anderem eine immunsuppressive Wirkung. Wichtig hierfür ist der Membran-stabilisierende Effekt. Er erstreckt sich praktisch auf alle biologischen Membranen. Durch diesen Effekt hemmen Glukokortikoide zum Beispiel die Ausschüttung von lysosomalen Enzymen. Es erfolgt eine Hemmung der Leukozyteninfiltration und eine T-Zell Umverteilung. Dadurch sinkt deren Anzahl in der Peripherie. Durch Hemmung der IL-2 Freisetzung reduziert sich die Proliferationsrate der T-Lymphozyten. Ebenso wird die Aktivierung der T-Zellen beeinträchtigt. Die Zytokinsynthese in den T-Lymphozyten wird vermindert, IL-1, IL-6 und TNF werden in geringerer Menge gebildet. Durch eine Verminderung der Makrophagenaktivierung wird die Phagozytose verringert. Die Bindung von Antikörpern an

Effektorzellen wird herabgesetzt. Eine lang anhaltende und hochdosierte Gabe ruft eine Verminderung der Antikörperbildung hervor (FREY, LÖSCHER, 2002). Durch all diese Eigenschaften wird eine deutliche Th2–Antwort auf einen Helminthenbefall effektiv gehemmt. Die Infektion bleibt bestehen.

Nach meinen ersten erfolglosen Versuchen eine Infektion zu setzen wurde bei erneuten Infektionsversuchen den Tieren Prednisolon verabreicht. Nun gelang es die Mäuse zu infizieren und den Nematodenbefall aufrecht zu erhalten. Mit *A. tetraptera* infizierte Tiere schieden ca. zwei Monate Eier aus. Dies entspricht in etwa der maximalen Lebensdauer des weiblichen Wurmes. Die Anzahl der im Kot auffindbaren Eier sank mit zunehmender Dauer der Ausscheidung ab und erlosch dann völlig. Somit blieb die gesetzte Infektion die einzige, die Tiere infizierten sich nicht aus ihrer Umwelt neu.

Mit *T. muris* infizierte Mäuse schieden ungefähr 2,5 Monate deutlich Eier aus. Danach ging die Ausscheidung auf so geringe Werte zurück, dass die Gewinnung eingestellt wurde.

S. obvelata gehört mit *A. tetraptera* zu den am weitesten verbreiteten Nematoden in der Versuchstierzucht. Dies liegt sowohl an dem kurzen Reproduktionszyklus des Wurmes als auch an dem typischen Verhalten der Mäuse, die die Eier aus der Perianalgegend durch Fellpflege oder soziale Kontakte mit infizierten Tieren aufnehmen. Ein Desinfektionsversuch an *Syphacia*–Eiern konnte nicht im Suspensionsversuch durchgeführt werden, da die Anzahl der Eier, welche ich aus dem Kot natürlich infizierter Tiere gewinnen konnte gering war. Dies lag sowohl an der typischen Eiablage, die hauptsächlich in der Perianalgegend des Wirtstieres erfolgt, als auch an der geringen Anzahl von Eiern, welche die Weibchen hervorbringen. Eine Gewinnung einer ausreichenden Anzahl von Eiern war mir nicht möglich. Zudem gehen bei jedem neuen Arbeitsschritt Eier verloren.

Da *S. obvelata* einer der bedeutendsten Helminthen bei Mäusen ist, wurde er der Vollständigkeit halber im Literaturteil mit abgehandelt.

5.1.2 Suspensionsversuch

Im Rahmen dieses Versuches war es nicht möglich Neopredisan 135–1 an *A. tetraptera*– und *T. muris*–Dauerstadien übereinstimmend mit den Richtlinien der DVG zu testen, da dort als Modell Eier des Schweinespulwurms *Ascaris suum* dienen. *A. suum* legt täglich 200 000 bis 2 Mio. Eier. Gemäß der Richtlinien werden die Eier aus den Uterusschläuchen der Würmer gewonnen. Die Weibchen von *A. tetraptera* legen im Laufe ihres Lebens ungefähr 370–400 Eier. Eine Gewinnung aus dem Kot über

einen längeren Zeitraum führt zu einer höheren Eiausbeute als dies bei Tötung der Tiere und der Gewinnung aus den Uteri möglich gewesen wäre. *T. muris* Weibchen legen täglich zwar mehr Eier als *A. tetraptera* Weibchen, aber auch mit dieser Eiausbeute wäre es nicht gelungen, die in den Richtlinien geforderte Konzentration von 100 000 Eier / ml herzustellen. Die Anzahl der Mäuse, die nötig gewesen wäre um genug weibliche Würmer zu beherbergen, hätten den Rahmen des Versuches und die Möglichkeit der Unterbringung der Tiere gesprengt. Um eine so große Menge Eier zu erhalten, hätten die gewonnenen Dauerstadien über einen langen Zeitraum hinweg gelagert werden müssen und vermutlich an Infektiosität verloren.

Durch die Gewinnung der Eier aus dem Kot wies die Eisuspension einen höheren Verschmutzungsgrad auf als dies wahrscheinlich bei der Gewinnung aus den Uterus-schläuchen der Fall gewesen wäre, wobei auch hier Gewebspartikel vorhanden gewesen wären. Somit ist die Gefahr eines erhöhten Eiweißfehlers gegeben. VON DER HEIDE (1973) ermittelte die Größe des Eiweißfehlers durch Gegenüberstellung von Ergebnissen, welche in Suspensionsversuchen, die mit und ohne Serumzusatz durchgeführt wurden, erzielt wurden. Hierbei stellte sie fest, dass die Anwesenheit von Eiweiß zu einer geringen Beeinträchtigung der Ergebnisse führte. Allerdings testete sie kein Mittel auf alleiniger Kresolbasis. Betrachtet man beispielsweise die Versuchsergebnisse für das Mittel LOMASEPT, das unter anderen Wirkstoffen Kresol enthält, so ist die Abtötungsrate ohne Serumzusatz für die meisten Einwirkzeiten höher, aber nicht für alle, daher ist der Eiweißfehler nicht ausgeprägt.

Nach den Richtlinien soll die Eisuspension mit WSH angesetzt werden. In den von mir durchgeführten Versuchen wurde Leitungswasser verwendet. Dies führt nach VON DER HEIDE (1973) nicht zu Veränderungen des Ergebnisses.

Die Konzentration der Eisuspension soll gemäß der Richtlinien mit einer Mc Master-Kammer durch acht Zählungen bestimmt werden. Durch die Gewinnung der Eier aus dem Kot der Tiere zeigte sich die Sicht durch Kotpartikel eingeschränkt. Vor allem die durchscheinenden Eier von *A. tetraptera* waren sehr schwer zu erkennen. Deshalb erfolgte die Eikonzentrationbestimmung anhand der Auszählung von zehn Portionen unter dem Lichtmikroskop. Hierdurch war der Flüssigkeitsfilm dünner und somit die Sicht besser.

Die Prüfung von Desinfektionsmitteln an Spulwurmeiern hat gemäß der Richtlinien der DVG im Suspensionstest und im Keimträgertest zu erfolgen. Im Suspensionsversuch werden die nicht embryonierten Eier von *A. suum* in einer Glaspetrischale mit dem zu testenden Desinfektionsmittel in Kontakt gebracht. Durch die Vermengung von 1 ml Eisuspension mit der gleichen Menge an Desinfektionsmittellösung entsteht eine Ei-Desinfektionsmittelsuspension in Gebrauchslösung, welche auf einem

Wipptisch in Bewegung gehalten wird. Beim Keimträgertest dienen 15 cm große Wandfliesen als Trägermaterial für die Eispension. Die Rückseite der Fliesen muss hierfür abgebürstet und getrocknet werden. Die Fliesen werden dann mit der Vorderseite nach unten in eine Plastikschaale mit einem Durchmesser von 30 cm gelegt und mit einer Wasserwaage ausgerichtet. Nun werden 5 ml der Eispension auf die Trägerfliese aufgetragen. Nach einer Stunde Trocknungszeit wird die Fliese mit Desinfektionsmittellösung in Anwendungskonzentration überschichtet bis ein lückenloser Film entsteht. Da die Fliesenrückseite einen Teil der Desinfektionsmittellösung aufnimmt, wird nach zehn Minuten erneut Desinfektionsmittel aufgebracht. Der weitere Verlauf des Versuches ist bei beiden Ansätzen identisch.

Da mir für beide Versuchsansätze nicht genug Eier zu Verfügung standen, musste ein Test ausgewählt werden. Auch gehen bei beiden Ansätzen im Verlauf des Versuches Eier für die Auswertung verloren. HIEPE (1985) untersuchte Wiederfindungsraten an verschiedenen Keimträgern. Hierzu benutzte er Oozysten. Er fand die Oozysten am besten bei glatten Materialien wie Glas wieder und am schlechtesten bei rauen Oberflächen wie Ziegeln. SANDER (2000) führte Dekontaminationstest an *A. suum* Dauerstadien durch. Hierfür wurden unterschiedliche Keimträger verwandt. Sie benutzte als Keimträger unter anderem Objektträger und die Rückseite von Fliesen. Nach Aufbringen der Eispension wurden diese Trägermaterialien auch mit Wasser abgespült. Bei den Versuchen, in denen die Glasfläche als Keimträger dienten, war die Wiederfindungsrate höher als bei Versuchen mit Fliesen. Somit fiel die Wahl auf den Suspensionstest.

Die ersten Suspensionsversuche an Eiern von *T. muris* wurden mit einer 2%igen Endkonzentration durchgeführt. Der Grund hierfür war, dass Neopredisan 135-1 bereits seine Wirksamkeit in dieser Konzentration an Eiern von *A. suum* bewiesen hat und in dieser Konzentration gegen Wurmeier vom Hersteller empfohlen wird. Um die Ergebnisse des ersten Versuchansatzes mit 2%iger Desinfektionsmittellösung zu überprüfen, wurde dieser mit der gleichen Konzentration zweimal wiederholt. In allen drei Versuchsansätzen konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden.

Dann erfolgte ein Versuch mit einer 1%igen Anwendungskonzentration um herauszufinden, ob mit der halben Konzentration des Desinfektionsmittels ähnlich gute Ergebnisse zu erzielen sind.

Auch der erste Versuch mit den Eiern von *A. tetraptera* wurde mit einer Anwendungskonzentration von 2% durchgeführt. Der zweite Versuch erfolgte mit einer 1%igen Konzentration. Da schon bei der höheren Konzentration keine ausreichende Desinfektionswirkung bei einer Einwirkzeit von 30 Minuten erzielt werden konnte, wurde im zweiten Versuch auf diesen Ansatz verzichtet. Ein weiterer Grund für die Reduktion

der Versuchsansätze war die geringe Eianzahl, die für die Versuche zur Verfügung stand, da die Menge der abgelegten Eier bei *A. tetraptera* sehr gering ist. Auf eine Einwirkzeit von 180 Minuten wurde verzichtet, weil in den Richtlinien der DVG die 120 minütige Zeit zu Beurteilung des Desinfektionserfolges herangezogen wird und somit Neopredisan 135–1 mit einer zwei stündigen Einwirkzeit gegen Wurmeier in die Desinfektionsmittelliste aufgenommen wurde. Daher ist eine längere Anwendungszeit durch den Verbraucher nicht vorgesehen.

Die Embryonierungsdauer betrug bei den Desinfektionsversuchen an *T. muris*-Dauerstadien mit einer Anwendungskonzentration von 2% 34 und 35 Tage. Bei dem Versuch mit einer Konzentration von 1% wurden am 34. Tag 300 Eier des Kontrollansatzes ausgezählt. Da die Anzahl der embryonierten Eier unter denen der davor stattgefundenen Versuche lag, wurde dies auch am 35. Tag durchgeführt. Da sich die absolute Embryonierungsrate auch am 37. Tag nicht erhöht hatte, erfolgte nun die Beurteilung.

5.1.3 Ermittlung des Desinfektionserfolges

Trichuris muris:

Die Richtlinien verlangen eine Durchmusterung der Ansätze mit einem Untertischmikroskop bei ca. 160 facher Vergrößerung. Hierbei wird der Boden der sechs Vertiefungen je Ansatz untersucht. Es werden 6 x 50 Eier ausgezählt. Diese Vorgabe konnte so nicht übernommen werden, da die Sicht durch die übrig gebliebenen Kotbestandteile eingeschränkt war und die im Sediment enthaltenen Eier nicht beurteilt werden konnten. Deshalb wurde der Überstand abpipettiert und das Sediment resuspendiert. Nun wurde mit einer Impföse etwas von dieser Flüssigkeit auf einen Objektträger überführt, mit einem Deckgläschen abgedeckt und bei 400 facher Vergrößerung jeweils 50 Eier pro Vertiefung ausgezählt. Durch die 400 fache Vergrößerung war der Entwicklungszustand der Eier besser zu beurteilen.

Die rechnerische Ermittlung des Desinfektionserfolges ist durch die Richtlinien klar vorgegeben und wurde auch so übernommen. Hierdurch ist eine deutliche Einteilung in embryonierte und nicht embryonierte Eier nötig, die dazu führt, dass keine Unterscheidung hinsichtlich verschiedener Degenerationsformen vorgenommen wird. Bei den dem Desinfektionsmittel ausgesetzten Eiern wurden außer embryonierten und nicht embryonierten Eiern auch morphologisch veränderte Stadien gefunden. Diese wurden in dieser Versuchsreihe immer den nicht embryonierten Eiern zugerechnet. PHILLIPS (1980) untersuchte in der von ihr vorgelegten Arbeit die von ihr „desinfizierten“ Eier auf unterschiedliche Weisen. Sie führte sowohl lichtmikroskopische

Untersuchung als auch Versuche mit Chlorbleichlauge durch, in welchen embryonale Bewegung sichtbar gemacht wurde. Dann verglich sie die erzielten Ergebnisse. Diese korrelierten signifikant bis sehr hoch signifikant miteinander. Bei Desinfektionsversuchen mit Phenol, Kresol und verschiedenen phenolhaltigen Desinfektionsmitteln bewegte sich die Irrtumswahrscheinlichkeit bei $<0,1\%$. Somit scheint nach Literaturangaben die mikroskopische Beurteilung der Eier zu aussagekräftigen Ergebnissen hinsichtlich des Entwicklungszustand der larvalen Stadien zu führen.

Aspiculuris tetraptera:

Die Eier von *A. tetraptera* entwickeln sich in der Umwelt rasch weiter. Aus diesem Grund war in einem Teil der gewonnenen Eier immer schon eine Larve erkennbar. Da für eine Bestimmung gemäß der DVG-Richtlinien ein nicht embryoniertes Ei Voraussetzung ist, wurde ein anderer Versuchsablauf gewählt. Es wäre natürlich möglich gewesen, den Anteil der schon vor dem Desinfektionsversuch embryonierten Eier mikroskopisch zu bestimmen. Dieser Wert hätte dann von den Ergebnissen der absoluten Embryonierungsraten abgezogen werden müssen. Da es sich hierbei um mit Fehler behaftete große Zahlen handelt, hat die Differenz keine Signifikanz.

Wegen der somit schlechten Beurteilbarkeit gemäß der Richtlinien wurde der Desinfektionserfolg im Infektionsversuch mit „desinfizierten“ Eiern bestimmt.

Deshalb wurde je eine Maus pro Desinfektions- und Kontrollansatz mit der Eispension per Knopfkanüle infiziert. Durch das Angehen der Infektion bei den mit dem Kontrollansatz infizierten Mäusen kann davon ausgegangen werden, dass auch die für die Desinfektionsansätze verwendeten Eier grundsätzlich embryonierungsfähig waren.

5.2 Besprechung der Ergebnisse

5.2.1 *Trichuris muris*

Werden die Eier von *A. suum* gemäß der Richtlinien gewonnen, so erfolgt dies direkt aus den Uteri weiblicher Würmer. Auf diese Weise gewonnen Dauerstadien weisen eine andere Oberflächenstruktur auf als Eier, welche aus dem Kot der Tiere gewonnen werden. Bei einer Entnahme aus dem Uterus fehlt dem Ei die äußerste, vom Uterus gebildete Schicht. Diese Hülle war bei den in diesem Versuch verwendeten Dauerstadien vorhanden. Nun stellt sich die Frage, ob sich das Vorhandensein dieser Hüllstruktur auf die Ergebnisse auswirkt und dies zu anderen Ansprüchen hinsichtlich der Embryonierungsraten führen muss. Nach Versuchen von VON DER HEIDE (1973) und SANDER (2000) wirkt sich die Anwesenheit der Hüllstruktur nicht auf die Versuchsergebnisse aus. Beiden Autorinnen nahmen Untersuchungen an direkt aus den Uteri weiblicher Würmer gewonnenen Eiern und Eiern, die aus dem Kot isoliert wurden, vor. Die durchgeführten Desinfektionsversuche führten zu vergleichbaren Ergebnissen. Somit wurden in diesem Versuchsablauf die gleichen Ansprüche an den Desinfektionserfolg gestellt wie in den Richtlinien der DVG gefordert.

Setzt man nicht embryonierte Eier unterschiedlicher Würmer Desinfektionsmittel aus, so zeigen sie nach angemessener Bebrütungsdauer teilweise ein anderes morphologisches Erscheinungsbild als ein nicht „desinfiziertes“ Ei, welches den gleichen Bedingungen ausgesetzt wurde. Dies ist von mehreren Autoren beschrieben worden, welche nach einer Einteilung für diese Veränderungen suchten.

So teilte LARSEN (1955) die Degenerationsformen, welche er in seinen Desinfektionsversuchen an *Askariden*- und *Trichostrongyliden*-Eiern fand, in folgende Hauptgruppen ein:

- Veränderungen, welche im Morulastadium auftreten, es erscheinen Vakuolen
- atypische Teilungsvorgänge
- aus der Schrumpfform hervorgehende, undurchsichtige Embryonalmasse
- deutlich morphologisch Abweichungen von den weiterentwickelten Formen

Die von LARSEN gewählte Einteilung scheint zur Beschreibung der hier beobachteten Veränderungen am besten geeignet.

Im Rahmen dieses Versuches erfolgte keine Aufzeichnung über die mengenmäßige Verteilung der Veränderungen. Alle morphologischen Abweichungen wurden den nicht embryonierten Eiern zugerechnet.

Ein Teil der mit Neopredisan 135–1 behandelten Eiern unterschied sich von den unbehandelten Eiern der Kontrollgruppe. Andere „desinfizierte“ Eier veränderten sich morphologisch nicht. Sie behielten das Aussehen nicht embryonierter Eier auch nach abgeschlossener Bebrütungsdauer bei.

Nach erfolgter Desinfektion konnte Vakuolenbildung beobachtet werden. Es zeigten sich eine oder mehrere Vakuolen verschiedener Größe. Einige Eier beinhalteten nur eine Vakuole, welche mehr als 1/3 des Innenraums einnahm. In andere Dauerstadien hatten sich so viele kleine Vakuolen gebildet, dass der Inhalt schaumig wirkte. Die Vakuolenbildung ist in Bild 5.1a deutlich zu sehen. Abb. 5.1b zeigt ein Ei mit geschrumpfter Embryonalmasse. Diese Veränderung wurde selten beobachtet.



Abb. 5.1: a) *Trichuris muris*-Ei mit blasigen Degenerationserscheinungen 34 Tage nach 120 minütiger Desinfektion mit Neopredisan 135–1. b) Degeneriertes *Trichuris muris*-Ei 34 Tage nach 90 minütiger Desinfektion mit Neopredisan 135–1.

Atypische Teilungsvorgänge wurden häufiger festgestellt. Es entstanden zwei oder mehr kugelige Gebilde im Inneren des Eis.

Das in Abbildung 5.2 gezeigte Ei wurde in seiner Weiterentwicklung gestoppt.



Abb. 5.2: Nicht entwickeltes Ei von *T. muris* 34 Tage nach 90 minütiger Desinfektion mit Neopredisan 135-1.

Wie Abbildung 5.3 verdeutlicht, lagen verschiedene Degenerationsformen und morphologisch normal entwickelte Larven nebeneinander vor.



Abb. 5.3: Nicht embryonierte *T. muris*-Dauerstadien 34 Tage nach 90 minütiger Desinfektion mit Neopredisan 135-1.

Zur Beurteilung des Desinfektionserfolges wurden die Anforderungen, welche die DVG-Richtlinien an ein Desinfektionsmittel gegen Spulwurmeier stellen, herangezogen. Die DVG-Richtlinien fordern folgendes:

„Zur Eintragung in die Liste geprüfter Desinfektionsmittel für die Tierhaltung müssen im Suspensionstest wenigstens 98%, im Keimträgertest wenigstens 95% der *Ascaris suum*-Eier nach 120 Minuten langer Einwirkzeit in ihrer Entwicklung gehemmt sein.“

Dieser Anspruch wird in allen an *T. muris*-Eiern durchgeführten Versuchen erfüllt. Für die Versuche mit einer 2% igen Gebrauchskonzentration ergaben sich in Tabelle 5.1 dargestellten Ergebnisse.

	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
abs. ER [%] 120 Min.	1,84	0,34	1,50
rel. ER [%] 120 Min.	1,97	0,37	1,59
Wi [%] 120 Min.	98,03	99,63	98,41

Tab. 5.1: Embryonierungsraten in den Desinfektionsversuche an Dauerstadien von *T. muris* mit Neopredisan 135-1 mit einer Anwendungskonzentration von 2% und 120 minütiger Einwirkzeit.

Somit ist eine Entwicklungshemmung von wenigstens 98% in allen Fällen erreicht. Stellt man die absoluten Embryonierungsraten aller Versuche mit einer 2% igen Lösung dar, so zeigen sie alle einen ähnlichen Verlauf wie in Abbildung 5.4 zu sehen ist.

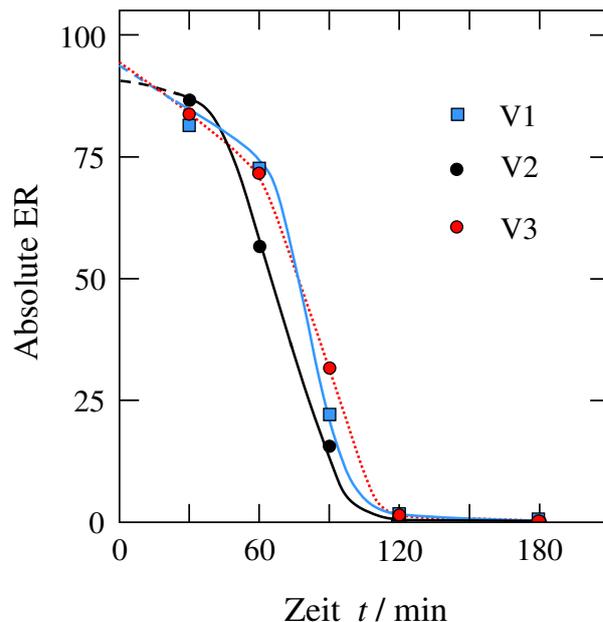


Abb. 5.4: Absolute Embryonierungsraten aller Versuche mit Neopredisan 135-1 mit einer Konzentration von 2%.

Anfänglich nimmt die Embryonierungsrate nur wenig ab. In dieser Periode werden die am wenigsten resistenten Eier in ihrer weiteren Entwicklung gehemmt. Bei zunehmender Expositionsdauer der Dauerstadien verringert sich der Anteil entwicklungsfähiger Eier stark. Besonders ausgeprägt ist dies nach einer Einwirkdauer von 60 Minuten. Vermutlich wird nun die Lipidschicht der Eier überwunden und Neopredisan 135–1 kann im Inneren der Eis seine Wirkung entfalten. Nach 120 Minuten Desinfektionsdauer sind nur noch wenige Eier in der Lage eine Weiterentwicklung zu vollziehen.

Die Richtlinien besagen, dass die Embryonierungsrate der Kontrollansätze mindestens 90 % betragen sollte. Diese Anforderung wird den Versuchen mit einer Anwendungskonzentration von 2 % erfüllt.

	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
abs. ER [%] Kontrolle	93,30	90,67	94,17

Tab. 5.2: Embryonierungsraten der Kontrollansätze der Desinfektionsversuche an Dauerstadien von *T. muris* mit Neopredisan 135–1 mit einer Anwendungskonzentration von 2 %.

Der mit einer 1 % igen Lösung durchgeführte Desinfektionsversuch erbrachte ebenfalls eine ausreichende Entwicklungshemmung. So wurden nach einer Einwirkdauer von 120 Minuten 99,22 % an ihrer Weiterentwicklung gehindert. Allerdings lag hier die Embryonierungsrate des nicht mit Desinfektionsmittel behandelten Kontrollansatzes mit 85,67 % unter den in den Richtlinien erwähnten 90 %. Eine Rate von 85,50 % wurde am 34. Tag nach erfolgter Desinfektion ermittelt. Da die Rate so niedrig schien, wurden eine erneute Auszählungen von je 300 Eiern der nicht desinfizierten Kontrollgruppe am 35. und am 37. Tag durchgeführt. Da auch am 37. Tag kein deutlicher Anstieg beobachtet wurde, erfolgte nun die Ermittlung des Desinfektionserfolges. Da die relative Embryonierungsrate die absolute Embryonierungsrate der Kontrolle miteinrechnet, kann die Desinfektionsleistung nach 120 Minuten dennoch als gut gemäß der Richtlinien bewertet werden. Die in diesem Versuch verwendeten Eier schienen weniger vital als die Eier in den zuerst durchgeführten Versuchen mit der 2 %igen Neopredisan–135–1–Lösung zu sein. Vergleicht man die Embryonierungsraten, so nimmt der Anteil an weiterentwicklungsfähigen Eiern bei dem Versuch mit der 1 %igen Anwendungskonzentration schneller ab als bei den Versuchen, die mit der 2 %igen Konzentration erfolgten. Auch zeigten die Eier niedrigere Embryonierungsraten, obwohl sie einer geringeren Konzentration Desinfektionsmittel ausgesetzt waren. Schon nach 60 minütiger Desinfektionsdauer entwickelten sich nur noch 32,00 % weiter. Bei den zuerst durchgeführten Versuchen mit einer Anwen-

dungskonzentration von 2 % waren dies im Schnitt mit 67,06 % mehr als doppelt so viele, selbst die niedrigste absolute Embryonierungsrate im zweiten Versuch betrug mit 56,56 % deutlich mehr. Die für die Desinfektionsversuche verwendeten *Trichuris*-Eiern wurden für alle Versuche aus dem Kot der gleichen Mäuse während einer Ausscheidungsperiode gewonnen.

Mit den „desinfizierten“ Eiern des zweiten Versuchansatzes mit Neopredisan 135–1 in einer Enkonzentration von 2 % wurde ein Infektionsversuch an Balb/c Mäusen durchgeführt. Die Eier der nicht desinfizierten Kontrollgruppe führten zu einer Infektion, die Tiere schieden Dauerstadien im Kot aus. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Eier nach 35 Tagen bei Raumtemperatur infektiös waren. Auch die Tiere, welche *Trichuris*-Eier erhielten, die 30 Minuten mit Neopredisan 135–1 desinfiziert worden waren, begannen mit dem Kot Eier auszuscheiden. Erhielten die Mäuse Dauerstadien, welche dem Desinfektionsmittel länger als 30 Minuten ausgesetzt worden waren, so konnten keine Eier im Kot nachgewiesen werden. Nach einer 60 minütigen Desinfektionszeit enthielten nach 35 Tagen 56,67 % der Eier des zweiten Versuchansatzes larvale Stadien. Bei einer Infektionsdosis von annähernd 450 *Trichuris*-Eiern entspricht dies ungefähr 255 weiterentwickelten Eiern. Tabelle 5.3 zeigt die ungefähre Anzahl der embryonierten Eier, welche eine Maus im Rahmen des Infektionsversuches erhielt und den Infektionserfolg.

	Kontrolle	30 Min.	60 Min.	90 Min.	120 Min.	180 Min.
abs. ER [%]	90,67	86,67	56,67	15,67	0,34	0,00
Embry. Eier/ Infektionsdosis	408	390	255	70	2	0
Eier im Kot nachweisbar	ja	ja	nein	nein	nein	nein

Tab. 5.3: Infektionsversuch mit den Eiern der zweiten Versuchansatzes mit *Trichuris muris*-Eiern

WAKELIN (1973) infizierte im Rahmen seiner Versuche Mäuse sowohl mit 10, 100 als auch 1000 Eiern. Als die Tiere 14 Tage p.i. getötet wurden, konnten in allen Mäusen Larven gefunden werden.

Demnach hätte eine Infektion mit 250 embryonierten Eiern und eine Behandlung mit Prednisolon zu einer Infektion der Mäuse mit anschließender Eiauscheidung führen können. Da dies nicht der Fall war, wurden die Dauerstadien soweit geschädigt, dass sie im Wirt nicht zu einer patenten Infektion führten. Dies wirft die Frage auf, ob eine Einteilung in embryoniert / nicht embryoniert nur auf Grund lichtmikroskopi-

scher Untersuchung sinnvoll ist, denn embryoniert lässt nicht auf Entwicklungsfähigkeit rückschliessen. Diese Fragestellung wurde nicht weiter untersucht, auch ist ein durchgeführter Infektionsversuch zu wenig um sichere Aussagen machen zu können. 1997 wurde Neopredisan 135–1 durch das Labor Dr. Böse, Hildesheim, an *A. suum*-Eier in Anlehnung an die DVG-Richtlinien getestet (persönliche Mitteilung Menno Chemie-Vertriebsges.M.B.H). Es erfolgte die Prüfung im Suspensions- und im Keimträgertest. Untersucht wurde eine Endkonzentration von 2 % und 3 %. Hierfür wurde Neopredisan 135–1 in 1,11 facher Konzentration angesetzt. Dann wurden 0,9 ml der Desinfektionsmittellösung mit 0,1 ml Eispension gemischt. Dieses Verfahren wurde gewählt, da die Experimentatoren bei vorangegangenen Versuchen die Erfahrung gemacht hatten, dass es bei Ansatz der doppelten Anwendungskonzentration zur Ausfällung der aktiven Substanzen kommen kann.

Von mir wurde das Desinfektionsmittel unmittelbar vor dem Suspensionstest in doppelter Anwendungskonzentration angesetzt. In den wenigen Minuten, die bis zur Mischung mit der Eispension vergingen, konnte ich visuell keine Veränderung der Desinfektionslösung feststellen. Während der Versuche kam es trotz ständiger Bewegung der Desinfektions-Eispensionsmischung durch den Wipptisch zur Bildung eines braunen Bodensatzes, welcher durch leichtes Schwenken der Petrischalen mit der Hand wieder aufgelöst werden konnte. Da dies auch bei dem Kontrollansatz auftrat, gehe ich davon aus, dass dieser Satz vorherrschend aus Kotpartikeln bestand, allerdings wurde dies nicht nachgeprüft.

Nach einer 20 tägigen Bebrütung der Platten bei 25 °C wurden jeweils 300 Eier pro Ansatz mit 200 facher Vergrößerung beurteilt. Der durchgeführte Suspensionstest führte zu folgenden, in Tabelle 5.4 angeführten, Ergebnissen:

	30 Min.	60 Min.	90 Min.	120 Min.	180 Min.	240 Min.
Wi [%], 2%ige K.	58	83	87	100	100	100
Wi [%], 3%ige K.	100	100	100	100	100	100

Tab. 5.4: Wirksamkeit von Neopredisan 135–1 in 2 % und 3 %iger Anwendungskonzentration an *A. suum*-Eiern im Suspensionsversuch durchgeführt durch das Labor Dr. Böse

Ebenfalls 1997 erfolgten Desinfektionsversuche an Eiern der Gattung *Heterakis* durch das Institut für Parasitologie und Zoologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien (persönliche Mitteilung Menno Chemie-Vertriebsges.M.B.H). Es wurde sowohl ein Suspensionstest als auch ein Infektionsversuch mit „desinfizierten“ Eiern durchgeführt. Die für den Desinfektionsversuch benötigten Eier wurden aus dem Kot infizierter Tiere gewonnen. Es wurden verschiedene Einwirkzeiten und Desinfektionsmit-

telkonzentrationen im Doppelsatz mit ca. 20 Eiern getestet. Die „desinfizierten“ Eier wurden mit Leitungswasser gewaschen, zur Weiterentwicklung bei Raumtemperatur inkubiert und täglich belüftet. Nach 22 Tagen hatten sich im Durchschnitt in 91 % der unbehandelten Eier der Kontrollansätze Larven entwickelt und die Beurteilung der mit Neopredisan 135–1 behandelten Ansätze erfolgte. Bei einer Konzentration von 0,25 % wurde zwar Segmentation aber keine Larve beobachtet, ebenso bei Verwendung einer 1 % igen Lösung. Wurde die Konzentration auf 2 % erhöht, war keine Segmentation mehr zu beobachten und die Eier zeigten Deformation.

Für den Infektionsversuch wurden Eier bei Raumtemperatur inkubiert, dann wurden die infektiöse Eier zwei Stunden mit 2 % iger Lösung desinfiziert. Darauf erfolgte eine Infektion von jeweils vier einwöchigen Küken mit ca. 50 dieser Eiern. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten nicht „desinfizierte“ Dauerstadien. Bei den Tieren, welche die mit Neopredisan 135–1 behandelten Eier erhielten, konnten im Gegensatz zu den Tieren der Kontrollgruppe weder Eier im Kot, noch Würmer im Darm nachgewiesen werden.

So zeigt sich hinsichtlich der Wirksamkeit des Desinfektionsmittels an den Dauerstadien der verschiedenen Würmer nach den für die Beurteilung nach DVG–Richtlinien relevanten 120 Minuten folgendes Ergebnis:

	Wi[%] 120 Minuten
<i>A. suum</i>	100
<i>Heterakis ssp.</i>	100
<i>T. muris</i>	99

Tab. 5.5: Wirksamkeit des Desinfektionsmittels Neopredisan 135–1 2 %iger Konzentration nach einer Einwirkdauer von 120 Minuten an unterschiedlichen Dauerstadien im Suspensionstest. Durchschnittliche Wirksamkeit von drei an *T. muris* durchgeführten Versuchen.

5.2.2 *Aspiculuris tetraptera*

Der erste Desinfektionsversuch wurde mit einer 2 %igen Anwendungskonzentration durchgeführt. Nach Literaturangaben beginnen die weiblichen Würmer ab dem 24 Tag p.i. mit der Eiablage. In meinem Versuch vergingen 27 Tage bis zum ersten Auftreten von Eiern im Kot. Es konnten sowohl bei den Mäusen, welche die „unbehandelten“ Eier der Kontrollgruppe erhielten, als auch bei den Tieren, die mit Eier infiziert wurden, welche 30 Minuten lang dem Desinfektionsmittel ausgesetzt worden waren, Eier im Kot nachgewiesen werden. Hatten die Mäuse die länger „desinfizierten“ Dauerstadien erhalten, so konnten keine Eier im Kot nachgewiesen werden.

Somit konnte ab einer Einwirkzeit von mindestens 60 Minuten eine patente Infektion verhindert werden. Nach Literaturangaben beginnen die weiblichen Würmer ab dem 24 Tag p.i. mit der Eiablage.

Um eine gesicherte Aussagen machen zu können, reicht jedoch ein Versuch nicht aus. Der darauffolgende Versuch mit einer 1%igen Lösung führte zu einem unklaren Ergebnis. Die Zeit, welche bis zu einer Eiausscheidung verging, betrug 49 Tage. Eine Beschreibung einer solch langen Präpatenz konnte in der Literatur nicht gefunden werden. Somit liegt die Vermutung nahe, dass die Eiausscheidung nicht auf der von mir durchgeführten experimentellen Infektion der Mäuse beruht. Wahrscheinlich infizierten sich die Tiere durch Eier aus der Umwelt, obwohl sich in dem Raum, in dem die Tiere untergebracht waren keine *A. tetraptera* positiven Tiere befanden. Allerdings wird *A. tetraptera* wie im Literaturteil angeführt leicht innerhalb einer Tierhaltung verbreitet. Somit brachte dieser Versuch keine verwertbaren Ergebnisse.

5.2.3 Schlussfolgerung

Die Desinfektionswirkung von Neopredisan 135–1 an *T. muris*-Eiern entspricht in einer Anwendungskonzentration von 2% den von der DVG gestellten Anforderungen. In den Versuchen wurde sowohl eine ausreichende Embryonierungsrate der Eier der Kontrollgruppe, als auch eine gute Wirksamkeit nach einer Desinfektionszeit von 120 Minuten erreicht. Diese Ergebnisse konnten in drei Versuchen bestätigt werden.

In dem Suspensionsversuch mit einer 1%igen Lösung an *T. muris*-Eiern lag die absolute Embryonierungsrate der Kontrollgruppe unter den gewünschten 90%, allerdings entsprach die Wirksamkeit nach einer Desinfektionszeit von 120 Minuten mit 99,22% den Forderungen der DVG.

Bei einer Anwendungskonzentration von 2% reichte in den Infektionsversuchen mit *T. muris*- und *A. tetraptera*-Eiern eine 60 minütige Einwirkzeit aus, um eine patente Infektion der Mäuse zu verhindern. Im Versuch mit *T. muris* betrug die relative Embryonierungsrate nach einer Desinfektionsdauer von 60 Minuten 56,67%. Dies entspricht einer Anzahl von ca. 255 embryonierten Eiern, welche nicht zu einer patenten Infektion der Mäuse führten. Somit waren die in den Eiern morphologisch normal entwickelten Larven so geschädigt, dass sie sich nicht zu adulten, eierlegenden Würmern weiter entwickeln konnten.

Auf Grund der Versuchsergebnisse ist Neopredisan 135–1 gut geeignet um eine Infektion von Mäusen durch *T. muris*- und *A. tetraptera*-Dauerstadien zu verhindern. Vermutlich besteht eine ähnlich gute Wirkung von Neopredisan 135–1 auch gegen die Eier von *S. obvelata*, da der Aufbau der Eischale sehr ähnlich ist.

6. Zusammenfassung

In Anlehnung an die von der DVG erstellten Richtlinien zur Desinfektionsmittelprüfung erfolgte die Testung des Desinfektionsmittels Neopredisan 135–1, Wirkstoff Preventol CMK (p-Chlor-m-kresol), im Suspensionsversuch. Als Testobjekt dienten die Dauerstadien von *Trichuris muris*.

Die benötigten Wurmeier wurden aus dem Kot experimentell infizierter Mäuse gewonnen. Da unter natürlichen Verhältnissen eine kontinuierliche, aber nur geringgradige Eiausscheidung erfolgt, wurden Balb/c Mäuse zunächst mit Prednisolon immun-supprimiert. Dadurch wurde eine weitaus höhere Eiausscheidung erzielt.

Die Beurteilung des Embryonierungsgrades der Eier erfolgte lichtmikroskopisch nach angemessener Bebrütungsdauer. Es wurden pro Versuchansatz jeweils 300 Eier einer Kontrollgruppe sowie je 300 Eier nach 30, 60, 90, 120 und 180 minütiger Desinfektionsdauer begutachtet.

In der vom Hersteller gegen Wurmeier angegebenen Anwendungskonzentration von 2 % wurde nach der zur Bewertung der Wirksamkeit herangezogenen Einwirkzeit von 120 Minuten in drei Versuchsansätzen eine durchschnittliche Wirksamkeit von 99 % erzielt. Tiere, die Eier erhielten, die länger als 30 Minuten dem Desinfektionsmittel ausgesetzt worden waren, zeigten keine Eiausscheidung.

Ein Suspensionstest wurde mit einer Anwendungskonzentration von 1 % durchgeführt. Hierbei wurde nach 120 Minuten Desinfektionszeit ebenfalls eine Wirksamkeit von 99 % ermittelt.

Für die Überprüfung der Wirksamkeit von Neopredisan 135–1 auf *Aspiculuris tetraptera*-Eier wurde ein anderer Weg gewählt, da ein Teil der Eier zum Zeitpunkt der Eigewinnung aus dem Kot bereits embryoniert war. Es erfolgte ein Infektionsversuch nach Desinfektion der Eier mit 2 % iger Lösung und angemessener Embryonierungsdauer. Die Tiere der Kontrollgruppe und die Tiere, die Wurmeier erhielten, welche 30 Minuten „desinfiziert“ worden waren, schieden in der Folge Eier aus. Eier, die mindestens 60 Minuten dem Desinfektionsmittel ausgesetzt worden waren, führten nicht mehr zu patenten Infektionen mit Eiausscheidung.

Somit konnte im Rahmen der Versuche die gute Wirksamkeit des Desinfektionsmittels Neopredisan 135–1 gegen die getesteten Wurmeier nachgewiesen werden.

Summary

Study of the efficiency of Neopredisan 135-1 via the investigation of resting stages of *Aspiculuris tetraptera* and *Trichuris muris*

Following the DVG guidelines for the testing of disinfectants, experiments in suspension were carried out in order to study the efficiency of Neopredisan 135-1 with Preventol CMK (p-chlorine-m-cresol) as active ingredient. In these investigations eggs of *Trichuris muris* were used as testing objects.

The worm eggs for the testing runs were extracted from the excrement of experimentally infected mice. Under natural conditions a continuous but only a rather low egg release is obtained. The immunity of Balb/c mice was thus suppressed by the application of Prednisolon. In this way a considerably higher egg release could be achieved.

After an appropriate breeding time, the development of the eggs was studied via inspection with a light microscope. In each run 300 eggs of a control group were assessed together with 300 eggs that had been disinfected for 30, 60, 90 120 and 180 minutes, respectively.

A disinfectant solution containing 2% Neopredisan 135-1, as proposed by the manufacturer, was applied for 120 minutes. An average efficiency of 99% was obtained in three runs. Animals infected with eggs which had been exposed to the disinfectant for more than 30 minutes did not exhibit any egg release.

One suspension test was carried out with a concentration of 1%. The effectiveness after a disinfection time of 120 minutes was also found to be 99%. Animals infected with eggs which were exposed for more than 30 minutes to disinfectant did exhibit egg release.

To test the efficiency of Neopredisan 135-1 against the eggs of *Aspiculuris tetraptera* we chose a different approach because some the eggs were already embryonated at the time the eggs were extracted from the mouse excrement. An infection test was performed with eggs which were disinfected with a 2% solution and an appropriate duration of embryonation. Both, the animals of the control group and the animals with eggs that had been „disinfected“ for 30 minutes excreted eggs. However, eggs that had been exposed to the disinfectant for at least 60 minutes did not lead to a patent infection with egg release.

In conclusion, the high effectiveness of the disinfectant Neopredisan 135-1 against worm eggs could be verified.

7. Literaturverzeichnis

Adamson, M.L (1984a):

Haplodiploidy in *Aspiculuris tetraptera* (Nitsch) (Heteroxyematidae) and *Syphacia obvelata* (Rudolphi) Oxyuridae, nematode (Oxyurida) parasites of *Mus musculus*.

Canad. J. Zool. 62, 804–807

Anderson R.C. (2000):

Nematode Parasites of vertebrates. Their development and transmission. 2nd edition.

Wallingford: CABI Publishing

Anya, A.O. (1965):

Physiology of infection with oxyurid parasites: development and hatching of eggs.

Parasitology 55, 12–13

Anya, A.O. (1966)

Studies on the biology of some oxyurid nematodes:

II. The hatching of eggs and development of *Aspiculuris tetraptera* Schulz, within the host.

J. Helminthol. 40 (3), 261–268

Baker D.G.(Hrsg.) (2003):

Natural pathogens of laboratory animals. Their effects on research

Washington D.C.: ASM Press

Bazzano T. et al (2002):

Patterns of infection with the nematodes *Syphacia obvelata* and *Aspiculuris tetraptera* in conventionally maintained laboratory mice.

Mem. I. Oswaldo Cruz 97 (6), 847–853

Beattie G.M. et al (1981):

Induction of T- and B-lymphocyte responses in antigenically stimulated athymic mice.

Cancer Res. 41 (6), 2322–2327

Blackwell N.M., Else K.J. (2001):

B Cells and Antibodies are required for resistance to the parasitic gastrointestinal nematode *Trichuris muris*.

Infect. Immun. 69 (6), 3860–3868

Bieniek H., Tober-Meyer B. (1976):

Zur Ätiologie der Colitis und des Prolapsus recti bei der Maus.

Z. Versuchstierkd. 18, 337–348

Campbell W.C. (1963):

Spontaneous cure in *Trichuris muris* infections in albino mice and its suppression by cortisone.

J. Parasitol. 49 (4), 628–623

Chan K.F. (1952):

Life cycle studies on the nematode *Syphacia obvelata*.

Amer. J. Hyg. 56 (1), 14–21

Chan K.F., Kopilof S. (1958):

The susceptibility of two strains of white mice to *Syphacia obvelata* infections.

J. Parasitol. 44 (4, Section1), 451–452

Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (2000):

Desinfektionsmittelrichtlinien, 3 Aufl.

DVG-Verlag

Dix J. et al (2004):

Assessment of methods of destruction of *Syphacia muris* eggs.

Lab. Anim. 38 (1), 11–16

Eaton G.J. (1972):

Intestinal helminths in inbred strains of mice.

Lab. Anim. Sci. 22 (6), 850–853

Else K.J., DeSchoolmeester L.M.(2003):

Immunity on *Trichuris muris* in the laboratory mouse.

J. Helminthol. 77,(2), 95–98

Enigk K. (1947):

Die Desinfektion bei Spulwurm- und Kokzidienbefall.

Deut. Tierärztl. Woch. 54, 86–89

Enigk K. (1979):

Resistenz der Dauerformen von Endoparasiten der Haustiere.

Berl. Münch. Tierärztl. 92, 491–497

Fahmy M.A.M. (1954):

An investigation on the life cycle of *Trichuris muris*.

Parasitology 44 (1–2), 50–57

Frey H.H., Löscher W. (Hg) (2002)

Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin.

Stuttgart: Enke Verlag

Flynn R. (1973):

Parasites of laboratory animals. 1st ed.

Iowa State Pr.

Gesellschaft für Versuchstierkunde–Society for Laboratory Animal Science

URL: <http://www.GV-SOLAS.de>

Ghiglietti R. et al (1995):

Viability of *Ascaris suum*, *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris muris* eggs to alkaline pH and different temperatures .

Parassitologia 37 (2–3), 229–232

Hasslinger M.A., Wiethe T. (1987):

Zum Oxyurenbefall kleiner Labortiere und seiner Bekämpfung mit Ivermectin.

Tierärztl. Prax. 15, 93–97

Hiepe T. et al (1985):

Untersuchungen zur Desinfektion gegen exogene Parasitenstadien–Entwicklung eines Keimträgermodells.

Monatsh. Veterinärmed. 40, 191–194

Hoag W.G. (1961):

Oxyuriasis in laboratory mouse colonies.

Am. J. Vet. Res. 22, 150–153

Hsü K.C. (1951):

Experimental studies on egg development, hatching and retroinfection in *Aspiculuris tetraptera*.

J. Helminthol. 25, 131–160

Hussey K.L. (1957):

Syphacia muris vs. *S. obvelata* in laboratory rats and mice.

J. Parasitol. 43 (5), 555–559

Hüttemann M. (2004):

Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Entwicklungsstadien von *Angiostrongylus cantonensis* und *Trichuris muris* (Nematodes).

Düsseldorf: Heinrich–Heine–Universität, Mathematische–Naturwissenschaftliche Fakultät, Diss.

Jettmar H.M., Exner H. (1951):

Thermoresistenzversuche an Ascaris- und Trichuriseiern.

Arch. Hyg. 134 (3), 173–186

Johnston C.E. et al (2005):

Isolates of *Trichuris muris* elicit different adaptive immune responses in their murine host.

Parasite Immunol. 27, 69–78

Keeling J.E.D. (1961):

Experimental trichuriasis I. Antagonism between *Trichuris muris* and *Aspiculuris tetraptera* in the albino mouse.

J. Parasitol. 47, 641–646

Kellogg H.S., Wagner J.E. (1982):

Experimental transmission of *Syphacia obvelata* among mice, rats, hamsters, and gerbils.

Lab. Anim. Sci. 32 (5), 500–501

Klement P. et al (1996):

An oral ivermectin regime that eradicates pinworms (*Syphacia* spp.) in laboratory rats and mice.

Lab. Anim. Sci. 46 (3) 286–290

Larsen R. (1955):

Über die Wirksamkeit des Desinfektionsmittels Euphagol VA auf Askariden- und Trichostrongyliden-Eiern.

Gießen: Justus–Liebig–Universität, Fachbereich Veterinärmedizin, Diss.

Lipman N.S. et al (1994):

Eradication of pinworms (*Syphacia obvelata*) from a large mouse breeding colony by combination oral anthelmintic therapy.

Lab. Anim. Sci. 44 (5), 517–520

Lübcke R. et al (1992):

Impaired intestinal electrolyte transport in rats infested with the common parasite *Spyphacia muris*.

Dig. Dis. Sci. 37 (1), 60–64

Lünsmann W. (1972):

Laboratoriumsuntersuchungen über die Widerstandsfähigkeit dünn- und dickschaliger Nematodeneier gegenüber differenten Umweltbedingungen (Temperatur, Sauerstoffabschluß, Trockenheit).

München: Ludwig—Maximilians—Universität, Tierärztliche Fakultät, Diss.

Mahida Y.R. (2003):

Host-parasite interactions in rodent nematode infections.

J. Helminthol. 77 (2), 125–131

Mathies A.W. (1959):

Certain aspects of the host-parasite relationship of *A.tetraptera*, a mouse pinworm.

I. Host specificity and age resistance.

Exp. Parasitol. 8 (19), 31–38

Maeß J., Kunstyr I. (1981):

Diagnose und Bekämpfung häufiger Parasiten bei Versuchstieren.

Tierärztl. Prax. 9 (2), 259–264

McNair D.M., Timmons E.H. (1977):

Effects of *Aspiculuris tetraptera* and *Syphacia obvelata* on exploratory behavior of an inbred mouse strain.

Lab. Anim. Sci. 27 (1), 38–42.

Metzler A. (2002):

Vorlesungsskript Prophylaktische Tiermedizin, Reinigung und Desinfektion der Universität Zürich WS 2002/2003

Mullink J.W.M.A. (1970):

Pathological effects of oxyuriasis in the laboratory mouse.

Lab. Anim. 4 (2), 197–201

Neuser V.(1974a):

Beiträge zur Morphologie, Anatomie und Biologie von *Aspiculuris tetraptera* (Schulz).

Z. Parasitenk. 43(3), 151–168

Neuser V. (1974b):

Rhythmus der Eiproduktion bei *Aspiculuris tetraptera* (Schulz).

Z. Parasitenk. 43 (3), 169–180

Nicklas W. et al. (1984):

Erfahrungen mit Fenbendazol bei der Therapie von Oxyureninfektionen in einem Versuchstierbestand.

Berl. Münch. Tierärztl. Wsch. 97 (1), 21–24

Pakes S.P., Benirschke K. (1971)

Diseases of laboratory animals complicating biomedical research.

Am. J. Pathol. 64, 624–769

Pearson D.J., Taylor G. (1975):

The influence of the nematode *Syphacia obvelata* on adjuvant arthritis in rats.

Immunol. 29 (2), 391–396

Panesar T.S. (1989):

The moulting pattern in *Trichuris muris* (Nematoda: Trichuroidea).

Can. J. Zool. 67 (9), 2340–2343

Pavlov P. et al (1959):

Untersuchungen über die Wirkung von o-Kresol auf Askarideneier.

Berl. Münch. Tierärztl. 72, 224–225

Philipps R. (1980):

Desinfektionsversuche an Parasitendauerformen.

Hannover: Tierärztliche Hochschule, Diss.

Philipot F. (1924):

Notes on the eggs and early development of some species of Oxyuridae.

J. Helminthol. (2), 239–252

Reber H. (1972):

2. Internationales Colloquium über die Wertbestimmung von Desinfektionsmitteln in Europa.

Zbl. Bakt. Myk. Hyg. I C. 157, 1–147

Rajasekariah G.R. et al (1991):

Response of pre-adult and adult stages of *Trichuris muris* to common anthelmintics in mice.

Int. J. Parasitol. 21 (6), 697–702

Sander S. (2000):

Versuche zur Etablierung eines Dekontaminationstests an Eiern von *Ascaris suum*.
Hannover: Tierärztliche Hochschule, Diss.

Sato Y. et al. (1995):

Antibody production in *Syphacia obvelata* infected mice.
J. Parasitol. 81 (4), 559–562

Schreier C., Speck J. (1966):

Desinfektionsmaßnahmen in Geflügelbetrieben.
Tierärztl. Umschau 21, 572–575

Strauch D., Böhm R. (2002):

Reinigung und Desinfektion in der Nutztierhaltung und Veredelungswirtschaft.
Stuttgart: Enke Verlag

Taffs L.F. (1976):

Pinworm infections in laboratory rodents: a review.
Lab. Anim. 10 (1), 1–13

Thienpont D., Rochette F., Vanparijs O.F.J (1990):

Diagnosen von Helminthosen durch koproskopische Untersuchung. 2te Aufl.
Belgien: Jansen research foundation Beerse

van der Gulden W.J. , van Erp A.J. (1972):

The effect of paracetic acid as a disinfectant on worm eggs.
Lab. Anim. Sci. 22 (2), 225–226

von der Heide G. (1973):

Ausarbeitung standardisierter labormäßiger Prüfmethode für parasitizide Desinfektionsmittel.

Hannover: Tierärztliche Hochschule, Diss.

Wagner M. (1988):

The effect of infection with the pinworm (*Syphacia muris*) on rat growth.
Lab. Anim. Sci. 38 (4), 476–478

Wakelin D. (1967):

Acquired immunity to *Trichuris muris* in the albino laboratory mouse.
Parasitology 57 (3), 515–524

Wakelin D. (1969):

Studies on the immunity of albino mice to *Trichuris muris*.

The stimulation of immunity by chemically abbreviated infections.

Parasitology 59 (3), 549–555

Wakelin D. (1970):

Studies on the immunity of albino mice to *Trichuris muris* Suppression of immunity by cortisone acetate.

Parasitology 60 (2), 229–237

Wakelin D. (1973):

The stimulation of immunity to *Trichuris muris* in mice exposed to low-level infections.

Parasitology 66 (1), 181–189

Wharton D.A. (1979 a):

Oogenesis and egg–shell formation in *Aspicularis tetraptera* Schulz (Nematoda: Oxyuroidea).

Parasitology 78 (2), 131–143

Werner H.P. in **Frey H.H., Löscher W.** (Hg) (2002)

Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin.

Stuttgart: Enke Verlag

Wharton D.A. (1979 b):

The structure of the egg–shell of *Aspicularis tetraptera* Schulz (Nematoda: Oxyuroidea).

Parasitology 78 (2), 145–154

Wharton D.A. (1980):

Nematode egg–shells.

Parasitology 81 (2), 447–463

Zenner L. (1998):

Effective eradication of pinworms (*Syphacia muris*, *Syphacia oblevata*, *Aspicularis tetraptera*) from a rodent breeding colony by oral antihelminthic therapy.

Lab. Anim. 32 (3), 337–342

Zeitschriftentitelabkürzungen gemäß : Institute for Scientific Information (ISI)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. E. Schein für die Überlassung des Themas und für die Betreuung während der Arbeit bedanken.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der FU Berlin für die fachliche Beratung, die Hilfe bei der Untersuchung der Kotproben und die Versorgung der Versuchstiere, Fr. Katharina Seidl für die technischen Einweisungen und die schönen Aufnahmen.

Ich danke meinen Eltern für die Unterstützung während des Studiums und bei der Erstellung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinem Vater für seine Tätigkeit als Lektor und LaTeX-Berater.

Selbständigkeitserklärung

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

Heidelberg, den 25. August 2007

Kathrin Hunklinger