

3. Material und Methode

3.1 Versuchstiere

Der Infektionsversuch sollte an 48 Ratten und 34 Hausschweinen durchgeführt werden. Es wurde vor Beginn des Versuchs festgelegt, dass dieser Versuch abgebrochen wird, sobald an drei aufeinander folgenden Untersuchungstagen in den Ratten keine Larven mehr gefunden werden.

Infiziert wurden 48 Ratten und weil es zu einem Abbruch des Versuches kam wurden nur 20 der 34 Schweine infiziert. Ebenfalls aufgrund des Versuchabbruchs erfolgte die Durchführung der Untersuchungen nur an 27 Ratten und den 20 Hausschweinen. Die Ratten wurden speziell für Tierversuche gezüchtet und unter üblichen Laborbedingungen, nach Geschlechtern getrennt, im Institut für Parasitologie der FU Berlin gehalten.

Die Schweine, männliche und weibliche Tiere im Alter von 8 bis 10 Wochen, stammten aus einem Zuchtbetrieb und wurden paarweise in vorab desinfizierten Laufboxen mit Stroheinstreu des Instituts für Parasitologie und der Klinik für Klauentierkrankheiten der FU Berlin gehalten. Die Fütterung erfolgte mit einem handelsüblichen Schweinefutter, als Tränke wurde Wasser ad libitum angeboten. Die einzige Ausnahme bildete nur der Infektionstag, da zur besseren Aufnahme das Infektionsmaterial einem Feuchtfutter für Hunde untergemengt wurde.

Der Kot der Schweine wurde mindestens 3 Wochen vor Infektion mittels Flotationsverfahren auf *Ascaris suum*-Eier untersucht, um eine vorhergehende Infektion auszuschließen.

3.2 Infektionsmaterial

Bei Schweineschlachtungen der Hausschlachtereier Ingo Bertram, Dorfstr. 11, 14913 Niedergörsdorf anfallende adulte *Ascaris suum* wurden in 0,9%iger NaCl-Lösung bei 38°C im Brutschrank aufbewahrt. Von den unter diesen Bedingungen mehrere Tage überlebenden Würmern wurden überwiegend reife Eier ausgeschieden. Zur Gewinnung der in der Kochsalzlösung enthaltenen Eier wurden die adulten *Ascaris suum* täglich in frische physiologische Kochsalzlösung umgesetzt und wieder in den Brutschrank zurückgestellt. Die ausgewechselte Kochsalzlösung wurde zur Sedimentation der darin befindlichen Eier über Nacht stehen gelassen und am folgenden Tag bis auf den mit Eiern angereicherten Bodensatz abgegossen.

Die so gewonnenen Eier wurden zur Entfernung der äußeren Muzinschicht in Natriumhypochlorid über einen mehrstündigen Zeitraum auf einem elektrischem Rührgerät gerührt und anschließend 3 bis 4 mal in 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen. Die Sedimentation erfolgte durch Zentrifugation (2 min 1800 U/min).

Nach Resuspension in 1,5%iger Formalinlösung, die unter Zimmertemperatur in halb zugedeckten Petrischalen aufbewahrt wurde, und täglicher Belüftung mittels einer Glaspipette und Pipettierball entwickelten sich in den Petrischalen innerhalb von 40 bis 49 Tagen infektiöse Larven.

Das Zusammenführen mehrerer Chargen ergab eine Suspension von 2100 Eiern / 1,5 ml Wasser.

3.3 Infektionsversuch

Tabelle 2: Versuchsplan für TVV-Reg.-Nr.: 0160/04

Tag	Maßnahme
0	Orale Infektion aller Ratten und 2 Kontrollschweine mit <i>Ascaris suum</i> mittels Knopfkanüle (Ratte) bzw. über das Futter (Schweine)
1 Tag post infectionem	Tötung von 3 Ratten mit Chlorophorm; Untersuchung von jeweils einer Hälfte der Ratten auf Larven von <i>Ascaris suum</i> mittels Verdauung, die anderen Rattenhälften werden zu gleichen Teilen an 2 <i>Ascaris suum</i> -negative Schweine verfüttert
3 Tag post infectionem	siehe 1. Tag p.i.
7 Tag post infectionem	siehe 1. Tag p.i.
10 Tag post infectionem	siehe 1. Tag p.i.
17 Tag post infectionem	siehe 1. Tag p.i.
24 Tag post infectionem	siehe 1. Tag p.i.

31 Tag post infectionem	siehe 1. Tag p.i.
38 Tag post infectionem	siehe 1. Tag p.i.
45 Tag post infectionem	siehe 1. Tag p.i. Tag 45 p.i. war der letzte Tag des Versuches, letztmalig erfolgte hier die Infektion zweier <i>Ascaris suum</i> -negativer Schweine
52 Tag post infectionem	siehe 1. Tag p.i.
59 Tag post infectionem	siehe 1. Tag p.i.
66 Tag post infectionem	siehe 1. Tag p.i.
73 Tag post infectionem	siehe 1. Tag p.i.
80 Tag post infectionem	siehe 1. Tag p.i.
87 Tag post infectionem	siehe 1. Tag p.i.
94 Tag post infectionem	siehe 1. Tag p.i.

Die Infektion der 48 Ratten erfolgte durch Eingabe von 1,5 ml der Eisuspension mittels einer Knopfkanüle direkt in bzw. unmittelbar vor den Mageneingang.

Die Infektion der Schweine 1 und 2 erfolgte über die Zugabe der Eisuspension zum Futter und diente dem Nachweis der Infektiösität der Larven.

In den in Tab. 2 dargestellten Zeitabständen bis einschließlich Tag 45. p.i. wurden jeweils 3 Ratten durch Chloroform getötet und enthäutet. Die Kadaver wurden gewogen, sezirt und Magen, Darm, Lunge, Leber, Milz, Nieren und Herz entnommen. Um die weitere Verarbeitung zu erleichtern und die Verdaulichkeit zu verbessern, wurden die Knochen nach dem Ablösen der Muskulatur verworfen. Die Muskulatur und die Organe wurden einzeln gewogen und zu gleichen Teilen für die Infektion der Schweine und zur Weiterverarbeitung in Verdauungslösung aufgeteilt.

Für die Infektion der Schweine wurde das Infektionsmaterial mittels einer Küchenmaschine (Moulinette) zu einem Brei verarbeitet, in zwei gleiche Portionen abgewogen und anschließend mit Hundefutter vermengt den Schweinen verfüttert.

Verbleibende Organe und Muskulatur wurden, nachdem zuvor mit einem Skapell von Leber und Lunge Proben zur Anfertigung histologischer Schnitte genommen wurden, mit einer Schere zerkleinert und separat in Rührgefäße mit angesetzter Verdauungslösung überführt. Auf Grund der hohen Wahrscheinlichkeit, dass Herz, Niere und Milz nicht von den Larven durchwandert wurden, sind diese Organe stets zu einer Probe zusammengeführt worden.

Die Rührgefäße wurden abwechselnd in den Wärmeschrank bei 38°C und auf heizbare Rührgeräte gestellt, um somit eine schnellere und bessere Verdauung der Organe herbeizuführen.

Die Verdauungslösung wurde nach 90 min durch Gaze gefiltert. Die in der Gaze zurückgehaltenen größeren Organteile wurden mit Wasser abgespült, um eventuell aufliegende Larven noch zu erfassen, und dann verworfen.

Die gewonnene Verdauungsflüssigkeit wurde nach Zugabe einiger Tropfen Lugol'scher Lösung zur Fixierung und Anfärbung der Larven unter einem Binokularmikroskop durchmustert.

3.4 Untersuchung von Kotproben der Schweine

Die Kotproben wurden mit dem Flotationsverfahren auf enthaltene *Ascaris suum*-Eier untersucht.

Dabei werden ca. 3-5 g Kot und das 10-15 fache an Flotationslösung, hier 9% Natrium-Chlorid-Lösung mit einer Dichte von 1,2, in einem geeignetem Gefäß mit einem Spatel oder ähnlichem verrührt. Durch ein Sieb (Maschenweite 500-800µm) wird ein Teil der Suspension in ein Zentrifugenröhrchen gegossen und bei 300g (ca. 2000 U/min) für 3 Minuten zentrifugiert. Anschließend werden mit einer gebogenen Drahtöse (Durchmesser ca. 5 mm) an der Flüssigkeitsoberfläche mehrere Tropfen Flüssigkeit abgenommen und zur mikroskopischen Untersuchung auf einen Objektträger verbracht.

3.5 Schlachtung der Schweine und Untersuchung auf Spulwürmer

Die Schlachtung der Schweine erfolgte in unterschiedlichen Zeitabständen nach der Infektion mit verdauten Ratten. Ausgeführt wurden die Schlachtungen durch die Hausschlachtereier Ingo Bertram, Dorfstr. 11, 14913 Niedergörsdorf. Dabei wurden insbesondere die Lebern makroskopisch auf die typischen bindegewebigen Zubildungen, sog. „milk spots“ untersucht. Auch der Darminhalt wurde makroskopisch auf enthaltene adulte Würmer hin inspiziert.

3.6 Anfertigung und Auswertung histologischer Schnitte

Die Anfertigung der histologischen Schnitte erfolgte im Institut für Veterinärpathologie der FU Berlin. Die Gewebeproben von Lebern und Lungen der Ratten wurden direkt nach der Entnahme in 4%igem Formalin fixiert, um unmittelbar einsetzende autolytische Prozesse zu stoppen. Die fixierten Proben wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und entfettet, um sie anschließend in Paraffin einzubetten. Mittels eines Schlittenmikrotoms (Jung, Heidelberg) angefertigte, 5-7 µm dicke Schnitte, wurden auf Objektträger aufgezogen, luftgetrocknet und im Brutschrank bei 60°C nachgetrocknet. Die getrockneten Präparate wurden in Xylol entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe rehydratisiert und anschließend in Aqua bidest. überführt.

Für die lichtmikroskopische Untersuchung erfolgte die Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach Hansen. Bei dieser Färbung wird aus Hämatoxylin durch Zugabe von Alaun Hämalaun. Die beiden Farbstoffe sind basisch und reagieren mit sauren Bestandteilen der Zelle, z.B. Nukleinsäuren des Zellkerns, und stellen diese blau dar. Eosin enthält vier Brommoleküle; wird das Brom durch Jod ersetzt, entsteht der Farbstoff Erythrosin. Eosin und Erythrosin reagieren mit den basischen Bestandteilen der Zelle, z.B. dem Zytoplasma, und stellen diese rot dar (WEYRAUCH und SMOLLICH, 1998).