

Aus dem Department für Pathobiologie
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

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

Etablierung eines Sporulationshemmtests für *Cystoisospora suis*- Oozysten

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Natalie Reiter

Wien, im Juni 2021

Betreuerin: Univ.Prof. Dr.med.vet. Anja Joachim
Institut für Parasitologie
Department für Pathobiologie
Veterinärmedizinische Universität Wien

BegutachterIn: Dr. med. vet. Lukas Schwarz

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
2.	LITERATURÜBERSICHT	2
2.1.	<i>CYSTOISOSPORA SUI</i> S	2
2.1.1.	Taxonomische Einordnung	2
2.1.2.	Entwicklungszyklus	2
2.1.3.	Morphologie der Oozysten	3
2.1.4.	Epidemiologie	3
2.1.5.	Übertragung und endogene Entwicklung	4
2.1.6.	Pathohistologie, Klinik und Risikofaktoren der Cystoisosporose	4
2.1.7.	Immunität	5
2.1.8.	Diagnose	5
2.1.9.	Therapie und Prophylaxe	6
2.1.9.1.	Hygiene als Prophylaxe	6
2.1.9.2.	Toltrazuril	6
2.1.9.3.	Andere Antikokzidien	7
2.2.	SPORULATIONSBEDINGUNGEN	8
2.2.1.	Umgebungstemperatur	8
2.2.2.	Luftfeuchtigkeit	8
2.2.3.	Desinfektionsmittel	9
2.2.4.	Vergleich mit anderen Parasiten	9
2.3.	ZIEL DER STUDIE	10
3.	TIERE, MATERIAL UND METHODIK	11
3.1.	TIERE UND GRUPPEN	11
3.1.1.	Experimentelle Infektion und Oozystengewinnung	12
3.1.2.	Oozystendetektion	12
3.1.3.	Anreicherung der Oozysten	13

3.2.	ERMITTLUNG DER SPORULATIONSRATE	14
3.3.	STATISTIK	16
4.	ERGEBNISSE	17
4.1.	OOZYSTENAUSSCHIEDUNG.....	17
4.2.	FAECAL SCORING UND DURCHFALL	18
4.3.	BERECHNUNG DER OOZYSTENKONZENTRATION	19
4.4.	SPORULATIONSHEMMTEST	20
5.	DISKUSSION	26
5.1.	HEMMUNG DER SPORULATION.....	26
5.2.	DESINFEKTIONSMITTEL	26
6.	ZUSAMMENFASSUNG	31
7.	SUMMARY	33
8.	LITERATURVERZEICHNIS	34
9.	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	40

Abkürzungen

AF	Autofluoreszenz
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
OpG	Oozysten pro Gramm Kot
SD	Study day
T	Zeitpunkt
WSH	Wasser spezifischer Härte

1. Einleitung und Fragestellung

Cystoisospora suis zählt zu den wichtigsten Erregern von Durchfallerkrankungen beim Saugferkel und stellt oft einen großen wirtschaftlichen Verlust dar. Die Cystoisosporose kommt weltweit sehr häufig vor, dabei spielt es keine Rolle, um welche Art von Betriebsform es sich handelt (Joachim und Shrestha 2020). Die Infektion in einem Wurf erreicht ihren Höhepunkt meist 2-4 Wochen nach der Geburt (Damriyasa und Bauer 2006; Meyer et al. 1999; Niestrath et al. 2002; Stuart et al. 1982b; Wieler et al. 2001; Worliczek et al. 2007). Eine schwedische Studie zeigte jedoch, dass die Infektion auch bis zur sechsten Lebenswoche andauern kann (Pettersson et al. 2019). Die Infektionsrate variiert stark und kann mehr als 80 % der Ferkelwürfe in einem Bestand betreffen, abhängig von der Jahreszeit, dem Hygienemanagement und der Bodenbeschaffenheit (Meyer et al. 1999). Bei älteren Tieren findet keine klinische Manifestation statt, selbst wenn sie höheren Infektionsdosen an Oozysten ausgesetzt waren (Stuart et al. 1982b).

Infektionen können auch in hygienisch gut geführten Betrieben auftreten, die ein etabliertes Rein-Raus-Verfahren haben und dabei auf Sauberkeit und Desinfektion achten. Eine Ursache für die mangelnde Kontrolle trotz Desinfektion ist die Unwirksamkeit von gängigen Desinfektionsmitteln. (Hinney et al. 2020; Martineau und Del Castillo 2000). Desinfektionsmittel, die auf Kresolen basieren, zeigen eine gute Wirksamkeit gegenüber Oozysten von *C. suis*, besonders wenn eine Woche nach dem Abferkeln gereinigt und desinfiziert wird. Eine mehrmalige Desinfektion mit Produkten auf Kresolbasis während der Säugephase scheint aber keine verbesserten Resultate zu erzielen (Straberg und Dausgies 2007).

Die vorliegende Arbeit setzte sich mit den Bedingungen auseinander, unter denen Oozysten von *C. suis* sporulieren können, aber auch an der Sporulation gehemmt werden können. Im Sporulationshemmtest wurde der Einfluss von Temperatur (4 °C bis 40 °C) und Chemikalien untersucht. Eine Hemmung der Sporulationsfähigkeit auf der Ebene der endogenen Stadien über den Einfluss von Futterzusätzen wurde ebenfalls untersucht.

2. Literaturübersicht

2.1. *Cystoisospora suis*

2.1.1. Taxonomische Einordnung

Cystoisospora suis wurde erstmals von Biester und Murray 1934 im Jahr 1934 als neue Kokzidienspezies beim Schwein beschrieben. Zu dem Zeitpunkt wurde der Kokzidiose keine klinische Relevanz beigemessen. Erst um 1980 wurden gehäuft Fälle mit klinischer Symptomatik bekannt (Stuart et al. 1980).

Cystoisospora suis (synonym *Isospora suis*) gehört zum Reich der Protozoa und wird in den Stamm Alveolata (Unterstamm Apicomplexa, Ordnung Eimeriida, Familie Sarcocystidae, Gattung *Cystoisospora*) eingeteilt (Deplazes et al. 2021). Zu den Schwestergattungen von *Cystoisospora* zählen *Neospora*, *Sarcocystis* und *Toxoplasma* (Carreno et al. 1998). In älteren Literaturstellen wurde die Gattung als *Isospora* angesprochen, synonym zur heutigen Gattung *Cystoisospora*. In der Arbeit von Harleman und Meyer (1983) wurde schon erwähnt, dass die Gattung *Cystoisospora* seit 1977 existiert (Frenkel 1977). Heutzutage wird die Saugferkelkokzidiose der Gattung *Cystoisospora* unter der Art *C. suis* angesprochen, da unter der Gattung von *Isospora* nurmehr die entsprechenden Parasiten der Vögel zusammengefasst sind. Da die beiden Gattungen aber grundlegende Unterschiede aufweisen, wurde die Namensgebung *Cystoisospora* vorgeschlagen (Barta et al. 2005).

2.1.2. Entwicklungszyklus

Die Entwicklung von *C. suis* findet intestinal statt, wenn sporulierte Oozysten von Ferkeln aufgenommen wurden. Nachdem die Oozysten den Dünndarm erreicht haben, werden die Epithelzellen von den excystierten Sporozoiten befallen. Die Vermehrung beginnt mit ungeschlechtlicher Vermehrung (Merogonie) gefolgt von geschlechtlicher Vermehrung (Gamogonie), wonach Mikro- und Makrogamonten zur Zygote fusionieren. Die letzte Entwicklungsstufe im Darm wird als Oozyste bezeichnet, welche dann mit dem Kot in die Umwelt ausgeschieden wird, um nach einer weiteren Teilung (Sporogonie) wiederum vom nächsten Ferkel aufgenommen zu werden. Dabei entwickelt sich die Oozyste zum infektiösen Stadium mit zwei Sporozysten, welche wiederum je vier Sporozoiten enthalten. Der gesamte Zyklus dauert 6-7 Tage (Joachim und Shrestha 2020).

2.1.3. Morphologie der Oozysten

Die Oozysten von *C. suis* sind kugelförmig mit einer durchsichtigen, glatten Wand. Durchschnittlich messen sie eine Länge von 19,5 µm und eine Breite von 17,3 µm. Eine sporulierte Oozyste besitzt zwei ellipsoide Sporozysten, welche wiederum vier wurstförmige Sporozoiten enthalten (Vetterling 1965).

2.1.4. Epidemiologie

Die Cystoisosporose ist weltweit verbreitet mit einer hohen Prävalenz bei Saugferkeln (Lindsay et al. 1985; Roepstorff et al. 1998; Wieler et al. 2001). In einer Studie, die im deutschsprachigen Raum durchgeführt wurde, zeigte eine Prävalenz von *C. suis* von 76,2 %. Hier wurden Deutschland (unterteilt in Norden, Süden, Zentral/Osten und Westen), Österreich und die Schweiz untersucht. Praktizierende Tierärzte sendeten insgesamt 1745 Kotproben von 324 Betrieben ein. Der Hauptanteil der Betriebe (93,5 %) hatte bei Ferkeln im Alter von 2-3 Wochen Probleme mit Durchfall, der oft im Zusammenhang mit Kümmern der Tiere stand (Mundt et al. 2005).

Eine andere Studie, die in Skandinavien durchgeführt wurde, zeigt eine Prävalenz der Saugferkelkokzidiose von 20-32 % in Schweden. In Dänemark und Island wurde eine Prävalenz unter 1 % festgestellt und in Norwegen und Finnland eine Prävalenz von 5 %. Hier wurden 516 Herden untersucht, wobei nicht nur auf *C. suis*, sondern alle relevanten porzinen Darmparasiten untersucht wurden (Roepstorff et al. 1998).

In Ontario, Kanada wurde eine retrospektive Studie über neun Jahre durchgeführt, die sich mit den verschiedenen Ursachen des neonatalen Durchfalls bei Ferkeln beschäftigte. Es wurden 237 Fälle aufgearbeitet, die Ferkel waren in einem Alter zwischen ein bis sieben Tagen. Bei 33 % der Fälle konnte keine eindeutige Ursache des Durchfalls gefunden werden. Die Prävalenz von *C. suis* betrug dabei nur 6 %, hauptsächlich in den ersten vier Jahren der Studie. Das bestätigt die Tatsache, dass die Kokzidiose erst nach ein bis zwei Wochen mit Durchfall klinisch manifest wird. Im Sommer kam es im Vergleich zum Winter und Frühling zu einem vermehrten Aufkommen der Cystoisosporose (Chan et al. 2013).

In Ghana wurde eine Studie mit zehn zufällig ausgewählten Dörfern zu je 50-200 Schweinen pro Dorf durchgeführt. Es wurde auf Ekto- und Endoparasiten untersucht und dabei eine Prävalenz von 27 % für *C. suis* gefunden (Permin et al. 1999).

2.1.5. Übertragung und endogene Entwicklung

Die Oozysten von *C. suis* können über den Kot infizierter Tiere, kontaminierte Ställe oder auch durch Equipment bereits kurz nach der Geburt übertragen werden, da die Sporulation unter optimalen Bedingungen in einem Tag abgeschlossen ist (vgl. Kap. 2.1.2). Nach 5-6 Tagen der Infektion entstehen Läsionen an der Darmwand, welche sich nach 10-14 Tagen regenerieren. Der Verlauf der Parasitenentwicklung ist begleitet von Durchfall, der in der Regel 7-14 Tage nach der Geburt auftritt (Driesen et al. 1993; Eysker et al. 1994). Die Sauen gelten nicht als Hauptausscheider, es werden nur gelegentlich Oozysten in Kotproben gefunden. Eine Studie in zwei Betrieben zeigte, dass sich die Oozystenausscheidung während der Geburt nicht signifikant ändert. Zudem wurden auch keine Hinweise darauf gefunden, dass sich endogene Stadien von *C. suis* in Milch oder Plazenta befinden. Im Gegensatz zur geringen Oozystenausscheidung der Sauen scheiden die Ferkel eine wesentlich höhere Anzahl aus, im Durchschnitt 235.000 Oozysten pro Gramm Kot (OpG), während die unbehandelten Sauen bei der Geburt ca. 650 OpG im ersten Betrieb und 2750 OpG im zweiten Betrieb ausschieden (Stuart et al. 1982b).

2.1.6. Pathohistologie, Klinik und Risikofaktoren der Cystoisosporose

Die Inkubationszeit von *C. suis*, d.h. die Zeit zwischen Aufnahme der Oozysten bis zum Auftreten erster Symptome, beträgt im Durchschnitt 3-5 Tage (Harleman und Meyer 1985; Stuart et al. 1982a). Die Cystoisosporose tritt im Alter von 7-28 Tagen auf (Driesen et al. 1993; Martineau und Del Castillo 2000; Niestrath et al. 2002; Stuart et al. 1982b; Vítovec und Koudela 1990).

Histologisch wurden nach den ersten 72 Stunden nach Aufnahme der Oozysten keine Veränderungen festgestellt. Nach 4-9 Tagen wurden im Jejunum und Ileum Organismen gefunden. Leichte Zottenatrophie und fokale Infiltrate der Lamina propria zeigten sich bei der Sektion von den Tieren, die Oozysten vor 7-9 Tagen aufgenommen haben. Neun Tage nach Ansteckung konnten Oozysten im Inhalt des Colons gefunden werden (Stuart et al. 1980). Oozysten wurden auch noch 11-14 Tage nach Aufnahme der Kokzidien im Darminhalt nachgewiesen (Harleman und Meyer 1984).

Klinisch zeigt sich die Cystoisosporose bei den Ferkeln mit übelriechendem, meist gelblichem Durchfall von breiiger bis flüssiger Konsistenz. Je weiter der Verlauf fortschreitet, desto flüssiger wird der Kot, allerdings finden sich in keiner Phase Blutbeimengungen (Worliczek et al. 2007). Die Dauer des Durchfalls kann variabel sein. In einer Studie wurde gezeigt, dass die

Hälfte der Ferkel weniger als zwei Tage Durchfall hatte. Allerdings bestand eine Korrelation zwischen Dauer des Durchfalls und der reduzierten Gewichtszunahme. Kümern und verminderte Tageszunahmen zählen zu den wichtigsten Symptomen der Erkrankung, welche vor allem wirtschaftliche Verluste bedeuten (Mundt et al. 2006). Es wurde auch eine Korrelation zwischen Alter und Schweregrad der Infektion beobachtet. Je jünger die Tiere bei der Infektion sind, desto stärker ist die Ausprägung der Symptome, wie z.B. verlängerte Dauer des Durchfalls. Die Menge der aufgenommenen Oozysten spielt im Vergleich dazu eine weniger wichtige Rolle (Mundt et al. 2003b).

2.1.7. Immunität

Ferkel, die eine Infektion durchgemacht haben, erlangen eine gute Immunität gegen eine Reinfektion. Es spielt dabei keine Rolle, ob die Tiere natürlich oder experimentell infiziert werden. Wie lange der Immunstatus aufrecht bleibt, ist unbekannt. Allerdings gibt die geringe Prävalenz der älteren Schweine einen Hinweis auf lange Immunität (Stuart et al. 1982c). Koudela und Kučerová (1999) verglichen die erworbene Immunantwort mit der natürlichen Altersresistenz. Die Resistenz wurde nicht passiv über Kolostrum und Milch auf die Ferkel übertragen. Die Ergebnisse stimmen damit überein, dass das Alter eine entscheidende Rolle spielt, wie stark sich die Erkrankung ausprägt. Das deutet gleichzeitig auf die größere Bedeutung der unspezifischen Immunantwort hin, die bei jungen Ferkeln noch wenig entwickelt ist (Worliczek et al. 2007).

2.1.8. Diagnose

Für die Diagnose der Cystoisosporose sind mehrere Methoden möglich. Die Flotation stellt eine wichtige Methode zur Oozystendetektion dar. Durch die Fetttröpfchen im sehr fettreichen Kot der Ferkel müssen Modifikationen in der Flotation vorgenommen werden, um die Oozysten darstellen zu können. Man kann nach der Flotation noch eine Sedimentation mit einer kolloidalen Lösung (z. B. Percoll®, GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA) durchführen. Die Lösung ist allerdings teuer und kann durch eine Zucker-Salz-Lösung ersetzt werden. Des Weiteren ist es auch möglich, Kotausstriche anzufertigen, die unter einem Autofluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Die Wand der Oozysten geben typischerweise ein blaues Licht ab. Molekulare Verfahren sind eine weitere Möglichkeit der Diagnostik, die zwar hohe Spezifität und Sensitivität aufweisen, aber hohe Kosten verursachen (Joachim et al. 2018a). Vorberichtlich gehäuftes Auftreten von Durchfall bei Saugferkeln, dessen

Konsistenz pastös-breiig und Farbe gelblich-beige bis hin zu gräulich ist, weist auf eine Kokzidiose hin. Der Zeitpunkt und die Häufigkeit der Probennahme spielen eine wichtige Rolle bei der Oozystendetektion, da eine einmalige Beprobung eines Wurfes aufgrund der kurzen Ausscheidungsdauer zu wenige *C. suis*-positive Tiere erfasst. Eine zweifache oder dreifache Beprobung der Saugferkel ist sinnvoller, um positive Würfe zu erkennen. Der optimale Zeitpunkt der Beprobung liegt zwischen der ersten und dritten Woche (Joachim et al. 2018a; Meyer et al. 1999).

2.1.9. Therapie und Prophylaxe

2.1.9.1. Hygiene als Prophylaxe

Die völlige Eliminierung der Oozysten ist unter normalen Bedingungen nur schwer umsetzbar (Mundt et al. 2005). Eine erfolgreiche Bekämpfung der Cystoisosporose setzt ein gutes Hygienekonzept, vor allem Reinigung mit kokzidienwirksamen Desinfektionsmitteln, voraus (Hinney et al. 2020). Das kresolbasierte Mittel Neopredisan 135-1® (Menno Chemie, Norderstedt, Germany) konnte unter Laborbedingungen zufriedenstellende Ergebnisse erzielen, in der Feldstudie konnte es dennoch nicht alle Oozysten inaktivieren. Zusammen mit der kurzen Präpatenz, der raschen Sporulation und der schnellen Vermehrung der Protozoen trägt dies zur Persistenz von *C. suis* in einem Bestand bei. Daher besteht das Ziel darin, den Infektionsdruck durch Inaktivierung möglichst vieler Oozysten so gering wie möglich zu halten. Eine wichtige Maßnahme zur Desinfektion ist die vorherige gründliche Reinigung (Straberg und Dauschies 2007).

2.1.9.2. Toltrazuril

Toltrazuril gehört zu der Gruppe der Triazine und wird als Kokzidiozid eingesetzt. Es wird beim Ferkel oral in Form einer Suspension (Baycox®, Bayer Animal Health, Leverkusen, Deutschland) oder als Injektionspräparat in Kombination mit Eisen, hier Gleptoferron, (Forceris®, Ceva, Libourne, France; Baycox® Iron, Bayer Animal Health, Leverkusen, Deutschland) verabreicht. Die orale Darreichungsform wird 3-5 Tage nach der Geburt den Ferkeln verabreicht, wohingegen das Injektionspräparat 1-3 Tage nach der Geburt intramuskulär injiziert wird. Dadurch konnte sowohl die Dauer als auch die Menge der Oozysten signifikant verringert werden. Die Tiere zeigten keinen Durchfall und bessere Gewichtszunahmen im Vergleich zu den Kontrollgruppen, welche nicht behandelt worden waren, da die Resorptionsfähigkeit des Darms erhalten blieb (Hiob et al. 2019; Joachim et al.

2018b; Joachim et al. 2019). Mikroskopisch wurde die Länge der Darmzotten gemessen, sie waren bei den behandelten Tieren länger als bei den Kontrollgruppen (Mundt et al. 2003a; Mundt et al. 2007).

2.1.9.3. Andere Antikokzidia

Sulfonamide bieten, parenteral appliziert, einen ähnlich guten Schutz wie Toltrazuril vor einer Cystoisosporose, allerdings müssen diese über sechs Tage, beginnend bei der Infektion, gegeben werden. Das stellt einen wesentlich höheren Aufwand im Vergleich zur einmaligen Gabe von Toltrazuril dar. Des Weiteren besteht nur ein kurzer Zeitraum der effektiven Bekämpfung zur Verfügung (Joachim und Mundt 2011).

Diclazuril, auch ein Triazin, bietet als Medikament gegen *C. suis* keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Eine zweimalige orale Anwendung beeinflusste weder Durchfall und Gewichtsentwicklung noch die Oozystenausscheidung (Mundt et al. 2007).

Amproliumhydrochlorid und Furazolidon wurden als Kokzidiostatikum für die Therapie der Cystoisosporose getestet. Beide Medikamente konnten keine zufriedenstellenden Ergebnisse liefern, da die Oozystenausscheidung und die klinischen Symptome nicht gelindert werden konnten. Die Behandlung mit Furazolidon zeigte leicht verzögerte klinische Symptome im Vergleich zu Amproliumhydrochlorid (Girard und Morin 1987).

Halofuginon ist ein Quinazolinonalkaloid, welches als Kokzidiostatikum zwar die Oozystenausscheidung hemmt, aber die Tageszunahmen nicht verbessert (Matuschka und Männer 1981).

Ionophore, wie z.B. Monensin und Lasalocid, welche häufig bei der Geflügelkokzidiose verwendet werden, haben bei *C. suis* keine ausreichende Wirksamkeit. Durchfall, Oozystenausscheidung und intestinale Läsionen konnten nicht verhindert werden (Doré und Morin 1987; Matuschka und Männer 1981).

2.2. Sporulationsbedingungen

2.2.1. Umgebungstemperatur

Die Umgebungstemperatur spielt neben ausreichend Feuchtigkeit bei der Sporulation eine entscheidende Rolle. Eine Studie, die mehrere Protozoengattungen, wie *Eimeria* und *Toxoplasma*, untersucht und verglich, zeigt, dass kühle Temperaturen die Sporulation hemmen. Warme Temperaturen begünstigen die Sporulation; ab Temperaturen von 35 °C und mehr wird die Sporulation allerdings wieder gehemmt (Fayer 1980). Ernst et al. 1986 verglichen Studien verschiedener Autoren und kamen zu dem Schluss, dass meist Temperaturen zwischen 21 °C und 28 °C gewählt wurden, um die Oozysten im Labor sporulieren zu lassen.

Eine Studie aus 2009 untersuchte die Überlebensfähigkeit von Oozysten unter verschiedenen Parametern, wie Temperatur und Luftfeuchtigkeit. Die Oozysten sporulierten nach zwölf Stunden bei 30 °C, nach 12-18 Stunden bei 25 °C und nach 24 Stunden bei 20 °C. Die Luftfeuchtigkeit hatte hier keine Auswirkungen auf die Sporulationsrate. Es wurden auch Oozysten über Monate bei 4 °C gekühlt aufbewahrt, die Fähigkeit zur Sporulation ging dabei nicht verloren. Das deutet darauf hin, dass bei einer Temperatur von 4 °C wenig bis keine Sporulation stattfindet (Langkjær und Roepstorff 2008). Das bestätigten auch die Ergebnisse einer Arbeit von 1982, in der die Sporulation bei Temperaturen von 20 bis 37 °C erreicht wurde. Allerdings dauerte hier der Prozess der Sporulation bis zu 56 Stunden. Des Weiteren wurden auch Temperaturen von 4 °C, 40 °C, 42 °C, 45 °C und 50 °C untersucht, bei denen aber keine Sporulation mehr stattgefunden hat. Daher dürfte der Grenzwert zwischen 37 °C und 40 °C liegen, ab dem keine Sporulation mehr möglich ist (Lindsay et al. 1982). Die besten Bedingungen für eine schnelle Sporulation liegen zwischen 30 °C und 37 °C (Lindsay et al. 1982; Stuart und Lindsay 1986).

2.2.2. Luftfeuchtigkeit

Oozysten von Kokzidien sind grundsätzlich sensibel gegenüber Trockenheit, vor allem im Zusammenhang mit hohen Temperaturen, da dies zur Austrocknung und folglich zur Zerstörung der Oozyste führt. Das bedeutet, je höher die Luftfeuchtigkeit ist, desto länger überleben die Oozysten und haben somit die Chance zu sporulieren (Langkjær und Roepstorff 2008).

2.2.3. Desinfektionsmittel

Unter den Desinfektionsmitteln wirkt vor allem Ammoniumhydroxid stark hemmend auf die Sporulation. Erst bei starker Verdünnung von ca. 1 % Ammoniak in Wasser können 77 % der Oozysten nach 120 Stunden noch sporulieren. 2,5%iges Kaliumdichromat hingegen lässt ca. 90 % der Oozysten nach 120 Stunden sporulieren. Auch 3%ige Schwefelsäure lässt die Oozysten zu einem hohen Prozentsatz sporulieren (Stuart et al. 1981). 2,5%iges Kaliumdichromat wird auch häufig für Studien eingesetzt, um die angereicherten Oozysten zur Sporulation zu bringen und gleichzeitig mikrobielle Kontamination zu hemmen (Otten 1995). Die Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft führt ein aktuelles Register von Desinfektionsmitteln, deren Wirkung gegen Kokzidienoozysten gemäß Standardprotokoll geprüft wurde (Ausschuss „Desinfektion“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft 2021).

2.2.4. Vergleich mit anderen Parasiten

Eimeria tenella, *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* und *Eimeria necatrix*, Auslöser der Kokzidiose bei Hühnern, können bei einer Temperatur von ca. 25° C für 48-72 Stunden inkubiert werden, um hohe Sporulationsraten von bis zu 95 % zu erreichen. Die benötigten Oozysten werden von infizierten Hühnern gewonnen und, mittels Sedimentation und Zentrifugieren, weiter aufbereitet (Daughschies et al. 2002; Fatemi et al. 2015; Molan et al. 2009). *E. tenella* kann bei 4° C über einen Zeitraum von drei Wochen unsporuliert aufbewahrt werden (Daughschies et al. 2002).

Eimeria spp. in Lämmern, ähnlich wie bei den Kokzidien der Hühner, sporulieren bei Raumtemperatur von 26-28° C. Eine Aufbewahrung von unsporulierten Oozysten ist bei 4° C möglich (Saratsis et al. 2012).

Der Schweinespulwurm *Ascaris suum* braucht zur Entwicklung der Eier Temperaturen von mindestens 15° C. Bei zunehmender Wärme steigt auch die Entwicklungsrate der Eier, wobei die optimale Entwicklungstemperatur bei 31° C liegt (Joachim et al. 2001; Larsen und Roepstorff 1999; Stevenson 1979).

2.3. Ziel der Studie

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit lautet, dass die Sporulationshemmung mithilfe eines In-Vitro-Tests überprüft werden kann. Dafür werden Oozysten von *C. suis* aus dem Kot von infizierten Ferkeln mittels Aufbereitung durch eine Percoll®-Lösung (GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA) isoliert. Die Oozysten in der hergestellten Lösung werden zur Sporulation gebracht. Dabei werden die physikalischen und chemischen Einflüsse (Temperatur und Desinfektionsmittel) auf die Sporulation untersucht.

3. Tiere, Material und Methodik

3.1. Tiere und Gruppen

Für den Versuch wurden Ferkel von einer Kreuzung der Rassen Edelschwein x Landrasse aus einem konventionellen Betrieb verwendet. Insgesamt wurden drei Würfe für das Experiment hinzugezogen, wobei in drei Gruppen pro Wurf eingeteilt wurde (Tab. 1):

Oral behandelt mit Futterzusatz = **Gruppe A**

Oral behandelt mit Toltrazuril (Baycox® 50 mg/ml, Bayer Animal Health, Leverkusen, Deutschland) = **Gruppe B**

Negativkontrolle, oral behandelt mit einem Placebo = Trägerstoff der Gruppe A (1/3 Sonnenblumenöl + 2/3 Wasser) = **Gruppe C**

Details zu dem Futterzusatz aus Gruppe A wurden aus Vertraulichkeitsgründen nicht angegeben.

Tab. 1: Behandlungsgruppen. KGW: Körpergewicht. SD: Study Day (Studientag, wobei SD 1 = Tag nach der Geburt).

Gruppe	Behandelt mit	Anzahl Ferkel zu Beginn der Studie	Zeitpunkt der Behandlung
A	Futterzusatz, 1,3 ml/kg KGW	10	SD 5
B	Toltrazuril (20 mg/kg KGW)	10	SD 5
C	Trägerstoff, 1,3 ml/kg KGW	10	SD 5

Die Studie wurde als randomisierte Blindstudie durchgeführt. Die Gruppen wurden zufällig mithilfe einer Randomisierungsliste, die in Excel erstellt worden war, zugeteilt.

Der erste Tag des Experiments (SD1) war der Tag nach der Geburt der Ferkel (24h+) und die Studie endete vier Wochen später (SD29).

Die Studie wurde von der Ethik- und Tierschutzkommission der Vetmeduni Wien geprüft und von dem Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft und Forschung unter der Nummer BMWF-68.205/0034-WF/V/3b/2016 genehmigt.

3.1.1. Experimentelle Infektion und Oozystengewinnung

Alle Gruppen erhielten am dritten Lebenstag (SD3) eine einmalige Dosis von 1000 sporulierten Oozysten eines Laborstammes von *C. suis* (Wien-I). Die Oozysten wurden mit einer Einweg-Pasteurpipette peroral, über den Zungengrund, verabreicht. An SD5 wurde die Behandlung begonnen.

Um die Oozysten zu gewinnen, wurde über einen Zeitraum von 28 Tagen Kot von allen Ferkeln einzeln gesammelt und mittels Flotation die Anzahl der Oozysten bestimmt.

3.1.2. Oozystendetektion

Zunächst wurde jede Probe untersucht und die Konsistenz (Faecal Score 1-4, wobei 3 und 4 als Durchfall beurteilt wurden (Joachim et al. 2018a)) bewertet. Danach wurden Kotausstriche angefertigt, um dann mittels Autofluoreszenz (AF) die Anwesenheit von Oozysten zu überprüfen.

Beim Ausstrich wurde der Kot mit einem Holzspatel zerdrückt und zerrieben, um den Kot gleichmäßig zu verteilen und damit das Mikroskopieren zu erleichtern. Ein kleines Stück Kot (ca. 0,1 g) wurde auf einen Objektträger aufgetragen, mit 2-3 Tropfen Leitungswasser verdünnt und vermischt und dann mit einem Deckgläschen versehen. Danach konnte mittels AF ermittelt werden, ob sich Oozysten in den jeweiligen Ausstrichen befanden.

Falls dies der Fall war, wird die genaue Anzahl an Oozysten mithilfe der McMaster-Methode bestimmt. Dabei wurde idealerweise 0,5 g Kot, mindestens aber 0,3 g Kot, in einem kleinen Plastikwägeschälchen abgewogen und mit Flotationslösung (gesättigte Kochsalzlösung, NaCl, D: 1,2) im Verhältnis von 9:1 mithilfe einer 2 ml Plastikpipette aufgefüllt. Die Mischung wurde mit einem Holzspatel suspendiert und in ein 5 ml Plastikröhrchen gegossen. Ein Stück 2 cm x 2 cm zweilagige Gaze wurde auf das Röhrchen gelegt und mit einer Drahtöse (Durchmesser < 2 cm) auf den Boden gedrückt, so dass die groben Partikel aus der Kotsuspension herausgefiltert wurden. Dann wurde sofort 200 µl des Überstandes entnommen und diese in vorbereitete 2 ml Eppendorfgefäße pipettiert, welche zuvor mit 1800 µl Kochsalz-Zucker-Lösung befüllt wurden. Das Röhrchen wurde verschlossen und drei Mal über Kopf geschwenkt. Mit der Pipette wurde die Suspension nochmals durchgemischt und ungefähr 800 µl aufgezogen, um zwei McMaster-Kammern möglichst blasenfrei zu befüllen. Pro Zählkammer betrug das Volumen unter dem Zählfeld 150 µl.

Die Kammern wurden 3-5 Minuten zur Flotation stehen gelassen, damit man die flotierten Oozysten anschließend mit 100-facher Vergrößerung zählen konnte.

Die Gesamtzahl der Oozysten in zwei Feldern entsprach der Anzahl in 300 µl verdünnter Suspension. Dabei musste der Verdünnungsfaktor 1:100 berücksichtigt werden. Daraus ergab sich die Berechnungsformel:

$$n = x * 333$$

wobei n = Oozysten pro Gramm Kot (OpG) und x = gezählte Oozysten aus zwei Zählfeldern

3.1.3. Anreicherung der Oozysten

Für die Anreicherung wurden Proben von Gruppe A und Gruppe C verwendet.

Vor der Anreicherung wurde 1 Liter einer 25%igen Percoll®-Lösung (GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA) hergestellt, welche mit Leitungswasser verdünnt wurde. Diese wurde gekühlt gelagert und vor Gebrauch auf Raumtemperatur aufgewärmt.

Wenn möglich wurde nur mit Kot mit OpG > 2000 gearbeitet. Der breiige bis flüssige Kot wurde in einem Kotbecher mit Leitungswasser auf maximal 50 ml aufgefüllt, der Becher wurde mit Deckel fest verschlossen und die Kotsuspension durch kräftiges Schütteln suspendiert. Größere Kotpartikel wurden mit einem Holzspatel zerdrückt oder mit einem Magnetrührer solange verrührt, bis sich die Teilchen auflösten. Die Mischung wurde über ein Sieb und einen Trichter in das 50 ml Zentrifugenröhrchen 1 geschüttet und durch eine Zentrifuge zehn Minuten bei $600 < g$ ($g = 9,81 \text{ N/kg}$) ohne Bremse sedimentiert. Der Überstand wurde in das Zentrifugenröhrchen 2 dekantiert und die im Sediment befindlichen Oozysten von dem Zentrifugenröhrchen 1 wurden in 25%-igen Percoll® resuspendiert. Zentrifugenröhrchen 1 und Zentrifugenröhrchen 2 wurden gemeinsam erneut durch Zentrifugieren sedimentiert. Der wässrige Überstand von Zentrifugenröhrchen 2 wurde verworfen und die fettige Suspension von Zentrifugenröhrchen 1 in Zentrifugenröhrchen 2 resuspendiert. Das Sediment aus Zentrifugenröhrchen 1 wurde mit Wasser wieder aufgefüllt und wurde wie zuvor, gemeinsam mit Zentrifugenröhrchen 2, zentrifugiert. Der Überstand von Zentrifugenröhrchen 2 wurde wieder verworfen. Der Überstand aus Zentrifugenröhrchen 1 wurde in das Zentrifugenröhrchen 2 geleert und das Sediment von Zentrifugenröhrchen 1 mit Wasser vermischt. Der Inhalt von

Zentrifugenröhrchen 1 wurde in eine Petrischale gefüllt und das leere Zentrifugenröhrchen 1 wieder mit der Hälfte der Flüssigkeit aus Zentrifugenröhrchen 2 resuspendiert.

Beide Zentrifugenröhrchen wurden mit Wasser bis 50 ml aufgefüllt und ein letztes Mal zentrifugiert. Beide Überstände wurden verworfen und die Sedimente mit Wasser wieder aufgefüllt und in eine Petrischale gefüllt.

3.2. Ermittlung der Sporulationsrate

Zunächst wurden die Oozystenkonzentrationen in den einzelnen Proben ermittelt. Für den Hemmtest wurde aus den Petrischalen Suspension entnommen, wobei pro Petrischale zwei McMaster-Kammern befüllt und die Oozysten ausgezählt wurden. Wie weiter oben schon beschrieben, wurde mit der Pipette ungefähr 800 µl Suspension aufgezogen, um zwei McMaster-Kammern möglichst blasenfrei zu befüllen. Pro Zählkammer beträgt das Volumen 150 µl. Die Oozysten wurden 3-5 Minuten zum Flotieren stehen gelassen, damit man sie anschließend mit 100-facher Vergrößerung zählen konnte.

Mit den gezählten Oozysten wurden anschließend 6-Well-Platten (VWR, Wien, Österreich) bestückt. Pro Well wurden 500 Oozysten aus der Suspension entnommen, dann wurde die Suspension auf 2 ml Flüssigkeit aufgefüllt (je nach Platte handelte es sich um Wasser oder 2%igem Desinfektionsmittel (mikrozid® AF liquid; Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland)).

Die Oozystenkonzentration wurde wie folgt berechnet:

$$n = \frac{\bar{x} * \text{Verdünnungsfaktor}}{0,15}$$

wobei n = Anzahl Oozysten pro ml, \bar{x} = Mittelwert aus zwei McMaster-Zählungen

Oozysten aus der unbehandelten Gruppe C wurden in fünf verschiedene Ansätze unterteilt und jeweils für mindestens vier Tage inkubiert:

- Inkubation in Leitungswasser bei Raumtemperatur (entspricht ca. 24 °C) (entspricht der Positivkontrolle)
- Inkubation in Leitungswasser bei 4 °C
- Inkubation in Leitungswasser bei 11 °C
- Inkubation in Leitungswasser bei 40 °C
- Inkubation in 2%igem Flächendesinfektionsmittel mikrozid® AF liquid bei Raumtemperatur
-

Oozysten aus Gruppe A, welche mit dem Futterzusatz behandelt wurden, wurden bei Raumtemperatur inkubiert, um die Sporulationsrate festzustellen.

Allen Ansätzen wurde zusätzlich Kaliumdichromat (Endkonzentration 2%) zugesetzt und sie wurden täglich, durch Schwenken der Platten, belüftet. Des Weiteren wurde auf Austrocknen der Wells geachtet und wenn nötig Leitungswasser bzw. Desinfektionsmittel aufgefüllt.

Alle Inkubationen wurden mindestens zwei Mal wiederholt mit Proben von unterschiedlichen Tagen, wobei die Ansätze mit Leitungswasser bei Raumtemperatur aus Gruppe C und A vier Mal wiederholt wurden.

Nach mindestens vier Tagen Inkubation konnten die Platten ausgezählt werden. Dies wurde mittels eines inversen Mikroskops umgesetzt, es wurden mindestens fünf der sechs Wells und 50 Oozysten pro Well ausgezählt. Beim Auszählen wurde zwischen Oozysten mit oder ohne einzelner Sporonten (unsporuliert und nicht infektiös) und Oozysten mit zwei Sporozysten und deutlich erkennbaren Sporozoiten (sporuliert und infektiös), differenziert.

Der Prozentsatz sporulierter Oozysten wurde je Well und Gesamtansatz ermittelt und auf die Ergebnisse der Positivkontrolle bezogen. Es wurde folgendermaßen berechnet:

$$x = \frac{y * 100}{Y}$$

wobei x = Prozentsatz sporulierter Oozysten, y = Anzahl sporulierter Oozysten, Y = Gesamtanzahl beurteilter Oozysten.

Zeitpunkt 1 (T1) ist der Tag, an dem die ersten Ansätze für alle Temperaturbereiche, dem Desinfektionsmittel und dem Futterzusatz erfolgten. An Zeitpunkt 4 (T4), welcher drei Tage nach T1 stattgefunden hat, wurden idente Ansätze wie an T1 hergestellt. An T1 und T4 werden An Zeitpunkt 2 (T2), der Folgetag von T1, und Zeitpunkt 3 (T3), der zweite Tag nach T1, wurden nur Ansätze für Raumtemperatur und den Futterzusatz angefertigt (Tab. 2)

Tab. 2: Schematische Darstellung der verschiedenen Ansätze zwischen T1-T4. Ein Kreuz zeigt die Zeitpunkte, an denen ein Ansatz erfolgte.

	T1	T2	T3	T4
Raumtemperatur	x	x	x	x
Futterzusatz	x	x	x	x
4° C	x			x
11° C	x			x
40° C	x			x
Desinfektionsmittel	x			x

3.3. Statistik

Für die statistische Analyse der verschiedenen Parameter, wie Kot-Scoring, Autofluoreszenzdetektion, Oozystenausscheidung und Sporulationsraten wurde der Chi-Quadrat Test verwendet. Für die statistische Signifikanz wurde $P < 0,05$ angenommen. Zur Berechnung der Statistik wurde Microsoft Excel verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. Oozystenausscheidung

In Gruppe A und C waren alle Ferkel mindestens einmal positiv in der AF und somit konnte hier kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($P=1,000$). In der Gruppe, die mit Toltrazuril behandelt wurde, war über den Beobachtungszeitraum ein Ferkel an einem Tag AF-positiv (Abb. 1).

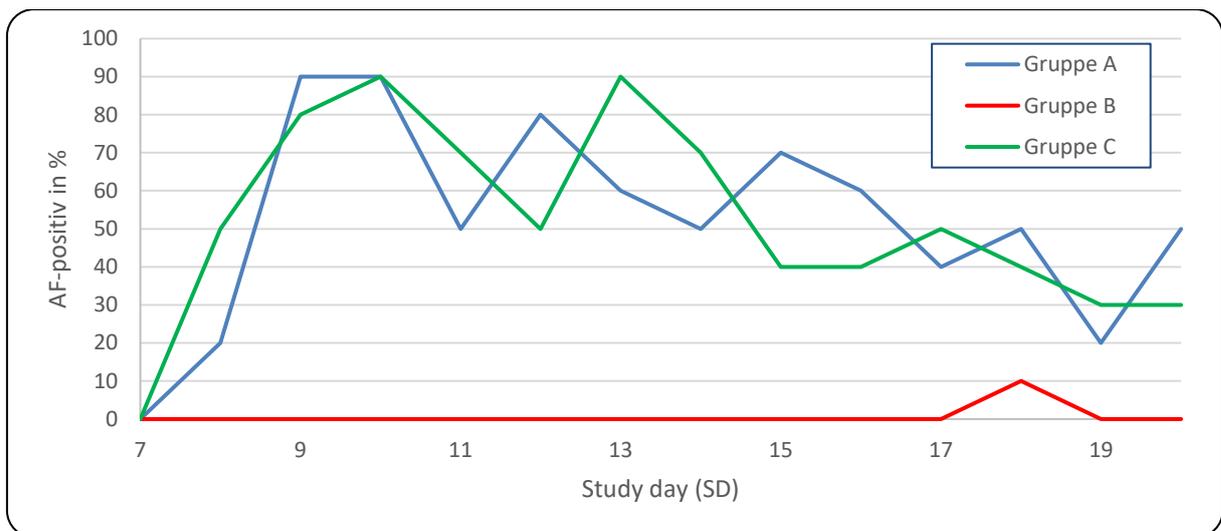


Abb. 1: Anteil der AF-positiven Tiere in % der Gruppe A, B und C zwischen SD 7 und SD 20.

Die durchschnittlichen OpG zeigten bei der Kontrollgruppe einen deutlich stärkeren Anstieg als bei der Gruppe A. Gruppe A hatte im Durchschnitt 14538 OpG und Gruppe C 89000 OpG. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war nicht signifikant ($P=0,225$). Jedes Ferkel beider Gruppen war mindestens einmal positiv und man konnte daher keinen signifikanten Unterschied nachweisen ($P=1,000$). Bei Gruppe B konnten keine Oozysten in der McMaster-Zählung nachgewiesen werden (Abb. 2).

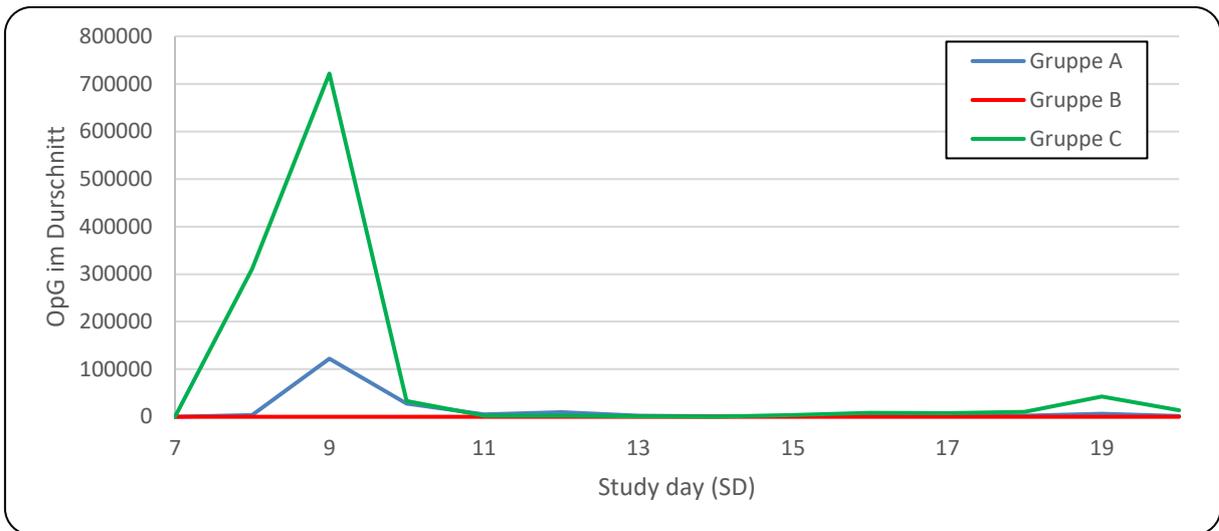


Abb. 2: Durchschnittliche OpG der Gruppe A, B und C zwischen SD 7 und SD 20.

4.2. Faecal Scoring und Durchfall

Vor der Aufbereitung für den Sporulationshemmtest wurden die Kotproben hinsichtlich der Konsistenz bewertet. Die mit Toltrazuril behandelten Ferkel der Gruppe B zeigten kaum Durchfall, während Ferkel aus Gruppe A und Gruppe C einen deutlichen Krankheitsverlauf zeigten (Abb. 1 und 2). Sowohl der prozentuale Anteil an Tieren mit Durchfall ($P=0,891$), als auch der Faecal Score ($P=0,854$) wies keinen signifikanten Unterschied zwischen Gruppe A und C auf.

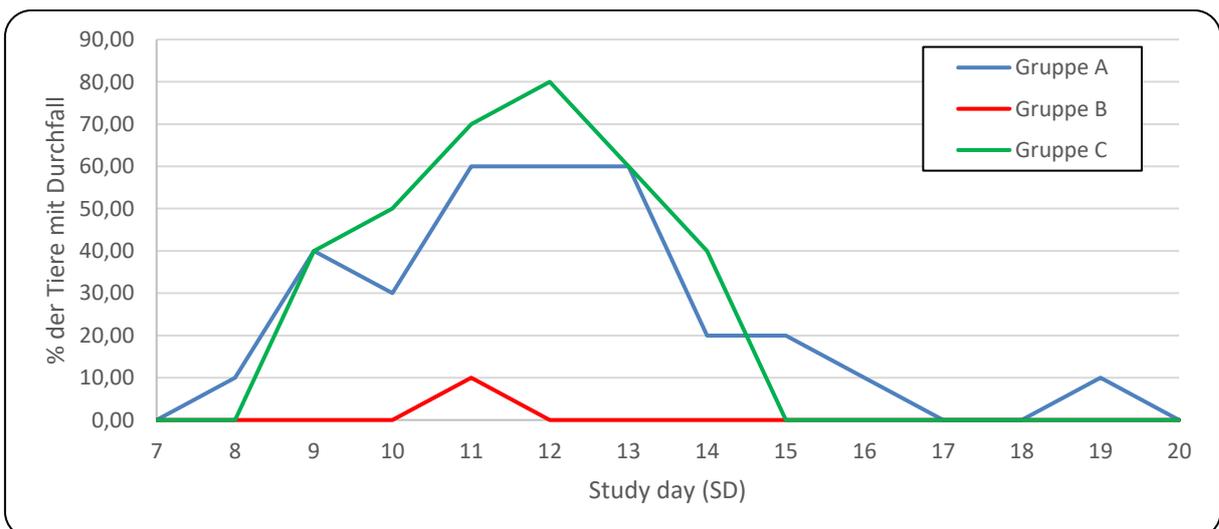


Abb. 3: Anteil der Tiere mit Durchfall in % der Gruppe A, B und C zwischen SD 7 und SD 20.

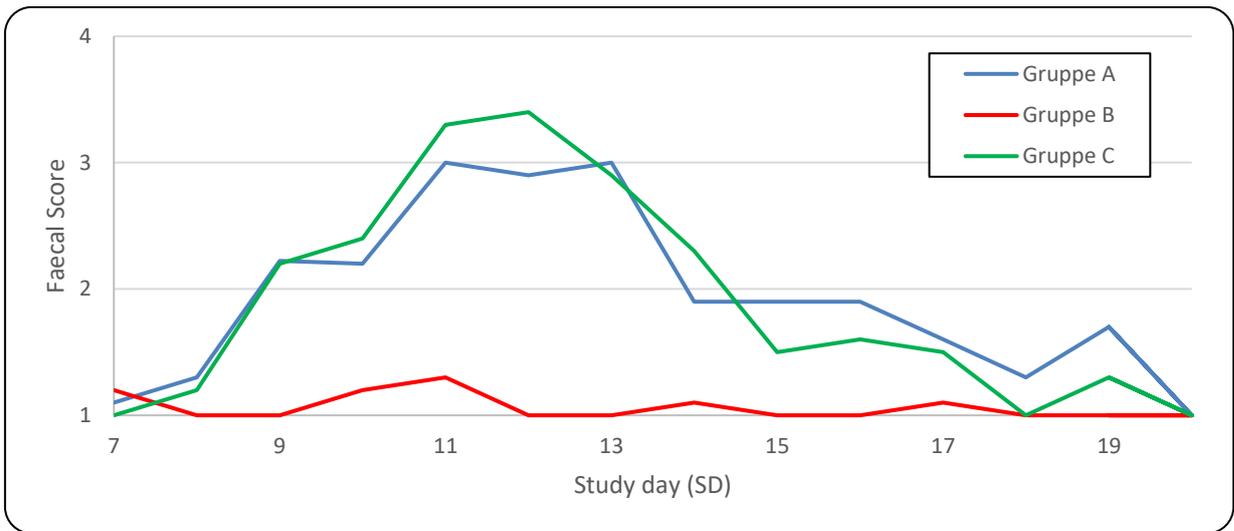


Abb. 4: Mittelwerte der Faecal Scores der Gruppe A, B und C zwischen SD 7 und SD 20.

4.3. Berechnung der Oozystenkonzentration

Pro Well waren 500 Oozysten notwendig. Jedes Well wurde mit dem entsprechenden Volumen bestückt und mit 2 ml Leitungswasser oder Desinfektionsmittel aufgefüllt. Dem wurde noch Kaliumdichromat in einer Endkonzentration von 2% zur Verhinderung von Verkeimungen und zur Unterstützung der Sporulation zugesetzt (Tab. 2).

Tab. 3: Ergebnisse aus den McMaster Auszählungen und die daraus folgenden Berechnungen zur Oozystenkonzentration von Gruppe A (behandelt mit Futterzusatz) und Gruppe C (unbehandelt). Verdünnungsfaktor: 10.

Gruppe	McMaster-Zählung	Mittelwert \bar{x}	Oozystenkonz./ml	Volumen [ml pro Well] (gerundet)
Gruppe A				
T1	30/38	34	2267	0,250
T2	81/90	85,5	5700	0,090
T3	98/100	99	6600	0,076
T4	8/8	8	533	1,000
Gruppe C				
T1	156/164	160	10667	0,050
T2	23/20	21,5	14333	0,035
T3	85/78	81,5	5433	0,092
T4	55/62	58,5	3900	0,130

4.4. Sporulationshemmtest

Der Mittelwert der sporulierten Oozysten während der vier Zeitpunkte betrug bei einer Raumtemperatur von 24 °C 79,7 %. Die Rate der Sporulation war hier somit am höchsten im Vergleich zu den Platten der anderen Temperaturen und auch des Flächendesinfektionsmittels (Abb. 3). Der Chi-Quadrat Test zeigte keinen signifikanten Unterschied an den vier Tagen ($P=0,999$). Die Platten wurden an T1 14 Tage, an T2 sechs Tage, an T3 sieben Tage und an T4 sechs Tage nach dem Befüllen der Platten ausgezählt.

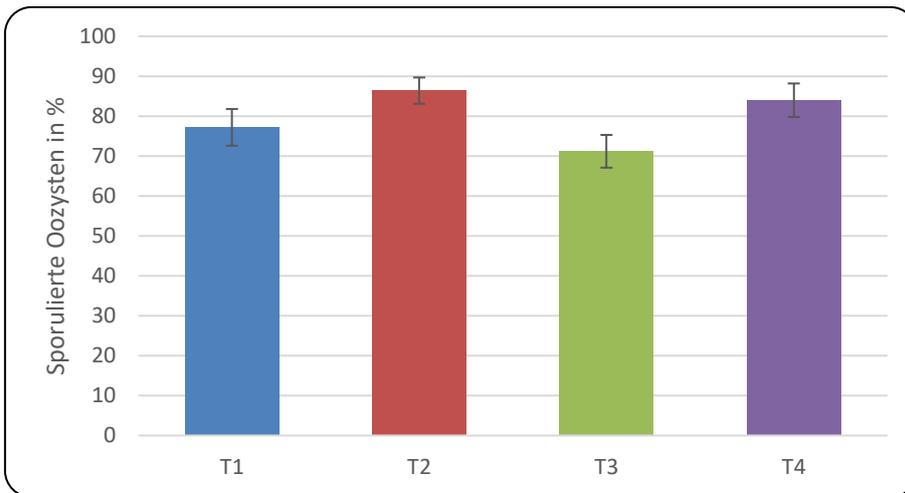


Abb. 5: Durchschnittsraten sporulierter Oozysten in % bei Raumtemperatur (24 °C) zu allen vier Zeitpunkten.

Bei 4 °C lagen die Sporulationsraten im Durchschnitt bei 1,4 % und somit deutlich am niedrigsten im Vergleich zu allen anderen Ansätzen. Hier wurden pro Well nicht mehr als zwei sporulierte Oozysten gefunden. An T4 waren, bis auf eine Oozyste, alle Oozysten unsporuliert (Abb. 4). Im Chi-Quadrat Test zeigte sich kein signifikanter Unterschied an T1 und T4 ($P=0,999$). Zwischen den Proben bei 4° C und den Kontrollproben bei 24° C an T1 und T4 zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($P<0,0001$ für T1 und T4). Die Platte von T1 wurde 21 Tage später und die Platte von T4 19 Tage nach dem Befüllen der Platte ausgezählt. Jedes Well der Platte von T2 wurde einmalig drei Tage nach dem Befüllen mit 1 ml Leitungswasser aufgefüllt, um Austrocknen zu verhindern.

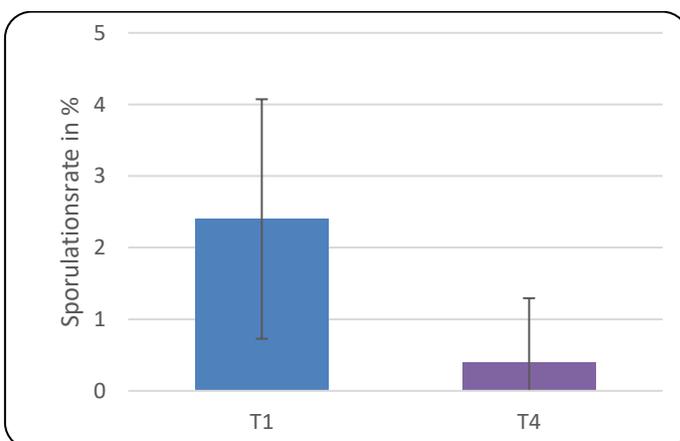


Abb. 6: Durchschnitt der Sporulationsraten bei 4 °C zu T1 und T4.

Die 6-Well-Platten bei 11 °C zeigten durchschnittlich 61,2 % an sporulierten Oozysten über beide Zeitpunkte T1 und T4 (Abb. 5). Die Sporulation der Oozysten wurde bei diesen Temperaturen etwas besser gehemmt als bei Raumtemperatur, dennoch wurde ein großer Teil nicht an der Sporulation gehindert. Im Chi-Quadrat Test zeigte sich kein signifikanter Unterschied an T1 und T4 ($P=0,811$). Zwischen den Proben bei 11° C und den Kontrollproben bei 24° C an T1 und T4 konnte ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden ($P=0,031$ für T1 und $P<0,0001$ für T4). Die Platte von T1 wurde 19 Tage und die Platte von T4 16 Tage nach dem Befüllen ausgezählt. Die Platte von T1 musste einmalig elf Tage nach Befüllen mit jeweils 2 ml Leitungswasser pro Well aufgefüllt werden. Ein Well wurde mit 3 ml aufgefüllt, da dieses ausgetrocknet war.

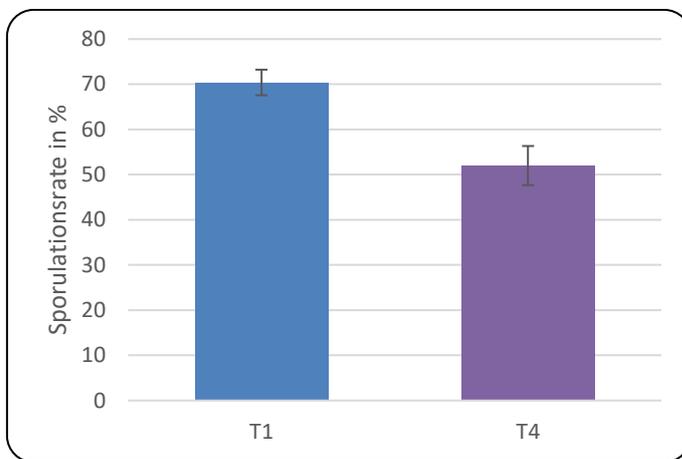


Abb. 7: Durchschnitt der sporulierten Oozysten in % bei 11 °C zu T1 und T4.

Bei einer Temperatur von 40 °C betrug die Rate der sporulierten Oozysten im Durchschnitt 42,2 % an beiden Zeitpunkten. Hier war ein deutlicher Unterschied zwischen T1 und T4 zu erkennen (Abb. 6). Im Chi-Quadrat Test zeigte sich kein signifikanter Unterschied an T1 und T4 ($P=0,946$). Zwischen den Proben bei 40° C und den Kontrollproben bei 24° C an T1 und T4 konnte ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden ($P<0,0001$ für T1 und T4). Beim Auszählen der 6-Well-Platten im Mikroskop waren einige Strukturen zu sehen, die schwer zuzuordnen waren. Die Platte von T1 wurde 21 Tage und die Platte von T4 13 Tage nach dem Befüllen ausgezählt. Ein großes Problem dieser Platten war die Austrocknung. Obwohl spätestens alle zwei Tage kontrolliert wurde, wie viel Flüssigkeit vorhanden war, sind die Platten mehrmals ausgetrocknet. Die Platten beider Zeitpunkte wurden mehrmalig mit Leitungswasser aufgefüllt.

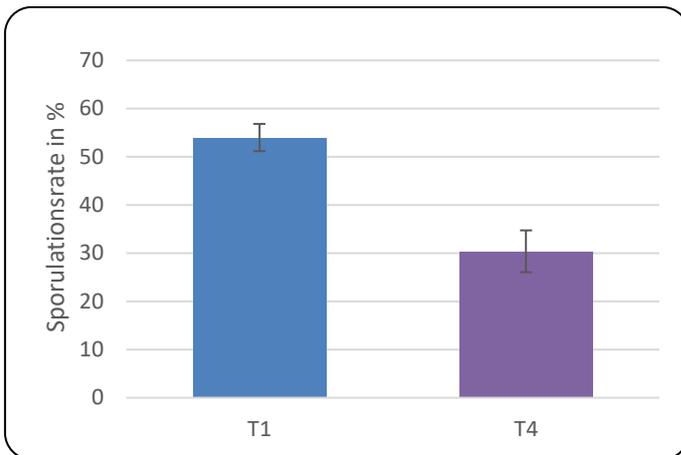


Abb. 8: Durchschnitt der sporulierten Oozysten in % bei 40 °C zu T1 und T4.

Die Platte von T1 mit 2%igem Flächendesinfektionsmittel mikrocid® AF liquid konnte nicht ausgewertet werden, da keine Oozysten gefunden werden konnten. Das Bild im Mikroskop zeigte kristalline Formen und die Flüssigkeit in den Wells hatte sich entfärbt. Bei der Platte von T4 konnten die Oozysten ausgezählt und ausgewertet werden. Der Durchschnitt ergab 42 % an sporulierten Oozysten und daher ein ähnliches Ergebnis, wie bei den Platten der Temperatur von 40 °C (Abb. 7). Zwischen den Proben bei dem Desinfektionsmittel und den Kontrollproben bei 24° C an T4 konnte ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden ($P < 0,0001$). Die Platte von T4 wurde 18 Tage nach Befüllen ausgezählt.

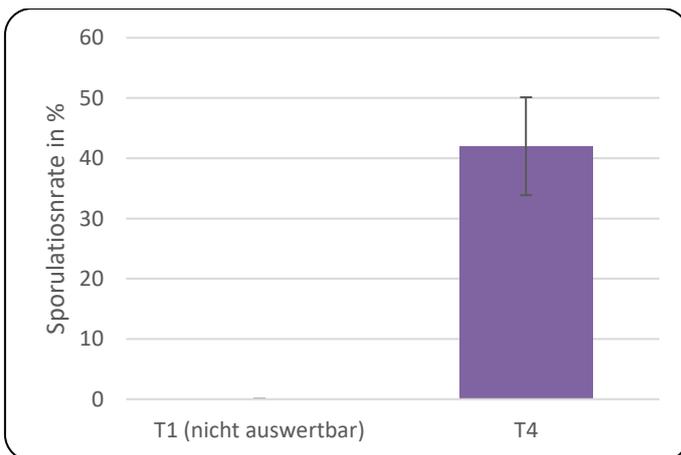


Abb. 9: Durchschnitt der sporulierten Oozysten in % mit 2%igem Flächendesinfektionsmittel mikrocid® AF liquid bei Raumtemperatur (24 °C) zu T1 und T4.

Beim Vergleich der Proben sah man die deutliche Hemmung der Sporulation bei 4 °C. Sie lag an beiden Zeitpunkten T1 und T4 beinahe bei 100 %. Bei 40 °C konnte zwar an T4 eine Hemmung von 70 % erreicht werden, allerdings konnte an T1 die Sporulation nur zu 46 % gehemmt werden. Bei 11 °C besteht eine ähnliche Diskrepanz zwischen T1 und T4, wobei hier die stärkste Hemmung bei 48 % an T4 erreicht wurde. Bei Raumtemperatur wurde, wie erwartet, die geringste Hemmung erzielt und ein Großteil der Oozysten sind sporuliert. Die Sporulation mit 2%igem Flächendesinfektionsmittel mikrocid® AF liquid zeigte eine Hemmung von 58 % an T2 (Abb. 8).

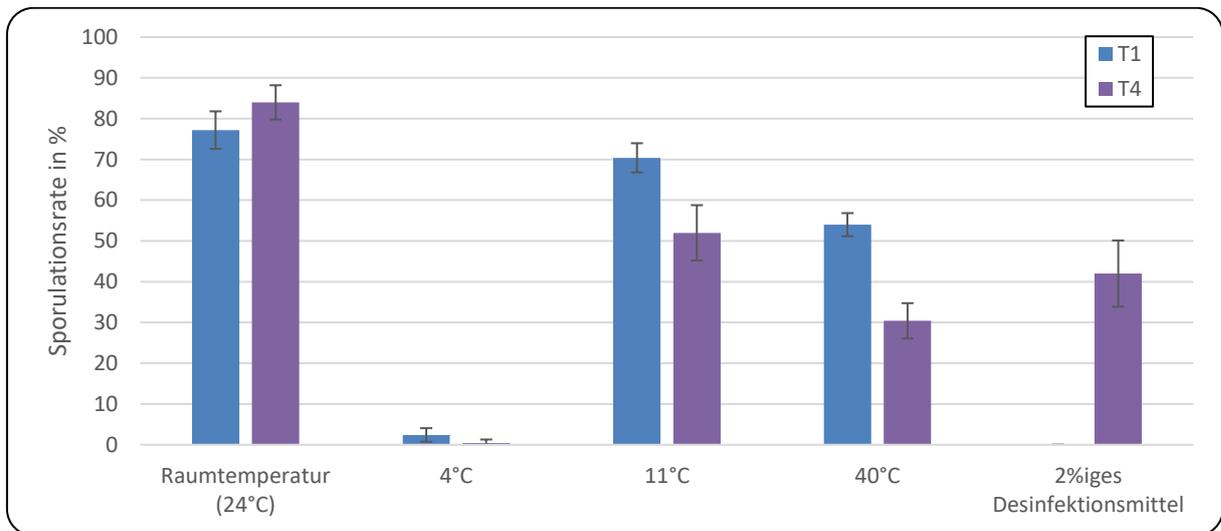


Abb. 10: Vergleichende Rate der sporulierten Oozysten in % der Proben aller Temperaturen und des Desinfektionsmittels zu T1 und T4.

Die Sporulationsrate beim Futterzusatz betrug im Mittelwert der vier Tage 69,3 %. Die Rate war um 10% geringer als die der Kontrollgruppe bei 24° C. Die ersten beiden Platten an T1 und T2 wiesen eine deutlich geringere Sporulationsrate im Durchschnitt auf als an den beiden letzten Zeitpunkten. Der Chi-Quadrat Test zeigte keinen signifikanten Unterschied an den vier Tagen ($P=0,999$). Die Platten wurden an T1 15 Tage, an T2 sechs Tage, an T3 sieben Tage und an T4 sechs Tage nach dem Befüllen der Platten ausgezählt.

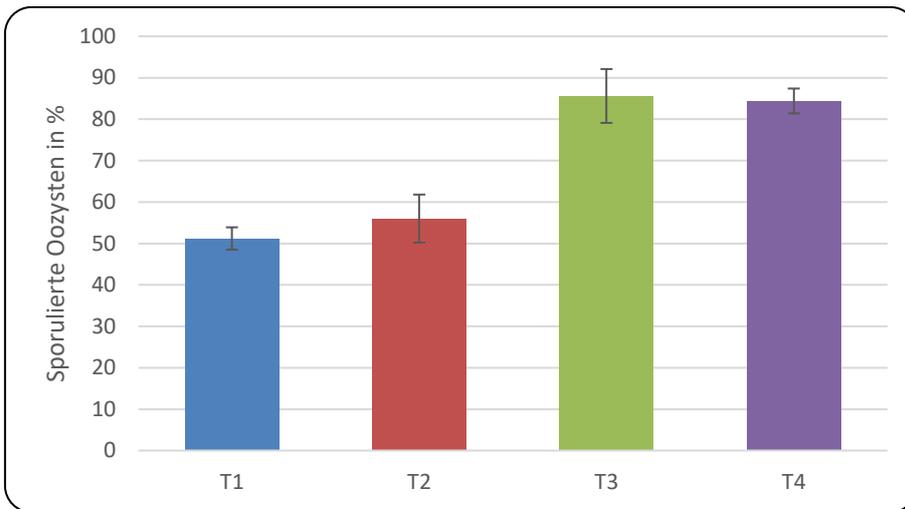


Abb. 11: Durchschnitt der sporulierten Oozysten in % mit Futterzusatz zu allen vier Zeitpunkten.

Im Vergleich zwischen den Proben mit Futterzusatz und der unbehandelten Kontrollgruppe, war eine gehemmte Sporulation während den ersten beiden Zeitpunkten beim Futterzusatz zu erkennen. Bei den letzten Zeitpunkten konnte man aber keinen Unterschied der beiden Ansätze erkennen, sodass hier kein Effekt mehr des Futterzusatzes sichtbar war (Abb. 10). An T1-T3 waren signifikante Unterschiede zwischen dem Futterzusatz und der Kontrollgruppe zu erkennen ($P < 0,0001$ für T1 und T2, $P = 0,005$ für T3). Am letzten Zeitpunkt T4 konnte kein signifikanter Unterschied gezeigt werden ($P = 0,867$).

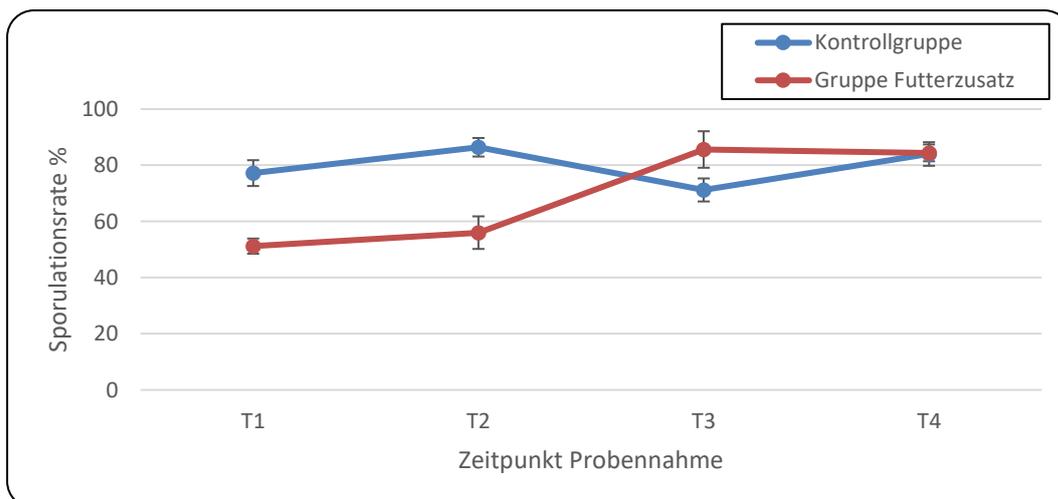


Abb. 12: Vergleichende Betrachtung der Sporulationsrate in % bei der Kontrollgruppe und der Gruppe, die den Futterzusatz erhalten hatte.

5. Diskussion

5.1. Hemmung der Sporulation

In dieser Arbeit wurde getestet, unter welchen Bedingungen die Sporulation der Oozysten von *C. suis* gehemmt wird, im Vergleich zu Oozysten, welche unter Standardbedingungen inkubiert wurden. Es gibt verschiedene Angaben hinsichtlich der optimalen Lagerungstemperatur, damit die Oozysten sporulieren können. Einerseits gibt es Angaben dazu, dass die Oozysten bei 37 °C nach zwölf Stunden komplett sporuliert sind (Lindsay et al. 1982), andererseits wird eine vollständige Sporulation bei Temperaturen von 20 °C bis 30 °C nach 24 Stunden dokumentiert (Langkjær und Roepstorff 2008).

Die Hemmung der Sporulation verhindert die Entwicklung infektionsfähiger (sporulierter) Oozysten und kann daher über die Reduktion des Infektionsdrucks zur Prävention der Kokzidiose beitragen. In entsprechenden Tests kann so getestet werden, ob sich ein Desinfektionsmittel für den Einsatz gegen Kokzidien eignet. Dabei werden die benötigte Konzentration und Einwirkdauer untersucht, mit der eine Hemmung erfolgreich möglich ist. Der Sporulationshemmtest wurde für *E. tenella* beim Geflügel etabliert. Die Wirksamkeit von Preventol® CMK (Lanxess, Köln, Germany) und Neopredisan 135-1® (Menno Chemie, Norderstedt, Germany) konnte so mit einem standardisierten Verfahren getestet werden (Daugschies et al. 2002). Der Sporulationshemmtest ist allerdings derzeit kein anerkanntes Verfahren zur Prüfung nach den Richtlinien der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft.

5.2. Desinfektionsmittel

Die Desinfektionsmittel gegen Parasiten unterliegen einem standardisierten Prüfverfahren des Ausschusses der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG). Für die Aufnahme eines Desinfektionsmittels in die Liste der DVG setzt die Bestimmung der MHK, die Bestimmung eines geeigneten Neutralisationsmittels sowie die Prüfung im Suspensions- und Keimträgertest voraus. Zum Vergleich des Sporulationshemmtests wird die Testung von Desinfektionsmittel an unentwickelten Eiern des Schweinespulwurms *A. suum* herangezogen. Die Eier werden aus dem Dünndarm von Schlachtschweinen gewonnen. Die Spulwurmeier werden unter dem Mikroskop untersucht, um den Entwicklungsgrad festzustellen. Die Eispension kann für 3 Wochen im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt werden, wenn täglich die Hälfte der Flüssigkeit gewechselt wird. Beim Suspensionstest wird das zu prüfende

Desinfektionsmittel bei $10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ und fakultativ bei $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Unmittelbar vor dem Test wird das Desinfektionsmittel in doppelter Anwendungskonzentration mit Wasser spezifischer Härte (WSH) angesetzt. Alle Ansätze werden doppelt angelegt, wobei pro Glaspetrischale 0,5 ml Desinfektionsmittel und 0,5 ml Eisuspension hinzugefügt werden. Für die Kontrolle wird WSH statt Desinfektionsmittel verwendet. Die Proben werden mittels Schüttelapparat in permanenter Bewegung gehalten während der zu prüfenden Zeit (30, 60, 90, 120 und 180 Minuten). Die Suspension wird in ein mit WSH gefülltes Becherglas (1500-2000 ml) überführt und bei Raumtemperatur wird eine Sedimentation über 24 Stunden durchgeführt. Der Überstand wird verworfen und das Sediment wird in Zellkulturplatten überführt, die bei 25°C für 20 Tage inkubiert werden. (Ausschuss „Desinfektion“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft 2021).

Im Sporulationshemmtest wurde das Flächendesinfektionsmittel mikrocid® AF liquid getestet, welches nicht in der Liste der DVG steht. Die Chemikalie wurde nicht, wie in dem Prüfverfahren angegeben, vor der Sedimentation zu der Suspension hinzugefügt und somit wurden auch keine speziellen Einwirkzeiten getestet. Das Desinfektionsmittel wurde auch vor dem Test nicht auf eine vorgegebene Temperatur gebracht. Die gezeigte Hemmung der Sporulation von *C. suis* bei 4°C könnte, ähnlich wie im dem Prüfverfahren für *A. suum*, für künftige Tests zur Aufbewahrung der Oozysten dienen.

Zusätzlich zum Suspensionstest, wird, laut DVG Richtlinien, noch ein Keimträgertest zur Prüfung eines Desinfektionsmittels durchgeführt, wobei dieser hier nicht durchgeführt wurde und kein Vergleich möglich ist.

5.3. Hemmung der Oozysten anderer Kokzidienarten

Die Oozysten der Eimerien von Schafen können, ähnlich wie die Oozysten von *C. suis*, aufbereitet werden, um Sporulationshemmtests durchzuführen, wobei eine Kühlung bei 4°C die Sporulation komplett hemmt (Saratsis et al. 2012). Bei *C. suis* konnten ähnliche Ergebnisse beobachtet werden. Auch hier wurde die Sporulation bei 4°C beinahe zur Gänze verhindert.

Auch beim Geflügel spielen Kokzidien eine wichtige Rolle in der Landwirtschaft. Bei *E. tenella* wurde eine hohe Sporulationsrate von mindestens 95 % bei einer Temperatur von 25°C und einer Inkubationszeit von drei Tagen erreicht (Daughschies et al. 2002). In einem Versuch zur Untersuchung der Sporulationshemmung von Pinienrindenextrakt wurden *E. tenella*, *E. maxima* und *E. acervulina* bei einer Temperatur von $25\text{-}29^{\circ}\text{C}$, abhängig von der Eimerienspezies, zur Sporulation gebracht (Molan et al. 2009). Bei *C. suis* wurden zwar keine

95 % an Sporulation bei Raumtemperatur (24 °C) beobachtet, aber unter den untersuchten Proben, war das die Probe mit der höchsten Sporulationsrate.

Der Sporulationshemmtest zeigte die Sporulationsrate der verschiedenen Temperaturen und einem Desinfektionsmittel bei *C. suis* auf. Bei 4° C waren die Oozysten beinahe zur Gänze an der Sporulation gehemmt und im Mikroskop sehr gut zu identifizieren. An den beiden Zeitpunkten T1 und T4 wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt. Ein signifikanter Unterschied in den Sporulationsraten konnte zu den Kontrollproben bei Raumtemperatur gesehen werden, was auch schon bei der deutlichen Differenz der Ergebnisse zu sehen war. Bei 4° C kann man eine zuverlässige Hemmung der Sporulation annehmen, wobei nach 19 und 21 Tagen ausgezählt wurde. Für einen zukünftigen Sporulationshemmtest im Hinblick auf eine Prüfung von Desinfektionsmittel gegen *C. suis* wäre das eine Möglichkeit, die unsporulierten Oozysten aufzubewahren. Für spezifischere Daten könnte man noch mehr Proben untersuchen und zu verschiedenen Zeitpunkten auswerten, um eine maximale Lagerdauer bestimmen zu können.

Die Proben bei Raumtemperatur lieferten sehr hohe Sporulationsraten, was zu erwarten war. Dennoch sporulierten ca. 20 % der Oozysten nicht. Die Ergebnisse der Oozysten variierten etwas mehr an den beiden Zeitpunkten als bei 4 °C, zeigten aber keinen signifikanten Unterschied an allen Zeitpunkten.

Bei 11 °C zeigten sich größere Unterschiede in der Sporulationsrate zwischen beiden Zeitpunkten, wobei sich hier dennoch kein signifikanter Unterschied zeigte. Die Wells sind kaum ausgetrocknet, allerdings wurde einmal bei der Platte von T1 jedes Well mit Leitungswasser wieder aufgefüllt. Das könnte ein Grund dieser Diskrepanz sein, wobei auch bei 4 °C bei einer Platte alle Wells aufgefüllt wurden und kein großer Unterschied zwischen den beiden Platten sichtbar war. Im Vergleich zu den Kontrollproben war ein signifikanter Unterschied zu erkennen, wobei bei T1 die schwächste Signifikanz unter den untersuchten Proben zu sehen war.

Bei 40 °C konnte man, ähnlich wie bei 11 °C, sehen, dass es zwischen T1 und T4 Schwankungen in der Rate der sporulierten Oozysten gab. Dennoch konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Proben gezeigt werden. Ein großes Problem bei der Temperatur von 40 °C war das Verhindern des Austrocknens, was die unterschiedlichen Ergebnisse erklären könnte. Daher sind die Ergebnisse dieser Platten wenig aussagekräftig. Hier müsste öfter kontrolliert werden, ob die Proben genug Flüssigkeit enthalten. Eine andere

Möglichkeit dieses Problem zu verhindern, ist von Beginn an mehr Leitungswasser pro Well hinzuzufügen. Bei 40 °C wurden die zwei Platten beider Zeitpunkte im Abstand von acht Tagen untersucht. Das könnte hier ein weiterer Grund für die große Abweichung der Resultate der Platten sein. Hier war auch bei beiden Temperaturen von 11 °C und 40°C die Auswertung schwieriger als bei 4 °C, da mehr Hintergrundmaterial, wie Futterreste, im Mikroskop sichtbar waren. Manche Strukturen beim Auszählen konnten nicht eindeutig zugeordnet werden und wurden bei der Auswertung nicht weiter beachtet. Auch hier besteht ein signifikanter Unterschied und somit Reduktion der Sporulationsrate zu den Kontrollproben an beiden Zeitpunkten.

Die Beurteilung mit 2%igem Flächendesinfektionsmittel mikrocid® AF liquid bei Raumtemperatur (24 °C) hatte nur bedingt Aussagekraft, da die Platte von T1 nicht auswertbar war. In der Probe konnte keine einzige Oozyste gefunden werden. Womöglich ist ein Fehler beim Pipettieren oder der Lagerung entstanden, da alle Wells betroffen waren. Zur Vermeidung dieses Problems sollten in zukünftigen Tests die Oozysten nach Befüllen der Wells unter dem Mikroskop kontrolliert werden. Die Platte von T4 zeigte unsporulierte Oozysten von 58 %, was für eine wirksame Desinfektion nicht ausreichend wäre. Es besteht dennoch ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollprobe und dem Desinfektionsmittel an T4 und damit einer gesenkter Sporulationsrate durch die Chemikalie. Um aussagekräftigere Ergebnisse zu erhalten, müsste man neue Platten anfertigen, da hier kein Vergleich zu einer anderen Probe dargestellt werden konnte. Man könnte auch versuchen das Desinfektionsmittel in einer höheren Anwendungskonzentration zu testen, ähnlich dem Suspensionstest nach dem Prüfverfahren der DVG.

Der getestete Futterzusatz konnte an den ersten beiden Tagen der Probennahme eine Hemmung im Vergleich zur Kontrollgruppe erzielen und einen signifikanten Unterschied zeigen. An den beiden letzten Zeitpunkten lag wenig Unterschied zwischen beiden Gruppen vor, wobei an T3 die Gruppe des Futterzusatzes sogar eine höhere Sporulationsrate als die Kontrollgruppe zeigte. Es war ein signifikanter Unterschied an T3 zwischen den beiden Proben zu sehen, was bedeutet, dass die Kontrollprobe eine deutlich geringere Sporulationsrate zeigte als der Zusatz. Gruppe A zeigte zwar geringere OpG als die Kontrollgruppe, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten festgestellt wurde. Jedes Ferkel beider Gruppen hatte mindestens einmal Durchfall und war AF-positiv über den Studienzeitraum. Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse ist die zu kurze Wirkung des Präparats. Es könnte eine an T1 und T2 noch einen ausreichenden Wirkspiegel haben, um die Sporulation

signifikant zu hemmen. Für eine weitere Evaluierung könnte die Sporulation nach mehrmaliger Gabe des Zusatzes untersucht werden. Eine weitere Möglichkeit für die Resultate wäre, dass bei den ersten beiden Zeitpunkten ein anderes Ferkel beprobt wurde als bei den letzten beiden Zeitpunkten. Des Weiteren könnte die oozystenreiche Ausscheidungsphase verpasst worden sein, da nur einmal am Tag beprobt wurde.

Zusammenfassend zeigte die Arbeit eine zuverlässige Hemmung der Sporulation von *C. suis* bei 4 °C. Alle anderen Temperaturen und Chemikalien konnten keine zufriedenstellenden Ergebnisse im Sinne eines Sporulationshemmtest zeigen. Für ein standardisiertes Verfahren im Sinne von Tests mit Desinfektionsmittel müsste man die Bedingungen an die Prüfmethode der DVG anpassen. Festgelegte Anwendungskonzentrationen und Einwirkdauer von den getesteten Substanzen wären wichtige Parameter zur genauen Bestimmung der Eignung eines Desinfektionsmittels. Zusätzlich vorgegebene Temperaturen der verwendeten Chemikalien führen zu exakteren Ergebnissen.

6. Zusammenfassung

Cystoisospora suis ist einer der wichtigsten Durchfallerreger beim Ferkel. Die Morbidität ist bei der Cystoisosporose hoch, die Mortalität hingegen sehr gering. Diagnostisch werden die Oozysten mittels Flotationsverfahren oder Autofluoreszenz nachgewiesen. Die einzige zugelassene Therapie ist der Einsatz von Toltrazuril. Zu den prophylaktischen Maßnahmen gehören gute Hygiene, sowie ein etabliertes Rein-Raus-Verfahren und die Anwendung wirksamer Desinfektionsmittel. Hierfür gibt es Leitlinien der DVG wie die Prüfung eines Desinfektionsmittels zu erfolgen hat, um für das jeweilige Einsatzgebiet eine Zulassung zu erhalten. Für *C. suis* existiert kein vergleichbares Verfahren oder Daten dazu. Als vergleichendes Modell wird die Leitlinie für Desinfektionsmittel gegen *Ascaris suum* (Larvenentwicklungshemmtest) herangezogen. Für die Untersuchung solcher Daten wurden Ferkel in drei Gruppen, welche zuvor randomisiert wurden, aufgeteilt und am dritten Lebenstag (SD3) mit Oozysten von *C. suis* infiziert. Eine Gruppe wurde mit einem Futterzusatz behandelt, die zweite Gruppe wurde mit Toltrazuril therapiert und die letzte Gruppe diente als Kontrollgruppe. Der Kot der Ferkel wurde mittels Kotausstrich, Autofluoreszenz und McMaster-Zählung untersucht. Die Oozysten wurden anschließend angereichert, um 6-Well-Platten mit ca. 500 Oozysten pro Well zu bestücken. Für den Sporulationshemmtest wurden vier Temperaturbereiche (4 °C, 11 °C, 24 °C, 40 °C) und ein Desinfektionsmittel (2%igem Flächendesinfektionsmittel mikrocid® AF liquid) bei Raumtemperatur an zwei Zeitpunkten (T1 und T4) ausgewählt, wobei bei 24 °C zusätzlich noch zwei Ansätze hergestellt wurden (T2 und T3). Der Futterzusatz wurde an vier Zeitpunkten (T1-T4) angesetzt. Die Platten wurden mindestens für vier Tage inkubiert, bevor mit der Zählung der Oozysten begonnen wurde. Die Ergebnisse der Auszählungen zeigten die stärkste Hemmung der Sporulation bei 4 °C. Die Sporulationsrate lag bei weniger als 3 %. Bei 40 °C und 11 °C sporulierten die Oozysten zwischen 30 % und 70 %, wobei hier die Resultate stärkere Schwankungen zeigten. Bei 24 °C betrug die Sporulationsrate durchschnittlich ca. 80 %. Bei dem 2%igem Flächendesinfektionsmittel mikrocid® AF liquid konnte der Ansatz von T1 nicht ausgewertet werden und die Probe von T4 zeigte im Durchschnitt 42 % an sporulierten Oozysten. Der getestete Futterzusatz konnte nur an den ersten beiden Zeitpunkten eine Sporulationshemmung erzielen und zu den letzten beiden Zeitpunkten keinen wesentlichen Unterschied zur Kontrollgruppe zeigen. Für zukünftige In-Vitro-Tests kann bei 4° C eine zuverlässige Hemmung erwartet werden und zur Lagerung unsporulierter Oozysten verwendet werden. Man könnte noch weitere Tests zur maximalen Haltbarkeit der unsporulierten

Oozysten durchführen. Angelehnt an die Prüfverfahren der DVG wären Temperatur der verwendeten Desinfektionsmittel, Anwendungskonzentration und Einwirkdauer wichtige Parameter, um ein möglichst einheitliches Verfahren zu etablieren.

7. Summary

Cystoisospora suis is one of the most important causative agents of diarrhoea in neonatal piglets. Diarrhoea occurs at the age of 7-28 days and displays a pasty, liquid consistency with no blood present. Additionally, to diarrhoea, the daily weight gain of the piglets declines, which means a significant economic loss. The morbidity of cystoisosporosis is high, the mortality on the other hand rather low. Diagnostics to detect the oocysts include a modified flotation and fluorescence microscopy. The only approved drug for the treatment of cystoisosporosis is toltrazuril. Preventive measures include good hygiene practices such as all-in-all-out procedures and disinfection, although just a few are efficient against coccidia. Guidelines of DVG to test for efficacy of disinfectants are available for other parasites but not for *C. suis*. The test method of *Ascaris suum* larval development was taken as a comparison model. To investigate such conditions, piglets were divided into three randomized groups and infected with oocysts on the third day of life (SD3). One group was treated with a feed additive, the second group received toltrazuril and the last group was left untreated and served as control group. The faeces of the piglets were examined through faecal smears, autofluorescence and McMaster method. The oocysts were further concentrated to fill 6-well-plates with 500 oocysts each. The conditions selected for the sporulation inhibition assay were four temperatures (4 °C, 11 °C, 24 °C, 40 °C) and a disinfectant (2 % surface disinfectant mikrozyd® AF liquid) at room temperature at two different points in time (T1 und T4), whereas at 24 °C there were made two additional samples (T2 and T3). The samples for the feed additive were prepared at four different points in time (T1-T4). The samples were incubated for at least four days before the oocysts were counted. The samples with the least sporulated oocysts were found at 4 °C. The sporulation rate was under 3 % at that temperature. At 40 °C and 11 °C the rate of sporulated oocysts was between 30 % and 70 % but the results varied a lot. At 24 °C the main sporulation rate was about 80 % of all the oocysts counted. The 2 % surface disinfectant mikrozyd® AF liquid could not be examined at T1 and the second sample at T4 showed an average of 42 % of sporulated oocysts. The feed additive only showed a significant inhibition of sporulation at the first two days, a significant higher sporulation than the control group on the third day and did not differ from the control group on the last days. For future in vitro test procedures the temperature at 4° C provides a reliable inhibition of sporulation. There could be further testing to examine the durability of the unsporulated oocysts at that temperature. Similar to the guidelines of the DVG, a standardized temperature of the used disinfectants, an application concentration and an exposure time seems advisable to establish a consistent test.

8. Literaturverzeichnis

Ausschuss „Desinfektion“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft 2021: DVG-Liste „Tierhaltungsbereich. <https://www.desinfektion-dvg.de/index.php?id=1800>.

Barta, J. R., Schrenzel, M. D., Carreno, R., Rideout, B. A. (2005): The genus *Atoxoplasma* (Garnham 1950) as a junior objective synonym of the Genus *Isoospora* (Schneider 1881) species infecting birds and resurrection of *Cystoisospora* (Frenkel 1977) as the correct genus for *Isoospora* species infecting mammals. *Journal of Parasitology* 91, 726–727.

Biester, H. E., Murray, C. (1934): Studies in infectious enteritis of swine. VIII. *Isoospora suis* n. sp. in swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 85, 207–219.

Carreno, R. A., Schnitzler, B. E., Jeffries, A. C., Tenter, A. M., Johnson, A. M., Barta, J. R. (1998): Phylogenetic analysis of coccidia based on 18S rDNA sequence comparison indicates that *Isoospora* is most closely related to *Toxoplasma* and *Neospora*. *The Journal of eukaryotic microbiology* 45, 184–188.

Chan, G., Farzan, A., Lay, J. de, McEwen, B., Prescott, J. F., Friendship, R. M. (2013): A retrospective study on the etiological diagnoses of diarrhea in neonatal piglets in Ontario, Canada, between 2001 and 2010. *Canadian Journal of Veterinary Research* 77, 254–260.

Damriyasa, I. M., Bauer, C. (2006): Prevalence and age-dependent occurrence of intestinal protozoan infections in suckling piglets. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 119, 287–290.

Dauguschies, A., Böse, R., Marx, J., Teich, K., Friedhoff, K.T (2002): Development and application of a standardized assay for chemical disinfection of coccidia oocysts. *Veterinary Parasitology* 103, 299–308.

Deplazes, P., Joachim, A., Mathis, A., Strube, C., Taubert, A., Samson-Himmelstjerna, G., Zahner, H. (2021): *Parasitologie für die Tiermedizin*. 4., überarbeitete Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, S. 45.

Doré, M., Morin, M. (1987): Porcine neonatal coccidiosis: evaluation of monensin as preventive therapy. *The Canadian Veterinary Journal* 28, 663–666.

Driesen, S. J., Carland, P. G., Fahy, V. A. (1993): Studies on preweaning piglet diarrhoea. *Australian veterinary journal* 70, 259–263.

Ernst, J. V., Lindsay, D. S., Jarvinen, J. A., Todd, K. S., Bane, D. P. (1986): The sporulation time of *Isospora suis* oocysts from different sources. *Veterinary Parasitology* 22, 1–8.

Eysker, M., Boerdam, G. A., Hollanders, W., Verheijden, J.H.M. (1994): The prevalence of *Isospora suis* and *strongyloides ransomi* in suckling piglets in the Netherlands. *Veterinary Quarterly* 16, 203–205.

Fatemi, A., Razavi, S. M., Asasi, K., Torabi Goudarzi, M. (2015): Effects of *Artemisia annua* extracts on sporulation of *Eimeria* oocysts. *Parasitology Research* 114, 1207–1211.

Fayer, R. (1980): Epidemiology of protozoan infections: The coccidia. *Veterinary Parasitology* 6, 75–103.

Frenkel, J. K. (1977): *Besnoitia wallacei* of Cats and Rodents: With a Reclassification of Other Cyst-Forming Isosporoid Coccidia. *Journal of Parasitology* 63, 611–628.

Girard, C., Morin, M. (1987): Amprolium and furazolidone as preventive treatment for intestinal coccidiosis of piglets. *The Canadian Veterinary Journal* 28, 667–669.

Harleman, J. H., Meyer, R. C. (1983): *Isospora suis* infection in piglets. A review. *Veterinary Quarterly* 5, 178–185.

Harleman, J. H., Meyer, R. C. (1984): Life cycle of *Isospora suis* in gnotobiotic and conventionalized piglets. *Veterinary Parasitology* 17, 27–39.

Harleman, J. H., Meyer, R. C. (1985): Pathogenicity of *Isospora suis* in gnotobiotic and conventionalised piglets. *Veterinary Record* 116, 561–565.

Hinney, B., Cvjetković, V., Espigares, D., Vanhara, J., Waehner, C., Ruttkowski, B., Selista, R., Sperling, D., Joachim, A. (2020): *Cystoisospora suis* control in Europe is not always effective. *Frontiers in Veterinary Science* 7, 113.

Hiob, L., Holzhausen, I., Sperling, D., Pagny, G., Meppiel, L., Isaka, N., Dauschies, A. (2019): Efficacy of an injectable toltrazuril – gleptoferron (Forceris®) to control coccidiosis (*Cystoisospora suis*) in comparison with iron supplemented piglets without anticoccidial treatment. *Veterinary Parasitology X* 1, 100002.

Joachim, A., Dülmer, N., Dauschies, A., Roepstorff, A. (2001): Occurrence of helminths in pig fattening units with different management systems in Northern Germany. *Veterinary Parasitology* 96, 135–146.

- Joachim, A., Guerra, N., Hinney, B., Hodžić, A., Karembe, H., Shrestha, A., Sperling, D. (2019): Efficacy of injectable toltrazuril-iron combination product and oral toltrazuril against early experimental infection of suckling piglets with *Cystoisospora suis*. *Parasites and Vectors* 12, 272.
- Joachim, A., Mundt, H.-C. (2011): Efficacy of sulfonamides and Baycox® against *Isospora suis* in experimental infections of suckling piglets. *Parasitology Research* 109, 1653–1659.
- Joachim, A., Ruttkowski, B., Sperling, D. (2018a): Detection of *Cystoisospora suis* in faeces of suckling piglets - when and how? A comparison of methods. *Porcine Health Management* 4, 20.
- Joachim, A., Shrestha, A. (2020): Coccidiosis of Pigs. In: J. P. Dubey, Hrsg. *Coccidiosis in Livestock, Poultry, Companion Animals and Humans*. Boca Raton, FL: CRC Press, 125–145.
- Joachim, A., Shrestha, A., Freudenschuss, B., Palmieri, N., Hinney, B., Karembe, H., Sperling, D. (2018b): Comparison of an injectable toltrazuril-gleptoferron (Forceris®) and an oral toltrazuril (Baycox®) + injectable iron dextran for the control of experimentally induced piglet cystoisosporosis. *Parasites & Vectors* 11, 206.
- Koudela, B., Kučerová, S. (1999): Role of acquired immunity and natural age resistance on course of *Isospora suis* coccidiosis in nursing piglets. *Veterinary Parasitology* 82, 93–99.
- Langkjær, M., Roepstorff, A. (2008): Survival of *Isospora suis* oocysts under controlled environmental conditions. *Veterinary Parasitology* 152, 186–193.
- Larsen, M. N., Roepstorff, A. (1999): Seasonal variation in development and survival of *Ascaris suum* and *Trichuris suis* eggs on pastures. *Parasitology* 119, 209–220.
- Lindsay, D. S., Current, W. L., Ernst, J. V. (1982): Sporogony of *Isospora suis* Biester, 1934 of swine. *Journal of Parasitology* 68, 861–865.
- Lindsay, D. S., Current, W. L., Taylor, J. R. (1985): Effects of experimentally induced *Isospora suis* infection on morbidity, mortality, and weight gains in nursing pigs. *American Journal of Veterinary Research* 46, 1511–1512.
- Martineau, G. P., Del Castillo, J. (2000): Epidemiological, clinical and control investigations on field porcine coccidiosis: Clinical, epidemiological and parasitological paradigms? *Parasitology Research* 86, 834–837.

- Matuschka, F. R., Männer, K. (1981): The development of weaned piglets experimentally infected with *Isospora suis* as a model for the effect of lasalocid and halofuginone on coccidia. *Zentralblatt für Bakteriologie A* 248, 565–574.
- Meyer, C., Joachim, A., Dauschies, A. (1999): Occurrence of *Isospora suis* in larger piglet production units and on specialized piglet rearing farms. *Veterinary Parasitology* 82, 277–284.
- Molan, A. L., Liu, Z., De, S. (2009): Effect of pine bark (*Pinus radiata*) extracts on sporulation of coccidian oocysts. *Folia Parasitologica* 56, 1–5.
- Mundt, H.-C., Cohnen, A., Dauschies, A., Joachim, A., Prosl, H., Schmäscke, R., Westphal, B. (2005): Occurrence of *Isospora suis* in Germany, Switzerland and Austria. *Journal of Veterinary Medicine Series B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 52, 93–97.
- Mundt, H.-C., Dauschies, A., Wüstenberg, S., Zimmermann, M. (2003a): Studies on the efficacy of toltrazuril, diclazuril and sulphadimidine against artificial infection with *Isospora suis* in piglets. *Parasitology Research* 90, 160-162.
- Mundt, H.-C., Joachim, A., Becka, M., Dauschies, A. (2006): *Isospora suis*: an experimental model for mammalian intestinal coccidiosis. *Parasitology Research* 98, 167–175.
- Mundt, H.-C., Joachim, A., Dauschies, A., Zimmermann, M. (2003b): Population biology studies on *Isospora suis* in piglets. *Parasitology Research* 90, S158-S159.
- Mundt, H.-C., Mundt-Wüstenberg, S., Dauschies, A., Joachim, A. (2007): Efficacy of various anticoccidials against experimental porcine neonatal isosporosis. *Parasitology Research* 100, 401–411.
- Niestrath, M., Takla, M., Joachim, A., Dauschies, A. (2002): The role of *Isospora suis* as a pathogen in conventional piglet production in Germany. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 49, 176–180.
- Otten, A. (1995): The epizootiology and pathogenic significance of infections with *Isospora suis* in ten piglet production operations in Nordrhein-Westfalen: [Dissertation]. Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Permin, A., Yelifari, L., Bloch, P., Steenhard, N., Hansen, N. P., Nansen, P. (1999): Parasites in cross-bred pigs in the Upper East Region of Ghana. *Veterinary Parasitology* 87, 63–71.

- Pettersson, E., Hestad, S., Möttus, I., Skiöldebrand, E., Wallgren, P. (2019): Rotavirus and *Cystoisospora suis* in piglets during the suckling and early post weaning period, in systems with solid floors and age segregated rearing. *Porcine Health Management* 5, 7.
- Roepstorff, A., Nilsson, O., Oksanen, A., Gjerde, B., Richter, S. H., Örtenberg, E., Christensson, D., Martinsson, K. B., Bartlett, P. C., Nansen, P., Eriksen, L. et al. (1998): Intestinal parasites in swine in the Nordic countries: Prevalence and geographical distribution. *Veterinary Parasitology* 76, 305–319.
- Saratsis, A., Regos, I., Tzanidakis, N., Voutzourakis, N., Stefanakis, A., Treuter, D., Joachim, A., Sotiraki, S. (2012): In vivo and in vitro efficacy of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) against *Eimeria spp* in lambs. *Veterinary Parasitology* 188, 1–9.
- Stevenson, P. (1979): The influence of environmental temperature on the rate of development of *Ascaris suum* eggs in Great Britain. *Research in Veterinary Science* 27, 193–196.
- Straberg, E., Dauschies, A. (2007): Control of piglet coccidiosis by chemical disinfection with a cresol-based product (Neopredisan 135-1®). *Parasitology Research* 101, 599–604.
- Stuart, B. P., Bedell, D. M., Lindsay, D. S. (1981): Coccidiosis in swine: effect of disinfectants on in vitro sporulation of *Isospora suis* oocysts. *Veterinary Medicine Small Animal Clinician* 76, 1185–1186.
- Stuart, B. P., Bedell, D. M., Lindsay, D. S. (1982a): Coccidiosis in swine: a search for extraintestinal stages of *Isospora suis*. *Veterinary Record* 110, 82–83.
- Stuart, B. P., Gosser, H. S., Allen, C. B., Bedell, D. M. (1982b): Coccidiosis in swine: Dose and age response to *Isospora suis*. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 46, 317–320.
- Stuart, B. P., Lindsay, D. S. (1986): Coccidiosis in Swine. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 2, 455–468.
- Stuart, B. P., Lindsay, D. S., Ernst, J. V., Gosser, H. S. (1980): *Isospora suis* Enteritis in Piglets. *Veterinary Pathology* 17, 84–93.
- Stuart, B. P., Sisk, D. B., Bedell, D. M., Gosser, H. S. (1982c): Demonstration of immunity against *Isospora suis* in swine. *Veterinary Parasitology* 9, 201–209.
- Vetterling, J. M. (1965): Coccidia (Protozoa: Eimeriidae) of swine. *The Journal of Parasitology* 51, 897–912.

Wieler, L. H., Ilieff, A., Herbst, W., Bauer, C., Vieler, E., Bauerfeind, R., Failing, K., Klös, H., Wengert, D., Baljer, G., Zahner, H. (2001): Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in Southern Germany. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 48, 151–159.

Worliczek, H. L., Buggelsheim, M., Saalmüller, A., Joachim, A. (2007): Porcine isosporosis: Infection dynamics, pathophysiology and immunology of experimental infections. *Wiener Klinische Wochenschrift* 119, 33–39.

9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Anteil der AF-positiven Tiere in % der Gruppe A, B und C zwischen SD7 und SD20.	17
Abb. 2: Durchschnittliche OpG der Gruppe A, B und C zwischen SD7 und SD20.	18
Abb. 3: Anteil der Tiere mit Durchfall in % der Gruppe A, B und C zwischen SD7 und SD20.	18
Abb. 4: Mittelwerte der Faecal Scores der Gruppe A, B und C zwischen SD7 und SD20.	19
Abb. 5: Durchschnittsraten sporulierter Oozysten in % bei Raumtemperatur (24 °C) zu allen vier Zeitpunkten.	21
Abb. 6: Durchschnitt der Sporulationsraten bei 4 °C zu T1 und T4.	21
Abb. 7: Durchschnitt der sporulierten Oozysten in % bei 11 °C zu T1 und T4.	22
Abb. 8: Durchschnitt der sporulierten Oozysten in % bei 40 °C zu T1 und T4.	23
Abb. 9: Durchschnitt der sporulierten Oozysten in % mit 2%igem Flächendesinfektionsmittel mikroloid® AF liquid bei Raumtemperatur (24 °C) zu T1 und T4.	23
Abb. 10: Vergleichende Rate der sporulierten Oozysten in % der Proben aller Temperaturen und des Desinfektionsmittels zu T1 und T4.	24
Abb. 11: Durchschnitt der sporulierten Oozysten in % mit Futterzusatz zu allen vier Zeitpunkten.	25
Abb. 12: Vergleichende Betrachtung der Sporulationsrate in % bei der Kontrollgruppe und der Gruppe, die den Futterzusatz erhalten hatte.	25

Tab. 1: Behandlungsgruppen. KGW: Körpergewicht. SD: Study Day (Studientag, wobei SD 1 = Tag nach der Geburt).	11
Tab. 2: Schematische Darstellung der verschiedenen Ansätze zwischen T1-T4.....	16
Tab. 3: Ergebnisse aus den McMaster Auszählungen und die daraus folgenden Berechnungen zur Oozystenkonzentration von Gruppe A (behandelt mit Futterzusatz) und Gruppe C (unbehandelt). Verdünnungsfaktor: 10.	20

Danksagung

Ich möchte mich besonders bei Prof. Joachim für die Betreuung der Diplomarbeit bedanken, bei der sie sehr viel Geduld und Unterstützung gezeigt hat.

Einen weiteren großen Dank möchte ich an Frau Ruttkowski für die großartige Unterstützung meines praktischen Teils und bei der Aufbereitung der Proben. Meine Fragen wurden stets beantwortet und ich wurde gut betreut. Des Weiteren möchte ich Aruna Shrestha, PhD für die Betreuung und Hilfe beim praktischen Teil danken.

Ich möchte auch den Tierpflegerinnen, Frau Martina Lastufka und Frau Sonja Barbara Rohrer, für die große Hilfe beim Beprobieren danken. Sie haben mir geduldig und empathisch den Arbeitsablauf erklärt und mich in diesen eingebunden. Die Tiere erfuhren durch die Betreuung der Mitarbeiter eine hervorragende Pflege.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben. Besonders möchte ich mich noch bei meinem Partner bedanken, der mich über meine gesamte Studienlaufbahn bekräftigt hat und mich immer auf den Weg zu meinem Traumberuf unterstützt hat.