

Aus dem Department für

Biomedizinische Wissenschaften der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Sprecher: O. Univ.-Prof. Dr. med. vet. Matthias Müller

Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Leitung: Univ.-Prof. Dr. med. univ. Veronika Sexl

**Untersuchungen zum praxistauglichen Einsatz von Zinkchlorid-  
Natriumchlorid-Lösung versus Zinksulfatlösung zur Eimerien-  
Diagnostik bei Kamelidenpatienten**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von:

Theresa Hösl

Wien, im September 2021

Betreuerin und erste Begutachtung:

Ass. Prof. Dr. rer. nat. Agnes Dadak, DVetPharm

Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Department für Biomedizinische Wissenschaften

der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Veterinärplatz 1, 1210 Wien

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Literaturübersicht</b> .....	<b>3</b>
2.1 Eimerienarten bei Neuweltkameliden.....	3
2.2 Pathogenität der Eimerien.....	6
2.3 Eimerienmanagement .....	8
2.4 Untersuchungen zum Vorkommen kamelidenspezifischer Eimerien.....	9
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>11</b>
3.1 Suspensionsmedien.....	11
3.2 Aufarbeitungsmethoden.....	12
3.3 Modifizierte McMaster-Methode.....	12
3.4 Statistische Auswertung.....	13
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>14</b>
4.1 <i>Eimeria</i> spp.....	14
4.1.1 Oozystendetektion kleiner Eimerien mittels Zinksulfatlösung und Zinkchlorid-Natriumchlorid-Lösung.....	14
4.1.2 Vergleich der Aufarbeitungsmethoden A und B.....	17
4.2 <i>Eimeria macusaniensis</i> .....	19

<b>5. Diskussion.....</b>	<b>20</b>
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>25</b>
<b>7. Summary.....</b>	<b>26</b>
<b>8. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>27</b>
<b>9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>28</b>
9.1 Abbildungen.....	28
9.2 Tabellen.....	28
<b>10. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>29</b>
<b>11. Danksagung.....</b>	<b>35</b>

## 1. Einleitung

Die Haltung von Neuweltkameliden, zu denen Alpakas und Lamas zählen, wird in Mitteleuropa immer beliebter und die Alpaka- und Lamapopulation steigt weiter an. In Österreich werden derzeit etwa 10.000 Tiere gehalten (Erlacher 2020), da für diese Tierart keine Kennzeichnungspflicht besteht und nur die Tierhaltung gemeldet werden muss, ist diese Zahl nur ein geschätzter Wert. Für Großbritannien wurde die Kamelidenpopulation 2017 mit 35.000 Alpakas und 4.000 Lamas angegeben (Halsby et al., 2017). In Nordamerika werden Neuweltkameliden seit vielen Jahrzehnten gezüchtet und mit einer Tierzahl von etwa 53.000 Alpakas (About Alpacas 2021) und 164.941 Lamas (Llama Statistics 2021) angegeben. In Südamerika, jenem Gebiet, in dem Lamas und Alpakas ursprünglich beheimatet sind, wird die Zahl auf 8,8 Millionen (Gauly et al., 2018) geschätzt.

Endoparasitosen zählen zu den häufigsten Erkrankungen bei Neuweltkameliden, darunter auch die Eimeriose, da Eimerien ubiquitär vorkommen und saisonal unabhängig ausgeschieden werden (Rohbeck 2006; Franz et al., 2015).

Zu den bisher bei Lamas und Alpakas beschriebenen wirtsspezifischen Eimerienarten zählen *Eimeria (E.) alpaca*, *E. ivitaensis*, *E. lamae*, *E. macusaniensis*, *E. punoensis* und *E. peruviana*, wobei letztere nicht mehr von allen Literaturstellen als nachgewiesener Parasit angeführt wird (Rohbeck 2006).

Zur Pathogenität dieser Eimerienarten liegen nur wenige Daten vor. Von den genannten Arten scheint *E. macusaniensis* die höchste Pathogenität aufzuweisen, vor allem, wenn eine Infektion in Kombination mit anderen Eimerienarten auftritt (Lenghaus et al., 2004; Palacios et al., 2006; Johnson et al., 2009). Anders als bei anderen Tierarten, stellt die Eimeriose eine bei Neuweltkameliden in allen Altersklassen auftretende parasitäre Infektionskrankheit dar, die auch zum Tod der Tiere führen kann (Cebra et al., 2007). Regelmäßige parasitologische Kotuntersuchungen mit exakter Eimerien-Diagnostik sind daher sowohl in Hinblick auf therapeutische Maßnahmen bei Einzeltieren, als auch im Rahmen der Herdenbetreuung von großer Wichtigkeit. Als diagnostisches Standardverfahren gilt bis dato die Koproskopie. Zur Detektion von Eimerienoozysten aus Neuweltkamelidenkot wird meist die Flotationsmethode unter Verwendung einer Zinksulfatlösung mit unterschiedlichem spezifischen Gewicht (1,18-1,36 g/ml) oder einer Zuckerlösung (spezifisches Gewicht: 1,27-1,33 g/ml) als

Suspensionsmedium verwendet (Rohbeck 2006, Chigerwe 2007, Johnson 2007, Ballweber 2009, Twomey et al., 2010, Diaz 2016). Im Allgemeinen gilt, dass Flotationsmedien mit höherer Dichte eine bessere Detektion von größeren Eimerienoozysten erlauben. Davon betroffen ist vor allem der Nachweis von *E. macusaniensis*, der sich im Vergleich zu den anderen Eimerienarten morphologisch als besonders groß erweist.

Der vorliegenden Arbeit liegt die Hypothese zugrunde, dass die Wahl des Suspensionsmediums für die Detektion der Eimerienoozysten aller Eimerienarten aus Neuweltkamelidenkot eine entscheidende Rolle dahingehend spielt, dass anzahlmäßig mehr Oozysten nachgewiesen werden, je höher die Dichte des Mediums ist. Als weitere Hypothese wurde postuliert, dass eine mehrstündige Lagerung der zu untersuchenden Kotprobe im Suspensionsmedium (bei 4 °C) vor der Auszählung zu einer höheren Treffsicherheit bezüglich des Nachweises von Eimerienoozysten führt, als eine sofortige Untersuchung der Kotprobensuspension. Eine entsprechende Beobachtung wurde von Cebra und Stang (2008) publiziert.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, erstmalig ein international kaum genutztes und für die vorliegende Studie adaptiertes Zinkchlorid-Natriumchlorid-Medium im Vergleich zu einem Standardmedium (Zinksulfatlösung) im Rahmen des Nachweises von Eimerienoozysten mittels der für TierärztInnen einfach durchzuführenden McMaster-Untersuchungsmethode unter Anwendung zweier unterschiedlicher Probenaufarbeitungsmethoden zu evaluieren.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1 Eimerienarten bei Neuweltkameliden

Es wurden bisher sechs Neuweltkameliden-spezifische Eimerienarten in der Literatur beschrieben, die sich in Größe und Pathogenität unterscheiden: *E. punoensis*, *E. alpaca*, *E. lamae*, *E. ivitaensis*, *E. macusaniensis*, *E. peruviana*. Die sechste Art, *E. peruviana*, wurde erstmals von Yakimoff (1934) bei einem Lama beschrieben. In rezenter Literatur wird diese Eimerienart allerdings kaum noch als nachgewiesene Parasitenart angeführt (Rohbeck 2006). Im Folgenden werden daher die als gesichert geltenden fünf Eimerienarten beschrieben.

Die Eimerienarten können in zwei Gruppen, kleine und große Eimerienarten, eingeteilt werden. Zu den kleinen Eimerienarten zählen *E. punoensis*, *E. alpaca*, *E. lamae*, zu den großen zählen *E. ivitaensis* und *E. macusaniensis*.

*E. punoensis* ist die kleinste (8-11 x 5-7µm) der Eimerienarten bei Neuweltkameliden (Tab.1). Die Form ist ellipsoid bis ovoid, sie besitzen eine dünne Schale. Die nächstgrößere Art ist *E. alpaca*, mit einer Größe von 10-13x7-8 µm, deren Form ellipsoid bis rund-ovoid ist. Auch diese Art ist dünnchalig. Zu den kleinen Eimerien gehört ebenso *E. lamae*, auch mit einer dünnen Schale, einer Größe von 13-16 x 8-10 µm und einer piri- bis ovoidpiriformen Morphologie (Guerrero 1967). *E. ivitaensis* und *E. macusaniensis* zählen beide zu den großen Eimerienarten, sie sind gut doppelt so groß wie die anderen Arten. *E. ivitaensis* hat eine Größe von 32-41 x 12-14 µm, ist dickschalig, hat eine braune Farbe und besitzt eine ellipsoide Form. *E. macusaniensis* ist piriform bis ovoid-piriform, 33-40 x 16-20 µm groß, hat eine dunkelbraune Farbe und eine deutliche Mikropylenkappe im Gegensatz zu *E. ivitaensis* (Cafrune et al., 2009).

**Tab. 1:** Übersicht über bei Neuweltkameliden auftretenden Eimerienarten und Morphologie ihrer Oozysten

Eimerienart	Oozystenform	Oozystengröße (µm)	Schale der Oozyste
<i>E. punoensis</i>	ellipsoid bis ovoid	8-11 x 5-7	dünnschalig
<i>E. alpaca</i>	ellipsoid bis rund-ovoid	10-13 x 7-8	dünnschalig
<i>E. lamae</i>	ellipsoid bis ovoid	13-16 x 8-10	dünnschalig
<i>E. ivitaensis</i>	ellipsoid	32-41 x 12-14	dickschalig
<i>E. macusaniensis</i>	piriform bis ovoid-piriform	33-40 x 16-20	dickschalig

Der Lebenszyklus der Eimerien lässt sich in zwei Phasen unterteilen: eine endogene Phase, die im Dünndarm des infizierten Wirts abläuft und eine exogene Phase, die in der Umwelt abläuft. Die Infektion erfolgt mit der Aufnahme von sporulierten Oozysten. Im Dünndarm läuft zunächst eine ungeschlechtliche Vermehrung (Schizogonie) ab, gefolgt von einer geschlechtlichen Differenzierung (Gametogonie) in männliche Mikrogameten und weibliche Makrogameten. Die nach Entstehung einer Zygote (Verschmelzung von Mikrogameten mit Makrogameten) gebildeten Oozysten werden mit dem Kot ausgeschieden und gelangen somit in die Umwelt. Hier erfolgt nun die exogene Phase. In Abhängigkeit des Vorhandenseins von

Sauerstoff, Temperatur und Feuchtigkeit kommt es zur erneuten Sporulation und es entstehen infektiöse Oozysten (McKenna 2006; Mehlhorn und Piekarski 2002).

Für die verschiedenen Eimerienarten sind unterschiedliche Präpatenzzeiten beschrieben (Tab. 2). *E. punoensis* hat eine Präpatenz von 10 Tagen, *E. alpaca* und *E. lamae* (weisen eine ähnliche Präpatenzzeit auf. Die Präpatenz von *E. macusaniensis* ist jedoch mit bis zu 36 Tagen deutlich länger (Guerrero 1967).

**Tab. 2:** Präpatenzzeiten der verschiedenen Eimerienarten

<b>Eimerienart</b>	<b>Präpatenz (Tage)</b>
<i>E. punoensis</i>	10
<i>E. alpaca</i>	16-18
<i>E. lamae</i>	16
<i>E. ivitaensis</i>	*
<i>E. macusaniensis</i>	32-36

Legende: \* = unbekannt

Eimerien besitzen eine hohe Wirtsspezifität. Demnach können sich alle Kamelidenarten mit denselben Eimerienarten infizieren, jedoch nicht mit Eimerienarten anderer Tierarten. In der Literatur findet man Informationen, dass die Entwicklungsstadien von *E. macusaniensis* fast identisch mit denen von *E. cameli*, die beim Kamel und Trampeltier auftreten, sind. Eine Infektion mit *E. macusaniensis* und *E. cameli* bei den Altweltkamelen und Neuweltkameliden ist deshalb nicht auszuschliessen (McKenna 2006).

## 2.2 Pathogenität der Eimerien

Wie bereits erwähnt, erfolgt die Infektion mit Eimerien durch orale Aufnahme von sporulierten Oozysten. Mischinfektionen mit mehreren Eimerienarten werden bei Neuweltkameliden häufig beobachtet. Bei einer Eimerieninfektion steht die Intensität der Eiausscheidung anscheinend nicht im Zusammenhang mit der Ausprägung einer klinischen Symptomatik (Foreyt und Lagewuist 1992, Cebra und Stang 2008). Zu dieser Einschätzung führte u.a. ein Infektionsversuch bei vier Lamas mit *E. alpaca* und *E. punoensis*, der bei keinem der Tiere zu pathologischen Symptomen führte, obwohl alle infizierten Lamas eine hohe Anzahl an Oozysten im Kot ausschieden. Es wird in Folge der Ergebnisse dieser Studie vermutet, dass *E. alpaca* und *E. punoensis* zumindest für Lamas älter als ein Jahr nicht pathogen sein dürften (Foreyt und Lagewuist 1992).

Infektionen mit Eimerien können demnach klinisch asymptomatisch (Guerrero 1967; Foreyt und Lagewuist 1992, Rawdon et al., 2006, McKenna 2006) verlaufen oder mit der Ausprägung klinischer Symptome einhergehen. Klinische Fälle werden als sporadisch auftretend beschrieben und sind in Verbindung mit Stressfaktoren und/oder schlechtem/unzureichendem Betriebsmanagement zu sehen (Lenghaus et al., 2004). Als klinisches Symptom wird das Auftreten von Durchfall (wässrig bis blutig), Dehydratation, Fressunlust, Apathie, Abmagerung sowie Kolik beobachtet, auch ein plötzliches Verenden der Tiere ist beschrieben (Rosadio und Ameghino 1994, Lenghaus et al., 2004, Palacios et al., 2006, Chiwerge et al., 2007, Cafrune et al., 2009, Ballweber 2009, Johnson et al., 2009, Fowler 2010, Dubey 2018). Wichtig ist zu erwähnen, dass Durchfall als klinisches Symptom nicht immer vorhanden ist (Lenghaus et al., 2004). Zieht man hier einen Vergleich zu anderen Tierarten, ist diese Tatsache durchaus als Besonderheit bei Neuweltkameliden zu werten.

Es wird angenommen, dass *Eimeria* spp. eher das luminale Darmepithel zerstören, während *E. macusaniensis* invasiv in die tieferen Schichten der Darmwand eindringt (Lenghaus et al., 2004).

Eine hohe Anzahl an verschiedenen Entwicklungsstadien der Eimerien ist histologisch in der Mukosa im Bereich der Lamina propria zu sehen (Oozysten, Schizonten, etc.). An der Schleimhautoberfläche kommt es zu einer Reduktion der Lieberkühn'schen Krypten sowie zu einer Verkürzung der Darmzotten (Rawdon et al., 2006). Neutrophile Granulozyten und Makrophagen finden sich in der *Lamina propria* und *Muscularis mucosae* der Schleimhaut. Die Submukosa zeigt ödematöse Veränderungen mit einer massiven Infiltration von Makrophagen, Plasmazellen und Neutrophilen. In Folge kann es auch zur Ausbildung von Ulzera und/oder

einer bakteriell bedingten nekrotisierenden Enteritis kommen (Leguía 1991). *Clostridium perfringens* spielt dabei eine bedeutende Rolle (Leguia 1991, Schock et al., 2007, Rosadio et al., 2010, Dubey 2018).

Rosadio und Ameghino (1994) beschrieben den Ausbruch einer Eimeriose auf einer Farm im Süden Perus. 12 Alpakas, die zwischen 25 und 35 Tagen alt waren, starben. Acht dieser Tiere zeigten ante mortem Durchfall, vier weitere verendeten plötzlich ohne Ausprägung klinischer Symptome. Die Sektion zeigte bei allen Tierkörpern eine hochgradige Abmagerung. Auffällig waren bei allen Tieren eine gerötete Dünndarmschleimhaut sowie eine Vergrößerung der Mesenteriallymphknoten. Pathohistologisch bestand eine partielle Ulzeration, die Darmzotten waren hgr. atrophiert. Überall in der Schleimhaut konnte eine beachtliche Menge an geschlechtlichen und ungeschlechtlichen Eimerien-Stadien mikroskopisch detektiert werden. Es handelte sich dabei um Oozysten von *E. macusaniensis*.

Cebra et al. (2003) isolierten *Eimeria* spp. In sechsvon 45 (13%) nicht abgesetzten Lama- oder Alpaka-Crias mit Durchfall. Diese sechs Crias waren zwischen 21 und 60 Tage alt. Am häufigsten konnten hier Eimerien in den feuchteren Monaten (Herbst und Winter) isoliert werden, in Kongruenz mit dem Auftreten von Durchfällen. Ein besonderer Fall einer Eimeriose in Kombination mit einer Leptospirose wurde bei einem drei Monate alten Guanako berichtet (Hodgin et al., 1984). Das Cria zeigte vor dem Verenden keine klinischen Symptome, die mit einer Eimeriose in Zusammenhang zu bringen waren, dennoch konnten postmortal Eimerenoozysten im Kot nachgewiesen werden; in der Darmschleimhaut lagen jedoch keine pathohistologischen Veränderungen vor. Costarella und Anderson (1999) berichteten über ein vier Wochen altes Lamafohlen, bei dem ein Ileus im Bereich des Überganges des Dünndarms in den Dickdarm diagnostiziert wurde. Eine parasitologische Kotuntersuchung ergab einen hochgradigen Befall mit Eimerienoozysten. Bemerkenswert war, dass auch dieses Fohlen zu Lebzeiten keinen Durchfall aufwies, ein ursächlicher Zusammenhang des Eimerienbefalls mit dem Ileus wurde in Erwägung gezogen, konnte aber nicht nachgewiesen werden.

Als besonders pathogen wird eine Eimerieninfektion beschrieben, wenn *E. macusaniensis* in Kombination mit anderen Eimerienarten, wie *E. lamae*, *E. ivitaensis* oder *E. punoensis* auftritt (Palacios et al., 2006, Johnson et al., 2009).

Plötzliche Todesfälle bzw. das Auftreten einer klinischer Eimeriose sind aber auch bei einer alleinigen Infektion mit *E. macusaniensis* sowohl bei Crias als auch bei adulten Lamas und Alpakas beschrieben (Lenghaus et al., 2004, Palacios et al., 2006, Rawdon et al., 2006, Cebra

et al., 2007, Johnson et al., 2009, Rosadio et al., 2010, Dubey 2018). Dass von einer Eimeriose auch adulte Tiere betroffen sein können, ist als weitere Besonderheit bei dieser Tierart hervorzuheben (Cebra et al., 2007, Schock et al., 2007, Ballweber 2009, Johnson et al., 2009).

Für *E. lamae* wird ebenso eine erhöhte Pathogenität angenommen, wie in einer Studie von Guerrero et al. (1970) beschrieben, nachdem nach einem Infektionsversuch eines Alpakafohlens mit Oozysten von *E. lamae*, massiver Durchfall und Dehydratation auftraten und das Tier schließlich verstarb.

### **2.3 Eimerienmanagement**

Ein massiver Eimerienbefall von Lamas und Alpakas ist oftmals in Herden mit großer Tierzahl, und/oder mangelnder Hygiene zu beobachten. Um das zu verhindern, sollte für jedes Tier ein Fressplatz zur Verfügung stehen. Die Fressplätze sollten täglich von Futterresten befreit und gereinigt werden. Eine Kontamination des Futters und Wassers mit Kot und Urin ist unbedingt zu vermeiden (Gauly et al., 2018). Ein weiterer Faktor, der die Eimeriose begünstigen kann, ist Stress für die Tiere, sei es Stress innerhalb der Herde, Transportstress, Ortswechsel, Shows, Verkäufe oder auch das Umstallen. Wie Cebra et al. (2007) beschrieben, entwickelten 30 Alpakas eine klinische Eimeriose, nachdem sie auf einen neuen Hof und dort auf eine neue Weide, die für sechs Monate unbenutzt war, kamen. Der erste Todesfall ereignete sich 20 Tage nach dem Umzug, und eine schwere präpatente *E. macusaniensis* Infektion wurde histologisch bestätigt. Dabei ging auch hervor, dass sowohl ein Lebensalter unter 1 Jahr als auch Stress bei älteren Tieren, die Oozystenausscheidung signifikant beeinflussten. Daher sind neben regelmäßig durchzuführenden Hygienemaßnahmen und einem guten Weidemanagement, das heißt regelmäßiges Absammeln der Kotstellen, eine Aufteilung der Weide und damit verbunden ein regelmäßiges Umtreiben der Tiere zur Sicherstellung eines guten Graswachstums (Steinwider 2019), ein möglichst stressfreier Umgang, eine individuelle Quarantäne von Zukauftieren und eine Untersuchung auf Eimerien vor dem Einstellen zugekaufter Tiere empfehlenswert (Gauly et al., 2018). Eine gute Tierbeobachtung, das bedeutet mehrmals täglich Kontrolle der Herde und besonders auffälliger Einzeltieren mit entsprechender Dokumentation ist ebenso wichtig, da Veränderungen im Verhalten oft ein Anzeichen für eine Erkrankung sein können (Gauly et al., 2018). Der Body-Condition-Score sollte regelmäßig geprüft werden, um so ein Abmagern der Tiere rechtzeitig zu erkennen, da

dies ein Leitsymptom vieler Erkrankungen einschließlich der Eimeriose ist (Twomey et al., 2014). Um den Eimerienbefall innerhalb der Herde unter Kontrolle zu halten, ist neben der Einhaltung oben erwähnter Parameter, auch eine regelmäßige Kotuntersuchung der Einzeltiere und/oder der Herde empfehlenswert, um den Infektionsdruck durch Endoparasiten zu erfassen und entsprechende Maßnahmen treffen zu können (Gauly et al., 2018).

#### **2.4 Untersuchungen zum Vorkommen kamelidenspezifischer Eimerien**

Lambacher et al. untersuchten 2016 die Prävalenz von Eimerien in Österreich. Dazu wurden von 469 klinisch gesunden Neuweltkameliden (270 Alpakas und 199 Lamas) aus 86 Betrieben Kotproben untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass *Eimeria* spp. in 77,2% und *E. macusaniensis* in 11% der Proben nachweisbar waren.

Kultscher et al. (2018) führten eine Studie durch, mit dem Ziel einen Überblick über Auftreten und Management von Endoparasiten bei Alpakas in Deutschland und Österreich zu erhalten. Wie die Ergebnisse zeigten, waren in 73,3% der Betriebe (insgesamt 81 Betriebe, davon 65 in Deutschland und 16 in Österreich) Tiere mit Eimerien infiziert.

Stropnicka und Svobodova (2011) erhoben das Vorkommen von Endoparasiten in Lamas und Alpakas in der Tschechischen Republik. Es wurden dabei in 63% der untersuchten 101 Kotproben *Eimeria* spp. diagnostiziert. *E. macusaniensis* wurde in 1,9% der Fälle gefunden.

Twomey et al. (2014) berichteten, dass in England und Wales häufig die vier Arten *E. alpaca*, *E. lamae*, *E. macusaniensis* und *E. punoensis* auftreten. *E. ivitaensis* konnte in zwei Herden nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Studie wurde in 10,6% der Fälle ein Eimerienbefall diagnostiziert. Zur Diagnostik wurden die Koproskopie und die pathohistologische Untersuchung von Darmabschnitten toter Tiere herangezogen.

In Südamerika wurde das Vorkommen aller fünf kamelidenspezifischen Arten von Eimerien beschrieben: *E. lamae*, *E. alpaca*, *E. punoensis* (Guerrero 1967), *E. macusaniensis* (Guerrero et al., 1971), und *E. ivitaensis* (Leguia und Casas 1998). Dabei lag die Prävalenz von *E. macusaniensis* bei 120 Alpakas in Peru bei 17,5% (Guerrero et al., 1970). In Argentinien

ermittelten Cafrune et al. 2009 für Guanacos einen Befall mit *E. macusaniensis* von 25%, für Vicunas 14,3% und 50,3% für Lamas.

Das für Nordamerika erhobene Vorkommen von *E. macusaniensis* lag bei 1,0% von 189 Lamas aus Oregon (Rickard und Bishop 1988) und im Mittleren Westen der USA bei 8,5% bei 200 Lamas beziehungsweise bei 8,7% bei 69 Alpakas (Jarvinen 1999).

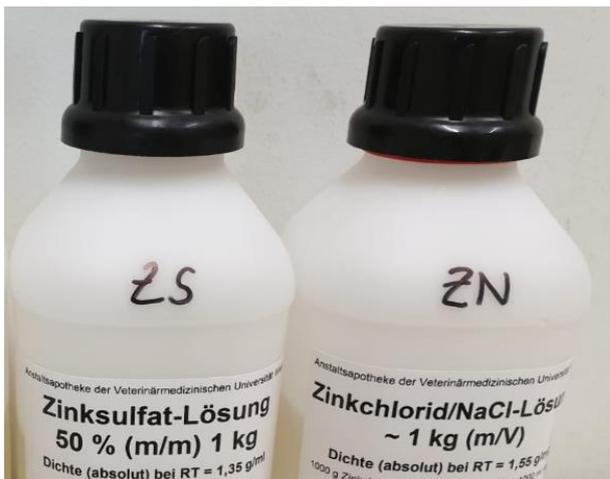
In Neuseeland untersuchten Rawdon et al. (2006) speziell das Vorkommen von *E. macusaniensis*, der 2005 dort erstmals in der Kotprobe eines importierten weiblichen Alpakas nachgewiesen wurde. Die AutorInnen untersuchten insgesamt 460 Tiere von fünf unterschiedlichen Farmen. Insgesamt konnten bei 15 Tieren (3,26%) *E. macusaniensis* nachgewiesen werden.

### 3. Material und Methode

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurden 50 Neuweltkameliden-Kotproben quantitativ auf Eimerienoozysten untersucht. Einschlusskriterium für diese Studie war eine Mindestoozystenzahl/g Kot von 50. Die Kotproben waren direkt nach dem Kotabsatz aufgesammelt worden und bis zur diagnostischen Aufarbeitung bei 4-6°C gelagert. Die Lagerung erfolgte unter möglichst quantitativem Luftausschluss in Plastikbeuteln für maximal 4 Tage. Die unterschiedlichen Eimerienarten wurden nicht näher differenziert, sondern die Gesamtheit an Eimerienoozysten der Arten *E. punoensis*, *E. alpaca*, *E. lamae* unter den Begriffen „kleine Eimerien“ bzw. „*Eimeria* spp.“ zusammengefasst. Die größeren Arten *E. macusaniensis* und *E. ivitaensis* wurden einzeln erfasst.

#### 3.1. Suspensionsmedien

Als Suspensionsmedien zur Aufarbeitung der zuvor homogenisierten Kotproben wurden zwei Medien unterschiedlicher Dichte verwendet: zum einen Zinksulfatlösung mit einer Dichte (absolut) bei Raumtemperatur (RT) von 1,35 g/ml (Anstaltsapotheke der Vetmeduni Vienna, Österreich), zum anderen Zinkchlorid-Natriumchlorid-Lösung mit einer Dichte (absolut) bei RT von 1,55 g/ml (Anstaltsapotheke der Vetmeduni Vienna, Österreich) (Abb. 1).



**Abb. 1:** für die Aufarbeitung der Kotproben verwendete Suspensionsmedien (private Sammlung)

### 3.2 Aufarbeitungsmethoden

Vor der Aufarbeitung der Kotproben wurde die benötigte Menge Kot aus dem jeweiligen Plastikbeutel entnommen und gut durchmischt, so dass die Parasitenstadien möglichst homogen verteilt vorlagen.

Davon wurden jeweils 8 g Kot in je eine Reibschale gewogen (Sartorius Waage BP 4100), und mit 60 ml Zinksulfatlösung bzw. Zinkchlorid-Natriumchlorid-Lösung vermischt und mittels Pistills homogenisiert. Mit der einen Hälfte jeder so entstandenen Suspension wurde sofort wie unter Punkt 3.2.1 weitergearbeitet. Diese Methode wird in weiterer Folge als **Methode A** bezeichnet. Die andere Hälfte wurde in einen Messbecher überführt und für 18 Stunden bei 4°C kühl gelagert und erst danach, wie unter 3.2.1 beschrieben, weiterverarbeitet. Diese Methode wird in weiterer Folge als **Methode B** bezeichnet.

#### 3.2.1 Modifizierte McMaster-Methode

Bei der Methode nach McMaster handelt es sich um ein quantitatives Verfahren zur Bestimmung einer genauen Zahl an Parasitenstadien pro Gramm Kot (Bauer 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde jede - wie unter 3.2. hergestellte – homogenisierte Suspension (Methode A, Methode B) durch ein Sieb in einen Messbecher gegossen und auf 60 ml mit der entsprechenden Lösung (Zinksulfat bzw. Zinkchlorid-Natriumchlorid) aufgefüllt, anschließend geschwenkt und mit einer Pipette jeweils 7 ml in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 690 x g für 8 Minuten mit der Heraeus® Megafuge 1.0/1.0 R zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde mittels einer Pipette etwas Flüssigkeit von der Oberfläche aus dem Zentrifugenröhrchen entnommen und beide McMaster Zählkammern aufgefüllt. Die Zählkammer wurde zehn Minuten stehen gelassen und dann bei 100-facher Vergrößerung mikroskopiert (Novex Holland B-Series) und die Anzahl der sichtbaren Eimerienoozysten ausgezählt.

### 3.3. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software IBM SPSS (Version 24.0). Die beiden Suspensionsmedien wurden bei unterschiedlichen Aufarbeitungs- und Untersuchungsmethoden evaluiert und die erhaltenen Ergebnisse statistisch mittels Chi-Quadrat-Test für Häufigkeiten sowie Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben ausgewertet (wegen der Ordinalskalierung der Merkmale). Die entsprechenden Übereinstimmungen wurden mit Cohen's Kappa analysiert. Für alle statistischen Tests wurde der Wert für die Signifikanz auf  $p < 0,05$  festgelegt.

Zur Interpretation von  $\kappa$  (Wert von  $\kappa$  - Stärke der Übereinstimmung) wurden die Richtwerte nach Altman (1991) herangezogen (Tab. 3).

**Tab. 3:**  $\kappa$  - Stärke der Übereinstimmung: Richtwerte nach Altman (1991)

$\kappa$ -Wert	Übereinstimmung
< 0,20	schwach
0,21 – 0,40	leicht
0,41 – 0,60	mittelmäßig
0,61 – 0,80	gut
0,81 – 1,00	sehr gut

## 4. Ergebnisse

In den, im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Neuweltkamelidenkotproben, konnten sowohl „kleine“ Eimerien (*E. lamae*, *E. punoensis*, *E. alpaca*), die nicht weiter differenziert wurden und in der Ergebnisdarstellung als *Eimeria* spp. zusammengefasst sind, als auch „große“ Eimerien, (dazu zählen *E. ivitaensis* (wurde nicht detektiert) und *E. macusaniensis*) nachgewiesen werden.

Im Folgenden werden die Daten getrennt nach *Eimeria* spp. und *Eimeria macusaniensis* dargestellt.

### 4.1. *Eimeria* spp.

#### 4.1.1. Oozystendetektion kleiner Eimerien mittels Zinksulfatlösung und Zinkchlorid-Natriumchlorid-Lösung

Eine Fragestellung dieser Diplomarbeit bezog sich auf den Vergleich der beiden Suspensionsmedien hinsichtlich der Detektierbarkeit von kleinen Eimerien, wobei die Kotproben auf zwei unterschiedliche Arten zur Analyse vorbereitet wurden (Methode A, Methode B).

Die statistische Auswertung der Daten der nach Methode A aufgearbeiteten und mittels modifizierter McMaster-Technik analysierten Kotproben zeigte, dass bei Vergleich der Medien Zinksulfatlösung (Dichte bei RT 1,35 g/ml) versus Zinkchlorid-Natriumchlorid-Lösung (Dichte bei RT 1,55 g/ml) bezogen auf die Anzahl an positiv auf *Eimeria* spp. getesteter Kotproben keine exakte, jedoch eine gute Übereinstimmung ( $\kappa = 0,737$ ) gegeben war. Die weiterführende statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Tests zeigte, dass die Zinkchlorid-Natriumchlorid-Lösung dem Zinksulfatmedium, bezogen auf Oozysten-Detektion kleiner Eimerien, statistisch signifikant ( $p < 0,001$ ) überlegen war (Abb. 2).

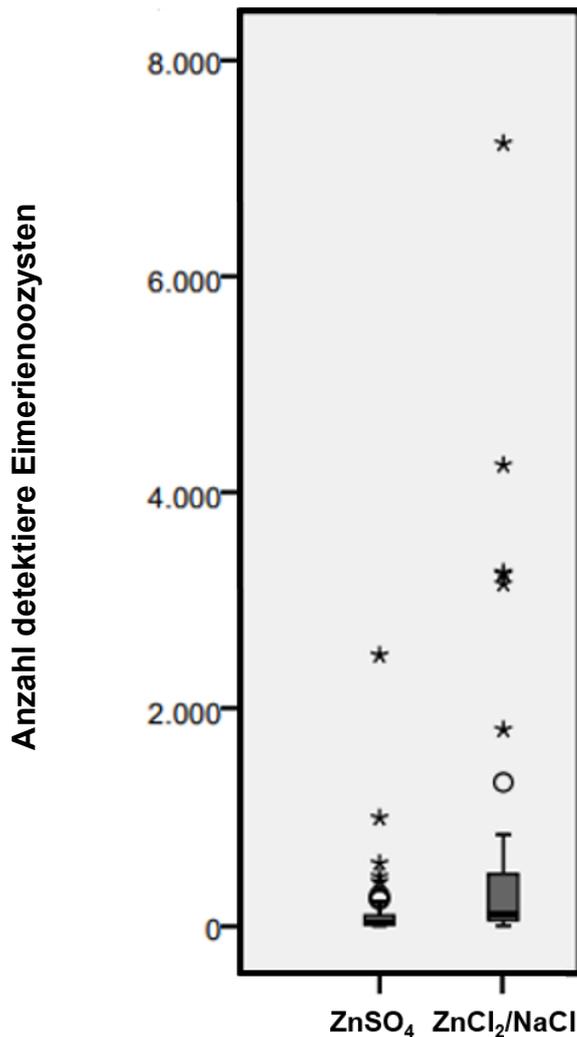


Abb. 2: Boxplot zum Vergleich der Oozystendetektion kleiner Eimerien mittels Zinksulfatlösung versus Zinkchlorid-Natriumchlorid-Lösung bei sofortiger Analyse (Methode A) der Kotproben; box = unteres/oberes quartil; Linie = median; o/\* = Ergebnisse, die über das 1,5 bzw. 3 - Fache des Interquartilsabstandes liegen.

Die statistische Datenauswertung der nach Methode B untersuchten Kotproben zeigte für den Vergleich der beiden Suspensionsmedien Zinksulfatlösung versus Zinkchlorid-Natriumchlorid-Lösung eine als gut zu kategorisierende Übereinstimmung der Anzahl positiver Testungen auf Oozysten kleiner Eimerien ( $\kappa = 0,778$ ). Die weiterführende statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Tests zeigte, dass die Zinkchlorid-Natriumchlorid-Lösung in Bezug auf Oozysten-

Detektion kleiner Eimerien auch bei Anwendung dieser Methode der Zinksulfat-Lösung statistisch signifikant ( $p < 0,001$ ) überlegen war (Abb. 3).

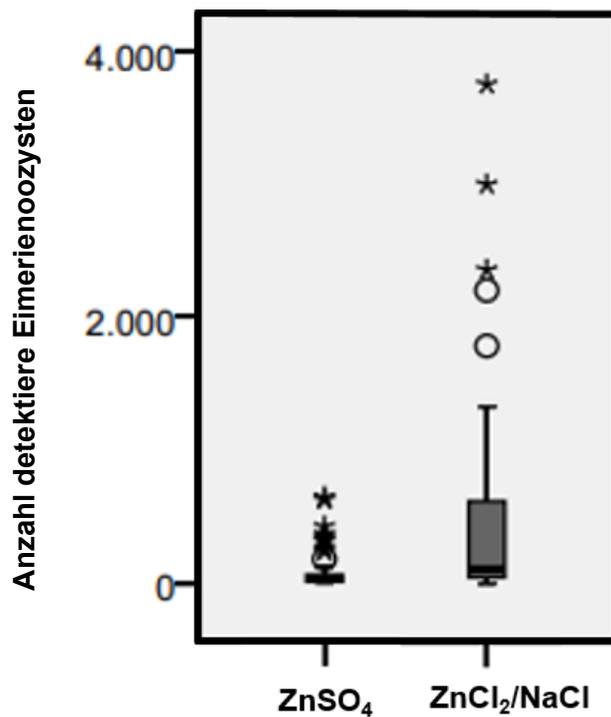
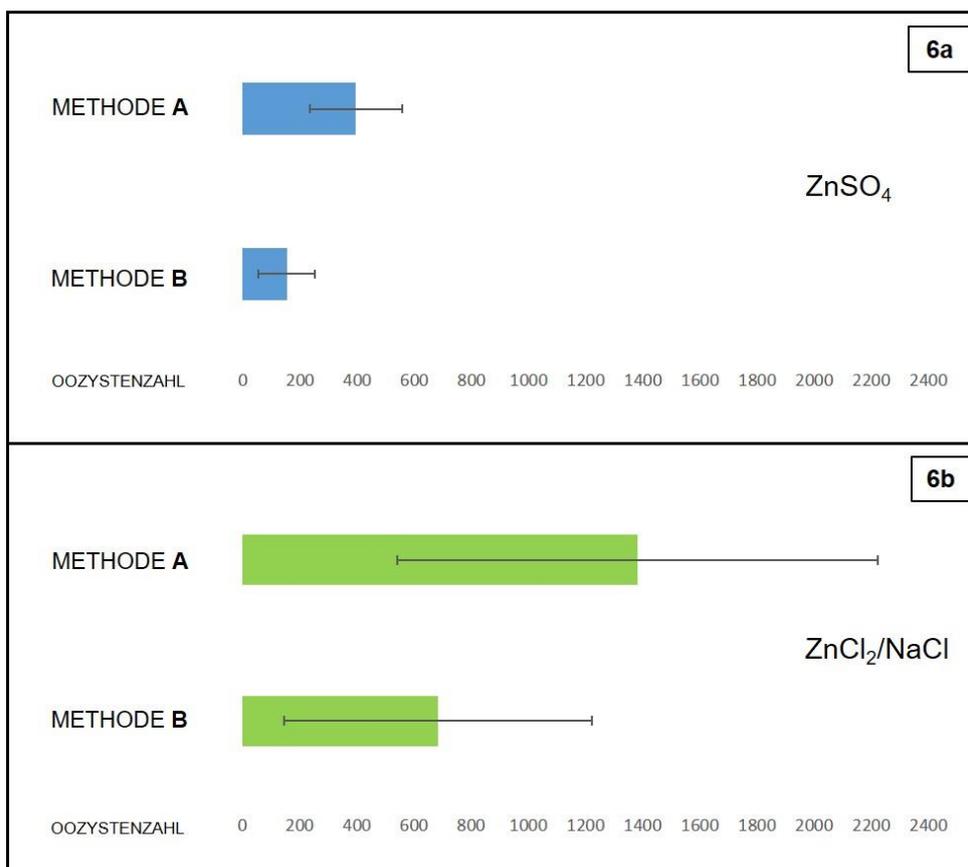


Abb. 3: Boxplot zum Vergleich der Oozystendetektion kleiner Eimerien mittels Zinksulfatlösung versus Zinkchlorid-Natriumchlorid-Lösung bei Anwendung der Methode B; box = unteres/oberes quartil; Linie = median; o/\* = Ergebnisse, die über das 1,5 bzw. 3 - Fache des Interquartilsabstandes liegen.

#### 4.1.2. Vergleich der Aufarbeitungsmethoden A und B

In der vorliegenden Arbeit wurde auch untersucht, ob die Probenaufarbeitung nach Methode B zu einer, im Vergleich zu Methode A besseren Oozystendetektion führen kann. Die Untersuchungsergebnisse wurden für jedes Medium (Zinksulfat- bzw. Zinkchlorid-Natriumchlorid Lösung) gesondert erhoben und ausgewertet.

Wie in Abb. 4 ersichtlich, zeigte sich sowohl bei Verwendung der Zinksulfat-Lösung ( $p=0,808$ ) als auch des Zinkchlorid-Natriumchlorid Mediums ( $p=0,348$ ) kein statistisch signifikanter Vorteil des längeren Stehenlassens der im jeweiligen Medium suspendierten Kotprobe (Methode B) bezogen auf den Oozysten-Nachweis kleiner Eimerien.



**Abb. 4:** Vergleich der Mittelwerte ( $\pm$  SD) detektierter *Eimeria* spp. Oozysten der mit Methode A und Methode B analysierten Kotproben ( $n=50$ ) bei Verwendung von Zinksulfatlösung (6a) bzw. Zinkchlorid-Natriumchlorid-Lösung (6b)

#### **4.2. *Eimeria macusaniensis***

Nur in zehn von insgesamt 50 Kotproben wurden mittels mikroskopischer Untersuchung Oozysten von *E. macusaniensis* detektiert. Aufgrund der niedrigen Probenanzahl erfolgt die Darstellung der Ergebnisse hinsichtlich des Vergleichs der beiden Suspensionsmedien und Kotalaufarbeitungsmethoden deskriptiv.

Bei sofortiger Analyse der mit Zinkchlorid-Natriumchlorid-Lösung (Dichte bei RT 1,55 g/ml) aufbereiteten Kotproben (Methode A) konnten in zehn Proben Oozysten von *E. macusaniensis* detektiert werden, bei Verwendung der Zinksulfatlösung (Dichte bei RT 1,35 g/ml) nur in sechs Proben.

Bei Anwendung der Methode B sank der Anteil positiv auf *E. macusaniensis* getesteter Kotproben bei beiden Medien, nämlich auf sieben mit Zinkchlorid-Natriumchlorid-Lösung und fünf mit Zinksulfatlösung.

## 5. Diskussion

Eine Infektion mit Eimerien kann bei Neuweltkameliden aller Altersklassen zu einem schweren Krankheitsbild mit Todesfolge führen (Palacios et al., 2006, Rawdon et al., 2006, Cebra et al., 2007, Cebra und Stang 2008, Rosadio et al., 2010, Dubey 2018). Es ist wichtig zu erwähnen, dass es bereits zu klinischen Symptomen kommen kann, ohne dass Oozysten ausgeschieden werden – man bedenke die unterschiedlichen und bezüglich *E. macusaniensis* langen Präpatenzzeiten (siehe Kapitel 2.1). Der Nachweis von Oozysten im Kot ist aber ein wesentlicher Faktor, um Bekämpfungsmaßnahmen zu veranlassen, die sowohl die Behandlung von Einzeltieren als auch metaphylaktische Maßnahmen auf Herdenebene mit einschließen. Nicht bei allen Parasitenarten, mit denen sich Neuweltkameliden infizieren können, ist ein frühzeitiger Nachweis gleich wesentlich (Franz und Dadak 2020).

Eine Studie von Cebra et al. (2012) hat das diagnostische Potential der PCR-Technik in Zusammenhang mit einer *E. macusaniensis* Infektionen während der Präpatenzperiode bei Neuweltkameliden überprüft. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die PCR Methode innerhalb der Präpatenzzeit einen Nachweis von *E. macusaniensis* ermöglichte. Bis dato fand diese Technik aber keinen Eingang in die Routinediagnostik. Bis dato gilt immer noch die koproskopische Untersuchung als Routineverfahren zur Eimeriendiagnostik bei Neuweltkameliden.

Das Ziel dieser Diplomarbeit war es, ein im Rahmen der Parasitendiagnostik aus Kamelidenkot international kaum genutztes und für die vorliegende Studie adaptiertes Zinkchlorid-Natriumchlorid-Medium im Vergleich zu einem Standardmedium (Zinksulfat-Lösung) bei der für TierärztInnen einfach durchzuführenden McMaster-Untersuchungsmethode zu evaluieren. Das adaptierte Zinkchlorid-Natriumchlorid-Medium wurde gewählt, da es mit einer Dichte bei RT von 1,55 g/ml eine deutlich höhere Dichte aufweist, als das Standardmedium Zinksulfat mit 1,35 g/ml und somit insbesondere den Nachweis der großen Eimerien erleichtern sollte (McKenna 2006). In diesem Zusammenhang wurde in dieser Arbeit auch evaluiert, ob sich die höhere Dichte des Mediums positiv oder negativ auf den Nachweis der kleinen Eimerienarten auswirkt. Da es nicht Ziel dieser Arbeit war, die unterschiedlichen Eimerienarten einzeln zu quantifizieren, sondern nur die Gesamtheit an Eimerienoozysten, wurden *E. punoensis*, *E. alpaca*, *E. lamae* unter den Begriffen „kleine Eimerien“ bzw. „*Eimeria* spp.“ zusammengefasst. Die als höchst pathogen beschriebene Art *E. macusaniensis* (Lenghaus et

al., 2004; Palacios et al., 2006; Johnson et al., 2009) wurde gesondert betrachtet. *E. ivitaensis* konnte in keiner der Kotproben nachgewiesen werden, mögliche Ursache dafür ist, dass diese Art sehr selten vorkommt, wie auch schon von Rohbeck (2006) und Cafrune et al (2009) beschrieben. Auch *E. macusaniensis* kommt im Vergleich zu den kleinen Eimerien seltener vor (Rohbeck 2006, McKenna 2006, Cebra und Stang 2008, Diaz 2016), wie auch die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten. In nur 10 von 50 (20%) Kotproben konnte *E. macusaniensis* nachgewiesen werden. Ein Grund dafür kann in der langen Präpatenzzeit von *E. macusaniensis* liegen, weswegen die Oozysten im Kot von Neuweltkameliden, die jünger als ein Monat sind, nicht detektiert werden können (McKenna 2006). Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden die Daten der Tiere von denen die Kotproben abstammten (Tierart, Geschlecht, Alter) nicht erfasst, da sie für die Bearbeitung der Fragestellung nicht relevant waren.

In dieser Arbeit wurden daher zwei Hypothesen geprüft. Zum einen, dass die Wahl des Suspensionsmediums für die Detektion der Eimerienoozysten aller Eimerienarten aus Neuweltkamelidenkot eine entscheidende Rolle dahingehend spielt, dass anzahlmäßig mehr Oozysten nachgewiesen werden, je höher die Dichte des Mediums ist. Als zweite Hypothese wurde postuliert, dass eine mehrstündige Lagerung der zu untersuchenden Kotprobe im Suspensionsmedium (bei 4 °C RT) vor der Auszählung zu einer höheren Treffsicherheit bezüglich des Nachweises von Eimerienoozysten führen kann, als die sofortige Untersuchung der Kotprobensuspension.

In Bezug auf die Aufarbeitungsmethode wurde in der Literatur beschrieben, dass ein über Nacht gekühlt stehen gelassener Probenansatz aus Kamelidenkot zu einer verbesserten Treffsicherheit beim Parasitennachweis führt, da die Parasitenstadien länger Zeit haben, sich im Suspensionsmedium freizusetzen (Cebra und Stang 2008).

Im Zuge der statistischen Datenauswertung wurden die Ergebnisse der Oozystendetektion bei sofortiger Aufarbeitung (Methode A) des Kotprobenansatzes mit jenen nach Lagerung desselben Ansatzes für 18 Stunden bei 4 °C RT (Methode B) verglichen. Diese Dauer wurde gewählt, da Methode B am darauffolgenden Tag aufgearbeitet wurde. Cebra und Stang (2008) haben in Ihrer Arbeit diesbezüglich keine genaue Zeitangabe angegeben. Sie sprechen nur von einem „über Nacht Einweichen“ der Kotprobe und einer Untersuchung derselben am folgenden Morgen.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten keinen statistisch signifikanten Vorteil der Methode B gegenüber Methode A in Bezug auf den Oozystennachweis kleiner Eimerien ( $p > 0,05$ ). Es konnten mit Methode A deutlich mehr Eimerien detektiert werden.

In Bezug auf Oozystendetektion von *E. macusaniensis* ergab sich ebenfalls kein Vorteil der Methode B. Im Gegenteil: es konnten mittels Methode A mehr Proben positiv auf *E. macusaniensis* getestet werden, unabhängig vom verwendeten Medium.

Die aufgestellte Hypothese, dass eine längere Verweildauer der Kotproben in Suspensionen zu besseren Detektionsergebnissen führen könnte, wurde somit nicht erhärtet. Das Untersuchen der Proben zeigte sich am nächsten Tag sogar erschwert, da vor allem die kleinen Eimerien ihre typische Form verloren haben, möglicherweise aufgrund ihrer dünnen Wand, wie Cebra und Stang (2008) auch in ihrer Arbeit diskutierten.

Vielmehr zeigen die erhaltenen Ergebnisse, dass die sofortige Aufarbeitung durchaus zu empfehlen ist, da sie vor allem zeitsparend ist. Damit kann man sie auch als „praxistauglich“ benennen und für praktizierende TierärztInnen als Untersuchungstechnik empfehlen.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten auch, dass nicht der Zeitpunkt der Analyse nach Kotprobenaufbereitung, sondern vielmehr das zur Aufbereitung verwendete Suspensionsmedium den ausschlaggebenden Faktor für eine zuverlässige Oozystendetektion Neuweltkameliden-spezifischer Eimerien darstellt. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden, wie weiter oben erwähnt, zwei Lösungen unterschiedlicher Dichte (absolut bei RT) als Suspensionsmedien im McMasterverfahren verwendet: zum einen Zinksulfatlösung (Dichte bei RT 1,35 g/ml) und zum anderen eine Zinkchlorid-Natriumchlorid-Lösung mit einer Dichte bei RT von 1,55 g/ml.

Die zur Analyse der Neuweltkamelidenkotproben angewandte modifizierte McMaster Methode wurde gewählt, weil sie ein quantitatives Verfahren darstellt, das für die Abschätzung der Wirksamkeit einer antiparasitären Therapie bzw. Entwicklung einer Arzneimittelresistenz bestens geeignet ist. Zudem lässt sich die Oozystenzahl bestimmen und man bekommt einen besseren Eindruck über den Infektionsdruck in der Herde, beziehungsweise über die Befallsintensität eines Einzeltieres. Dies ist eine Fragestellung, die bei der tierärztlichen Betreuung von Kamelidenherden im Rahmen eines Parasitenbekämpfungsprogrammes eine wesentliche Rolle spielt.

Im angewandten McMaster Verfahren wurde ein Zentrifugationsschritt vor Befüllung der Zählkammer durchgeführt. Dieser wurde bei Verwendung jedes Mediums und jeder Methode gleichermaßen ausgeführt. Die McMaster Methode wird für parasitologische Kotuntersuchungen von Neuweltkamelidenproben oft auch ohne Zentrifugation durchgeführt (Rohbeck 2006, Cebra et al., 2007, Twomey et al., 2014). Es wurde jedoch von Cebra und Stang (2008) beobachtet, dass die Zentrifugation der Kotsuspension zu einer höheren Detektionsrate unterschiedlicher Parasitenstadien führen kann.

Die erhobenen Daten zeigten, dass Oozysten der Eimerienart *E. macusaniensis* bei Verwendung der Zinkchlorid-Natriumchlorid-Lösung in deutlich mehr Proben nachzuweisen waren, verglichen mit Zinksulfat-Lösung, deren Verwendung teils zu falsch negativen Ergebnissen führte (10:6).

Dies ist ein wichtiges Ergebnis der vorliegenden Arbeit. Aufgrund des besonderen pathogenen Potenzials der Eimerienart *E. macusaniensis* (Dubey 2018) ist es allerdings vorteilhaft, eine (Misch)Infektion mit diesem Parasiten so früh als möglich diagnostizieren zu können.

Hervorzuheben ist, dass die besondere Eignung des Mediums Zinkchlorid-Natriumchlorid-Lösung nicht nur in Bezug auf den Nachweis der großen Eimerienart *E. macusaniensis* gezeigt werden konnte, sondern ebenso gute Resultate beim Nachweis kleiner Eimerien gegeben waren.

Die Zinkchlorid-Natriumchlorid-Lösung war dem Zinksulfatmedium, bezogen auf Oozysten-Detektion kleiner Eimerien, statistisch signifikant ( $p < 0,001$ ) überlegen; dies sowohl bei Anwendung der Aufarbeitungsmethode A als auch bei Methode B.

Bei Durchsicht der Literatur ist festzustellen, dass zur Detektion kleiner Eimerien der Neuweltkameliden meist Medien mit einem spezifischen Gewicht von 1,2 oder darunter (häufig gesättigte Natriumchlorid-Lösung) verwendet werden (Rohbeck 2006, Cebra und Stang 2008, Whitehead 2009, Twomey 2014). Medien höherer Dichte werden in diesen Publikationen nur zur Detektion von *E. macusaniensis* empfohlen.

Das in dieser Arbeit verwendete Zinkchlorid-Natriumchlorid-Medium (Dichte bei RT: 1,55 g/ml) hat sich hingegen zur Detektion aller wirtsspezifischen Eimerienarten bewährt und war dabei dem Standardmedium Zinksulfat-Lösung immer signifikant überlegen ( $p < 0,001$ ). Aufgrund

dieser Ergebnisse kann es daher für den Einsatz im Praxisalltag zur zuverlässigen Eimerien-Diagnostik bei Kamelidenpatienten uneingeschränkt empfohlen werden.

## 6. Zusammenfassung

Die Eimeriose stellt bei Neuweltkameliden, anders als bei anderen Tierarten, eine in allen Altersklassen auftretende parasitäre Infektionskrankheit dar, weswegen eine rasche und verlässliche Nachweismethode, die auch im Praxisalltag umsetzbar ist, wesentlich für praktizierende TierärztInnen ist, um frühzeitig in betroffenen Herden therapeutische und metaphylaktische Maßnahmen einleiten zu können. Das Ziel dieser Arbeit war, ein im Rahmen der Parasitendiagnostik aus Kamelidenkot international kaum genutztes und für die vorliegende Studie adaptiertes Zinkchlorid-Natriumchlorid-Medium (Dichte bei RT 1,55 g/ml) im Vergleich zu einem international gängigen Standardmedium (Zinksulfat mit Dichte bei RT 1,35 g/ml) mit der für TierärztInnen einfach durchzuführenden quantitativen McMaster-Untersuchungsmethode zu evaluieren. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Wahl des Suspensionsmediums für die Detektion der Eimerienoozysten aus Neuweltkamelidenkot eine entscheidende Rolle spielt. Darüber hinaus wurden zwei unterschiedliche Aufarbeitungsmethoden (Methode A und Methode B) miteinander verglichen, bei der die Kotproben unterschiedlich lange im Suspensionsmedium verweilten (Methode A: sofortige Weiterverarbeitung; Methode B: Weiterverarbeitung nach 18 Stunden Lagerung bei 4 °C). Da Methode B bei keinem der beiden Suspensionsmedien einen Vorteil gegenüber Methode A zeigte ( $p > 0,05$ ), ist die sofortige Weiterverarbeitung des Probenansatzes als zielführendes und rasches Verfahren zu empfehlen.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigten, dass bei Verwendung des für diese Arbeit speziell für die Untersuchung von Neuweltkamelidenkot adaptierten und hergestellten (Anstaltsapotheke der Vetmeduni Vienna) Mediums Zinkchlorid-Natriumchlorid-Lösung (Dichte bei RT 1,55 g/ml) nicht nur mehr Proben positiv auf Oozysten der Eimerienart *E. macusaniensis*, die als besonders pathogen angesehen wird, sondern auch signifikant mehr Oozysten der kleinen Eimerien (*E. punoensis*, *E. alpaca*, *E. lamae*) ( $p < 0,001$ ) detektiert werden konnten, als dies mit dem Standardmedium Zinksulfatlösung der Fall war.

Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Diplomarbeit kann die Verwendung einer Zinkchlorid-Natriumchlorid-Lösung mit Dichte bei RT von 1,55 g/ml zur effizienten Aufarbeitung von Neuweltkamelidenkotproben im McMaster Verfahren im Rahmen der Eimerien-Diagnostik bei Kamelidenpatienten uneingeschränkt empfohlen werden.

## 7. Summary

Unlike in other animal species, eimeriosis is a parasitic infectious disease that occurs in New World camelids of all ages, which is why a rapid and reliable detection method that can also be implemented in everyday practice is essential for veterinarians to be able to initiate therapeutic and metaphylactic measures in affected herds at an early stage. The aim of this work was to evaluate a zinc chloride-sodium chloride medium (density at room temperature 1.55 g/ml), which is hardly used internationally in the context of parasite diagnostics from camelid feces, in comparison to a common standard medium (zinc sulfate with density at room temperature 1.35 g/ml) using the quantitative McMaster technique, which is easy to perform for veterinarians. It was hypothesized that the choice of suspension medium plays a critical role in the detection of eimeria oocysts from New World camelid feces. In addition, two different processing methods (Method A and Method B) were compared, in which the fecal samples remained in the suspension medium for different lengths of time (Method A: immediate further processing; Method B: further processing after 18 hours of storage at 4 °C). Since method B showed no advantage over method A for either suspension medium ( $p>0.05$ ), immediate further processing of the sample preparation is recommended as a target-oriented and rapid procedure.

The present results show that when using the medium zinc chloride-sodium chloride solution (density at room temperature 1.55 g/ml), which was specially adapted and produced for this work for the examination of New World camelid feces (Anstaltsapotheke der Vetmeduni Vienna), not only more samples were positive for oocysts of the Eimeria species *E. macusaniensis*, which is considered to be particularly pathogenic, but also significantly more oocysts of the small eimeria (*E. punoensis*, *E. alpaca*, *E. lamae*) could be detected ( $p<0.001$ ) than was the case with the standard medium zinc sulfate solution.

Based on the results of the present thesis, the use of a zinc chloride-sodium chloride solution with density at room temperature of 1.55 g/ml can be recommended for efficient processing of New World camelid fecal samples in the McMaster procedure in the context of Eimeria diagnostics in camelid patients.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.....Abbildung

C.....Celsius

E.....Eimeria

hgr.....hochgradig

mac.....macusaniensis

ml.....Milliliter

RT.....Raumtemperatur

spp.....spezies, hier verwendet für die kleinen Eimerien

ün.....über Nacht

vs.....versus

ZnCl<sub>2</sub>NaCl.....Zinkchlorid-Natriumchlorid

ZnSO<sub>4</sub>.....Zinksulfat

## 9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 9.1 Abbildungen

**Abbildung 1:** für die Aufarbeitung der Kotproben verwendete Suspensionsmedien (private Sammlung).....11

**Abbildung 2:** Boxplot zum Vergleich der Oozystendetektion kleiner Eimerien mittels Zinksulfatlösung versus Zinkchlorid-Natriumchlorid-Lösung bei sofortiger Analyse (Methode A) der Kotproben; box = unteres/oberes quartil; Linie = median; o/\* = Ergebnisse, die über das 1,5 bzw. 3 - Fache des Interquartilsabstandes liegen.....15

**Abbildung 3:** Boxplot zum Vergleich der Oozystendetektion kleiner Eimerien mittels Zinksulfatlösung versus Zinkchlorid-Natriumchlorid-Lösung bei Anwendung der Methode B; box = unteres/oberes quartil; Linie = median; o/\* = Ergebnisse, die über das 1,5 bzw. 3 - Fache des Interquartilsabstandes liegen.....16

**Abbildung 4:** Vergleich der Mittelwerte ( $\pm$  SD) detektierter *Eimeria* spp, Oozysten der mit Methode A und Methode B analysierten Kotproben (n=50) bei Verwendung von Zinksulfatlösung (6a) bzw. Zinkchlorid-Natriumchlorid-Lösung (6b).....18

### 9.2 Tabellen

**Tabelle 1:** Übersicht über die bei Neuweltkameliden auftretenden Eimerienarten und Morphologie der OozystenKlicken oder tippen Sie hier, um Text einzugeben.....4

**Tabelle 2:** Übersicht über die Präpatenzzeiten der Eimerienarten Klicken oder tippen Sie hier, um Text einzugeben.....5

**Tabelle 3:**  $\kappa$  - Stärke der Übereinstimmung: Richtwerte nach Altman (1991).....13

## 10. Literaturverzeichnis

About Alpacas. <https://www.alpacaseller.com/info/usinfo.php>. (Zugriff 24.05.2021)

Altman DG. 1991. *Practical Statistics for Medical Research.*, Boca Raton, Chapman & Hall/CRC

Ballweber LR. 2009. Ecto- and Endoparasites of New World Camelids. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 25(2):295–310

Bauer, C. 2006. Untersuchungsmethoden. BOCH, J., SUPPERER, R., SCHNIEDER T. (Hrsg.): *Veterinärmedizinische Parasitologie*. 6. Auflage, Paul Parey, Berlin, 84-104.

Cafrune M.M., Marín R.E., Rigalt F.A., Romero S.R., Aguirre D.H. 2009. Prevalence of *Eimeria macusaniensis* and *Eimeria ivitaensis* in South American camelids of Northwest Argentina. *Veterinary Parasitology*, 162, S. 338–341.

Cafrune, M.M., Salatin, A.O., Mari´n, R.E., Romero, S., Auad, G.T., Aguirre, D.H., 2006. Especies de *Eimeria* diagnosticadas en llamas (*Lama glama*) de la Puna de Jujuy, Argentina.. Researchgate 16 Reunion Anual de la Asociacion Argentina Veterinaria Laboratorio, S. 152.

Cafrune, M.M., Salatin, A.O., Pivotto, R.A., Rigalt, F., Vera, R.E., Ruiz, H.M., Aguirre, D.H., 2006. Coprologia parasitaria en vicunas (*Vicugna vicugna*) de la Reserva de Laguna Blanca, Catamarca, Argentina. 4. Congreso Mundial de Camelidos, Santa Maria, Catamarca, Argentina, CD version, 3 pp.

Cebra CK, Stang Bernadette V. 2008. Comparison of methods to detect gastrointestinal parasites in llamas and alpacas. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2008.

Cebra CK, Valentine BA, Schlipf JW, Bildfell RJ, McKenzie E, Waitt LH, Heidel JR, Cooper BJ, Löhr CV, Bird KE, Saulez MN, Firshman AM 2007. *Eimeria macusaniensis* infection in 15 llamas and 34 alpacas. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 230, S. 94–100.

Cebra, C.K., Mattson, D.E., Baker, R.J., Sonn, R.J., Dearing, P.D., 2003. Potential pathogens in feces from unweaned llamas and alpacas with diarrhea. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 223, 1806–1808

Cebra CK, Valentine BA, Schlipf JW, Bildfell RJ, McKenzie E, Waitt LH, Heidel JR, Cooper BJ, Löhr CV, Bird KE, Saulez MN, Firshman AM. 2007. *Eimeria macusaniensis* infection in 15 llamas and 34 alpacas. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 230(1):94–100.

Cebra C., Stang B., Smith C., 2012. Development of a nested polymerase chain reaction assay for the detection of *Eimeria macusaniensis* in camelid feces. *American Journal of Veterinary Research*, Vol. 73, No. 1, S. 13.18

Chigerwe M, Middleton JR, Williams F 3rd, Tyler JW, Kreeger JM. 2007. Atypical coccidiosis in South American camelids. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19(1):122–125.

Costarella, C.E., Anderson, D.E., 1999. Ileoceocolic intussusception in a one-month-old llama. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 214, 1–2.

Díaz P, Panadero R, López R, Cordero A, Pérez-Creo A, López CM, Fernández G, Díez-Baños P, Morrondo P. 2016. Prevalence and risk factors associated to *Eimeria* spp. infection in unweaned alpacas (*Vicugna pacos*) from Southern Peru. *Acta Parasitologica*, 61(1):74–8.

Erlacher, H. 2020. Tierärztliche Betreuung und Behandlung von Neuweltkameliden in Österreich. Diplomarbeit, Veterinärmedizinische Universität Wien

Foreyt WJ, Lagewuist J. 1992. Experimental Infections of *Eimeria alpaca* and *Eimeria punoensis* in Llamas (*Lama glama*). *The Journal of Parasitology*, 78(5), S. 906–909.

Fowler ME. 2010. *Medicine and Surgery of Camelids*. Iowa, USA: Wiley-Blackwell. S.231–269.

Franz, S; Wittek, T; Joachim, A; Hinney, B; Dadak, AM (2015): Llamas and alpacas in Europe: Endoparasites of the digestive tract and their pharmacotherapeutic control. *Veterinary Journal* 2015; 204(3):255-262

Franz S, Dadak, A (2020). Gastrointestinal Nematode and Small Liver Fluke Infections Evans, CN Hrsg.: Alpaca Veterinary Field Manual. 4th. Ed. USA

Gauly M., Vaughan J., Cebra C., 2018. Neuweltkameliden: Haltung, Zucht, Erkrankungen, Vierte Auflage, Stuttgart, Thieme-Verlag, S. 43;75;82;147

Guerrero C, Alva J, Bazalar H, Tabacchi L 1970. Infeccion experimental de alpacas con *Eimeria lamae*. Boletén Extraordinario Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y Altura 4. S. 79-83

Guerrero CA 1967. Coccidia (Protozoa: Eimeriidae) of the Alpaca Lama pacos. The Journal of Protozoology, 14, S. 616–625.

Guerrero CA. 1967. Coccidia (Protozoa: Eimeriidae) of the Alpaca Lama pacos. The Journal of Protozoology, S. 613–616.

Guerrero, C. A., Alva J., Bazalar H. M., Rojas M. 1972. Esporulacion de *Eimeria macusaniensis* (Eimeriidae) de alpaca (*Lama pacos*). 3. Congreso Nacional de Biología, Peru,, 120.

Guerrero, C. A., Hernandez J., Bazalar H., Alva J. 1971. *Eimeria macusaniensis* n. sp. (Protozoa: Eimeriidae) of the alpaca *Lama pacos*. The Journal of Protozoology, 18, S. 162–163.

Guerrero, D., Alva M., Leguía G., Bazalar H. 1970a. Prevalencia de coccidias en alpacas *Lama pacos*. Boletén Extraordinario Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y Altura 4:84–90

Halsby K., Twomey DF., Featherstone C., Foster A., Walsh A., Hewitt K., Morgan D. 2017. Zoonotic diseases in South American camelids in England and Wales. *Epidemiology and Infection* , 145, 1037–1043.

Hodgin, C., Schillhorn van Veen, T.W., Fayer, R., Richter, N., 1984. Leptospirosis and coccidial infection in a guanaco. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 185, 1442–1444

Jarvinen, J. A. 1999. Prevalence of *Eimeria macusaniensis* (Apicomplexa: Eimeriidae) in Midwestern Lama spp. *The Journal of Parasitology*, 85, S. 373–376.

Johnson AL, Stewart JE, Perkins GA. 2009. Johnson AL, Stewart JE, Perkins GA. (2009): Diagnosis and treatment of *Eimeria macusaniensis* in an adult alpaca with signs of colic. *Veterinary Journal*, 179, S. 465–467.

Kultscher L., Joachim A., Wittek T., 2018. Auftreten und Management von Endoparasiten bei Alpakas in Deutschland und Österreich *Tierärztliche Praxis Großtiere* 4/2018, S. 241-248

Lambacher B., Wittek T., Joachim A., Dadak A., Stanitznig A., Tichy A., Duscher G., Franz S. 2016. From the New World to the Old World: endoparasites of South American Camelids in Austria, *Wiener tierärztliche Monatsschrift*, 103, S 33-42

Leguía G., Casas E. 1998. *Eimeria ivitaensis* n.sp.(Protozoa: Eimeriidae) en alpacas (*Lama pacos*). *Revista Peruana de Parasitología*, 13, S. 59–61.

Leguía G. 1991. The epidemiology and economic impact of llama parasites. *Parasitology Today*, Volume 7, Issue 2, S. 54–56.

Lenghaus C, O'Callaghan MG, Rogers C. 2004. Coccidiosis and sudden death in an adult alpaca (*Lama Pacos*). *Australian Veterinary Journal*, 82(11), S. 711–712.

Lenghaus C., O` Callaghan, M.G., Rogers C. 2004. Coccidiosis as sudden death in an adult alpaca (*Lama pacos*). *Australian Veterinary Journal*, S. 711–712.

Llama Statistics 2021. <https://core.ac.uk/download/pdf/11032089.pdf>, 24.05.2021

McKenna PB. 2006. *Eimeria macusaniensis* in camelids – a brief review. *Surveillance* 33, 4, S. 8–10.

Mehlhorn H, Piekarski G, Hrsg. 2002. *Grundriss der Parasitenkunde Parasiten des Menschen und der Nutztiere*. Sechste überarbeitete und erweiterte Auflage Heidelberg: Spektrum, 74-85, 90, 98-99

Palacios C.A., Perales R.A., Chavera A.E., Lopez M.T., Braga U., Moro M. 2006. *Eimeria macusaniensis* and *Eimeria ivitaensis* co-infection in fatal cases of diarrhoea in young alpacas (*Lama pacos*) in Peru. *Veterinary Record*, S. 344–345.

Palacios CA, Perales RA, Chavera AE, Lopez MT, Braga WU, Moro M. 2006. *Eimeria macusaniensis* and *Eimeria ivitaensis* co. infection in fetal cases of diarrhoea in young alpacas (*Lama pacos*) in Peru. *Veterinary Record*, 158, S. 344–345.

Palacios CA, Perales RA, Chavera AE, Lopez MT, Braga WU, Moro M. 2006. *Eimeria macusaniensis* and *Eimeria ivitaensis* co-infection in fatal cases of diarrhoea in young alpacas (*Lama pacos*) in Peru. *Veterinary Record*, S. 344–345.

Rawdon T., McFadden A., King C., Mitchell V., Howell M. 2006. Clinical findings and risk factors associated with the first report of *Eimeria macusaniensis* in New Zealand alpacas. *Surveillance*, 33(4), S. 11–15

Rickard, LG. und Bishop JK. 1988. Prevalence of *Eimeria* spp. (Apicomplexa: Eimeriidae) in Oregon Llamas. *The Journal of Protozoology*.

Rohbeck S. 2006. Parasitosen des Verdauungstrakts und der Atemwege bei Neuweltkameliden: Untersuchung zu ihrer Epidemiologie und Bekämpfung in einer südhessischen Herde sowie zur Biologie von *Eimeria macusaniensis*. Dissertation. Justus-Liebig-Universität Gießen

Rosadio H, Ameghino F 1994. Coccidial infections in neonatal peruvian alpacas. *Veterinary Record*, S. 459–460.

Rosadio R., Londone P-, Pérez D., Castillo H. Véliz A., Llanco L., Yaya K. Maturano L. 2010. *Eimeria macusaniensis* associated lesions in neonate alpacas dying from enterotoxemia. *Veterinary Parasitology*, 168, S. 116–120.

Schock A., Bidewell C.A., Duff J.P. Scholes S.F., Higgins R.J. 2007. Coccidiosis in British alpacas (*Vicugna pacos*). *Veterinary Record*, 160, S. 805–806.

Steinwigger A., 2019. Fütterungs- sowie Weidemanagement auf Kultur und Extensivweiden, Lama- Alpaka-Tagung, Bio-Institut, HBLFA Raumberg-Gumpenstein, file:///C:/Users/there/Downloads/fodok\_4\_22066\_weidesysteme\_weidestrategien\_lama\_alpaka\_tagung2019\_steinwiggera\_bioinstitut\_hblfa.pdf (Zugriff 24.08.2021)

Stropnicka L., Svobodova V. 2011. Occurrence of Endo- and Ectoparasites in Llamas and Alpacas in the Czech Republic. Folia Veterinaria, 55, S. 30–32.

Twomey DF., Wu G., Nicholson R., Watson EN., Foster AP 2014. Review of laboratory submissions from New World camelids in England and Wales. Veterinary Journal, 200, S. 51–59.

Whitehead C. (2009). Neonatal diseases in Llamas and Alpacas. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice 25, 367-384.

Yakimoff, W.L. 1934. Two new species of coccidian: *Eimeria truffitt* n.sp. of the eland (*Oriascanna*), and *Eimeria peruviana* n.sp. of the llama (*Lama glama*). Parasitology 26, 510-511

## 11. Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei meiner Betreuerin Frau Ass. -Prof<sup>in</sup> DVetPharm Mag<sup>a</sup> pharm. Dr<sup>in</sup> rer. nat. Agnes Dadak bedanken. Für all die Geduld, den fachlichen Rat, ihre nette Art, die Unterstützung bei Problemen und die immer wieder aufbauenden Worte.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Alexander Tichy für die statistische Auswertung, seine unkomplizierte Hilfe und seine hilfreichen Erklärungen bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an meine liebe Freundin und Kollegin Carmen Klug, für die schöne gemeinsame Zeit, für den gegenseitigen Rückhalt, für das gemeinsame Lernen, für die gegenseitige Unterstützung und dass Du immer für mich da warst. "Zu zweit ist einfach alles schöner."

Meinem Mann, meiner Familie und allen, die mich in den letzten Jahren während des Studiums unterstützt haben, möchte ich ebenso danken.