

Massengewinnung und Lagerung von *Taenia hydatigena*-Eiern sowie Isolierung lebensfähiger Onkosphären

Autor(en): **Deplazes, P. / Eckert, J.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires**

Band (Jahr): **130 (1988)**

PDF erstellt am: **27.06.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-591451>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Schweiz. Arch. Tierheilk. 130, 307–320, 1988

Aus dem Institut für Parasitologie
(Direktor: Prof. J. Eckert) der Universität Zürich

Massengewinnung und Lagerung von *Taenia hydatigena*-Eiern sowie Isolierung lebensfähiger Onkosphären

P. Deplazes) und J. Eckert*

1. Einleitung

In einer früheren Arbeit haben wir Daten zum Verlauf künstlicher Primär- und Reinfektionen von Hunden mit *Taenia hydatigena* und zur biologischen Charakterisierung dieses Parasiten (Isolat aus der Schweiz) beschrieben (Deplazes und Eckert, 1988). Die vorliegende Publikation befasst sich mit der Massengewinnung und Lagerung von *T. hydatigena*-Eiern sowie mit der Isolierung lebender Onkosphären. Hauptziel der diesbezüglichen experimentellen Arbeiten war, möglichst standardisierte Methoden zur Gewinnung lebensfähiger Onkosphären auszuarbeiten. Ausserdem sollten einige Erfahrungen mit der *in vitro*-Kultivierung von Onkosphären als Basis für spätere Arbeiten zur Antigengewinnung aus diesen Stadien gesammelt werden. Die Gewinnung solcher Antigene ist einerseits für die Verbesserung der Immundiagnostik von praktischer Bedeutung. Andererseits wurde nachgewiesen, dass *in vitro* aus Onkosphären von *T. saginata*, *T. hydatigena* und *T. ovis* gewonnene Antigene zur künstlichen Immunisierung von Rindern beziehungsweise von Schafen gegen die von den genannten *Taenia*-Arten verursachten Zystizerkose-Formen geeignet sind (Lit. bei Rickard, 1982). Die hier publizierten Daten sind daher auch im Hinblick auf Immunisierungsversuche von Interesse.

2. Material und Methoden

2.1. Hunde, Haltungsbedingungen, Parasitenmaterial und Infektion

Als Träger und Ausscheider von *Taenia hydatigena* dienten mit diesem Parasiten künstlich infizierte Hunde. Einzelheiten über die Versuchstiere, die Haltungsbedingungen sowie die Infektionsmethode sind in einer früheren Arbeit beschrieben (Deplazes und Eckert, 1988).

*) Zweiter Teil der Dissertation von P. Deplazes unter Leitung von Prof. J. Eckert an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Zürich

Adresse: Institut für Parasitologie der Universität Zürich, Winterthurerstrasse 266 a, CH-8057 Zürich

2.2. Gewinnung von Proglottiden und Eiern von *T. hydatigena*

2.2.1. Proglottidengewinnung: Die von den mit *T. hydatigena* infizierten Hunden ausgeschiedenen Einzelproglottiden (Ep) wurden täglich vier- bis fünfmal mit einer Pinzette vom Boden der Boxe gesammelt. Bis zur weiteren Verwendung (10–60 Tage) wurden jeweils 40 Ep in 100 ml Lagerungsflüssigkeit [physiol. NaCl-Lösung, 1000 Einheiten/ml Penicillin G, 1000 µg/ml Streptomycin und 250 ng/ml Fungizon (Gibco AG, CH-Basel)] in einem verschliessbaren Glasgefäss bei +4°C gelagert.

Die Isolation ganzer Taenien aus lebenden Hunden erfolgte durch anthelminthische Behandlung wie bei Deplazes und Eckert (1988) beschrieben. So gewonnene Bandwürmer oder spontan ausgeschiedene Proglottidenverbände (Pv) untersuchten wir auf die Anzahl ihrer Proglottiden sowie auf deren Entwicklungsgrad und Eiegehalt.

2.2.2. Isolierung von Eiern: Gravide Proglottiden von *T. hydatigena* wurden zunächst mit Hilfe eines Stössels in einem Metallsieb (Maschenweite 0,8 mm) über einem Becherglas zerquetscht und der Gewebebrei möglichst vollständig durch die Siebmaschen gespült. Die Suspension wurde mit Hilfe von Nylon-Sieben (Scrynel, Zürcher Beuteltuchfabrik AG, CH-Zürich) von 60 µm bzw. 40 µm Maschenweite von Fremdpartikeln und Proglottidengewebsresten gereinigt. Die so vorgeseiebte Suspension konnte dann langsam durch ein feines Nylon-Sieb (20 µm) gegossen werden. In diesem Sieb blieben *Taenia*-Eier zurück, kleinere Partikel und die Kalkkörperchen aus den Proglottiden traten aber durch. Mittels Zentrifugation (1240 × g, 5 Min., Raumtemperatur) konnten die Eier in einem 50-ml-Zentrifugenröhrchen im Sediment angereichert werden.

2.2.3. Gewinnung von Eiern aus einer Hundeboxe: In einer Boxe mit einer Grundfläche von 6,45 m², versehen mit einem gut abwaschbaren Kunstharzbodenbelag, wurden während 4 Tagen 2 Hunde mit patentem *T. hydatigena*-Befall gehalten. Jeden Morgen (nach gründlicher Entfernung des Kotes) wurde die Boxe mit Hilfe eines Hochdruckreinigers mit kaltem Wasserstrahl gereinigt. Die anfallende Waschflüssigkeit (ca. 40 Liter) konnte durch eine Einrichtung am Ablauf der Boxe aufgefangen werden. Die Isolation von Eiern aus Einzelproglottiden sowie die Anreicherung der Eier aus der Waschflüssigkeit erfolgten wie unter 2.2.2. beschrieben.

2.3. Beurteilung des Zustandes der Eier von *T. hydatigena*

Die Beurteilung des Zustandes der gewonnenen *Taenia*-Eier erfolgte aufgrund morphologischer, chemischer und biologischer Kriterien.

2.3.1. Morphologische Beurteilung: Bei mikroskopischer Untersuchung mit 400facher Vergrößerung liessen sich unreife Eier mit fehlender oder dünner Embryophore (auch «Eischale» genannt) von dickschaligen, reifen Eiern mit deutlich ausgebildeter Onkosphäre unterscheiden.

2.3.2. Widerstandsfähigkeit gegenüber Natrium-Hypochlorit: Bei Eiern mit vollständig ausgebildeter Embryophore prüften wir die Widerstandsfähigkeit ihrer Onkosphären gegenüber Na-Hypochlorit: Zu 0,4 ml Eisuspension (2000 Eier/ml) wurden 0,3 ml Na-Hypochlorit-Lösung (2% aktives Chlor, pH 12,0) zugegeben. Diese Suspension wurde sofort in eine McMaster-Zählkammer (Wetzel, 1951) abgefüllt. Innerhalb der ersten Minute wurden alle sedimentierten Eier eines Zählfeldes mikroskopisch bei hundertfacher Vergrößerung ausgezählt, bevor die Embryophoren zerfielen. Nach weiteren 4 bis 6 Minuten wurden unter demselben Zählfeld die durch Na-Hypochlorit aus der Embryophore befreiten und intakten Onkosphären ausgezählt. Diese Onkosphären sind abgerundet und in der Onkosphären-Membran eingeschlossen (Abb. 1a). Mit diesem Vorgehen liess sich der prozentuale Anteil der Onkosphären zur Eizahl (= 100%) berechnen. Zur Bestimmung dieser Na-Hypochlorit-Widerstandsfähigkeit (NaHW) einer Eifraktion wiederholten wir diesen Vorgang dreimal.

2.3.3. Isolierung und Aktivierung der Onkosphären:

a) *Auflösung der Embryophore*: Zu 4 ml wässriger Suspension mit 10 000 bis 20 000 Eiern in einem abschliessbaren 10-ml-Kunststoff-Zellkulturröhrchen mit planer Fläche (Nunc, Nr. 156758, DK-Roskilde) wurden 3 ml Na-Hypochlorit-Lösung (2% aktives Chlor, pH 12,0) gegeben, um die Embryophoren aufzulösen. Die Reaktion wurde nach 5–8 Minuten durch Zugabe von 4 ml PBS-Puffer (phosphatgepufferte physiologische NaCl-Lösung; pH 7,2) beendet. Die Na-hypochlorit-resistenten Onkosphären, die noch von der Onkosphären-Membran umschlossen waren, wurden darauf viermal mit 8 ml PBS-Puffer gewaschen (Zentrifugation bei $600 \times g$, 5 Minuten, Raumtemperatur, Absaugen des Überstandes jeweils bis auf 2 ml).

b) *Aktivierungsprozess*: Der Aktivierungsprozess wurde durch Zugabe von 0,25 ml 1 M HCl pro 10 ml Onkosphären-Suspension in PBS-Puffer vor der letzten Waschung eingeleitet. Nach Zentrifugation wurden zu 2 ml Onkosphären-Suspension 7 ml sterile und auf $+37^\circ\text{C}$ vorgewärmte künstliche Verdauungslösung gegeben. Die Lösung bestand aus: 1% Schweine-Pankreatin (Fluka, Nr. 76190, CH-Buchs/SG), 15% frischer oder zuvor bei -28°C gelagerter Schafgalle und 1% NaHCO_3 in dest. Wasser. Das verwendete Kulturgefäss wurde anschliessend sofort verschlossen (um das gebildete CO_2 nicht entweichen zu lassen) und mehrmals während der Inkubationszeit von 20 Minuten im Wasserbad bei $+37^\circ\text{C}$ kräftig geschüttelt.

Danach wurden die Onkosphären in einem Medium folgender Zusammensetzung gewaschen (siehe 2.3.3.a): Eagle's Minimal Essential Medium with Earle's Salts (EMEM) (Gibco AG, Nr. 0721100, CH-Basel), 4 mg/ml D-Glukose, 200 U/ml Penicillin G, 200 μg /ml Streptomycin; gepuffert mit 25 mM HEPES, pH 7,4.

c) *Aktivierungsrate*: Um die Vitalität der Eier quantitativ zu erfassen, wurde die Aktivierungsrate (aO/E %) bestimmt, die angibt, aus welchem prozentualen Anteil der Eier sich aktive Onkosphären isolieren liessen (Morphologie siehe Abb. 1). Bei der Berechnung dieser Rate wurden die durch die Behandlung mit Na-Hypochlorit und durch den Aktivierungsprozess verursachten Verluste an Onkosphären berücksichtigt. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Aktivierungsrate (aO/E \%)} = \frac{(\text{aO/O \%})^* \times (\text{NaHW \%})^{**}}{100}$$

2.4. Lagerung von *Taenia*-Eiern

2.4.1. *Lagerungsbedingungen*: Während 20 Tagen wurden die von 5 Hunden ausgeschiedenen Einzelproglottiden von *T. hydatigena* gesammelt, die Eier isoliert und unter 3 verschiedenen Bedingungen bis zu 270 Tagen gelagert:

a) Lagerung von 450 000 Eiern in 50 ml physiol. NaCl-Lösung mit Antibiotika-Zusatz (1000 U/ml Penicillin, 1000 μg /ml Streptomycin, 250 ng/ml Fungizon) in einem 50 ml Kunststoffröhrchen mit Schraubverschluss (Spitzboden, Falcon Nr. 2098, Dickinson and Company, Oxnard, CA 93030, USA) ohne Gasphase bei $+4^\circ\text{C}$. Wechsel der Lagerungsflüssigkeit alle 2 Monate.

b) Vor Lagerungsbeginn Behandlung der Eisuspension mit dem Desinfektionsmittel Chlorhexidin-Digluconat 1:5000 (Serva, D-Heidelberg) während 20 Minuten (Heath, 1973). Anschliessend wurden 200 000 Eier in 30 ml dest. Wasser in einem 50-ml-Becherglas bei freier Luftzufuhr im Kühlschrank bei $+4^\circ\text{C}$ gelagert. Ersetzen des verdunsteten Wassers monatlich.

c) In einem Kunststoffröhrchen mit Schraubverschluss (Cryotube 2 ml; Nunc, DK-Roskilde) wurden 1,8 ml Eisuspension (8000 Eier/ml physiol. NaCl-Lösung) in einem programmierbaren Einfrierautomaten (Kryo 10, Paner Biomed) mit einer Kühlrate von $5^\circ\text{C}/\text{Minute}$ auf -28°C gekühlt und bei dieser Temperatur in einer Tiefkühltruhe gelagert. Nach den in 2.4.2. aufgeführten

* – prozentualer Anteil der aktiven Onkosphären (aO) zur Onkosphären-Anzahl vor dem Aktivierungsprozess (siehe 2.3.3.b)

** – Na-Hypochlorit-Widerstandsfähigkeit in % (siehe 2.3.1.)

Lagerungszeiten wurde die Eissuspension wie folgt aufgetaut: Lagerungsgefäß im Wasserbad bei +37 °C inkubieren, bis das Eis geschmolzen ist, danach bei Zimmertemperatur 2 Stunden lagern und anschliessend Eier zur Vitalitätsprüfung verwenden.

2.4.2. *Vitalitätsprüfung und Bestimmung der Weiterentwicklungsrate*: Jeweils am 30., 50., 80., 110., 180. und 270. Tag der Lagerung bestimmten wir an 4 bis 6 Proben von den 3 verschiedenen gelagerten Eifractionen die Widerstandsfähigkeit gegen Na-Hypochlorit und die Aktivierungsrate der Onkosphären (siehe 2.3.2. und 2.3.3.). Nach 30- und 270tägiger Lagerung der Eier wurden die Onkosphären (700 bis 5000 Organismen) unter sterilen Bedingungen aktiviert und in Medium (siehe 2.3.3.b) mit 30% fötalem Kälberserum, pH 7,4 bei +37 °C in einem gänzlich gefüllten und dicht abgeschlossenen Kunststoff-Zellkulturrohrchen (10 ml mit planer Fläche) (Nunc, Nr. 156758, DK-Roskilde) gelagert. Nach sechstägiger *in vitro*-Kultivierung ohne Mediumwechsel zählten wir die sedimentierten, weiterentwickelten Onkosphären (runde, unbewegliche Larven mit Durchmesser 30–60 µm; siehe Abb. 3) in einer McMaster-Zählkammer (Zählung im Sediment) und berechneten die Weiterentwicklungsrate (prozentualer Anteil der weiterentwickelten Onkosphären zur Ausgangssuspension der aktiven Onkosphären).

3. Ergebnisse

3.1. Massengewinnung von Eiern

3.1.1. *Eimenge pro Einzelproglottis*: Aus den von 5 Hunden ausgeschiedenen Einzelproglottiden (Ep) wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Patenz Eier isoliert und quantitativ erfasst. Aus gesamthaft 4039 Ep konnten $19,7 \times 10^6$ *Taenia*-Eier isoliert werden. Die daraus berechnete Eizahl pro Ep betrug durchschnittlich 4855 (2429–7622). Mit dieser Methode war es möglich, während 20 bis 73 Tagen 13 420–87 746 Eier pro Hund und Tag zu gewinnen (Tab. 1).

3.1.2. *Gewinnung von Eiern aus einer Hundeboxe*: Aus den von 2 Hunden in 4 Tagen einzeln ausgeschiedenen 83 Ep und der Waschflüssigkeit der Hundeboxe isolierten wir 950 000 Eier. Die Anzahl gewinnbarer Eier pro Proglottis betrug 11 500. Pro Hund und Tag konnten durchschnittlich 118 750 Eier gewonnen werden. Das so erhaltene Eimaterial enthielt sehr viele Fremdpartikel.

3.2. Qualitative Beurteilung der Eier von *Taenia hydatigena*

3.2.1. Beurteilungsmethoden

a) *Morphologische Beurteilung*: Unreife Eier mit fehlender oder unvollständig ausgebildeter Embryophore konnten lichtmikroskopisch gut erkannt und von «reifen» Eiern mit dicker Embryophore abgegrenzt werden.

b) *Widerstandsfähigkeit gegenüber Na-Hypochlorit*: Mit der in 2.3.2. beschriebenen Methode konnten wir auf einfache Weise den Prozentsatz der nicht aktivierbaren Eier, deren Onkosphären nach Auflösung der Embryophore zerfielen, berechnen. Diese Methode wurde an 10 Stichproben aus derselben Eifraktion geprüft: Die Widerstandsfähigkeit dieser Eier gegenüber Na-Hypochlorit betrug $52,5\% \pm 4,7\%$. Aus Tab. 2 und 3 wird deutlich, dass Eier mit dicker Embryophore, die mikroskopisch als «reif» beurteilt wurden, grosse Schwankungen von 2% bis 83% in der Widerstandsfähigkeit gegenüber Na-Hypochlorit zeigten.

Tabelle 1 Qualitative und quantitative Daten zu *Taenia hydatigena*-Eiern aus Einzelproglottiden (Ep), die von 5 Hunden zu verschiedenen Zeitpunkten der Patenz ausgeschieden wurden.

| Hund Nr. | Untersuchungszeitpunkt | Ep | Ei- menge 10 ⁶ | Ep/Tag | Eimenge pro Ep | Eimenge pro Hund und Tag | NaHW in %*) | Aktivie- rungsrate in %**) |
|-------------|---|-----|---------------------------------|--------|-------------------|--------------------------------|----------------|----------------------------------|
| 1 | vom 60. bis 133. Tag der Patenz (73 Tage) | 681 | 2,43 | 9,3 | 3568 | 33 185 | 92 | nu |
| 2 | vom 310. bis 330. Tag der Patenz (20 Tage) | 258 | 1,22 | 12,9 | 4728 | 60 991 | 79 | nu |
| 5 | die ersten 57 Tage der Patenz | 697 | 2,22 | 12,2 | 3185 | 38 858 | 79 | 66 |
| 5 | vom 255. bis 318. Tag der Patenz (63 Tage) | 328 | 2,50 | 5,2 | 7622 | 39 634 | 81 | nu |
| 6 | ganze Patenz (41 Tage) | 599 | 3,60 | 14,6 | 6010 | 87 746 | nu | nu |
| 7 | die ersten 20 Tage der Patenz | 247 | 0,60 | 12,4 | 2429 | 30 121 | 91 | 56 |
| 7 | vom 275. bis 331. Tag der Patenz (56 Tage) | 711 | 4,34 | 12,7 | 6104 | 77 522 | 80 | 63 |
| 7 | vom 671. bis 709. Tag der Patenz (38 Tage) | 368 | 2,20 | 9,7 | 5978 | 57 989 | 86 | 58 |
| 11 | vom 224. bis 270. Tag der Patenz (46 Tage) | 150 | 0,61 | 3,3 | 4067 | 13 420 | 93 | nu |
| Mittelwert: | | | | | 4855 | 48 830 | 85 | 61 |

*) Na-Hypochlorit-Widerstandsfähigkeit der Onkosphären (Durchschnittswert aus drei Einzelbestimmungen von einer Stichprobe, siehe 2.3.2.)

***) siehe 2.3.3.c, nu: nicht untersucht

c) *Vitalitätsprüfung*: Durch die chemische Auflösung der Embryophore mit Na-Hypochlorit und die Aktivierung der Onkosphären mit künstlicher Dünndarmlösung (siehe 2.3.3.) konnten aktive (bewegliche) Onkosphären gewonnen werden (Morphologie siehe Abb. 1 a-c). Die Methodik zur Bestimmung der Aktivierungsrate (prozentualer Anteil der aktiven Onkosphären zur Ei-Anzahl vor dem Aktivierungsprozess) wurde in 10 Stichproben einer Eifraktion geprüft und ergab eine mittlere Rate von $63,5\% \pm 11,7\%$.

Ein weiteres biologisches Kriterium für die Beurteilung der Vitalität von Eiern bietet die Weiterentwicklungsfähigkeit von aktiven Onkosphären *in vitro*. Diese Untersuchungen werden in Abschnitt 3.3. beschrieben.

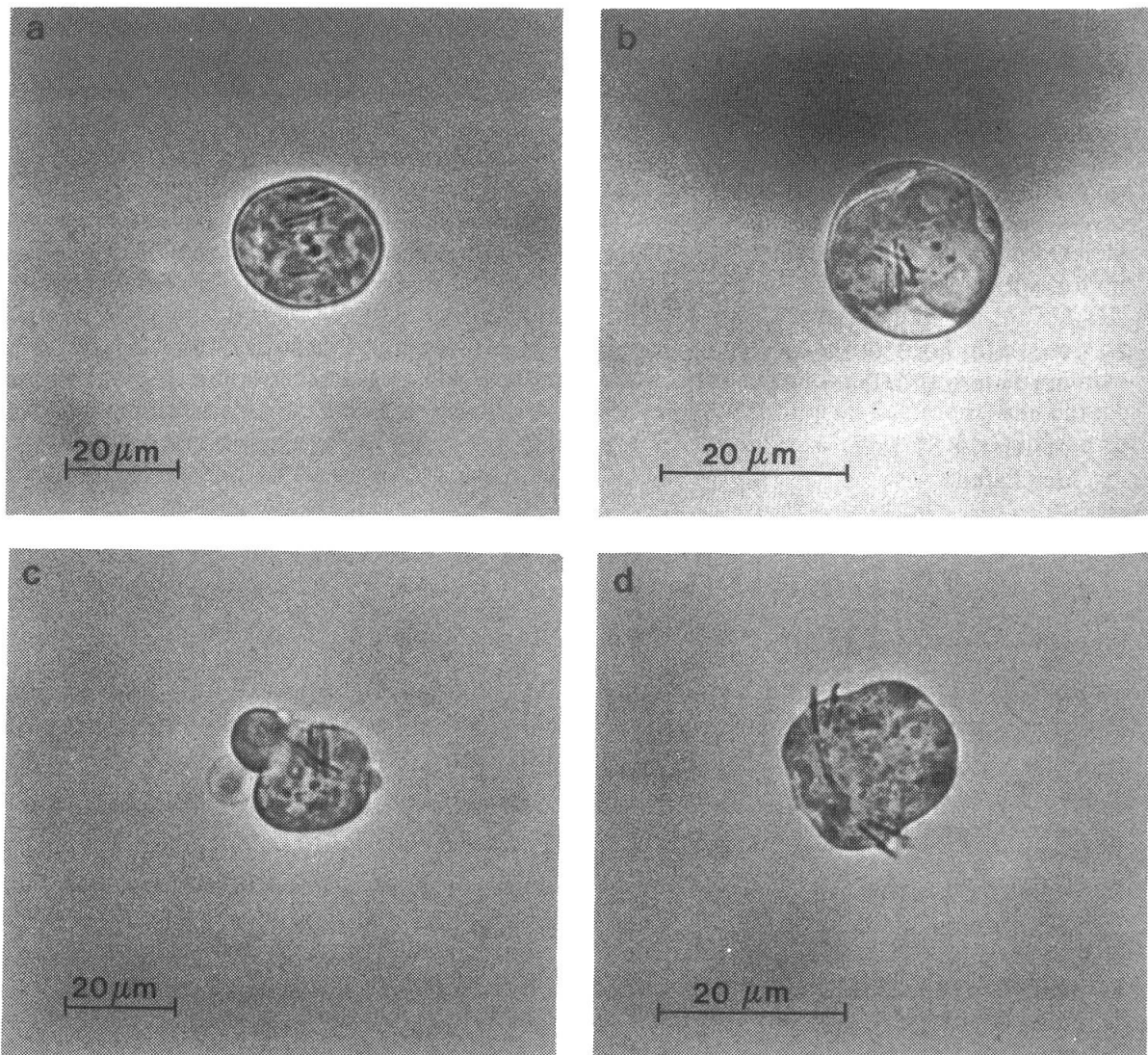


Abb. 1 Onkosphären von *Taenia hydatigena*: a) nach Na-Hypochlorit-Behandlung, b) mit künstlicher Verdauungslösung aktiviert (noch von der Onkosphären-Membran umgeben), c) beim Ausschlüpfen aus der Onkosphären-Membran, d) aktive (geschlüpfte) Onkosphäre.

3.2.2. Qualitative Beurteilung

Die aus den Einzelproglottiden während verschiedener Zeitpunkte der Patenz gewonnenen *Taenia*-Eier (Tab. 1) zeigten eine relativ konstante Widerstandsfähigkeit gegenüber Na-Hypochlorit von durchschnittlich 85% (80%–93%); die durchschnittliche Aktivierungsrate betrug 61% (56%–66%).

Bei drei zu verschiedenen Zeitpunkten der Patenz von Hund Nr. 7 gewonnenen Eischargen waren keine signifikante Qualitätsunterschiede festzustellen (Tab. 1).

Die Ergebnisse der qualitativen Untersuchungen von Bandwurmmaterial, das nach anthelminthischer Behandlung von Hunden gewonnen wurde, sind in Tab. 2 zusammengestellt. Von 13 gewonnenen Bandwürmern aus 4 Hunden enthielten 6 (46%) in den letzten 5 Proglottiden Eimaterial, das eine NaHW von mehr als 30% aufwies. Pro

Bandwurm konnten wir nie mehr als 10 gravide Proglottiden finden, deren Eier eine dicke Embryophore besaßen. Ähnliche Resultate erhielten wir bei der Untersuchung von Proglottidenverbänden (Pv), die ein mit 10 Finnen infizierter Hund (Nr. 7) während der Patenz ausschied. Nur aus 7 (21%) von 29 Pv konnte für eine weitere Aktivierung brauchbares Eimaterial (NaHW höher als 30%) gewonnen werden (Tab. 3).

Tabelle 2 Beurteilung der terminalen 5 Proglottiden von *Taenia hydatigena*, gewonnen nach antihelminthischer Behandlung von Hunden mit patenten Infektionen.

| Hund Nr. | Nr. | Bandwurm: | | mikroskopische Beurteilung: | | NaHW in % *) |
|-------------|-----|-----------|------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------|
| | | Kopf | Anzahl Proglottiden | Proglottiden | Eier | |
| 4 | 1 | + | 460 | gravid | dünne Embryo- phore (E) | 0 |
| | 2 | + | 490 | gravid | dicke E | 47 |
| | 3 | + | 390 | geschlechtsreif | — | nu |
| | 4 | + | 320 | gravid | dicke E | 6 |
| | 5 | + | 360 | gravid | dicke E | 2 |
| 3 | 1 | - | 150 | gravid | dicke E | 73 |
| 14 | 1 | + | 280 | gravid | dünne E | nu |
| | 2 | + | 400 | gravid | dicke E | 32 |
| | 3 | + | 300 | gravid | dünne E | nu |
| | 4 | + | 450 | gravid | dicke E | 33 |
| 9 | 1 | + | 410 | gravid | dicke E | 54 |
| | 2 | + | 420 | gravid | dicke E | 17 |
| | 3 | + | 400 | gravid | dicke E | 42 |

*) Widerstandsfähigkeit von Onkosphären gegen Na-Hypochlorit (siehe 2.3.2.); nur an Eiern mit dicker, vollständig ausgebildeter Embryophore geprüft.

+: nachgewiesen,

-: nicht nachgewiesen;

nu: nicht untersucht

3.3. Lagerung von *Taenia*-Eiern

Die Resultate der Lagerungsversuche sind in Abb. 2 dargestellt. Mit wenigen Ausnahmen nahm die NaHW der Eier während der Lagerungszeit unter allen drei Lagerungsbedingungen kontinuierlich ab, bei den tiefgefrorenen Eiern (-28 °C, Lagerungsmethode c) am stärksten.

Die Aktivierungsraten der Eier, gelagert bei +4 °C in physiol. NaCl-Lösung oder in dest. Wasser nach Behandlung mit Chlorhexidin-Diglukonat (Lagerungsbedingungen a und b), nahmen bis zum 110. Tag nicht signifikant ab und betrugen 55,6% bis 63,9% bzw. 48,9% bis 54,3%. Nach 180 Tagen waren sie leicht reduziert (38,8% und 46,0%), und nach 270 Tagen konnten noch aus 9,2% bzw. 24,0% der Eier aktive Onkosphären gewonnen werden.

Tabelle 3 Beurteilung der 5 terminalen, von spontan eliminierten Proglottidenverbänden abgetrennten Proglottiden von *Taenia hydatigena* (Hund Nr. 7).

| Proglottidenverband: Nr. | mikroskopische Beurteilung: | | NaHW in % *) | |
|-----------------------------|-----------------------------|----------------------|----------------------------|----|
| | Anzahl Proglottiden | Proglottiden Eier | | |
| 1 | 203 | gravid | dünne Embryo- phore (E) | nu |
| 2 | 58 | gravid | dünne E | nu |
| 3 | 165 | gravid | dicke E | 83 |
| 4 | 87 | gravid | dünne E | nu |
| 5 | 105 | geschlechtsreif | - | - |
| 6 | 60 | geschlechtsreif | - | - |
| 7 | 140 | gravid | dicke E | 61 |
| 8 | 270 | gravid | dicke E | 24 |
| 9 | 110 | gravid | dicke E | nu |
| 10 | 130 | gravid | dicke E | 3 |
| 11 | 70 | geschlechtsreif | - | - |
| 12 | 10 | geschlechtsreif | - | - |
| 13 | 32 | geschlechtsreif | - | - |
| 14 | 108 | geschlechtsreif | - | - |
| 15 | 31 | geschlechtsreif | - | - |
| 16 | 30 | gravid | dicke E | 37 |
| 17 | 30 | geschlechtsreif | - | - |
| 18 | 50 | gravid | dicke E | 50 |
| 19 | 35 | geschlechtsreif | - | - |
| 20 | 15 | gravid | dünne E | 0 |
| 21 | 95 | gravid | dicke E | 2 |
| 22 | 60 | gravid | dünne E | - |
| 23 | 30 | geschlechtsreif | - | - |
| 24 | 170 | gravid | dicke E | 67 |
| 25 | 160 | gravid | dicke E | 56 |
| 26 | 44 | gravid | dünne E | - |
| 27 | 120 | gravid | dünne E | - |
| 28 | 175 | gravid | dicke E | 17 |
| 29 | 50 | gravid | dünne E | - |

*) Widerstandsfähigkeit von Onkosphären gegen Na-Hypochlorit (siehe 2.3.2.); nur an Eiern mit dicker, vollständig ausgebildeter Embryophore geprüft.
nu: nicht untersucht

Am 30. und 270. Tag der Lagerung prüften wir die aktivierbaren Onkosphären *in vitro* auf ihre Weiterentwicklungsfähigkeit während 6 Tagen in einem komplexen Medium mit 30% fötalem Kälberserum; (siehe 2.3.2.b). Zu Beginn des Lagerungsversuches entwickelten sich aus den 3 verschiedenen gelagerten Eifractionen (Lagerungsbedingungen a, b und c) durchschnittlich 75,3%, 63,0% und 59,8% der aktiven Onkosphären zu runden, unbeweglichen Larven mit einem Durchmesser von 30–60 μm (Abb. 3).

Nach einer Lagerungszeit von 270 Tagen waren keine Unterschiede in der Grössenentwicklung bei den weiterentwickelten Onkosphären festzustellen; ihre Weiterentwicklungsrate betrug bei den Lagerungsbedingungen a und b durchschnittlich 67,4% und 68,1% (Abb. 2).

4. Diskussion

Nach den bisher vorliegenden, vor allem in Neuseeland von Gemmell et al. (1986 a, b) erarbeiteten epidemiologischen Erkenntnissen ist die Bekämpfung der durch verschiedene *Taenia*-Arten verursachten Zystizerkose des Schafes oder Rindes wegen des hohen «biotischen Potentials» der Parasiten sehr schwierig. Unsere eigenen Untersuchungen (Deplazes und Eckert, 1988) haben gezeigt, dass auch ein schweizerisches Isolat von *Taenia hydatigena* ein hohes biotisches Potential besitzt und sehr grosse Mengen an infektiösen Eiern produziert. Als eine neue Möglichkeit zur Bekämpfung der wirtschaftlich bedeutsamen Zystizerkosen der Hauswiederkäuer wird heute die Vakzination mit Antigenen aus Onkosphären angesehen (Lit. bei Rickard, 1982). Zu Forschungsarbeiten in dieser Richtung benötigt man geeignete Tiermodelle und grössere Mengen von *Taenia*-Onkosphären.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Versuch unternommen, die Möglichkeiten zur Massengewinnung von Eiern bzw. Onkosphären von *T. hydatigena* näher zu prüfen, geeignete Lagerungsbedingungen zu evaluieren sowie Kriterien für die Beurteilung der Vitalität der Onkosphären festzulegen.

Nach unseren früheren Feststellungen (Deplazes und Eckert, 1988) sind in den graviden Proglottiden von *T. hydatigena* durchschnittlich etwa 55 000 Eier vorhanden. Die hier vorliegende Arbeit zeigt, dass mit den von uns angewandten Methoden pro Proglottis aber nur 2429–7622 (Mittelwert: 4855) Eier isoliert werden konnten. Während 20–73 Tagen lag die tägliche Eiausbeute pro Hund zwischen 13 420 und 87 746. Diese Ausbeute war höher, wenn Hunde in einer speziell ausgerüsteten Boxe gehalten und die Eier sowohl aus den ausgeschiedenen Einzelproglottiden als auch aus der bei der Reinigung anfallenden Waschflüssigkeit isoliert wurden (118 750 Eier pro Hund und Tag).

Zur Beurteilung der gewonnenen Eier wurden morphologische und biochemisch-biologische Parameter verwendet. Dabei zeigte sich, dass die mikroskopisch-morphologische Beurteilung der Eier, das heisst der Nachweis einer dicken Embryophore, kein ausreichendes Kriterium bezüglich der Vitalität der in den Embryophoren eingeschlossenen Onkosphären darstellt. Bessere Hinweise darauf lieferte ein biochemischer Test, bei dem die Eier der Einwirkung von Natrium-Hypochlorit ausgesetzt werden, wobei die Embryophore zerfällt. Voll lebensfähige Onkosphären überstehen diese Prozedur, was hier als Widerstandsfähigkeit gegen Na-Hypochlorit (= NaHW) bezeichnet wird. Diese NaHW kann je nach Reifungsgrad und Zustand der Eier grossen Schwankungen unterliegen (s. Tab. 2 und 3). Bei Anwendung der von uns beschriebenen Sammel- und Isolationstechnik konnten wir jedoch schliesslich bei verschiedenen Hunden über längere Zeit Eichargen mit hohem NaHW zwischen 79% und 93% gewinnen (s. Tab. 1).

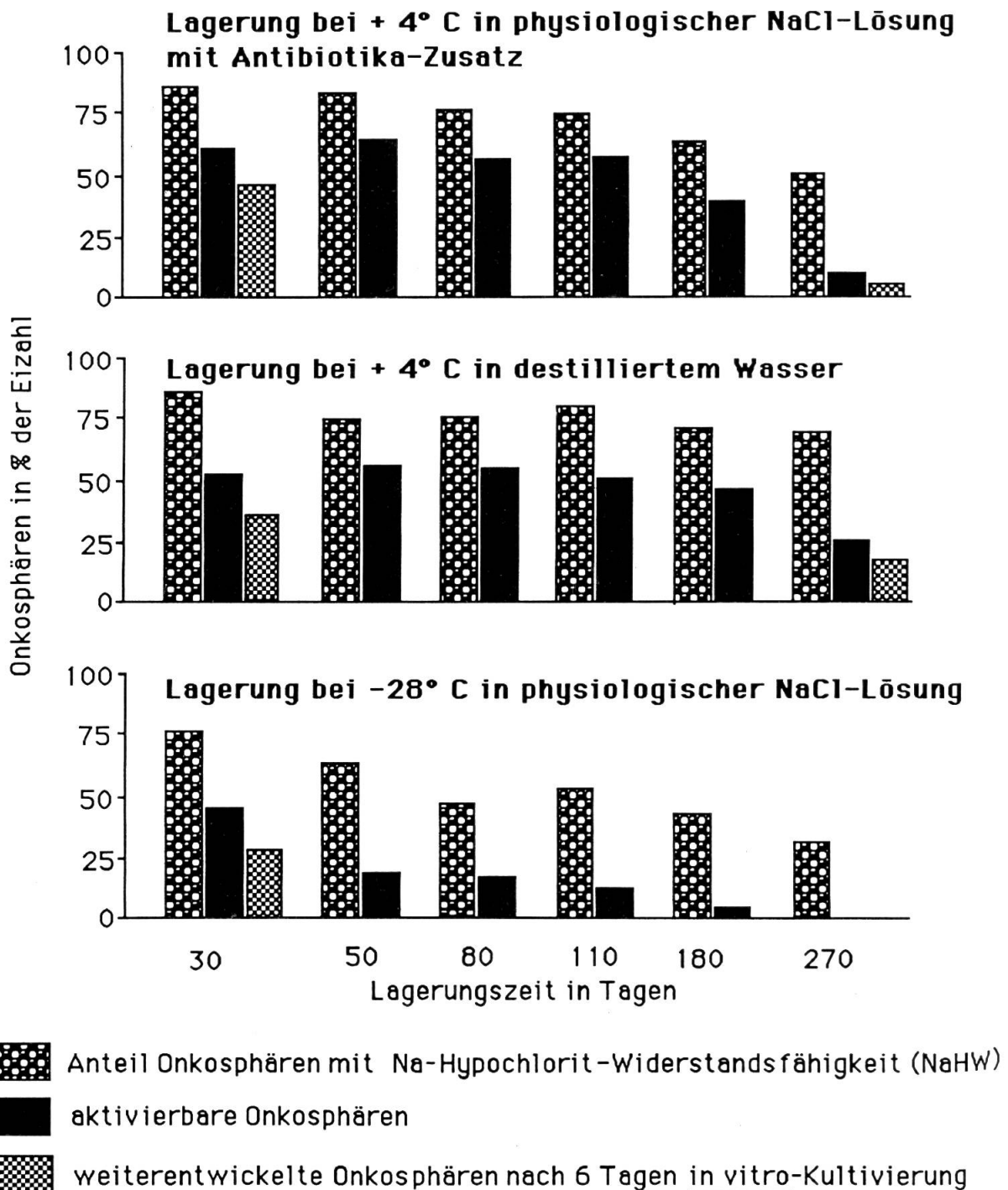


Abb. 2 Vitalitätsparameter der Onkosphären von *Taenia hydatigena* nach Lagerung der Eier unter verschiedenen Bedingungen.

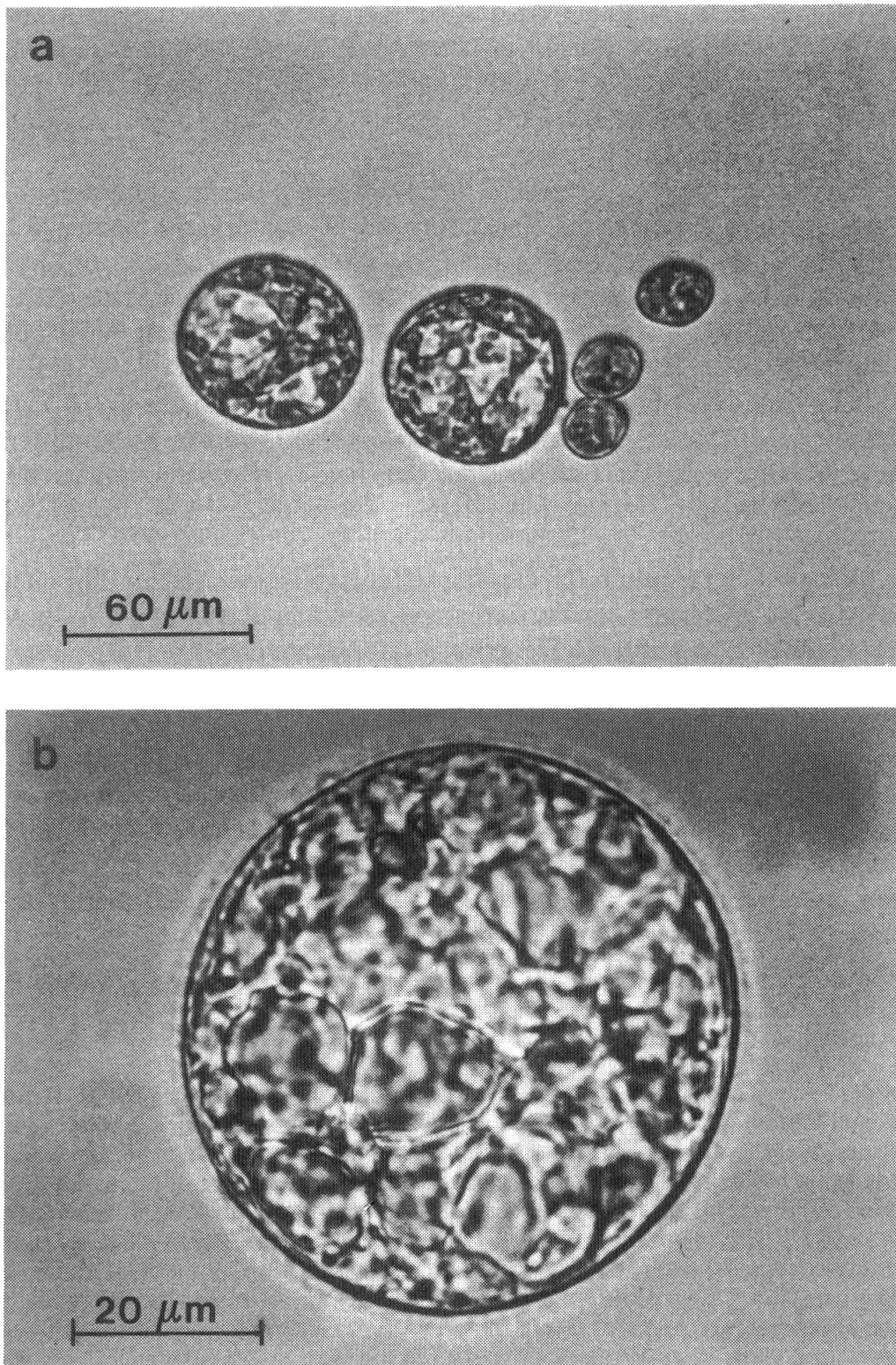


Abb. 3 In vitro weiterentwickelte Onkosphären von *T. hydatigena*:
a) zwei grosse Onkosphären links: nach 6 Tagen in Kultur; drei kleine Gebilde rechts: nicht aktivierte Onkosphären zum Vergleich.
b) Vergrößerung von weiterentwickelter Onkosphäre aus Bild a.

Ein weiteres Kriterium für die Vitalität der Eier ist die Aktivierungsrate der Onkosphären unter dem Einfluss künstlicher Verdauungslösung. Mit einer modifizierten Aktivierungs-Methode nach Heath (1982) stellten wir bei Eiern aus Einzelproglottiden Aktivierungsraten (prozentualer Anteil der aktiven Onkosphären zur Ei-Anzahl) von 56–66% fest (siehe Tab. 1).

Für Forschungsarbeiten sind genaue Kenntnisse über die Lagerungsfähigkeit von *Taenia*-Eiern wichtig. Gemmell (1977) lagerte Eier von *T. hydatigena* bis zu 300 Tage in Wasser bei +7 °C. Nach 90tägiger Lagerung entwickelten sich aus solchen Eiern nach künstlicher Infektion von Schafen infektiöse Finnen; nach 273 Tagen waren die Onkosphären zwar invasiv, entwickelten sich im Zwischenwirt aber nicht vollständig.

Mit unseren Untersuchungen konnten wir nachweisen, dass bei +4 °C in dest. Wasser oder in physiol. NaCl-Lösung gelagerte Eier von *T. hydatigena* nach 180 Tagen nur 10% bzw. 36% der anfänglichen Aktivierungsrate (= 100%) verloren hatten. Interessanterweise überlebte ein Teil der Eier das Einfrieren bei -28 °C, doch waren nach 180 Tagen nur noch 4% der Onkosphären aktivierbar, während nach 270 eine Aktivierung nicht mehr gelang.

Als biologisches Kriterium für die Beurteilung gelagerter *Taenia*-Eier diene die Weiterentwicklungsfähigkeit der aktivierbaren Onkosphären während 6 Tagen *in vitro*. Die Grössenentwicklung und die Weiterentwicklungsrate dieser Onkosphären schien durch die lange Lagerungszeit von 270 Tagen unter den Lagerungsbedingungen bei +4 °C (siehe 2.4.1.), im Vergleich zu aktivierbaren Onkosphären aus frischen Eiern, nicht beeinträchtigt zu werden.

Mit den in dieser Arbeit eingesetzten Methoden der Massengewinnung von *Taenia*-Eiern konnten wir die hohe Reproduktionsleistung von *T. hydatigena* im Hund ausnützen und mit einem minimalen Einsatz von Versuchstieren relativ grosse Eimengen gewinnen. Die gewonnenen Eier stellten ein qualitativ konstantes Ausgangsmaterial für Antigengewinnung sowie für *in vitro*-Kultivierungsversuche dar.

5. Zusammenfassung

Ziel der Untersuchungen war die Massengewinnung von *Taenia hydatigena*-Eiern mit Hilfe standardisierter Methoden, die Aufbewahrung der Eier unter verschiedenen Bedingungen sowie die Isolation lebensfähiger Onkosphären. Aus Einzelproglottiden, die von experimentell infizierten Hunden ausgeschieden wurden, konnten je nach angewandter Technik durchschnittlich 4855 bzw. 11 500 Eier/Proglottis gesammelt werden. Dies entspricht einer durchschnittlichen Gesamtmenge bis zu 118 750 Eiern pro Hund und Tag. Die Onkosphären aus Eiern von Einzelproglottiden hatten eine durchschnittliche Widerstandsfähigkeit gegen Natrium-Hypochlorit-Lösung (2% aktives Chlor) von 85%. Diese Resistenzrate erwies sich als zuverlässiger Parameter für die Vitalität von Onkosphären. Aus den Eiern, die zunächst einer Na-Hypochlorit-Lösung und anschliessend einer künstlichen Verdauungslösung (1% Pankreatin, 15% Schafgalle, 1% NaHCO₃ in destilliertem Wasser) ausgesetzt waren, konnten 56 bis 66% aktivierte (vitale) Onkosphären isoliert werden.

In physiologischer Kochsalzlösung oder in destilliertem Wasser bei +4°C gelagerte *Taenia*-Eier behielten hohe Onkosphären-Aktivierungsraten von 49 bzw. 59% bis zu 110 Tagen; anschliessend folgte ein Abfall der Aktivierungsraten auf 39 und 46% nach 180 Tagen, auf 9 und 24% nach

270 Tagen. Die Eier überlebten teilweise Tiefgefrieren in physiologischer Kochsalzlösung bei -28°C bis zu 180 Tagen mit Aktivierungsraten der Onkosphären von 16, 11 und 4% nach 80, 100 und 180 Tagen. Nach 6 Tagen *in vitro*-Kultivierung in einem komplexen Medium zeigten Onkosphären aus bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrten *Taenia*-Eiern ähnliche Charakteristika des Wachstums und der zystischen Entwicklung wie Onkosphären aus frischen Eiern.

Résumé

Le but de ces examens était l'obtention de grandes quantités d'œufs de *Taenia hydatigena* à l'aide de méthodes standardisées, leur conservation sous différentes conditions et l'isolation d'oncosphères viables. A partir de proglottis isolés rejetés par des chiens infectés expérimentalement, il a pu être récolté selon la technique utilisée en moyenne 4855 resp. 11 500 œufs par proglottis, ce qui correspond à une quantité totale moyenne pouvant atteindre 118 750 œufs par chien et par jour. Les oncosphères d'œufs de proglottis isolés avaient une capacité de résistance moyenne de 85% dans une solution d'hypochlorite de sodium (2% de chlore actif). Ce pourcentage de résistance s'est démontré comme un paramètre sûr de la vitalité des oncosphères. A partir d'œufs exposés premièrement à une solution d'hypochlorite de sodium et par la suite à une solution digestive artificielle (1% de pancréatine, 15% de bile de mouton, 1% de NaHCO_3 dans de l'eau distillée), il a pu être isolé 56 à 66% d'oncosphères activées (vitales).

Des œufs de *ténias* entreposés dans une solution physiologique de sel de cuisine ou dans de l'eau distillée à une température de $+4^{\circ}\text{C}$ conservaient des pourcentages élevés d'activation des oncosphères de 49 resp. 59% jusqu'à 110 jours. Par la suite, il a été observé une chute de ces pourcentages à 39 et resp. 46% après 180 jours et à 9 resp. 24% après 270 jours. Les œufs dans une solution physiologique de sel de cuisine ont survécu partiellement à la congélation à -28°C jusqu'à 180 jours avec des pourcentages d'activation des oncosphères de 16, 11 et 4% après 80, 110 et 180 jours. Après 6 jours de culture *in vitro* dans un milieu complexe, des oncosphères provenant d'œufs de *ténias* conservés à $+4^{\circ}\text{C}$ ont démontré des caractéristiques identiques de croissance et de développement kystique que celles des oncosphères d'œufs frais.

Riassunto

Lo scopo della ricerca fu la raccolta massiccia di uova di *Taenia hydatigena* con l'aiuto di metodi standardizzati, la conservazione delle uova in diverse condizioni, e l'isolazione di oncosfere vitali. Da proglottidi singole, eliminate da cani infettati sperimentalmente, a secondo del metodo usato poterono esser raccolte fra 4855 e 11 500 uova per proglottide. Ciò corrisponde ad una media di 118 750 uova in totale per cane al giorno. Le oncosfere da uova di proglottidi singole ebbero una resistenza dell'85% contro una soluzione di ipoclorito di sodio (2% di cloro attivo). Questa quota di resistenza si dimostrò esser un parametro attendibile per la vitalità delle oncosfere. Dalle uova, dapprima trattate con una soluzione di ipoclorito di sodio e poi sottoposte ad un processo digestivo (1% pancreatina, 15% bile di montone, 1% di NaHCO_3 in acqua distillata) si poterono isolare dal 56 al 66% di oncosfere attivate (vitali).

Le uova di *Taenia*, collocate in soluzione di cloruro di sodio o in acqua distillata a $+4^{\circ}\text{C}$, mantennero alti tassi di attivazione delle oncosfere, dal 49 al 59%, fino a 110 giorni. In seguito si registrò una caduta delle quote di attivazione dal 39 al 46% dopo 180 giorni e dal 9 al 24% dopo 270 giorni. Le uova congelate in soluzione fisiologica a -28°C sopravvissero fino a 180 giorni con quote di attivazione delle oncosfere del 16, 11 e 4% dopo 80, 110 e 180 giorni. Dopo 6 giorni di cultura *in vitro* in un medio complesso, le oncosfere nate da uova di *Taenia* conservate a $+4^{\circ}\text{C}$ presentarono caratteristiche di crescita e di sviluppo cistico simili a quelle nate da uova fresche.

Summary

Mass collection and storage of *Taenia hydatigena* eggs and isolation of viable oncospheres.

The aim of this study was the mass collection by standardized techniques of *T. hydatigena* eggs, their storage under various conditions and the isolation of viable oncospheres. From single proglottids released from experimentally infected dogs, an average of 4855 and 11 500 eggs/proglottid could be collected, depending on the technique used.

This corresponds to a total average of up to 118 750 eggs per dog and day. Oncospheres from eggs isolated from single proglottids exhibited an 85% average rate of resistance against treatment with sodium hypochlorite solution (2% active chlorine). This resistance rate proved to be a reliable parameter for the oncosphere viability. From eggs which had been exposed to sodium hypochlorite solution and subsequently to artificial digestion fluid (1% pancreatin, 15% sheep bile, 1% NaHCO₃ in distilled water), 56 to 66% active (viable) oncospheres could be isolated.

Taenia eggs stored in physiological saline or in distilled water at +4 °C retained high oncosphere activation rates of 49 and 59%, respectively, up to 110 days followed by a decrease to 39 and 46% after 180 days and 9 and 24% after 270 days. The eggs partially survived deep-freezing at -28 °C in physiological saline up to 180 days as indicated by oncosphere activation rates of 16, 11 and 4% after 80, 110 and 180 days. After 6 days of *in vitro* cultivation in a complex medium, oncospheres from eggs stored at +4 °C for 270 days exhibited equivalent characteristics of growth and cystic development as oncospheres from fresh eggs.

6. Literatur

Coman B. J. and Rickard M. D.: The location of *Taenia pisiformis*, *Taenia ovis* and *Taenia hydatigena* in the gut of the dog and its effect on net environmental contamination with ova. *Z. Parasitenk.*, 47, 237–248 (1975). — Deplazes P. und Eckert J.: Untersuchungen zur Infektion des Hundes mit *Taenia hydatigena*. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 130, 289–306 (1988). — Gemmell M. A.: Taeniidae: Modification to the life span of the egg and the regulation of tapeworm populations. *Exp. Parasitol.* 41, 314–328 (1977). — Gemmell M. A., Lawson J. R. and Roberts M. G.: Population dynamics in echinococcosis and cysticercosis: biological parameters of *Echinococcus granulosus* in dogs and sheep. *Parasitology.*, 92, 599–620 (1986 a). — Gemmell M. A., Lawson J. R., Roberts M. G., Kerin B. R. and Mason C. J.: Population dynamics in echinococcosis and cysticercosis: comparison of the response of *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena* and *T. ovis* to control. *Parasitology.*, 93, 357–369 (1986 b). — Gregory G. G.: Fecundity and proglottid release of *Taenia ovis* and *T. hydatigena*. *Aust. Vet. J.*, 52, 277–279 (1976). — Heath D. D.: An improved technique for the *in vitro* culture of *Taeniid* larvae. *Inter. J. Parasitol.*, 3, 481–484 (1973). — Heath D. D.: *In vitro* culture of cysticerci: An aid to investigations of morphological development and host-parasite relationships. In *Present State of Knowledge and Perspectives* (ed. A. Flisser, A. Willms, J. P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura, F. Beltran, New York, USA and London, Academic Press, 477–493 (1982). — Heath D. D. and Smyth J. D.: *In vitro* cultivation of *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena*, *T. ovis*, *T. pisiformis* and *T. serialis* from oncosphere to cystic larva. *Parasitol.*, 61, 329–343 (1970). — Rickard M. D.: Immunisation against infection with larval taeniid cestodes using oncospherical antigens. In *Present State of Knowledge and Perspectives* (ed. A. Flisser, K. Willms, J. P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura and F. Beltran), New York and London: Academic Press, 633–646 (1982). — Wetzel R.: Verbesserte McMaster-Kammer zum Auszählen von Wurmeiern. *Tierärztl. Umsch.*, 6, 209–210 (1951).

Dank: Wir danken Herrn Prof. P. F. Suter für die Übernahme des Korreferates und Herrn A. Rüdemann für die kompetente Mitarbeit und gute Betreuung der Hunde.

Manuskripteingang: 21. Januar 1988