

ZÜRCHER HOCHSCHULE FÜR ANGEWANDTE WISSENSCHAFTEN  
DEPARTMENT LIFE SCIENCES UND FACILITY MANAGEMENT  
INSTITUT UNR

## **Methodenentwicklung zum Nachweis von Kokzidien der Gattung Eimeria im Boden**



Bachelorarbeit

von

**Sebastian Jenni**

Bachelorstudiengang 2012

Abgabedatum 07.09.2017

Studienrichtung Umweltingenieurwesen

Fachkorrektoren:

Barbara Früh  
FiBL, Frick

Monika Hutter  
ZHAW, Wädenswil

## Impressum

### Schlagworte (keywords):

- Kokzidien
- Koprologie
- Eimeria
- Methodenetablierung
- Mc Master
- Oozysten
- Infektion
- Bodenproben
- Parasiten

### Zitiervorschlag:

Autor: Sebastian Jenni

Titel: Methodenentwicklung zum Nachweis von Kokzidien der Gattung Eimeria im Boden

Datum: 07.09.2017

Ort: Lausen (BL)

### Adresse des Instituts:

ZHAW Life Science and Facility Management

Institut für Umwelt und natürliche Ressourcen

Grüentalstrasse 14, Postfach

8820 Wädenswil

### Titelbild:

Eimeria maxima in der Probensuspension, Lichtmikroskop

## Zusammenfassung

Kokzidien sind einzellige Parasiten und weltweit verbreitet; sie kommen intrazellulär im Magen-Darmtrakt und der Leber vieler höherer Wirbeltiere vor. Teilweise sind sie hochpathogen und können die Kokzidiose auslösen, daher sind sie in der Nutztierhaltung einer der wirtschaftlich relevantesten Schadfaktoren. In der konventionellen Tierhaltung wird die Kokzidiose durch die präventive Gabe von Kokzidiostatika bekämpft. Diese sind in der biologischen Tierhaltung verboten, daher wird die Krankheit durch Stallhygiene und Weidemanagement vorgebeugt. Der Nachweis von Kokzidien in einer Bodenprobe ist für ein gezieltes Freilandmanagement zentral. Eine Methode zum Nachweis von Kokzidien der Gattung *Eimeria* in Bodenproben zu etablieren, ist Inhalt dieser Arbeit.

Der Nachweis des Dauerstadiums der Kokzidien, den Oozysten, geschieht standardmässig durch die koproskopische Untersuchung mittels Flotation und Auszählung in McMaster Zählkammern. Für den Versuch wurden Oozysten in Reinkultur verwendet, die aus dem Hühnerimpfstoff Paracox 5 der Firma MSD, entnommen wurden. Die verwendeten Bodenproben stammen aus einer Naturwiese. Nach der Aufbereitung der Bodenproben geschah der Nachweis mit McMaster Zählkammern. Die finale Methode wurde durch ein Standard Operation Protocol (SOP) dokumentiert. Basierend auf diesem SOP wurde die Methode durch einen Vorversuch geprüft und in einem Hauptversuch validiert. Im Hauptversuch wurden je drei Bodenproben nach einer, zwei, drei und fünf Wochen Infektionsdauer untersucht, dadurch wurde eine Zeitreihe erstellt. Jede Bodenprobe wurde zehnmal getestet. Die Resultate wurden mit dem Programm R statistisch ausgewertet. Es wurden eine ANOVA, eine Regressionsanalyse und ein T-Test durchgeführt.

Die Validierung ergab eine Wiederfindungsrate von 11-29%. Eine der Bodenproben, welche nach drei Wochen Infektionsdauer untersucht wurden, hatte eine signifikante Abweichung gegenüber den anderen Proben innerhalb der gleichen Infektionsdauer. Die Anforderungen an die Genauigkeit wurden, bezogen auf die einzelnen Bodenproben, in 66% der Fälle erfüllt. Innerhalb der Zeitreihe wurden je drei Bodenproben als Gruppe ausgewertet, dort erfüllte lediglich eine von drei Gruppen die Anforderungen an die Genauigkeit. Die Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze liegt bei 300 bzw. 2470 Oozysten pro Bodenprobe. Bezogen auf den Parameter Infektionsdauer zeigte sich die Methode als robust. Bei ausgetrockneten Bodenproben konnte keine einzige Oozyste nachgewiesen werden.

Prinzipiell ist die Methode in der Praxis anwendbar, doch müssen gewisse Einschränkungen im Gültigkeitsbereich gemacht werden, da die Versuche nur mit einem Bodenmaterial durchgeführt wurden und keine vollständige Validierung möglich war. Weiterführende Arbeiten sollten mehrere Bodentypen und Freilandbedingungen untersuchen.

## Abstract

Coccidia are monocellular parasites. They are prevalent worldwide and occur in the gastrointestinal system and the liver of higher vertebrates. In some cases, they are highly pathogenic and can cause coccidiosis. Therefore coccidian are one of the most important harm factors in the keeping of farm animals. In conventional farming, the coccidia are fought by preventive medication. Since this is not allowed in organic farming, strict hygiene in the barn and a directed field management are there the strategies. The detection of coccidian in soil samples are vital for a directed field management. To establish a method for detection coccidia of genus eimeria in soil samples is the content of this paper.

The detection of the permanent state of coccidian, the oocysts, is standardly performed by coproscopic study, with flotation and enumeration with McMaster Chambers.

A pure culture of oocysts, gained out of the vaccine Paracox 5 by MSD, was used for this experiment. The soil samples were collected from a natural meadow. The detection was performed with McMaster Chambers after preparation of the soil samples. The final method was documented with a SOP. Based on this SOP, the method was verified by a pilot test and validated by a main test. The main test included the testing of each three samples, one, two, three and five weeks after infection. This resulted in a timeline. Each soil sample was tested ten times. The results were statistically analysed with the program R. An ANOVA a regression analysis and a T-Test were performed.

The validation showed a recovery rate of 11-29%. One of the soil samples, which was examined three weeks after infection, showed significant differences compared to the other samples with similar duration of infection. The requirements for accuracy were fulfilled in 66% of the cases when looking on single soil samples. Within the timeline the samples were grouped for every duration of infection. There only one of three groups fulfilled the requirements for accuracy. The limit of detection is 300 oocysts per sample. The limit of quantitation is 2470 oocysts per sample. In terms of duration of infection the method is robust. In dried out samples, no oocysts were found.

In principal the method can be used in practise, however there are certain limitations for the range of validity, since there was only one kind of soil tested and no complete validation was performed. Further scientific work on this field should include a variety of soil samples and free field conditions.

## **Dank**

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die mich während der Arbeit unterstützt haben.

Erika Perler und Livia Baumgartner vom Parasitenlabor beim FiBL danke ich für die fachkundige Unterstützung bei der Entwicklung der Nachweismethode und den Probenvorbereitungen.

Für die rasche und unkomplizierte Zusendung des Impfstoffs danke ich Karin Kreyenbühl.

Simon Hafner danke ich für die Laboranalysen der Bodenproben.

Barbara Früh und Monika Hutter danke ich für die Betreuung und Korrektur der Arbeit.

## Inhalt

1	Einleitung .....	1
2	Biologie, Relevanz und Nachweis der Kokzidien in der Nutztierhaltung.....	3
2.1	Biologie der Kokzidien .....	3
2.2	Relevanz in der Nutztierhaltung.....	5
2.3	Koprologische Untersuchungsmethodik .....	6
3	Material .....	8
3.1	Impfstoff .....	8
3.2	Bodenproben.....	8
3.3	Laborartikel .....	10
3.4	Chemikalien .....	10
4	Methode .....	11
4.1	Einleitung .....	11
4.2	Anforderungsprofil.....	11
4.3	Konzeptionierung .....	12
4.4	Vorversuch.....	13
4.5	Hauptversuch.....	14
4.6	Infektion .....	16
4.7	Isolation.....	17
5	Resultate .....	19
5.1	Standard Operation Protocol (SOP) .....	19
5.2	Vorversuch.....	24
5.3	Hauptversuch.....	24
6	Diskussion.....	32
6.1	Entwicklungsphase.....	32
6.2	Vorversuch, Hauptversuch .....	34
6.3	Validierung .....	35
6.4	Gültigkeitsbereich der Methode.....	37

6.5	Anwendbarkeit in der Praxis.....	37
7	Fazit und Ausblick.....	38
8	Literatur.....	39

## 1 Einleitung

Kokzidien sind einzellige Parasiten und kommen bei vielen höheren Wirbeltieren vor. Innerhalb der Artengruppe gibt es nicht-, schwach- und hochpathogene Arten. Pathogene Arten lösen die Kokzidiose aus, eine Krankheit die auf der Zellschädigung des durch die Parasiten befallenen Organs beruht (Bauer et al., 2006).

Weltweit wurden bei allen wirtschaftlich relevanten Nutztierarten Kokzidien nachgewiesen. Beim Geflügel wird die Kokzidiose als die wichtigste parasitäre Erkrankung überhaupt angesehen (Fanatico, 2006).

In der konventionellen Tierhaltung wird, analog zur präventiven Antibiotikagabe, Kokzidiostatika eingesetzt, um den Krankheitsdruck niedrig zu halten. Die präventive Gabe von Medikamenten ist in der biologischen Nutztierhaltung verboten. Alternative Bekämpfungsstrategien sind, je nach Tierart, Impfstoffe, verbesserte Stallhygiene und ein vorbeugendes Weidemanagement (Heckendom & Frutschi, 2014; Malz, 2003). Durch die steigenden Anforderungen der Fleischkonsumenten an eine artgerechte Tierhaltung, wächst auch der Anteil an Nutztieren, die unter Freilandbedingungen gehalten werden. Dadurch beschränkt sich das Parasitenmanagement nicht mehr nur auf den Stall, sondern erhält auch für das Freiland eine höhere Relevanz. Um die Parasitendichte, und somit den Infektionsdruck, einschätzen zu können, muss eine einfache und praxistaugliche Methode etabliert werden, die Kokzidien in einer Bodenprobe nachweisen kann.

Die Diagnose auf Befall mit Kokzidien wird standardmässig durch eine koprologische Untersuchung durchgeführt. Somit wird der Nachweis erbracht, nachdem ein Tier bereits befallen ist. Der Nachweis ist möglich, auch wenn das Tier keine Krankheitserscheinungen zeigt (Deplazes Eckert et al., 2013).

Da die Kokzidien ausserhalb des Wirtes ein äusserst widerstandsfähiges Dauerstadium, die Oozyste, besitzen, ist die Gefahr einer Infektion über längere Zeit vorhanden. Dies ist besonders dann problematisch, wenn die Tiere sich auf einem Boden bewegen, auf welchem sich Oozysten befinden.

Bisher wurde der Zusammenhang zwischen Dauerstadium und Infektion jeweils nur im Nachhinein über die Diagnose bereits befallener Tiere untersucht (Tandler, 2005).

Ziel dieser Arbeit ist es eine Methode zu entwickeln um die Oozysten direkt im Boden nachweisen zu können. Die Methode soll mit den gleichen, oder ähnlichen Gerätschaften wie die standardisierte koprologische Untersuchung zu bewerkstelligen sein und damit eine kostengünstige Erweiterung im präventiven Krankheitsmanagement sein.



## Einleitung

Die Methode soll eine quantitative Bestimmung ermöglichen, um in weiteren Untersuchungen Grenzwerte zu ermitteln oder Weidepausen zu definieren.

## **2 Biologie, Relevanz und Nachweis der Kokzidien in der Nutztierhaltung**

### **2.1 Biologie der Kokzidien**

Kokzidien leben parasitisch, intrazellulär in höheren Wirbeltieren. Die meisten Arten befallen den Magen-Darm Trakt. Manche Arten befallen auch die Leber (Kaestner, 1965). Das Krankheitsbild wird im Allgemeinen als Kokzidiose bezeichnet. In dieser Arbeit werden ausschliesslich Kokzidien der Gattung *Eimeria* untersucht.

#### **Systematik**

Klassifikation:	Lebewesen
Domäne:	Eukaryoten (Eucaryota)
Reich:	Protisten (Protista)
Abteilung:	Alveolaten (Alveolata)
ohne Rang:	Apicomplexa
Unterklasse:	Kokzidien
Unterordnung:	Eimerida

Innerhalb der Unterordnung der Eimerida befindet sich die Gattung *Eimeria* (Kaestner, 1965).

#### **Verbreitung**

Kokzidien sind weltweit verbreitet. Bei vielen Nutztieren, beispielsweise dem Huhn, wird davon ausgegangen, dass jedes Tier mindestens einmal in seinem Leben mit Kokzidien in Kontakt kommt. Kokzidien sind bei Hühnern, Kaninchen, Schafen und Rindern, Schweinen, Menschen und diversen Haustieren nachgewiesen worden. Besonders in der Intensivhaltung kommt es zu einem pathologisch relevanten Infektionsdruck (Bauer et al., 2006).

#### **Lebenszyklus der Gattung *Eimeria***

Die vegetative und generative Vermehrung findet im Wirt statt. Nach mehreren vegetativen Zyklen kommt es zu einer Generation, welche sich sexuell fortpflanzt. In diesem Stadium werden Embryos in Form von Oozysten produziert, die den Wirt verlassen. Direkt nach dem Verlassen ist die Oozyste noch nicht sporuliert, man nennt diesen Zustand unreif. Nach einigen Tagen sporuliert die Oozyste. Die reife Oozyste stellt das Dauer- oder Dormanzstadium ausserhalb des Wirts dar. Nachdem der Wirt die Oozyste wieder oral aufgenommen hat, löst sich die Hülle auf und die nun freigesetzten Sporozoiten infizieren die Zellen des Wirts und die

vegetativen Vermehrungszyklen beginnen von neuem. Abbildung 1 zeigt den Lebenszyklus stellvertretend am Wirtstier Huhn. Obwohl annähernd alle Eimeria Arten streng wirtsspezifisch sind, läuft der Lebenszyklus identisch ab. (Fanatico, 2006)

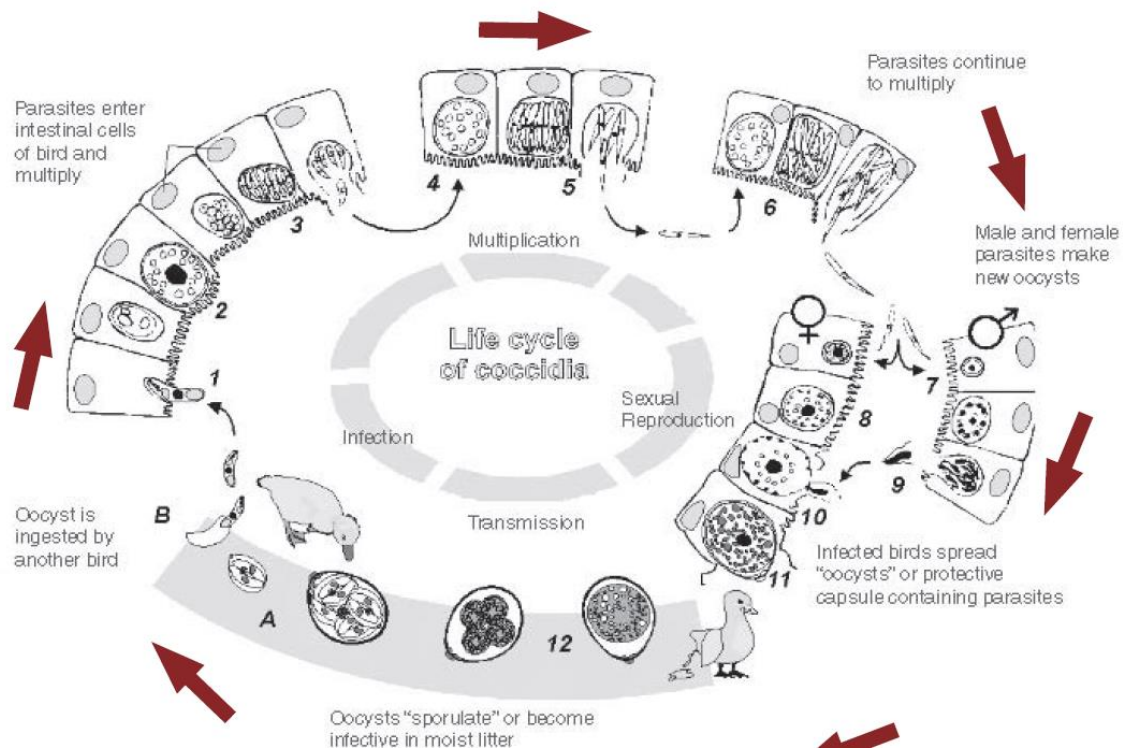


Abbildung 1: Lebenszyklus der Kokzidien der Gattung Eimeria Quelle: (Fanatico, 2006)

### Anatomie der Oozyste der Gattung Eimeria

Die Oozyste enthält vier Sporozysten mit je 2 Sporozoiten (siehe Abbildung 2). Die äussere Hülle der Oozyste besteht aus zwei Schichten, diese sind aus Kohlenhydraten und einem prolinreichen Protein hergestellt. Dies macht die äussere Hülle äusserst widerstandsfähig gegen Umwelteinflüsse. Die innere Hülle ist ebenfalls zweischichtig und besteht aus einer lipidhaltigen äusseren und einer glykoproteinhaltigen inneren Schicht. (Kühn, 2003)

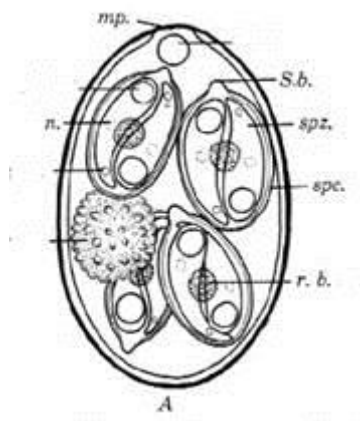


Abbildung 2: Darstellung einer Oozyte der Gattung *Eimeria*, m.p.: Mikropyle, n.: Nucleus, r.b.: Restkörper, spc.: Sporozyste, spz.: Sporozoit, S.b.: Stiedakörper, Quelle: [http://dna.kdna.ucla.edu/parasite\\_course-old/isospora\\_files/subchapters/molecular.htm](http://dna.kdna.ucla.edu/parasite_course-old/isospora_files/subchapters/molecular.htm)

## 2.2 Relevanz in der Nutztierhaltung

Die weltweiten wirtschaftlichen Schäden die durch die Kokzidiose verursacht werden, sind enorm. Beim Rind werden sie auf 700 Millionen, beim Geflügel auf 800 Millionen US-Dollar pro Jahr geschätzt (Bauer et al., 2006).

### Pathologie

Die Pathogenität verschiedener *Eimeria* Arten ist höchst unterschiedlich, die Arten werden in gering pathogen, mittel pathogen und hoch pathogen unterteilt (siehe Tabelle 1). Das Krankheitsbild umfasst Durchfall, Gewichtsverlust und blutiger Stuhl. Die Kokzidiose ist bei gesunden, erwachsenen Tieren nicht direkt lebensbedrohlich, sondern vermindert primär die Mastleistung. Jedoch sind die Tiere anfälliger auf Komorbiditäten und bei Jungtieren kann die Mortalität massiv ansteigen (Bauer et al., 2006).

Tabelle 1: Übersicht pathogener *Eimeria* Arten am Beispiel Huhn (Salisch & Siegmann, 2005)

Spezies	Pathogenität	Lokalisation				
		Duodenum	Jejunum	Ileum	Zaeka	Rektum
<i>Eimeria acervulina</i>	+	++	++	+		
<i>Eimeria brunetti</i>	++			++	+	++
<i>Eimeria maxima</i> *	++	+	++	++		+
<i>Eimeria mitis</i>	(+)	++	++	+		
<i>Eimeria necatrix</i>	+++		++	++	+	
<i>Eimeria praecox</i>	(+)	++	+			
<i>Eimeria tenella</i>	+++				++	

### Bekämpfung

Wie bei den meisten Krankheiten in der Nutztierhaltung ist eine gute Stallhygiene und saubere Trink- und Fressplätze die Grundvoraussetzung für einen möglichst niedrigen Krankheitsdruck.

In der konventionellen Tierhaltung ist die Zugabe von Kokzidiostatika im Futter die weitverbreitetste Bekämpfungsstrategie. Die Tiere können so über die kurze Mastzeit gesund gehalten werden. Diese Behandlung hat jedoch, analog zur präventiven Antibiotikagabe, gewisse Nachteile, wie etwa die Entwicklung von Resistenzen und eine zunehmend kritische Haltung der Konsumenten gegenüber Medikamenten im Tierfutter (Malz, 2003). Im Biolandbau ist laut Bioverordnung Artikel 16 zur Tiergesundheit die therapeutische Gabe von Medikamenten bei Einzeltieren erlaubt.

Ein vielversprechender Ansatz ist die Impfung von Jungtieren, welche ebenfalls im Biolandbau erlaubt ist. Dabei hat sich die Gabe von Lebendimpfstoff als äusserst wirkungsvoll erwiesen. Nachteilig sind bisher die hohen Kosten (Malz, 2003).

Bei Tieren mit Weidehaltung ist ein geschicktes Weidemanagement eine wirkungsvolle Strategie zur Reduktion der allgemeinen Parasitenbelastung (Heckendom & Frutschi, 2014).

### **2.3 Koprologische Untersuchungsmethodik**

Dieses Kapitel beschränkt sich auf Methoden, die in der Praxis durch Nutztierhalter Anwendung finden. Hauptkriterien hierbei sind der Untersuchungsaufwand und die benötigten Materialien.

Der Begriff Koprologie bezeichnet die Untersuchung von Exkrementen. Der Nachweis von Kokzidien und Parasiten allgemein geschieht standardmässig über den Nachweis im Kot. Geschieht die Diagnose unter Zuhilfenahme eines Mikroskops, spricht man von Koproskopie. In speziellen Fällen ist der postmortale Nachweis in den befallenen Organen angezeigt, diese Vorgehensweise wird dann als Histologie bezeichnet. (Deplazes et al., 2013)

Die koprologische Untersuchung ist in zwei Arbeitsschritte unterteilt, zuerst werden die Parasiteneier isoliert und, falls nötig, aufkonzentriert. Anschliessend werden die Befunde quantitativ und qualitativ bestimmt. Zur Isolation hat sich in vielen Fällen die Sedimentations- und Flotationstechnik oder eine Kombination der beiden Techniken bewährt. Zur quantitativen und teilweise auch qualitativen Bestimmung ist die McMaster Auszählkammer ein weitverbreitetes und kostengünstiges Instrument. Die Probengrösse ist bei der Standarduntersuchung 4g Frischkot, bei der kombinierten Isolationsmethode 20g. Dies erhöht die Sensitivität der Untersuchung, führt aber zu einem höheren Aufwand.

#### **Sedimentation und Flotation**

Bei der Sedimentation und der Flotation macht man sich den Umstand zunutze, dass die zu untersuchenden Teilchen innerhalb einer Suspension unterschiedliche Dichten haben. Bei der Sedimentation setzen sich schwerere Partikel am Grund des Untersuchungsgefässes ab, bei der Flotation schwimmen die leichteren Partikel oben auf. Die meisten Suspensionen befinden

sich in wässriger Lösung, diese hat typischerweise eine Dichte im Bereich von  $1 \text{ g/cm}^3$ . Die allermeisten Parasiten haben eine Dichte die über  $1 \text{ g/cm}^3$  liegt. Die Sedimentation kann somit direkt mit der vorhandenen Suspension durchgeführt werden. Allenfalls wird die Probe vorangehend noch filtriert. Bei der Flotation wird die Probe mit einem Flotationsmittel gemischt, die eine Dichte über  $1 \text{ g/cm}^3$  besitzt. Gebräuchlich sind gesättigte Kochsalzlösung mit einer Dichte von  $1.2 \text{ g/cm}^3$  oder Zinkchlorid mit einer Dichte von  $1.45 \text{ g/cm}^3$ . Die Wahl des Flotationsmittels richtet sich einerseits nach der Dichte der zu untersuchenden Parasiten und andererseits nach weiteren Begleitstoffen in der Suspension die ungewollt mitflotieren (Deplazes et al., 2013) (Beck & Pantchev, 2013).

### **McMaster**

Die McMaster Zählkammern sind Flotationskammern in der Grösse eines Objektträgers für ein Standardmikroskop (siehe: Abbildung 3). Die Kammern wurden 1939 von Gordon & Withlock eingeführt und 1951 von Wetzel modifiziert (Schmäschke, 2014). Auf der Oberseite der Kammer sind rechteckige Abschnitte eingraviert, sogenannte Bahnen. Innerhalb dieser Bahnen werden die Parasiten ausgezählt. Die Höhe der Kammern ist exakt  $1.5 \text{ mm}$ . Die eingeschlossene Fläche unter den Bahnen multipliziert mit der Höhe der Kammern ergibt pro Zählfeld ein Volumen von  $0.15 \text{ ml}$ . Die in dieser Arbeit verwendeten McMaster Zählkammern haben zwei Zählfelder. Dies ergibt pro McMaster Zählkammer ein untersuchtes Volumen von  $0.3 \text{ ml}$ . Die gefundenen Parasiten können somit auf das gesamte Probenvolumen hochgerechnet werden, was eine quantitative Bestimmung ermöglicht.

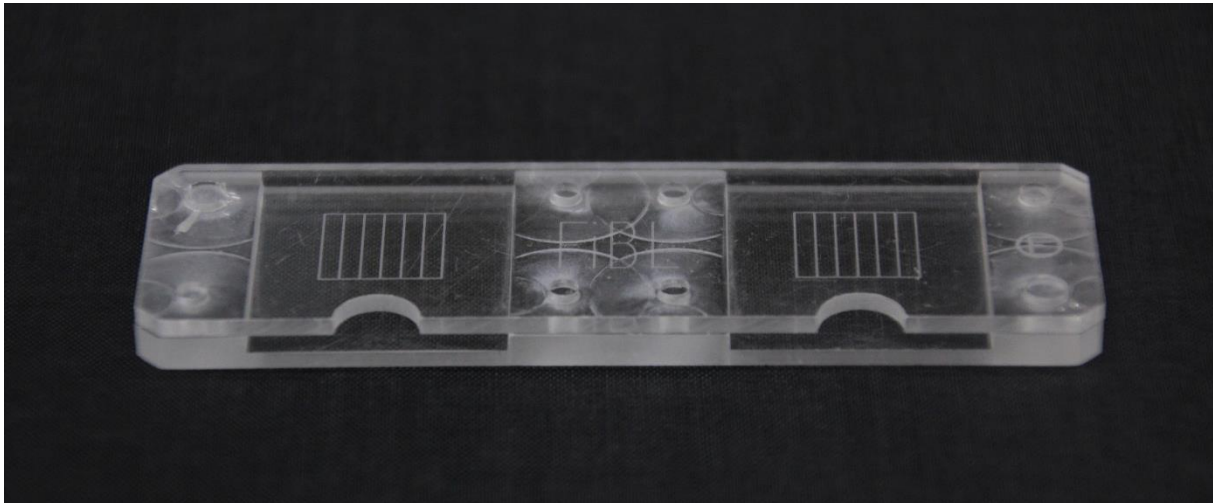


Abbildung 3: Mc Master Kammer nach Leonhard

### 3 Material

#### 3.1 Impfstoff

Grundvoraussetzung für die Methodenentwicklung waren Oozysten in Reinkultur in bekannter Konzentration. Da diese Gattung von Parasiten nicht in vitro sondern nur in vivo zu kultivieren ist, musste auf die eigene Herstellung einer Reinkultur verzichtet werden. Als Alternative bot sich der Impfstoff Paracox 5 der Firma *MSD Tiergesundheit* an. Es handelt sich um einen Lebendimpfstoff mit fünf verschiedenen Eimeriaarten. Der Impfstoff wird für die Immunisierung von Mastkühen verwendet. Die Eimeridien liegen in Form bereits sporulierter Oozysten vor, also demselben Stadium, wie es auch im Freiland natürlich vorkommt. Die unterschiedlichen Grössen der Oozysten decken einen weiten Bereich aller Eimeriaarten ab (siehe Tabelle 2). Somit lassen sie sich als Modellorganismus für weitere Eimeriaarten anderer Nutztiere verwenden. Der Hersteller gibt eine Oozystenkonzentration von mindestens 2300 Oozysten pro Impfdosis von 0.004ml an. Die tatsächlich vorhandene Konzentration konnte einfach durch quantitative Auszählung bestimmt werden und befindet sich im Bereich von 2600 Oozysten pro Impfdosis.

*Tabelle 2: Eimeriaarten des Impfstoffes Paracox 5 und deren durchschnittliche Grössen*

<b>Art</b>	<b>Grösse in <math>\mu\text{m}</math></b>
Eimeria acervulina	18 x 14
Eimeria mitis	16 x 15
Eimeria maxima CP	30 x 20
Eimeria maxima MFP	30 x 20
Eimeria tenella	23 x 19

#### 3.2 Bodenproben

Die verwendeten Bodenproben stammen alle aus derselben Entnahmestelle. Die Bodenprobe wurde aus einer Naturwiese entnommen, auf der seit über 30 Jahren ausschliesslich Rinder und Pferde weideten. Die Vegetation wurde auf einer Fläche von ca. 1 m<sup>2</sup> entfernt und die darunterliegende oberste Bodenschicht für die Untersuchung entnommen. Tabelle 3 fasst sämtliche relevanten Bodeneigenschaften zusammen. Die Bodenuntersuchung wurde im Bodenlabor der ZHAW Wädenswil durchgeführt. Es wurde bewusst keine Siebung und

## Material

Reinigung durchgeführt, um mit möglichst praxisnahem Probenmaterial zu arbeiten. Bei der Portionierung wurden jeweils die grössten Steine und Vegetationsreste entfernt, um die Handhabung zu vereinfachen (Abbildung 4). Das Probenmaterial wurde erdfeucht untersucht. Die benötigte Menge wurde auf 5-10 kg geschätzt, um 50-100 Proben zu 100 g herzustellen.



Abbildung 4: Probenmaterial nach dem Aussortieren der grössten Steine und Vegetationsresten

Tabelle 3: Eigenschaften Probematerial

Parameter	Wert	Methode
pH	7.37	CaCl <sub>2</sub>
Corg	6.17%	1. Corg 550C
Humusanteil	10.64%	Corg x 1.725
Sand	7.5%	Körnungsanalyse
Schluff	33.5%	Körnungsanalyse
Ton	59%	Körnungsanalyse



### 3.3 Laborartikel

Gegenstand	Typ / Hersteller	Spezifikationen
Zentrifuge	Heraeus Multifuge 1S Thermo Scientific, Waltham, USA	Kapazität: 8x 50 ml Leistung: max. 540 g
Waage	PM 4800 Deltarange Mettler, Columbus, USA	Messbereich / Auflösung: 0-800 g / 0.01 g 0-4100 g / 0.1 g
Vortexer	Vortex Genie 2, Model G560E Scientific Industries, Bohemia, USA	600 – 3200 1/min
Magnetrührer	Ret Basic IKA-Werke, Staufen im Breisgau, DE	Max. 1100 1/min
McMaster Zählkammer	2- Kammer (Leonhard), Edition F FiBI, Frick, CH	2x 0.15 ml Probenvolumen
Keramikmörser	-	Durchmesser Mörser: 13 cm Durchmesser Pistill: 3 cm
Versuchsschalen	-	Material: Polyethylen Volumen: 250 ml luftdicht verschliessbar
Küchensieb		Durchmesser: 5 cm Porengrösse: 675 µm
Papierfilter	MN615 Macherey-Nagel, Düren, DE	Durchmesser: 150 mm Rückhaltevermögen: 4-12 µm

### 3.4 Chemikalien

#### Natronlauge

Es wurde 0.5 molare Natronlauge verwendet. Die Dichte beträgt ca. 1.02 g/cm<sup>3</sup>.

#### Zinkchlorid

Die verwendete Zinkchlorid-Lösung wurde auf eine Dichte von 1.45 g/cm<sup>3</sup> eingestellt.

## 4 Methode

### 4.1 Einleitung

Zu Beginn wurde ein Anforderungsprofil an die Methode erstellt. Da die Methode eine Neuentwicklung darstellt, mussten diverse Anforderungspunkte angenommen werden, da keine Vergleichsdaten vorhanden sind. Zusätzlich wurde zwischen zwingenden und fakultativen Anforderungen unterschieden. Ausgehend vom Anforderungsprofil wurden Rahmenbedingungen und Erfüllungskriterien definiert, um über Erfolg oder Misserfolg einzelner Teilschritte entscheiden zu können. Als nächster Schritt wurden in der Konzeptionierungsphase verschiedene Untersuchungsansätze getestet und direkt auf ihre Tauglichkeit überprüft (siehe Abbildung 5). Je nach Situation wurden die Untersuchungsparameter iterativ verändert, um ihren Einfluss auf das Ergebnis zu ermitteln oder es wurden ganze Schritte verworfen und durch neue Ansätze ersetzt.

Resultat dieser Konzeptionierung war ein Standard Operation Protocol (SOP), welches die Untersuchung der Oozystenkonzentration in einer Bodenprobe mit vorgegebenem Volumen ermöglicht und neu nicht auf Kotuntersuchungen beschränkt ist.

Nach der Konzeptionierung wurde ein Vorversuch durchgeführt, um die Tauglichkeit der Methode zu beweisen. Um die Methode etablieren zu können, musste eine Validierung der Methode vorgenommen werden. Dies geschah durch den Hauptversuch.

Nach erfolgreichem Abschluss des Vorversuches wurde in einem Hauptversuch die Methode validiert, um die Qualität und Eignung der Methode zu dokumentieren.

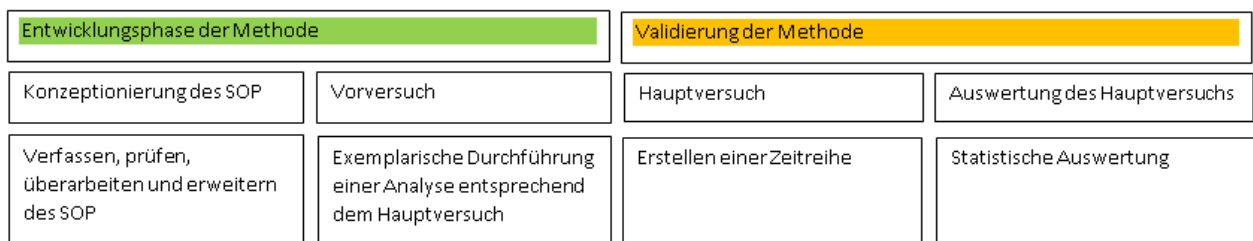


Abbildung 5: Schematischer Ablauf der Arbeit

### 4.2 Anforderungsprofil

Die nachstehende Auflistung gibt die zwingenden und fakultativen Anforderungen wieder.

#### Zwingende Anforderungen:

- Die Methode muss ein Probenvolumen von mindestens 100 Gramm (Frischsubstanz) untersuchen können

## Methode

- Die Probe muss so aufbereitet werden können, dass eine eindeutige Identifikation der Parasiten auf Gattungsniveau möglich ist.
- Die Wiederfindungsrate muss die Kriterien für eine statistische Auswertung erfüllen. Bei einer hohen Wiederfindungsrate von über 30% darf der Konfidenzintervall bei einem Signifikanzniveau von 95% höchstens 50% des Mittelwertes betragen. Bei einer niedrigen Wiederfindungsrate von unter 30% darf der Konfidenzintervall bei einem Signifikanzniveau von 95% höchstens 25% des Mittelwertes betragen.

### **Fakultative Anforderungen:**

- Identifikation der Parasiten auf Artniveau
- Extrapolation der Methode auf grössere Probenvolumina möglich

## **4.3 Konzeptionierung**

Die Entwicklung der Nachweismethode wurde in Anlehnung an bereits bestehende koprologische Untersuchungsmethoden durchgeführt. Es wurde angenommen, dass die Parasitenkonzentration im Boden massiv geringer sein würde als in einer Kotprobe, deshalb wurde die Probenmenge auf 100 Gramm Erde festgelegt. Die Gewichtsangabe bezieht sich auf die Frischsubstanz, wobei die effektiv vorhandene Feuchtigkeit variieren kann. Die Feuchtigkeit wird parallel zur Untersuchung mit zusätzlichen Proben bestimmt, um die Untersuchungsbedingungen zu dokumentieren. Die erhöhte Probemenge macht die Handhabung der Probensuspension grundsätzlich verschieden zu den etablierten koprologischen Untersuchungsmethoden, da zusätzlich eine Aufkonzentration der Probensuspension stattfinden muss um den Verdünnungsfaktor gering zu halten.

Die entwickelte Methode läuft nach folgendem Schema ab:

1. Herstellung Infektionslösung
2. Kontrolle der Infektionslösung
3. Infizieren der Bodenproben
4. Isolation der Oozysten aus den Bodenproben

Der erste Teilschritt wurde mittels Verdünnung des vorhandenen Impfstoffes mit Wasser durchgeführt. Die angestrebte Menge an auszubringenden Oozysten wurde bestimmt durch praktische Überlegungen. Die erwartete Menge an isolierten Oozysten sollte in einem Bereich liegen, der einerseits mit einem überschaubaren Aufwand gezählt werden kann, andererseits musste die Menge gross genug sein, um eine statistische Auswertung der Befunde zu ermöglichen. Die Kontrolle der Infektionslösung geschah direkt mit der McMaster Methode unter Verwendung derselben Verdünnung wie bei den Bodenproben. Dies um dieselbe

## Methode

Sensitivität zu gewährleisten. Die Infektion der Bodenproben geschah in Anlehnung an eine Validierungsarbeit des Instituts für Parasitologie Hannover (Kraemer, 2005). Die Infektionslösung wurde mit einer Pipette direkt auf die Bodenproben geträufelt.

Als letzter Schritt wurde die Isolation der Oozysten vorgenommen. Die Entwicklung der Methode zur Isolation kann als die eigentliche Methodenentwicklung interpretiert werden, da die vorangehenden Schritte lediglich eine Modifikation bestehender Methoden darstellte.

Eine bereits etablierte Methode wird in der Praxis mit einem SOP beschrieben. Ein Standard Operation Protocol ist eine genaue Arbeitsanweisung zur Durchführung einer Untersuchungsmethode. Da sämtliche Laborarbeiten für diese vorliegende Arbeit am FiBL durchgeführt wurden, wurden die bereits vorhandenen SOP's für gewisse Teilschritte direkt übernommen oder modifiziert angewandt. Für Untersuchungsschritte, die vollständig neu entwickelt wurden, wurde jeweils ein neues, provisorisches SOP erstellt, durchgeführt und überprüft. Bei erfolgreichem Abschluss eines Teilschrittes wurde das SOP übernommen, bei einem gescheiterten Versuch wurde das SOP entweder angepasst oder komplett verworfen.

Die fertige Methode gliedert sich nun in zwei Abschnitte mit jeweils einem vollständigen SOP. Erster Abschnitt ist die Herstellung der Infektionslösung, deren Kontrolle und anschließende Infektion der Bodenproben. Der zweite Abschnitt ist die Aufbereitung und Auswertung der infizierten Bodenprobe.

Standardmässig werden bei der Auswertung einer McMaster Zählkammer die Resultate beider Zählfelder addiert und als einzelner Wert behandelt. Dies um die methodenbedingte Streuung auszugleichen. Von der Addition der Resultate wurde in dieser Arbeit abgesehen um für die statistische Auswertung eine grössere Anzahl Werte zu erhalten.

### **4.4 Vorversuch**

Nach der Entwicklung des definitiven SOPs für die Teilschritte Infektion und Isolation wurden in einem Vorversuch drei Bodenproben jeweils dreimal getestet. Dadurch wurden pro Bodenprobe sechs Messwerte, also total 18 Werte für die statistische Auswertung generiert. Die Infektionslösung wurde durch drei McMaster Zählkammern untersucht. Da pro Zählkammer beide Zählfelder als einzelne Werte behandelt wurden, konnten so sechs Messwerte generiert werden. Die Versuchsdurchführung geschah analog dem Hauptversuch. Es wurde allerdings kein Zeitreihe erstellt sondern die Bodenproben wurden lediglich nach einer Woche Infektionsdauer untersucht. Denn Ziel des Vorversuches war es nicht eine reduzierte Ausführung des Hauptversuches zu machen, sondern die Teiluntersuchungen der Zeitreihe des Hauptversuches auf Durchführbarkeit zu testen. Bei einer der drei Bodenproben wurde versuchsweise auf das Mörsern verzichtet und die Natronlauge direkt in der Versuchsschale mit der Bodenprobe vermischt.

## 4.5 Hauptversuch

Nachdem der Vorversuch die Methode als tauglich erschienen liess, wurde im Hauptversuch die Methode validiert.

### Versuchsaufbau

Es wurden zu jedem Untersuchungszeitpunkt jeweils drei Bodenproben (1.1 bis 3.5 siehe Tabelle 4) fünfmal getestet. Pro Bodenprobe und Zeitpunkt wurden so mit der angewendeten Methode zehn Messwerte für die statistische Auswertung generiert. Die Proben wurden eine, zwei, drei und fünf Wochen nach der Infektion getestet. Für jeden Untersuchungszeitpunkt wurden also 30 Messpunkte erhoben. Die ersten neun Proben (1.1-3.3) wurden erdfeucht bei 4° Celsius gelagert, die letzten drei Proben (1.5-3.5) wurden bei Raumtemperatur gelagert und trockneten aus. Um den Einfluss der Parameter Austrocknung und Lagerungstemperatur gegenüber dem Parameter Infektionsdauer abgrenzen zu können, wurde zeitgleich mit den letzten drei Bodenproben (1.5-3.5) eine Bodenprobe getestet, die erdfeucht bei 4° Celsius gelagert wurde und seit fünf Wochen infiziert war. Sie wird als Reserve-Bodenprobe bezeichnet. Zusätzlich wurden drei Nullproben angefertigt die eine Woche nach Infektion mit Leitungswasser getestet wurden. Auch in diesem Fall wurden pro Probe zehn Messwerte generiert. Für die Nullproben wurden so total 30 Messwerte erhoben. Parallel wurde die Trockensubstanz von drei Bodenproben bestimmt.

*Tabelle 4: Versuchsaufbau Hauptversuch*

<b>Infektionsdauer</b>	1 Woche			2 Wochen			3 Wochen			5 Wochen		
<b>Bodenprobe</b>	1.1	2.1	3.1	1.2	2.2	3.2	1.3	2.3	3.3	1.5	2.5	3.5
<b>Lagerung</b>	Erdfeucht, 4° C			Erdfeucht, 4° C			Erdfeucht, 4° C			Raumtemperatur		

### Auswertung

Alle statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm R durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde bei 95% festgelegt. Von jeder Probe wurden der Mittelwert, die Standardabweichung und der Standardfehler bestimmt. Die Überprüfung auf Normalverteilung, beziehungsweise auf Gleichheit der Verteilungen, wurde mit dem Kolmogorow - Smirnow Test und dem Shapiro-Wilk Test durchgeführt. Bei den Probenkombinationen die beim Kolmogorow - Smirnow Test eine signifikante Abweichung der Verteilungen hervorbrachte, wurde zusätzlich der Lilliefors - Test angewandt um den unsicheren p-Wert zu korrigieren. Die Varianzhomogenität wurde mittels dem Bartlett-Test überprüft. Um signifikante Unterschiede zwischen den Bodenproben eines Untersuchungszeitpunkts zu beschreiben, wurden die Daten durch eine ANOVA ausgewertet.

## Methode

Der Einfluss der unterschiedlichen Infektionsdauer innerhalb der Zeitreihe wurde ebenfalls mit einer ANOVA untersucht. Um die signifikanten Unterschiede differenziert zu überprüfen, wurden für die Bodenproben nach drei Wochen Isolationsdauer (1.3-3.3) mittels einem Post-Hoc Verfahren, der Bonferroni - Holm Korrektur, untersucht.

### **Validierungsparameter**

Die Validierung geschah in Anlehnung an die Leitlinien zur Methodvalidierung des Umweltbundesamtes (Wellnitz & Gluschke, 2005)

Die Analytik kennt den Begriff der Maximalanforderungen an eine Methode und die zwingenden Anforderungen. Da die Methode intern validiert wurde und bis anhin keine Vergleichsmethode existiert, konnte über den Umfang der Validierungsparameter innerhalb der Arbeit frei gewählt werden. Zugleich konnten aus Gründen des gesamten Versuchsumfanges nicht alle Validierungsparameter geprüft werden. So war beispielsweise eine Robustheitsprüfung nur beschränkt möglich, da die Laboreinrichtung nicht gewechselt werden konnte.

Nachfolgend sind die ausgewählten Validierungsparameter in ihrer Charakteristik und Ausführung erklärt.

- **Richtigkeit**

Gibt an, wie gross die Differenz zwischen dem gemessenen Wert und dem wahren Wert liegt. In diesem Versuch ist diese Grösse direkt mit der Wiederfindungsrate der Oozysten verbunden. In der Praxis werden nie 100% der Oozysten wiedergefunden.

- **Genauigkeit**

Gibt an, wie gross die Streuung der Resultate bei Wiederholungen ist. Die Streuung wurde in diesem Versuch einerseits innerhalb einer Probe durch wiederholtes Testen einer Probe erfasst, andererseits wurden mehrere Proben unter den gleichen Bedingungen getestet um die Streuung zwischen mehreren Proben zu erfassen. Die Streuung und die statistische Auswertung durch den T-Test (Signifikanzniveau= 95%) wurden mit dem Statistikprogramm R untersucht.

- **Nachweisgrenze**

Gibt an, ab welcher Stoffkonzentration noch ein positives Resultat zu erwarten ist. In diesem Versuch ergibt sich die Grenze durch den Verdünnungsfaktor der Probensuspension.

- **Bestimmungsgrenze**

Gibt an, ab welcher Stoffkonzentration ein Resultat möglich ist, welche die Anforderungen an die Genauigkeit erfüllt.

## Methode

- **Selektivität**

Gibt an, wie anfällig das Analyseverfahren gegenüber Störkomponenten ist. In diesem Versuch ist die visuelle Reinheit der Probensuspension in der McMaster Kammer das entscheidende Kriterium. Sie wurde subjektiv bestimmt und fotografisch dokumentiert.

- **Robustheit**

Gibt an, wie sehr sich das Resultat ändert, wenn ein Untersuchungsparameter verändert wird. In diesem Versuch wurde eine Zeitreihe erstellt um den Einfluss der Infektionsdauer auf die Wiederfindungsrate zu erfassen. Zusätzlich wurde mit der letzten Probe der Einfluss von Temperatur und Feuchtigkeit der Probe auf die Wiederfindungsrate erfasst. Dies wurde mittels eines T-Testes (Signifikanzniveau = 95%) mit dem Statistikprogramm R ausgewertet.

## 4.6 Infektion

### Schematischer Ablauf

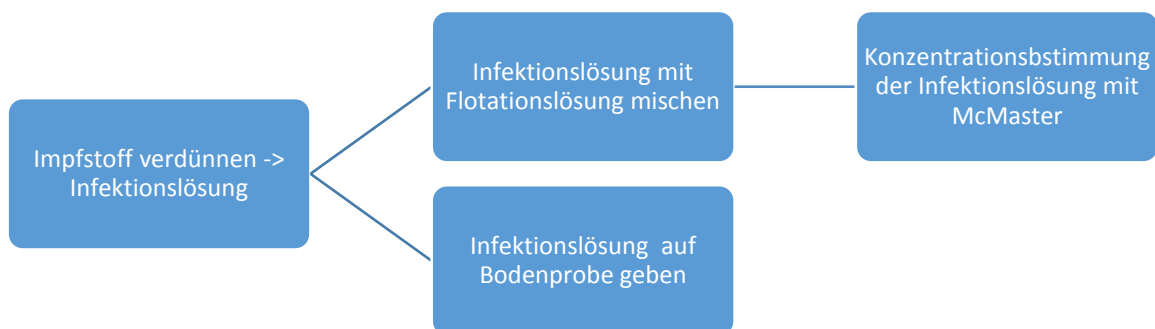


Abbildung 6: Schematischer Ablauf zur Herstellung, Applikation und Kontrolle einer Infektionslösung

### Herstellung der Infektionslösung

Die Infektionslösung besteht aus dem Impfstoff Paracox 5 und Wasser. Der Impfstoff besitzt eine Konzentration von 5750- 7475 Oozysten pro 0.01 ml (Institut für Veterinärpharmakologie und -toxikologie, 2017). Die Verdünnung wurde so gewählt, dass pro Portion (5 ml) Infektionslösung 0.02 ml Impfstoff beziehungsweise durchschnittlich 13225 Oozysten ausgebracht werden.

## Methode

Die Infektionslösung wurde mit dem Magnetrührer homogenisiert, um eine genügende Homogenisierung zu erreichen, wurden jeweils zehn Portionen Infektionslösung gleichzeitig hergestellt.

### Applikation und Infektionszeit

Die Applikation auf die Bodenprobe geschah mittels 10 ml Pipette. Beobachtungen ergaben, dass die 5 ml Infektionslösung von der Bodenprobe gründlich und gleichmässig aufgesogen wurde.

Die Infektionszeit wurde in der Entwicklungsphase auf eine Woche gesetzt, dies als Kompromiss zwischen einer realistischen Situation im Freiland und dem Zeitbedarf bis zu einem erneuten Isolationsversuch.

### Quantitative Bestimmung

Die quantitative Bestimmung geschah mittels Auszählung der McMaster Zählkammer, Flotationsmittel und Verdünnung sind gleich wie bei der Isolation, um die erhaltenen Werte möglichst vergleichbar zu halten.

## 4.7 Isolation

### Schematischer Ablauf

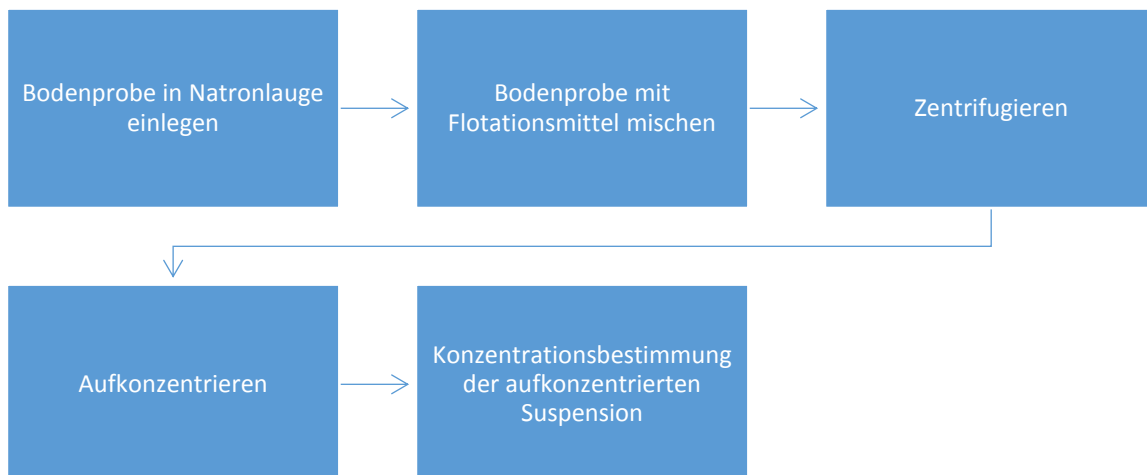


Abbildung 7: Schematischer Ablauf zur Isolation und Bestimmung der Oozysten in einer Bodenprobe

### Einlegen in Natronlauge

Das Einlegen in Natronlauge vor der eigentlichen Isolation wurde aus zwei Gründen durchgeführt, zum einen hilft es die Oozysten von den Erdpartikeln zu lösen (persönliche



## Methode

Mitteilung Erika Perler Leiterin Parasitenlabor FibL), zum anderen fungiert die Natronlauge als basischer Puffer und verhindert die Lösung von Kalk im Probenmaterial, was zur unerwünschter Schaumbildung in der Suspension führen würde.

### **Zugabe von Flotationsmittel & Mörsern**

Als Flotationsmittel standen gesättigte Natriumchloridlösung und Zinkchloridlösung zur Auswahl. Gesättigte Natriumchloridlösung besitzt eine Dichte von  $1.2 \text{ g/cm}^3$  dies ist für die Flotation von Oozysten im Allgemeinen ausreichend. Da die Probensuspension jedoch mit Natronlauge (Dichte:  $1.02 \text{ g/cm}^3$ ) bereits versetzt war, war die Gefahr einer unzulässigen Dichteabnahme zu hoch, um eine zuverlässige Flotation zu gewährleisten.

Das Mischen der Bodenprobe mit dem Flotationsmittel wurde in einem grossen Mörser durchgeführt.

### **Zentrifugieren**

Die Zentrifugation geschah in Anlehnung an das Kombinierte Sedimentations- und Flotationsverfahren bei 300 g (Deplazes et al., 2013) (Schmäscke, 2014). Es wurde beobachtet, dass nach einem Durchgang noch Erdpartikel an flotiertem organischem Material anhaftete. Durch wiederholtes Vortexen und abermaligem Zentrifugieren konnten die unerwünscht flotierten Begleitstoffe massiv reduziert werden.

### **Dekantieren und Filtrieren**

Aufgrund der grossen Probemenge musste ein Schritt zur Reduktion des vorhandenen Flotationsmittels durchgeführt werden. Die gesamte Menge an Flotationsmittel aus den Sedimentröhrchen betrug ca. 120 ml. Das Abgiessen durch einen Filter mit einem Rückhaltevermögen von 4-12  $\mu\text{m}$  separierte alle flotierten Oozysten im Filter.

### **Abwaschen des Filters**

Die somit isolierten Oozysten konnten nun durch umstülpen und abwaschen des Filters mit Flotationsmittel wieder in eine Suspension überführt werden. Die benötigte Menge um den Filter abzuwaschen konnte auf 45 ml beschränkt werden, was eine befriedigend geringe Verdünnung der Oozystenkonzentration zur Folge hatte.

### **Quantitative Bestimmung**

Die quantitative Bestimmung geschah mittels Auszählung der McMaster Zählkammer, Flotationsmittel und Verdünnung sind gleich wie bei der Kontrolle der Infektionslösung, um die erhaltenen Werte möglichst vergleichbar zu halten.

## **5 Resultate**

### **5.1 Standard Operation Protocol (SOP)**

Nachfolgend sind die beiden definitiven SOP`s für die Teilschritte Infizieren Bodenprobe und Isolation der Oozysten aufgeführt.

<b>Labormethoden, SOP (Standardvorgehensweise), Nummer 1</b>	
<b>Methode:</b>	<b>Infizieren der Bodenproben mit dem Impfstoff Paracox 5 (Hersteller MSD)</b> Herstellung und Applikation einer Infektionslösung mittels Verdünnung des Impfstoffes. Das Protokoll ermöglicht die Herstellung von 10 Portionen Infektionslösung. Die angegebenen Mengen Impfstoff und Wasser können erhöht werden, um mehr Portionen Infektionslösung herzustellen. Minimale Anzahl Infektionslösungen sind sieben Portionen, um eine ausreichende Homogenisierung zu gewährleisten. Vor der Infektion wird eine Portion Infektionslösung in einer McMaster Kammer auf ihre Oozystenkonzentration untersucht.
<b>Material:</b>	- Impfstoff Paracox 5 0.2ml - FIBL – McMaster Zählkammer - Pipette 0.01ml - Pipette 10ml - 2 x 100ml Messzylinder - Flotationslösung Zinkchlorid Dichte 1.45g/cm <sup>3</sup> - 900g Erde, frisch - Magnetrührer - Versuchsschale Polyethylen mit Deckel, 250 ml
0.2ml Impfstoff mit Pipette in Messzylinder geben Mit Wasser bis 50ml auffüllen	
<b>Teil Konzentrationsbestimmung:</b> 5ml des verdünnten Impfstoffes in Messzylinder pipettieren. Mit Flotationslösung bis 45ml auffüllen. Mit dem Magnetrührer 2 Minuten mischen. Aus der Mitte der Suspension 5ml der Suspension mit der 10ml Pipette aufziehen. Ersten Tropfen verwerfen und sofort die erste McMaster Kammer füllen. Vorgang wiederholen und zweite McMaster Kammer füllen. 5 Minuten warten (Oozysten flotieren in der Zählkammer) Auszählen unter dem Mikroskop Quantifizierung: Summe beider Zählfelder mit 150 multiplizieren → Ergibt die Oozystenkonzentration pro 5ml Infektionslösung	
Erstellt am / durch:	April 2017 /SJ
Zuletzt geändert am:	Juni 2017
Version:	5

Abbildung 8: SOP Teilschritt: Herstellung Infektionslösung Seite 1

Labormethoden, SOP (Standardvorgehensweise), Nummer 1

**Teil Infektion:**

Versuchsschale mit 100g Erde füllen.

Infektionslösung mit dem Magnetrührer 2 Minuten lang mischen.

Aus der Mitte der Suspension 5ml der Suspension mit einer 10ml Pipette aufziehen und gleichmässig über der Erdprobe verteilen.

Versuchsschale verschliessen und im Kühlschrank lagern.

Erstellt am / durch:	April 2017 /SJ
Zuletzt geändert am:	Juni 2017
Version:	5

Abbildung 9: SOP Teilschritt: Herstellung der Infektionslösung Seite 2

<b>Labormethoden, SOP (Standardvorgehensweise), Nummer 2</b>	
<b>Methode:</b>	<b>Isolation der Oocysten aus Bodenproben</b> Prinzip ist die Flotation und anschliessende Aufkonzentration der Oozysten aus der Bodenlösung. Die Auszählung geschieht mittels McMaster Zählkammer
<b>Material:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 100g infizierte Bodenprobe</li> <li>- FIBL – McMaster Zählkammer</li> <li>- Sedimentröhrchen 50ml</li> <li>- Pipette 10ml</li> <li>- Messzylinder 100ml</li> <li>- Mörser gross</li> <li>- Flotationslösung Zinkchlorid 1.45g/cm<sup>3</sup></li> <li>- Natronlauge (0.5m)</li> <li>- Magnetrührer</li> <li>- Vortexer</li> <li>- Zentrifuge</li> <li>- Trichterfilter 4-12 µm</li> <li>- Küchensieb</li> </ul>
<hr/> Bodenprobe min. 12 Stunden vor der Untersuchung in 50ml Natronlauge einlegen Bodenprobe im Mörser mit ca. 50ml Flotationslösung vermischen und zu einer homogenen Suspension verrühren Suspension gleichmässig in vier Sedimentröhrchen geben Rückstand im Mörser mit Flotationslösung in die Sedimentröhrchen spülen Sedimentröhrchen mit Flotationslösung auf 50ml auffüllen Sedimentröhrchen min. 20 Sekunden vortexieren Bei 300g 10min lang zentrifugieren Sedimentröhrchen kurz vortexieren (Sediment soll sich wieder lösen aber nicht wieder bis zur Oberfläche aufsteigen) Bei 300g 5 min lang zentrifugieren Den Überstand aller vier Sedimentröhrchen langsam durch den Trichterfilter geben Deckel der Sedimentröhrchen mit Flotationslösung spülen und ebenfalls in den Trichterfilter geben Filter umstülpen und Filtrat mit Flotationslösung, durch ein Küchensieb, in einen Messzylinder abspülen	
<b>Erstellt am / durch:</b>	April 2017 /SJ
<b>Zuletzt geändert am:</b>	Juli 2017
<b>Version:</b>	8

Abbildung 10: SOP Teilschritt: Isolation der Oozyste Seite 1

Labormethoden, SOP (Standardvorgehensweise), Nummer 2

Messzylinder bis 45ml mit Flotationslösung auffüllen  
Mit dem Magnetrührer 2 Minuten bei 1100 Umdrehungen pro Minute mischen  
Aus der Mitte der Suspension 5ml der Suspension mit der Pipette aufziehen  
Ersten Tropfen verwerfen und sofort die erste McMaster Kammer füllen  
Vorgang wiederholen und zweite McMaster Kammer füllen  
5 Minuten warten (Oocysten flotieren in der Zählkammer)  
Auszählen unter dem Mikroskop

Quantifizierung:

Summe beider Zählfelder mit 150 multiplizieren → Ergibt die Oocystenkonzentration pro 100g Bodenprobe

Erstellt am / durch:	April 2017 /SJ
Zuletzt geändert am:	Juli 2017
Version:	8

Abbildung 11: SOP Teilschritt: Isolation der Oozysten Seite 2

## 5.2 Vorversuch

### Infektionslösung

Am 07.07.17 wurde die Infektionslösung hergestellt und drei Bodenproben infiziert. Die Infektionslösung wurde dreimal mit einer McMaster Zählkammer kontrolliert. Der Durchschnitt der gefundenen Oozysten lag bei 12750 Stück bei einer Standardabweichung von 1146 Stück. Der Median lag bei 12900 Stück.

### Bodenproben

Eine Woche nach der Infektion wurden die Oozysten aus den drei Bodenproben reisoliert.

Tabelle 5 zeigt die Resultate des Vorversuchs.

*Tabelle 5: Resultate der Isolation im Vorversuch*

<b>Probennummer</b>	<b>Infektionsdauer</b>	<b>Durchschnittliche Anzahl isolierter Oozysten (n=6) inkl. Standardabweichung</b>	<b>Wiederfindungsrate</b>
1	1 Woche	5250 +/- 1694	41%
2	1 Woche	5850 +/- 929	46%
3	1 Woche	3100 +/- 592	24%

## 5.3 Hauptversuch

### Infektionslösung

Am 14.07.17 wurde die Infektionslösung hergestellt und 12 Bodenproben infiziert. Die Infektionslösung wurde fünfmal mit einer McMaster Zählkammer kontrolliert.

Der Durchschnitt der gefundenen Oozysten lag bei 12810 Stück bei einer Standardabweichung von 2720 Stück. Der Median lag bei 13200.

### Bodenproben

Eine Woche nach der Infektion wurden die ersten drei Bodenproben untersucht, am selben Tag wurden drei Nullproben untersucht, in welchen keine Oozysten gefunden wurden. Tabelle 6 zeigt die Resultate der Trockensubstanz-Bestimmung.

Der Wassergehalt lag bei den erdfeuchten Proben bei knapp 30%.

## Resultate

Tabelle 6: Feucht und Trockengewicht der Bodenproben

Probennummer	Feuchtgewicht [g]	Trockengewicht [g]	Trockensubstanz
1	100,12	68,49	68.4%
2	100,88	70,27	69.7%
3	100,10	68,88	68.8%

Tabelle 7 zeigt die Resultate im Hauptversuch 1 - 3 Wochen nach der Infektion.

Tabelle 7: Resultate im Hauptversuch, 1- 3 Wochen Infektionsdauer

Probennummer	Infektionsdauer	Durchschnittliche Anzahl isolierter Oozysten (n=10) inkl. Standardabweichung	Wiederfindungsrate
1.1	1 Woche	3180 +/- 737	25%
2.1	1 Woche	3240 +/- 581	25%
3.1	1 Woche	3660 +/- 780	29%
1.2	2 Wochen	2220 +/- 749	17%
2.2	2 Wochen	2520 +/- 556	20%
3.2	2 Wochen	1800 +/- 782	14%
1.3	3 Wochen	2820 +/- 871	22%
2.3	3 Wochen	2940 +/- 720	23%
3.3	3 Wochen	1410 +/- 484	11%

Am 18.08.2017 wurden die letzten drei Bodenproben untersucht, die Restfeuchtigkeit betrug noch 3.5 - 4.5%.

Es konnten bei diesen Bodenproben keine Oozysten gefunden werden

Tabelle 8 zeigt die Resultate der Reserve-Bodenprobe.



## Resultate

Tabelle 8: Resultate der Reserve – Bodenprobe

	<b>Infektionsdauer</b>	<b>Durchschnittliche Anzahl isolierter Oozysten (n=10) inkl. Standardabweichung</b>	<b>Wiederfindungsrate</b>
Reserve - Bodenprobe	5 Wochen	2370 +/- 728	19%

Abbildung 12 zeigt sämtliche Bodenproben, die zur späteren Validierung verwendet wurde. In der Reserve-Bodenprobe wurde zwar ebenfalls eine statistisch auswertbare Anzahl Oozysten gefunden, jedoch war die Zeitraum, in der sich die Bodenprobe in Natronlauge befand, wesentlich höher als nach dem SOP vorgegeben, daher wurde diese Probe nicht innerhalb der Validierung überprüft.

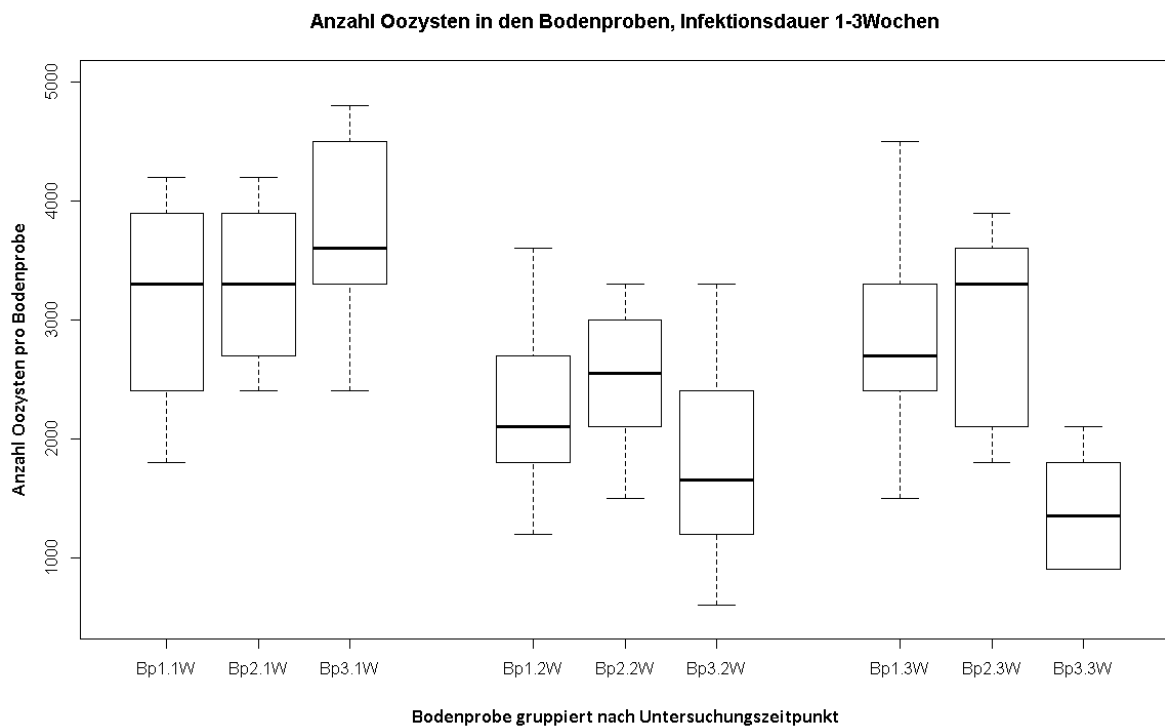


Abbildung 12: Anzahl Oozysten in den Bodenproben 1-3 Wochen Infektionsdauer, n=10 pro Bodenprobe, Der dicke schwarze Balken kennzeichnet den Median, die Whiskers kennzeichnen den höchsten bzw. tiefsten gemessenen Wert.

## Resultate

### Validierung

- **Richtigkeit**

Die Wiederfindungsrate lag bei 11 – 29%. Somit liegt die Differenz zwischen ausgebrachter und reisolierter Menge bei 71-89%.

Tabelle 9 zeigt die Resultate der statistischen Auswertung.

*Tabelle 9: Normalverteilung, Varianzhomogenität und signifikante Unterschiede der Mittelwerte der Bodenproben, Gruppirt nach Untersuchungszeitpunkt*

	Kolmogorow-Smirnow-Test p-Werte	Shiparo – Wilk Test p-Wert	Bartlett Test p- Wert	ANOVA p-Wert	Signifikante Unterschiede
Bodenproben (1.1-3.1) 1 Woche Infektionsdauer	(1.1 & 2.1) 0.9883 (1.1 & 3.1) 0.7591 (2.1 & 3.1) 0.4005	0.2583	0.6761	0.306	Nein
Bodenproben (1.2-3.2) 2 Wochen Infektionsdauer	(1.2 & 2.2) 0.4005 (1.2 & 3.2) 0.7591 (2.2 & 3.2) 0.4005	0.5012	0.5795	0.112	Nein
Bodenproben (1.3-3.3) 3 Wochen Infektionsdauer	(1.3 & 2.3) 0.7591 (1.3 & 3.3) 0.003323 (2.3 & 3.3) 0.01489 Lilliefors (3.3) 0.1024	0.4984	0.2462	0.000116	Ja

Bei den Bodenproben nach drei Wochen Infektionsdauer wurde ein signifikanter Unterschied festgestellt. Die Bodenprobe 3.3 unterscheidet sich signifikant von der Bodenprobe 1.3 ( $p = 0.00050$ ) und der Bodenprobe 2.3 ( $p = 0.00029$ ).

### Genauigkeit

Tabelle 10 zeigt die Resultate der statistischen Auswertung.

*Tabelle 10: Genauigkeit der einzelnen Proben ausgedrückt in Anteil des Konfidenzintervalls am Mittelwert [%]*

Probennummer	Mittelwert	Konfidenzintervall	Prozentualer Anteil am Mittelwert
1.1	3180	+/- 556	17.5%
2.1	3240	+/- 439	13.5%

## Resultate

3.1	3660	+/- 588	16.1%
1.2	2220	+/- 565	25.5%
2.2	2520	+/- 420	16.7%
2.3	1800	+/- 590	32.8%
1.3	2820	+/- 657	23.3%
2.3	2940	+/- 543	18.5%
3.3	1410	+/- 365	25.9%

Nun wurde die Streuung der Resultate der drei Bodenproben, die zum selben Zeitpunkt untersucht wurden, ermittelt (Tabelle 11).

*Tabelle 11: Genauigkeit der nach Untersuchungszeitpunkt gruppierten Bodenproben ausgedrückt in Anteil des Konfidenzintervalls am Mittelwert [%]*

	<b>Mittelwert</b>	<b>Konfidenzintervall</b>	<b>Prozentualer Anteil am Mittelwert</b>
Bodenproben 1 Woche Infektionsdauer	3360	+/- 650	19.34%
Bodenproben 2 Wochen Infektionsdauer	2180	+/- 898	41.2%
Bodenproben 3 Wochen Infektionsdauer	2390	+/- 2114	88.4%

Bei den einzeln untersuchten Bodenproben erfüllten 6 von 9 Proben die Anforderungen an die maximale Streuung.

Bei den gruppierten Bodenproben erfüllte 1 von 3 Proben die Anforderungen an die maximale Streuung.

### **Nachweisgrenze**

Der Verdünnungsfaktor ergibt sich aus dem Verhältnis des gemessenen Volumens zum Gesamtvolumen der Suspension. Bei dieser Methode ist das Volumen pro Zählfeld einer McMaster Kammer 0.15 ml, das Gesamtvolumen beträgt 45 ml, also 300mal mehr, folglich ist

## Resultate

der Verdünnungsfaktor 300. Daraus ergibt sich eine Nachweisgrenze von 300 Oozysten pro Bodenprobe.

### Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze liegt bei 2470 isolierten Oozysten pro Bodenprobe. Mittels Regressionsanalyse ( $p = 0.008$ ) und grafischer Auswertung der 95% Konfidenzintervalle, ist ab diesem Wert die geforderte Genauigkeit zu erwarten (siehe Abbildung 13).

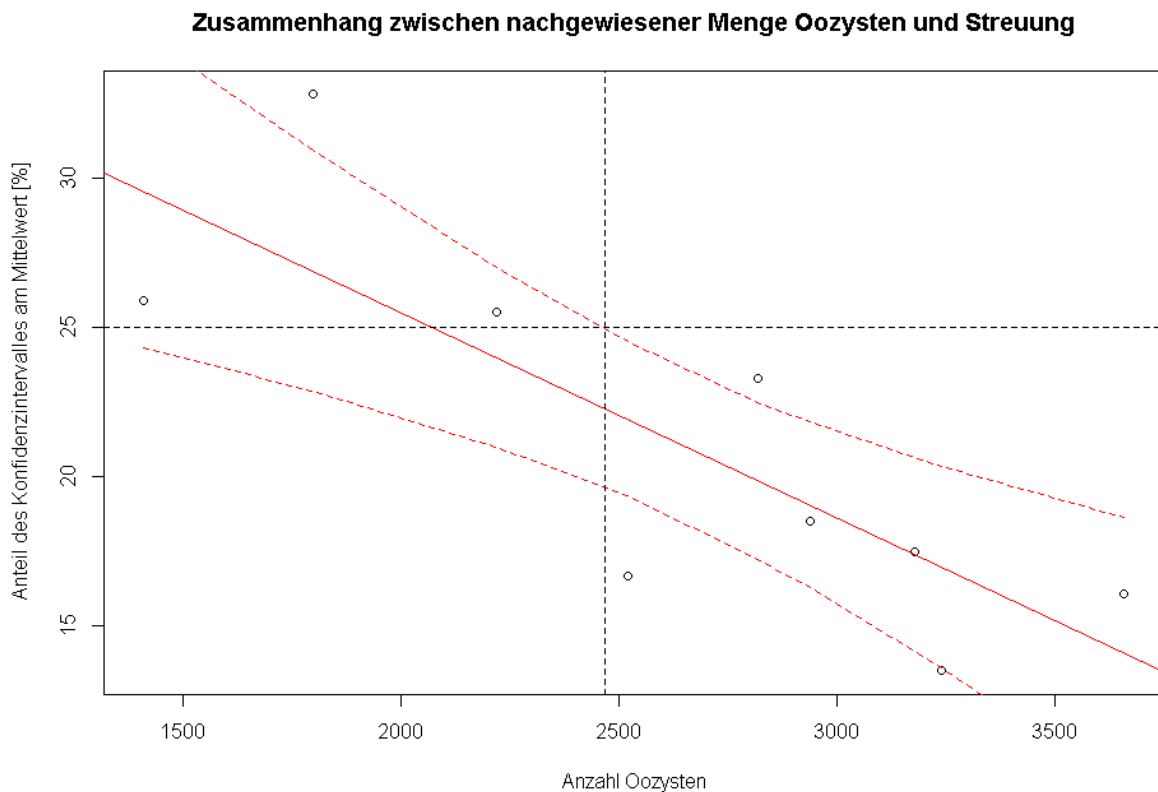


Abbildung 13: Zusammenhang zwischen nachgewiesener Menge Oozysten und Streuung

### Selektivität

Die Suspension konnte bezüglich optischer Reinheit so aufbereitet werden, dass eine eindeutige qualitative und quantitative Bestimmung der Oozysten auf Gattungs- sowie Artniveau möglich war (siehe Abbildung 14).

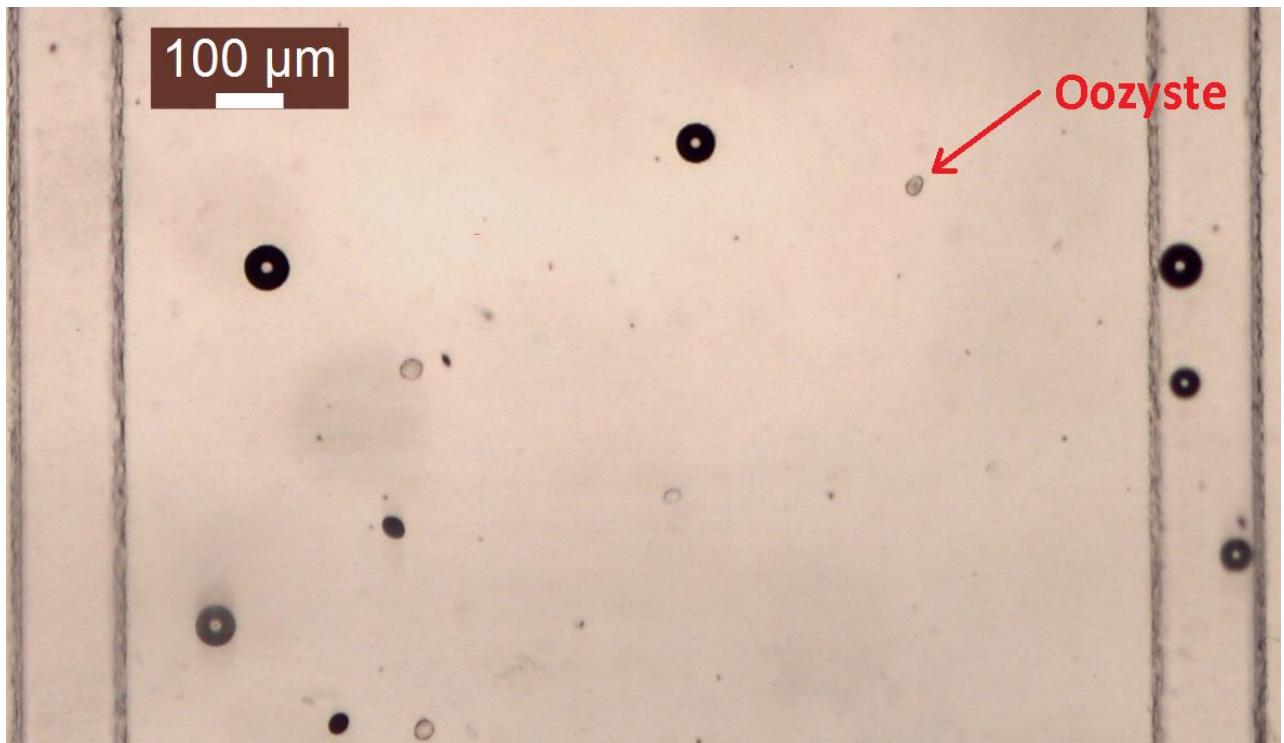


Abbildung 14: Ausschnitt McMaster Zählkammer, Vergrößerung 100x

### Robustheit

Tabelle 12 zeigt keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte bei einem Signifikanzniveau von 95%.

Tabelle 12: Normalverteilung, Varianzhomogenität und signifikante Unterschiede der Mittelwerte der Bodenproben, gemessen über die Infektionsdauer

Kolmogorow - Smirnow Test p-Werte	Shiparo – Wilk Test p-Wert	Bartlett Test p- Wert	Anova p-Wert	Signifikante Unterschiede
(1 Woche & 2 Wochen) 0.1 (1 Woche & 3 Wochen) 0.1 (2 Wochen & 3 Wochen) 0.6	0.4291	0.2922	0.0832	Nein

Bei den letzten drei Bodenproben (ausgetrocknet, gelagert bei Raumtemperatur, 5 Wochen Infektionsdauer) konnten keine Oozysten mehr gefunden werden (siehe Kapitel Resultate/Bodenproben), bei der Untersuchung der Reserve-Bodenprobe wurden jedoch mit den restlichen Bodenproben vergleichbare Mengen an Oozysten gefunden (siehe Tabelle 8), dies lässt auf einen starken Einfluss der Parameter Temperatur und Feuchtigkeit schliessen, aber keinen Einfluss des Parameters Infektionsdauer.

## Resultate

Durch die Untersuchung der Reserve-Bodenprobe konnte zusätzlich der Einfluss der Einlegezeit der Bodenprobe in Natronlauge dokumentiert werden (siehe Tabelle 13).

*Tabelle 13: Normalverteilung, Varianzhomogenität und signifikante Unterschiede der Mittelwerte der Bodenproben, Vergleich Einlegezeit in Natronlauge*

<b>Kolmogorow - Smirnow Test p-Wert</b>	<b>Shiparo – Wilk Test p-Wert</b>	<b>T-Test p-Wert</b>	<b>Signifikante Unterschiede</b>
0.6	Durchschnitt 24 Std Einlegezeit: 0.8168 4 Wochen Einlegezeit: 0.1348	0.723	Nein

## **6 Diskussion**

### **6.1 Entwicklungsphase**

Im folgenden Kapitel werden chronologisch die Schritte zur Entwicklung der Methode diskutiert.

#### **Siebung / Untersuchung Waschwasser**

Als erster Ansatz wurde die gesamte Bodenprobe durch ein Siebssystem gewaschen. Ziel war es, durch sukzessive Verkleinerung der Maschenweite, die Probe von allen Festkörpern zu trennen, die grösser sind als die grössten Eimeriaarten. Dieser Ansatz wurde aus mehreren Gründen verworfen. Zum einen erreichte die Menge an Waschwasser mehrere Liter, was die Handhabung allgemein erschwerte und die Verdünnung der Oozystenkonzentration unzulässig steigerte. Zum anderen wurde nach erfolgter Sedimentation des Waschwassers keine einzige Oozyste nachgewiesen. Es wurde vermutet, dass die Oozysten in den Sieben hängen geblieben sind.

#### **Ganze Probe mit Flotationslösung mischen, anschliessendes Dekantieren**

Die Bodenprobe wurde mit ca. 200 ml Flotationslösung vermischt und mit einem Mixer homogenisiert. Ziel war es, die nun in Suspension befindlichen Oozysten flotieren zu lassen und anschliessend die oberste Schicht zu dekantieren. Dieser Ansatz benötigte ein relativ grosses Gefäss von 500 ml, welches nicht in eine Zentrifuge passt. Die Suspension wurde mehrere Stunden stehengelassen um die Sedimentation und Flotation zu ermöglichen, was aber keine klare Trennung hervorbrachte und somit auch kein sauberes Dekantieren zuließ.

#### **Bodenprobe auf Sedimentröhrchen verteilen, anschliessendes Zentrifugieren**

Die Bodenprobe wurde mit Flotationslösung vermischt und auf vier Sedimentröhrchen zu je 50ml verteilt. Somit war ein Sedimentieren und Flotieren mithilfe einer Zentrifuge möglich.

Der Nachweis, ob die Flotation der Oozysten erfolgreich war, geschah mittels Auflegen eines Deckglases auf die Suspension und qualitativer Untersuchung des Deckglases unter dem Mikroskop. So wurden erstmals Oozysten nachgewiesen, die Menge war sehr gering und die Qualität (Reinheit) des Präparats war aufgrund starker Schaumbildung und flotiertem organischem Material ungenügend.

#### **Zusätzliches Mörsern und Zugabe von Natronlauge**

Der Ansatz mit den Sedimentröhrchen wurde beibehalten und um zwei Arbeitsschritte ergänzt. Zum einen wurde die Bodenprobe 12 Stunden vor der Untersuchung mit Natronlauge vermischt, zum anderen wurde die Bodenprobe, nach Zugabe der Flotationslösung, in einem grossen Mörser vermischt. Befürchtungen, dass die Oozysten durch das Zerstoßen zerstört

oder deformiert werden, konnten nicht beobachtet werden. Die anschliessende Untersuchung mittels Deckglas ergab eine erfolgsversprechende Anzahl Oozysten und die Schaumbildung konnte reduziert werden. Es wird angenommen, dass die Schaumbildung auf den Kalk in der Bodenprobe zurückzuführen ist und die Natronlauge als basischer Puffer agiert. Die Verunreinigungen durch organisches Material blieben dieselben.

### **Filtrieren und abspülen als Reinigungs- und Aufkonzentrationsvorgang und quantifizierbare Suspension erschaffen**

Nachdem die Isolation der Oozysten qualitativ gelungen war, musste die Suspensionsmenge reduziert und die Reinheit erhöht werden. Zu diesem Zweck wurde die flüssige Phase in den Sedimentröhrchen in einen Filter überführt, der die Oozysten zurückhält aber die überschüssige Flotationslösung entfernt. Als positiven Nebeneffekt konnte damit auch die Schaumproblematik vollständig gelöst werden.

Der Filter hielt auch das mitflotierte Organische Material zurück. Deshalb wurde beim anschliessenden Abwaschen des Filters dazwischen ein Küchensieb verwendet, um die grösseren Partikel herauszufiltern. Dieses Vorgehen erbrachte eine quantitativ bestimmbare Suspension hervor mit genügend hoher Reinheit und genügend geringer Verdünnung.

### **Optimieren der Begleitparameter**

Als letzter Entwicklungsschritt wurden folgende Parameter optimiert und definiert:

- **Menge Natronlauge**

Die endgültige Bodensuspension besteht aus einer Mischung aus Natronlauge und Zinkchlorid Lösung, deren Anteile bestimmen die Dichte der Suspension. Die Dichte wiederum hat einen Einfluss auf das Flotationsverhalten der Oozysten. Die Menge Natronlauge wurde so gewählt, dass sie die Bodenprobe gerade noch vollständig bedeckt.

- **Menge Flotationslösung**

Die Flotationslösung wird zweimal dazugegeben, vor und nach dem Filtrieren. Beim ersten Mal musste die Menge ausreichend sein um die Probensuspension giessfähig zu bekommen ohne das Fassungsvermögen der Sedimentröhrchen zu überschreiten. Beim zweiten Mal musste der Verdünnungsfaktor möglichst gering gehalten werden.

- **Geschwindigkeit und Dauer der Zentrifugation**

Auch hier galt es einen guten Kompromiss zu finden. Einerseits sollte die Suspension möglichst wenig Schwebepartikel enthalten, andererseits sollte die Probenvorbereitung in möglichst kurzer Zeit möglich sein.



- **Geschwindigkeit, Häufigkeit und Dauer des Mischens**

Diese Geschwindigkeit war begrenzt durch die maximale Geschwindigkeit des Vortexers. Häufigkeit und Dauer wurden aufgrund des beobachteten Verhaltens der Suspension auf so viel wie nötig und so wenig wie möglich ausgerichtet.

- **Definieren der Vorgehensweise zum Befüllen der McMaster Zählkammer**

Die beobachtete Streuung bei der Kontrolle der Infektionslösung machte eine ausführliche Arbeitsanweisung für die Schritte Homogenisieren der Suspension, Aufziehen der Pipette und Befüllen der Kammer nötig, um reproduzierbare Streuungen zu erhalten.

Diese Massnahmen verbesserten nicht primär die Wiederfindungsrate, sondern halfen die Streuung zu reduzieren und die Reproduzierbarkeit der Methode zu gewährleisten.

## **6.2 Vorversuch, Hauptversuch**

Die technische Methodenkritik gilt für den Vorversuch, wie auch den Hauptversuch, da sich die beiden Versuche lediglich in ihrem Umfang unterschieden.

Insgesamt wurden 16 Bodenproben untersucht und 74 McMaster Kammern beziehungsweise 148 Zählfelder ausgezählt. Im Folgenden werden die kritischen Punkte aufgelistet und diskutiert.

### **Befüllen der Sedimentröhrchen**

Das Aufteilen der Bodenprobe aus dem Mörser in die 4 Sedimentröhrchen führte in der Praxis zu einer heterogenen Verteilung der Festsubstanz zwischen den einzelnen Sedimentröhrchen. Zwar wurden im Anschluss alle 4 Sedimentröhrchen mit Flotationslösung auf dasselbe Niveau gefüllt, doch bleibt eine mögliche Variabilität hinsichtlich der Flotationsgeschwindigkeit bestehen, da nicht auszuschliessen ist, dass in einem Röhrchen mit einem höheren Feststoffanteil die Oozysten langsamer flotieren.

### **Filter auswaschen**

Der letzte Arbeitsschritt vor dem Befüllen der McMaster Zählkammern ist vermutlich der am meisten fehlerbehaftete. Die Effizienz des Abwaschens kann durch die Stärke und Verteilung des Abwaschstrahles stark beeinflusst sein. Zusätzlich war die Menge an Flüssigkeit die zum Abwaschen benutzt wurde direkt proportional zur Verdünnung der Oozysten. Dies führte zum Kompromiss mit möglichst wenig Flüssigkeit, möglichst gründlich den Filter abzuwaschen. Die mitflotierten organischen Partikel behinderten ein gleichmässiges Abwaschen zusätzlich.

Dieser Arbeitsgang muss hinsichtlich einer allfälligen Praxistauglichkeit der Nachweismethode verändert werden. Denkbar wären Filteraufsätze für Spritzen, um den Filter unter Druck mit

einem klar definierten Volumen auszuwaschen. Der Umfang und das Budget dieser Arbeit verhinderten jedoch die Anschaffung solcher Laborartikel.

### **Befüllen der McMaster Kammer**

Wie die relativ grosse Streuung innerhalb einer Bodenprobe bereits aufzeigt, ist das Bestimmen mit der McMaster Zählkammer ebenfalls fehleranfällig. Die Methode mit dem Magnetrührer ist die bis anhin zuverlässigste Methode, um eine homogene Suspension sicherzustellen. Auch bei etablierten koprologischen Methoden ist eine fünffache Wiederholung mit der McMaster Zählkammer notwendig, um zuverlässige Mittelwerte zu erhalten (persönliche Mitteilung Erika Perler Leiterin Parasitenlabor FiBL).

## **6.3 Validierung**

Die Validierung stellt bereits eine Interpretation der Resultate unter bereits festgelegten Kriterien dar, in diesem Kapitel sollen die Ergebnisse der Validierung anhand des Anforderungsprofils nochmals interpretiert und die Tauglichkeit der Validierungsparameter diskutiert werden.

Die Richtigkeit der Methode ist, unabhängig von ihrer Streuung, mit 11-29% Wiederfindungsrate zwar als brauchbar anzusehen, doch liegt hier noch ein grosses Verbesserungspotenzial vor. Wie bereits in der technischen Methodenkritik erwähnt, beinhalten mehrere Teilschritte innerhalb der Methode noch grosse Unsicherheiten. Eine grundsätzliche Schwierigkeit in der Fehleranalyse bei unbefriedigend niedriger Wiederfindungsrate ist, dass die irgendwo innerhalb des Gesamtprozesses verbliebenen Oozysten nicht exakt geortet werden können, da dieses Auffinden der verbliebenen Oozysten ja genau das zu untersuchende Problem darstellt. Wie schon in der Konzeptionierungsphase können lediglich Annahmen über den Verbleib getroffen werden und dann mittels neuer oder abgewandelter Methodik das Resultat zu verbessern. Aufbauend auf dieser Erkenntnis wurden die vermuteten Aufenthaltsorte der verbleibenden Oozysten, nach ihrer Wahrscheinlichkeit und Menge absteigend geordnet, nachfolgend aufgeführt:

- Auf dem Papierfilter
- Im Sediment in den Sedimentröhrchen
- In der Pipette beim Befüllen der McMaster Zählkammer

Die Genauigkeit der Methode ist bei den Einzelproben in rund 66% der Proben erfüllt worden, ferner hat die Regressionsanalyse zur Bestimmung der Bestimmungsgrenze einen klaren Zusammenhang zwischen Wiederfindungsrate und Genauigkeit aufgezeigt. Die Brauchbarkeit der Methode lässt sich somit entweder durch Erhöhung der Genauigkeit oder der

## Diskussion

Wiederfindungsrate steigern. Ob diese These auch bei stark höheren oder tieferen Wiederfindungsraten zutrifft, lässt sich nicht sagen, da die Methode nicht auf Linearität getestet wurde. Indes sind die neuralgischen Punkte innerhalb des Prozesses die zur Verminderung der Streuung führen könnten dieselben wie zur Erhöhung der Wiederfindungsrate. Die Anforderungen an die maximale Streuung zwischen den nach Untersuchungszeitpunkt gruppierten Bodenproben wurden lediglich bei einer von drei Gruppen erfüllt. Hier wäre eine grössere Anzahl Bodenproben nötig gewesen, um eine interpretierbare Statistik zu gewährleisten. Bei den Bodenproben mit drei Wochen Infektionsdauer gab es ein Resultat mit rund 50% geringerer Wiederfindungsrate. Ob dies auf ein Anwendungsfehler der Methode zurückzuführen ist, lässt sich nicht genau sagen; die wahrscheinlichste Fehlerquelle wird im Teilprozess Auswaschen des Papierfilters vermutet.

Die Nachweisgrenze ist, wie bereits bei der Validierung festgestellt wurde, direkt methodenbedingt und bedarf im momentanen Entwicklungsstadium der Methode keiner weiteren Optimierung.

Die Bestimmungsgrenze wurde mathematisch hergeleitet und liegt mit 2470 Oozysten pro Bodenprobe in einem Bereich der auch absolut als Minimum anzustreben ist. Liegt in der Praxis eine geringere Belastung des Bodens mit Oozysten vor, ist auch mit einem geringen Infektionsdruck zu rechnen, da für eine Infektion mit pathologischen Auswirkungen mehrere hundert bis zu zehntausenden Oozysten auf einmal von einem Tier aufgenommen werden müssen (Eckert et al., 1995).

Eine genügend hohe Selektivität wurde aus der subjektiven Wahrnehmung bestimmt, dass die Oozysten genügend klar und von Fremdpartikel befreit zu identifizieren sind. Obwohl in dieser Arbeit die Oozysten lediglich auf Gattungsniveau bestimmt wurden, wäre eine Bestimmung auf Artniveau ohne weiteres möglich, da die Reinheit der Suspension auch eine stärkere Vergrößerung des Mikroskops zuliesse. Das Titelbild der Arbeit wurde mit einer handelsüblichen Spiegelreflexkamera des Autors gemacht, indem mit einem Makroobjektiv das Okular des Mikroskops nochmals stark vergrössert wurde. Auf dem Bild lassen sich sämtliche Merkmale erkennen, die für eine eindeutige Artbestimmung notwendig sind.

Die Robustheit konnte statistisch lediglich mit dem Parameter Infektionsdauer untersucht werden. Gegenüber diesem Parameter verhielt sich die Methode robust. Bei einer Methodvalidierung, die die Maximalanforderungen gemäss den Leitlinien des Bundesamtes zu erfüllen hat, würde die Methode von mehreren Leuten unabhängig durchgeführt werden, um den Einfluss Mensch zu untersuchen, ebenfalls müssten verschiedene Labore die Methode durchführen um den Einfluss der gesamten Laborausstattung zu dokumentieren. In dieser Arbeit mussten auf diese Validierungsmethoden verzichtet werden.

Bei den letzten Bodenproben, die ausgetrocknet waren und bei Zimmertemperatur gelagert wurden, konnten keine Oozysten gefunden werden. Je nach Interpretation der Resultate lässt sich entweder sagen, dass die Methode gegenüber den Parametern Temperatur und Feuchtigkeit der Bodenprobe empfindlich, also nicht robust, ist, oder, und dies wird für wahrscheinlicher gehalten, die Oozysten haben, durch die Austrocknung bedingt, eine Änderung ihres Erscheinungsbildes erfahren, die sie nicht mehr als solche unter dem Mikroskop erkennen lässt.

Eine allfällige Extrapolation der Methode auf grössere Probenvolumina ist grundsätzlich machbar, wobei dies nicht getestet wurde. Die Probe müsste auf mehr Sedimentröhrchen verteilt werden, aber die Aufkonzentration mittels Papierfilter ist davon erst eingeschränkt, sobald das Fassungsvermögen des Filters erreicht ist, was aber eine immens hohe Anzahl Oozysten bedürfte.

### **6.4 Gültigkeitsbereich der Methode**

Die Methode wurde mit immer demselben Probenmaterial durchgeführt. Dies bedeutet nicht, dass die Methode mit einem variierenden Probenmaterial nicht funktioniert aber es ist eine der schwerwiegenden Lücken in der Validierung und somit muss der Gültigkeitsbereich auf dieses oder sehr ähnliches Probenmaterial eingeschränkt werden. Da das Probenmaterial Kalk enthielt und trotz anfänglicher Schwierigkeiten dieser Umstand keine Einschränkung verursacht, kann die Methode auf kalkreiche und vermutlich auch auf kalkarme Böden angewendet werden. Der Boden besitzt laut Körnungsanalyse einen hohen Tonanteil und einen geringen Sandanteil. Es wird vermutet, dass dies die Isolation erschwert, da der Boden stark zu Aggregation neigt und somit auch Oozysten eher an die Bodenpartikel binden oder sie sogar einschliessen könnte. Wünschenswert wären hier Testreihen mit verschiedenen Bodentypen, um einen allfälligen systematischen Unterschied in der Wiederfindungsrate in Abhängigkeit der Ton- und Sandanteile zu dokumentieren.

### **6.5 Anwendbarkeit in der Praxis**

Aufgrund der relativ hohen Streuung kombiniert mit einer relativ geringen Wiederfindungsrate ist die Richtigkeit der Methode den Erfordernissen der Untersuchung entgegenzustellen. Momentan ist der Untersuchungsaufwand noch zu hoch um die Methode als gleich kostengünstig wie eine standard-koprologische Methode anzubieten. Der Zeitaufwand war ungefähr viermal so hoch. Ob die Methode in der Praxis Anwendung finden wird, ist nicht zuletzt abhängig von den Entwicklungen im gesamten Parasitenmanagement.

## **7 Fazit und Ausblick**

Die Zielsetzung, eine Methode zu etablieren die Parasiten der Gattung Eimeria aus einer Bodenprobe heraus isolieren kann, ist als erfüllt zu betrachten. Obwohl die zwingenden Anforderungen an die Methodeneigenschaften nicht bei allen Wiederholungen bestätigt werden konnten, ist die Methode als solche funktionsfähig und kann mit kleinen Optimierungen auf die erforderliche Leistungsfähigkeit gebracht werden. Es ist jedoch dringend notwendig, die Methode mit verschiedenen Probenmaterialien zu testen, um den Gültigkeitsbereich zu erweitern.

Weitergehende Arbeiten sollten einen Freilandversuch ansteuern, um Daten von natürlich infizierten Bodenproben zu erhalten.

Um dem Ziel, eine vollständige Aussage über die Infektiosität einer bestimmten Weidefläche, gerecht zu werden, ist eine Untersuchung der gefundenen Oozysten auf ihre Vitalität notwendig. Dies wiederum ist durch Isolation der Oozysten aus der Probensuspension dieser Methode genauso möglich, wie aus der Suspension einer etablierten koprologischen Untersuchung.

## 8 Literatur

- Bauer, C., Boecking, O., Conraths, F. J., Dauschies, A., Deplazes, P., Joachim, A., Zahler-Rinder, M. (2006). *Veterinärmedizinische Parasitologie*. Berlin: Paul Parey Verlag.
- Beck, W., & Pantchev, N. (2013). *Praktische Parasitologie bei Heimtieren*. Hannover: Schlütersche.
- Deplazes, P., Eckert, J., Samson-Himmelstierna, G., & Zahner, H. (2013). *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin*. Stuttgart: Enke.
- Eckert, J., Braun, R., Shirley, M. W., & Coudert, P. (1995). *Guidelines on techniques in coccidiosis research*. Luxembourg: European Commission.
- Fanatico, A. (2006). *Parasite Management for Natural and Organic Poultry: Coccidiosis. Attra*.
- Heckendom, F., & Fruttschi, V. (2014). *Innere Parasiten der Rinder mit Weidemanagement nachhaltig regulieren*. Frick: Fibl.
- Institut für Veterinärpharmakologie und -toxikologie. (2010). *Tierarztneimittelkompendium der Schweiz*. Abgerufen am: 10. August 2017 Abgerufen von: [http://www.vetpharm.uzh.ch/reloader.htm?tak/00000000/00001562.VAK?inhalt\\_c.htm](http://www.vetpharm.uzh.ch/reloader.htm?tak/00000000/00001562.VAK?inhalt_c.htm)
- Kaestner, A. (1965). *Lehrbuch der speziellen Zoologie* (Bd. 1). Stuttgart: Gustav Fischer.
- Kraemer, A. (2005). *Validierung ausgewählter koproskopischer Untersuchungsmethoden zum direkten Nachweis parasitärer Stadien verschiedener Parasitenspezies der Haussäugetiere*. Hannover: Hochschule Hannover.
- Kühn, T. (2003). *Kokzidien des Kaninchens (Oryctolagus cuniculus) – Verlauf natürlicher Infektionen bei Boden- und Käfighaltung in einer Versuchstiereinheit*. Leipzig: Institut für Parasitologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig.
- Malz, C. (2003). *Lohmann Information, Möglichkeiten der Kokzidioseprophylaxe beim Geflügel*, 38 (1), S. 1-5.
- Salisch, H., & Siegmann, O. (2005). *Kokzidiosen, Kompendium der Geflügelkrankheiten*. Hannover: Schlütersche.
- Schmäschke, R. (2014). *Die Koproskopische Diagnostik von Endoparasiten in der Veterinärmedizin*. Hannover: Schlütersche.
- Tandler, F. (2005). *Untersuchungen zum Vorkommen und Epidemiologie von Edoparasiten bei Kühen in verschiedenen Haltungssystemen*. München: Tierärztliche Fakultät München.

## Literatur

Verordnung über die biologische Landwirtschaft und die Kennzeichnung biologisch produzierter Erzeugnisse und Lebensmittel (Bio-Verordnung). (22. September 1997).  
*SR 910.18* (Stand am: 1. Januar 2015)

Wellmitz, J., & Gluschke, M. (2005). *Leitlinie zur Methodenvailidierung*. Berlin:  
Umweltbundesamt.

## **Anhang**

- A. Anzahl Isolierter Oozysten aus den Bodenproben (Rohdaten)
- B. Anzahl Isolierter Oozysten aus den Infektionslösungen (Rohdaten)
- C. Datenblatt Impfstoff Paracox 5 aus dem Tierarzneimittelkompendium der Schweiz
- D. Plagiatserklärung



**A**

**Anzahl Isolierter Oozysten aus den Bodenproben (ohne Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor)**

Probennummer / Probenname	Anzahl Oozysten									
1.1	9	13	14	11	13	8	11	9	11	9
2.1	10	8	13	14	11	8	11	6	12	13
3.1	15	12	12	8	16	15	13	12	8	11
1.2	10	11	5	8	10	6	10	8	7	9
2.2	7	4	8	2	4	9	11	4	5	6
3.2	11	7	6	7	7	7	4	12	4	9
1.3	7	13	7	12	12	11	11	6	8	11
2.3	10	6	11	10	8	15	5	8	8	13
3.3	6	6	7	3	7	3	5	3	3	4
1.5 (ausgetrocknet)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.5 (ausgetrocknet)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3.5 (ausgetrocknet)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1 (Vorversuch)	28	21	11	17	15	13				
2 (Vorversuch)	24	18	23	18	15	19				
3 (Vorversuch)	10	13	7	9	11	12				
Reserve	9	5	13	5	9	10	7	9	6	6

**B****Anzahl Isolierter Oozysten aus den Infektionslösungen (ohne Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor)**

Infektionslösung	Anzahl Oozysten									
Vorversuch	44	45	42	36	48	40				
Hauptversuch	26	43	57	37	48	51	41	30	49	45

## C

### Datenblatt Impfstoff Paracox 5 aus dem Tierarzneimittelkompendium der Schweiz

#### 1 MSD Animal Health GmbH

#### 2 Attenuierter Lebendimpfstoff gegen Kokzidiose zur oralen Verabreichung; für Hühnerküken

#### 3 Zusammensetzung

1 Dosis\* (0.004 ml) enthält folgende Anzahl sporulierter Oozysten:

- *Eimeria (E.) acervulina*: 500 – 650 Oozysten
- E. maxima* CP: 200 – 260 Oozysten
- E. maxima* MFP: 100 – 130 Oozysten
- E. mitis*: 1000 – 1300 Oozysten
- E. tenella*: 500 – 650 Oozysten
- Phosphat-gepufferte Salzlösung: 0.004 ml

\* gemäss der *in-vitro* Zählung des Herstellers zum Zeitpunkt des Mischens bzw. der Freigabe

#### 4 Zielspezies

Huhn

#### 5 Eigenschaften / Wirkungen

Paracox® 5 ist eine klare, wässrige Suspension von Oozysten, die aus 5 "frühreifen", attenuierten Kokzidienstämmen gewonnen wurden. Der Impfstoff wird als Spray in der Brüterei eingesetzt oder über das Futter versprüht. Paracox® 5 vermindert die Infektionshäufigkeit sowie die klinischen Symptome einer Infektion durch die vier, für Hühner pathogenen *Eimeria*-Arten: *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. tenella*.

#### 6 Indikationen

Aktive Immunisierung von Hühnerküken gegen Infektionen verursacht durch *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. mitis* und *E. tenella*.

## **7 Dosierung / Anwendung**

### ***Impfschema***

Einmalige orale Verabreichung via Grobspray in der Brüterei oder via fein besprühtes Futter bei gesunden Eintagsküken in Bodenhaltung auf Einstreu.

Die Immunitätsentwicklung beginnt 14 Tage nach der Impfung und hält bis mindestens 40 Tage nach der Impfung an.

### ***Anwendung als Spray in der Brüterei***

Pro Küken sollte unter Nutzung eines Sprühgerätes, das einen Grobspray produziert, ein Volumen von 0,21 bis 0,28 ml gesprayed werden. Das nötige Volumen des Spraygerätes für 100 Küken ist zu ermitteln. Dieses Volumen wird mit 50 multipliziert, um die nötige Menge Wasser für 5000 Dosen zu berechnen (oder mit 10 für 1000 Dosen). Dieses Wasservolumen wird in einen geeigneten Behälter gegeben (normalerweise 1,0 bis 1,5 Liter für 5000 Dosen oder 200 bis 300 ml für 1000 Dosen). Es wird rote Lebensmittelfarbe (Cochenille, E120) in ausreichender Menge zugesetzt, um eine Konzentration von 0.1 mg/ml zu erreichen. Dies ist notwendig, um die Aufnahme des Impfstoffes durch die Hühner und somit die Wirksamkeit des Impfstoffes zu verbessern.

Die Impfstoffbehälter müssen vor Gebrauch 30 Sekunden lang kräftig geschüttelt werden, um ein Resuspendieren der Oozysten zu bewirken. Der Inhalt des Behälters wird mit dem vorbereiteten Wasser verdünnt und gründlich durchmischt. Die Impfstofflösung wird in das Spraygerätereservoir gefüllt und die Küken werden gleichmässig mit einem groben Spray benetzt.

Es ist darauf zu achten, dass die gesamte Fläche der Kükenboxen gleichmässig benetzt ist. Während des Impfvorganges ist das Reservoir des Spraygerätes regelmässig zu bewegen, um das Sedimentieren der Oozysten zu vermeiden. Die Küken werden dann wie gewohnt weiterbehandelt und in die Aufzuchtfarm gebracht.

### ***Anwendung via besprühtes Futter***

Die Dosis beträgt 0,004 ml pro Eintagsküken.

Genügend Futter für die ersten 24 - 48 h auf Papier oder Plastik auf dem Stallboden auslegen. Das Impfstofffläschchen vor Gebrauch kräftig 30 Sekunden lang schütteln, um die Resuspension der Oozysten zu gewährleisten. Paracox® 5 mit Wasser verdünnen - ca. 5000 Dosen in 3 Liter Wasser - und mit einem feinen Sprühkopf gleichmässig über das Futter sprühen. Während der Applikation das Sprühgerät regelmässig bewegen, um ein Sedimentieren der Oozysten zu vermeiden. Der Impfstoff muss sofort nach dem Verdünnen auf das Futter gesprüht werden. Es ist sicherzustellen, dass das ganze Futter besprüht wird, und dass die abgegebene Impfstoffmenge der Anzahl Tiere im Stall entspricht.

Den Impfstoff nicht über automatische Fütterungsanlagen verabreichen. Besprühtes Futter darf nicht direkt unter Wärmelampen platziert werden.

Wenn das behandelte Futter aufgenommen wurde kann mit der Routinefütterung fortgefahren werden.

## **8 Anwendungseinschränkungen**

### ***Kontraindikationen***

Kranke oder gestresste Tiere nicht impfen.

## **9 Unerwünschte Wirkungen**

3 - 4 Wochen nach der Impfung kann es gelegentlich zu einem leichten Befall mit z.B. *E. acervulina* und *E. tenella* kommen. Die dabei entstehenden geringgradigen Läsionen beeinträchtigen die Entwicklung der Küken nicht.

## **10 Absetzfristen**

keine

## **11 Wechselwirkungen**

Substanzen mit antikozydialer Wirkung, inkl. Sulfonamide und antibakterielle Wirkstoffe mit antikozydialer Aktivität können die Dauer des wirksamen Schutzes verkürzen.

Da keine entsprechenden Studien durchgeführt wurden wird empfohlen, innerhalb von 14 Tagen vor oder nach der Impfung keine anderen Impfstoffe zu verabreichen.

## **12 Sonstige Hinweise**

### ***Zu beachten***

- Um eine mögliche Feldinfektion vor Ausbildung des vollen Impfschutzes zu vermeiden, müssen die Stallungen nach jedem Aufzuchtzyklus sorgfältig gereinigt und desinfiziert werden.
- Der Impfstoff immunisiert keine anderen Spezies als Hühnerküken (*Gallus gallus*) gegen Kokzidiose und ist nur gegen die im Impfstoff enthaltenden *Eimeria*-Stämme wirksam.
- Weder vor noch nach der Impfung Futter oder Trinkwasser verabreichen, das antikozydiale Wirkstoffe enthält. Dies gilt für die gesamte Lebensdauer der Hühner. Der Schutz gegen Kokzidieninfektionen wird bei Tieren in Bodenhaltung (Kontakt mit Einstreu) nach Verabreichung von Paracox® 5 durch natürliche Boosterung erhöht.
- Sämtliche, zur Impfung benötigten Gegenstände müssen vor Gebrauch gründlich gereinigt werden.

- Während des Sprühvorgangs eine Maske und einen Augenschutz tragen.
- Unmittelbar nach Handhabung des Impfstoffs Hände gründlich waschen.

### **13 *Aufbrauchfrist***

Nach Anbruch eines Fläschchens muss der darin enthaltene Impfstoff sofort verbraucht werden. Leere und teilweise entleerte Behältnisse einer Schadstoffsammelstelle übergeben.

### **14 *Lagerung***

Im Kühlschrank (2° - 8°C) lagern. Vor Licht und Frost schützen. Versehentlich eingefrorener Impfstoff muss entsorgt werden.

**Arzneimittel, für Kinder unerreichbar aufbewahren.**

### **15 *Packungen***

5 × 1000 Dosen

5 × 5000 Dosen

Abgabekategorie: B

IVI Nr. 1562

*Informationsstand: 04/2010*

D

## Erklärung betreffend das selbständige Verfassen einer Bachelorarbeit im Departement Life Sciences und Facility Management

Mit der Abgabe dieser Bachelorarbeit versichert der/die Studierende, dass er/sie die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst hat.

Der/die unterzeichnende Studierende erklärt, dass alle verwendeten Quellen (auch Internetseiten) im Text oder Anhang korrekt ausgewiesen sind, d.h. dass die Bachelorarbeit keine Plagiate enthält, also keine Teile, die teilweise oder vollständig aus einem fremden Text oder einer fremden Arbeit unter Vorgabe der eigenen Urheberschaft bzw. ohne Quellenangabe übernommen worden sind.

Bei Verfehlungen aller Art treten Paragraph 39 und Paragraph 40 der Rahmenprüfungsordnung für die Bachelor- und Masterstudiengänge an der Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften vom 29. Januar 2008 sowie die Bestimmungen der Disziplinarmassnahmen der Hochschulordnung in Kraft.

Ort, Datum:

Lausen, 05.09.17

Unterschrift:



Das Original dieses Formulars ist bei der ZHAW-Version aller abgegebenen Bachelorarbeiten im Anhang mit Original-Unterschriften und -Datum (keine Kopie) einzufügen.

# Methodenentwicklung zum Nachweis von Kokzidien der Gattung Eimeria im Boden

Bachelorarbeit von Sebastian Jenni, Abgabedatum 07.09.2017



## Ausgangslage / Zielsetzung

Die steigenden Anforderungen der Konsumenten an artgerechte Tierhaltung haben dazu geführt, dass die Freilandhaltung einen immer grösseren Stellenwert in der gesamten Nutztierhaltung einnimmt. Die Kontrolle und Bekämpfung von Krankheitserregern unter Freilandbedingungen stellen neue Herausforderungen dar. Parasiten, speziell die Kokzidien, sind weltweit verbreitete Schadorganismen, die bei manchen Tierespezies zu den wirtschaftlich relevantesten Einbußen führen.

Im biologischen Landbau ist die präventive Gabe von Medikamenten verboten. Die Bekämpfungsstrategien sind primär eine strikte Stallhygiene und ein gezieltes Weidemanagement.

Die Diagnose von Kokzidien geschieht standardmässig durch eine koprologische Untersuchung, also dem Nachweis von Parasiteneiern (Oozysten) im Kot bereits infizierter Tiere.

Diese Arbeit befasst sich mit dem Nachweis von Parasiteneiern in Bodenproben um eine Freilandfläche auf ihr Infektions- und damit Schadpotenzial zu untersuchen, bevor Tiere auf die Fläche geführt werden. Dies kann zum einen helfen Neuinfektionen zu vermeiden, zum anderen können Informationen gesammelt werden, wie lange eine Fläche nach einem Tierbesatz noch ein Gesundheitsrisiko darstellt.

## Methodenentwicklung

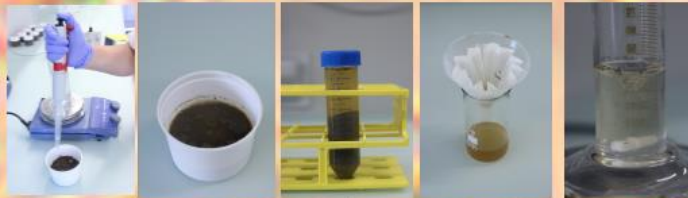
Die Methodenentwicklung gliederte sich in eine Entwicklungsphase und eine Validierungsphase.

### Entwicklungsphase:

- Anforderungsprofil → Was, Wieviel und Wie genau muss die Methode etwas nachweisen können?
- Konzeptionierung → Welche Techniken gibt es schon? Was funktioniert bei einer Bodenprobe?
- Proof of Concept → Bis wohin sind die Kokzidien schon gekommen? Wo sind sie entkommen?
- Vorversuch → Finde ich genug und genug zuverlässig?

### Validierungsphase:

- Hauptversuch → Die Wiederholung bringt Sicherheit: 12x Bodenproben infizieren und wieder isolieren  
120x Kokzidien unter dem Mikroskop auszählen
- Statistisch Auswerten → Finde ich immer gleich viel? Wieviele finde ich nicht?  
→ Was passiert, wenn sich im Versuchsaufbau etwas ändert?



1 2 3/4 5 6

## Die fertige Methode

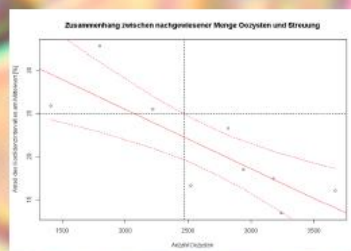
1. Kokzidien in Reinkultur auf die Bodenproben geben  
→ Infektion
2. Bodenproben in Natronlauge einlegen  
→ löst die Kokzidien von den Bodenpartikel und puffert die Suspension
3. Flotationsmittelzugabe und mischen
4. Zentrifugieren  
→ Kokzidien werden von den Bodenpartikel räumlich getrennt und schwimmen in der Suspension oben auf
5. Dekantieren und Filtrieren  
→ Kokzidien sind nun wieder isoliert
6. Filtrat wieder mit Flotationslösung mischen
7. Suspension in McMaster Zählkammer geben und Kokzidien auszählen



7

## Resultate

- Die Wiederfindungsrate lag bei 11-29%
- In 66% der Fälle konnten die Anforderungen an die Genauigkeit erfüllt werden
- Die Nachweisgrenze liegt bei 300 Oozysten pro 100g Boden
- Die Bestimmungsgrenze liegt bei 2470 Oozysten pro 100g Boden
- Die Methode verhält sich robust gegenüber der Infektionsdauer



## Fazit

Die Methode kann als funktionstüchtig angesehen werden, jedoch ist der Gültigkeitsbereich auf den verwendeten Bodentyp beschränkt. Die Streuung und die Wiederfindungsrate sind auf einem Niveau, auf der eine grobe Abschätzung des Krankheitsdrucks des Bodens gemacht werden kann. Beide Parameter haben ein grosses Verbesserungspotenzial, welches mit weiterer Optimierung der Methode ausgeschöpft werden kann. Im momentanen Entwicklungsstadium ist die Methode noch nicht als gleichwertig mit den bereits etablierten koprologischen Methoden anzusehen.

## Ausblick

Die Notwendigkeit einer gezielten und effektiven Bekämpfungsstrategie von Parasiten in der Freilandhaltung wird weiterhin vorhanden sein, und somit auch das Bedürfnis nach einer geeigneten Nachweismethodik. Unter diesen Voraussetzungen ist die Weiterentwicklung dieser Methode sicherlich eine praxisrelevante Aufgabe. Diverse Teilschritte der Methode sollten optimiert und prozesssicherer gestaltet werden. Die Anwendung der Methode auf verschiedene Bodentypen und das Testen der Methode unter Freilandbedingungen können den Gültigkeitsbereich der Methode erweitern. Um eine vollständige Aussage über den Krankheitsdruck die von einer potenziellen Freilandfläche ausgeht machen zu können, ist eine vertiefte Untersuchung der Kokzidien notwendig. Dies ist mit Kokzidien, die mit der vorliegenden Methode isoliert wurden, genauso möglich, wie mit Kokzidien, die mit bereits etablierten Methoden isoliert wurden.