

**Aus dem Institut für Parasitologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig
und
dem Institut für Parasitologie und Zoologie
der Veterinärmedizinischen Universität Wien**

**Vitalitätsbestimmung von *Cryptosporidium-parvum*-Oozysten in einem
Zellkultursystem mittels Immunfluoreszenztechnik
und computergestützter Bildanalyse**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig**

**eingereicht von
Cathleen Wackwitz
aus Meißen**

Leipzig, 2007

Wenn du
etwas weitersagen willst,
so siebe es zuvor durch drei Siebe:
Das erste
lässt nur das Wahre hindurch,
das zweite
lässt nur das Gute hindurch,
das dritte
lässt nur das Notwendige hindurch.
Was durch alle drei Siebe hindurchging,
das magst du weitersagen.

Sokrates

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Entwicklungszyklus und Morphologie	3
2.2	Taxonomie und Historie	4
2.3	Epidemiologie	8
2.3.1	Kryptosporidiose als Zoonose	8
2.3.2	Kryptosporidiose beim Rind	10
2.4	Pathogenese und Pathologie	11
2.4.1	Mensch	11
2.4.2	Tier	13
2.5	Therapie und Prophylaxe	14
2.5.1	Therapie beim Menschen	14
2.5.2	Prophylaxemaßnahmen beim Menschen	15
2.5.3	Therapie beim Kalb	16
2.5.4	Prophylaxemaßnahmen beim Kalb	16
2.6	Methoden zum Nachweis von <i>C. parvum</i>	16
2.6.1	Nachweis aus Kotproben	16
2.6.1.1	Mikroskopischer Nachweis und Färbetechniken	16
2.6.1.2	Immunologische Nachweisverfahren	17
2.6.1.3	Nachweis mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	17
2.6.2	Nachweis in Umweltproben	18
2.7	Methoden zur Vitalitätsabschätzung	19
2.7.1	Tierversuch	19
2.7.2	Exzystierung	19
2.7.3	Vitalfärbungen	20
2.7.4	In-Vitro-Kultivierung	21
2.7.4.1	Exzystierungshilfen	23
2.7.4.2	Alter der verwendeten Oozysten	24
2.7.4.3	Auswertung infizierter Zellkulturen	24
2.7.4.3.1	Färbungen	24
2.7.4.3.2	Elektronenmikroskopie	24
2.7.4.3.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	25
2.7.4.3.4	Immunfluoreszenz und Lumineszenz	25
2.8	Digitale Bildanalyse	29
2.9	Inaktivierung von <i>C. parvum</i> -Oozysten	30
2.9.1	Physikalische Methoden	30
2.9.2	Chemische Methoden	32

3	TIERE, MATERIAL UND METHODEN	34
3.1	Materialliste	34
3.1.1	Geräte	34
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	35
3.1.3	Reagenzien	35
3.2	Passagierung von <i>C. parvum</i> –Oozysten im Kalb	37
3.3	Nachweis von Oozysten im Kot mittels Heine-Färbung	37
3.4	Aufreinigung der Oozysten und Isolatbestimmung	38
3.5	Zählen der Oozysten zum Einstellen der Infektionsdosis	38
3.6	Bestimmung der Exzystierungsrate	39
3.7	Einfrieren und Auftauen von Zellen	39
3.8	Zählen von HCT-8 Zellen	40
3.9	Der <i>Cryptosporidium</i> -Zellkulturassay im Überblick	41
3.10	Anlegen der Zellkultur	42
3.11	Passage von HCT-8 Zellen	43
3.12	Infektion der Zellen	44
3.13	Ernte infizierter Kulturen	44
3.14	Markierung der intrazellulären Stadien	44
3.14.1	Polyklonale Antikörper	44
3.14.2	Monoklonale Antikörper ²⁾	45
3.15	Beschreibung der einzelnen Versuche	46
3.15.1	Überprüfung der Reproduzierbarkeit	46
3.15.2	Vergleich von Feldisolaten	46
3.15.3	Vergleich verschiedener Antikörper	47
3.15.4	Thermische Inaktivierung von Oozysten	47
3.16	Auswertung infizierter Zellkulturen	47
3.16.1	Mikroskopische Betrachtung und Aufnahme von Fluoreszenzbildern	48
3.16.2	Graubildverarbeitung	49
3.16.3	Digitale Markierung der intrazellulären Entwicklungsstadien	49
3.16.4	Binärbildbearbeitung	50
3.16.5	Messung mit QWin	50
3.16.6	Geometrische Filterung	51
3.17	Statistische Methoden	52

4	ERGEBNISSE	53
4.1	Gewinnung von <i>C. parvum</i> -Oozysten	53
4.1.1	Passagierung im Kalb	53
4.1.2	Aufreinigung und Isolatbestimmung	53
4.2	Bestimmung der Exzystierungsrate der Oozysten	54
4.3	Zellkultur	54
4.3.1	Anlegen und Passagieren der Zellkulturen	54
4.3.2	Infektion der Zellkulturen	54
4.3.3	Ernte der Zellkulturen und Nachweis der Entwicklungsstadien	55
4.4	Überprüfung der Reproduzierbarkeit	56
	Variations-	57
4.5	Vergleich von Feldisolaten	59
4.6	Vergleich verschiedener Antikörper	61
4.7	Inaktivierung von Oozysten: Einfluss der Temperatur auf die Infektiosität	63
4.8.1	Einzelbildanalyse	66
4.8.2	Erstellen einer Messroutine	67
5	DISKUSSION	69
5.1	In-vitro-Kultivierung von <i>C. parvum</i>	69
5.2	Überprüfung der Reproduzierbarkeit	72
5.3	Vergleich von Feldisolaten	74
5.4	Vergleich verschiedener Antikörper	75
5.5	Inaktivierung von Oozysten	76
5.6	Digitale Bildanalyse mit Leica QWin	79
5.6.1	Mikroskopische Betrachtung und Aufnahme von Fluoreszenzbildern	80
5.6.2	Auswertung der aufgenommenen Bilder	80
5.6.3	Erstellung einer Messroutine	82
5.6.4	Ausblick - digitale Bildanalyse	83
6	ZUSAMMENFASSUNG	84
7	SUMMARY	86
8	LITERATURVERZEICHNIS	88
9	ANHÄNGE	103
10	DANKSAGUNG	113

2 Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
BFTE	bovine fallopian tube epithelial cells
bp	base pairs (Basenpaare)
BS-C-1	green monkey kidney cells
CCL-6	human embryonic intestine 407 cells
COWP	<i>Cryptosporidium</i> oocyst wall protein
CPS-500	<i>Cryptosporidium parvum</i> Sporozoite Pellicle Antigen
CLS	circumsporozoite-like-glycoprotein
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane
DAPI	4',6'-Diamino-2-phenyl-indol
DMSO	Dimethylsulfoxid
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GW	Grauwert
h	Stunden
HCT-8	human colonic tumor cells
HFL	human fetal lung
HRT	human rectal tumor
Hsp70	Heat shock protein 70
Ig	Immunglobulin
HT29.74	human colon adenocarcinoma cells
IFAT	Immunfluoreszenztechnik
l	Liter
L929	Mouse fibroblast cells
LGA	Lewis rat small intestine carcinoma cells
mAK	monoklonaler AK
MDCK	Mardin-Darby canine kidney cells
Mio	Million
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
p.i.	post infectionem
N ₂ (liq)	Flüssigstickstoff
NGS	normal goat serum
pAK	polyklonaler AK
PBS	phosphate buffered saline
PCK	primary chicken kidney cells
PCR	polymerase chain reaction
PK	Positivkontrolle
PK-10	porcine kidney cells
RL95-2	human endometrial carcinoma cells

sec
T84
ZK

Sekunden
human colon carcinoma cells
Zellkultur

1 Einleitung

Kryptosporidiose ist eine parasitäre Darmerkrankung, die aufgrund der möglichen Erregerübertragung vom Tier auf den Menschen sowie von Mensch zu Mensch, den Zoonoseerkrankungen zugeordnet wird. Ihre Bedeutung reicht aufgrund einiger epidemiologischer Besonderheiten von der Veterinär -und Humanmedizin bis zur Lebensmittelhygiene und zur Umwelthygiene. Kryptosporidien werden weltweit in Oberflächengewässern, in Grund -und Trinkwasser gefunden, und endemisches Durchfallgeschehen wird häufig mit der Aufnahme von kontaminiertem Trinkwasser in Zusammenhang gebracht. Die humanpathologische Bedeutung der Erkrankung wird durch eine jährlich steigende Inzidenzrate statistisch untermauert sowie durch die bis heute fehlenden wirksamen Therapeutika. Letztere sind besonders für immunsupprimierte Patienten (v.a. AIDS-Kranke) von erheblicher Relevanz, da sie oft unter chronischen bis lebensbedrohlichen Infektionen leiden.

In der Landwirtschaft verursachen Kryptosporidien vor allem in der Kälberaufzucht hohe Verluste. Meist bleibt die veränderte Kotkonsistenz das einzige Symptom, vereinzelt werden jedoch auch schwerwiegende Erkrankungen bei wenige Tagen alten Kälbern beschrieben. Die Verschleppung von infektiösen Oozysten über das Ausbringen von Gülle stellt ein umwelthygienisches Problem dar, und man versucht derzeit über eine thermische Behandlung in Biogasanlagen die Kryptosporidien abzutöten.

Im Vergleich zu anderen Protozoen sind die Oozysten von *Cryptosporidium parvum* klein (4 – 6 µm), und ein mikroskopischer Nachweis lässt keine Aussage zu, ob die Oozysten noch exzystieren oder die enthaltenen Sporozoiten vital sind. Eine Reihe von Verfahren sind entwickelt worden, um die Vitalität und Infektiosität der gegen Umwelteinflüsse und Desinfektionsmittel sehr resistenten Oozysten abschätzen zu können. Der Tierversuch, eine vergleichsweise verlässliche Methode, ist aufwändig und teuer in der Durchführung. Die Bestimmung der Exzystierungsrate und die Vitalfärbung überschätzen die tatsächliche Infektiosität der Parasiten. Alternativ zu diesen Techniken stellt die In-Vitro-Kultivierung der Parasiten in einem Zellkultursystem eine moderne und entwicklungsfähige Methode dar.

Der Nachweis von intrazellulären Entwicklungsstadien gelingt derzeit über verschiedene Färbetechniken, die Immunfluoreszenztechnik, die Polymerasekettenreaktion und über die Elektronenmikroskopie.

Durch eine quantitative Analyse der gebildeten intrazellulären Entwicklungsstadien von *C. parvum* kann ein direkter Rückschluss auf die Vitalität der Oozysten erfolgen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Zellkultursystem etabliert und die bestehenden Methoden zur quantitativen Auswertung infizierter Zellkulturen mit Hilfe der digitalen Bildanalyse weiterentwickelt.

2 Literaturübersicht

2.1 Entwicklungszyklus und Morphologie

Kryptosporidien sind kleine (4-6 μm), obligat intrazellulär lebende Protozoen, deren komplexer Entwicklungszyklus bis heute im wissenschaftlichen Interesse steht (HIJJAWI et al. 2004).

Die zweischichtige Oozystenhülle von *C. parvum* verfügt über eine dünne Nahtstelle, durch die nach ihrer Ruptur vier kommaförmige Sporozoiten nach außen gelangen. Diese besitzen ein rundes und ein spitzes Ende, sie messen durchschnittlich 5,5 x 1,0 μm und sind in der Lage, aktiv durch kontraktionsähnliche Bewegung in Richtung Mikrovillisaum der Enterozyten zu wandern. Sobald die Sporozoiten die Darmzellen von Jejunum und Ileum berühren, verschmelzen sie am Vorderende über eine membranöse Verbindung mit der Wirtszellwand, und es bildet sich eine parasitophore Vakuole, welche dieses Entwicklungsstadium bald komplett umschließt (LUMB et al. 1988, ROMMEL 2000). Andere Kryptosporidienarten (*C. andersoni* und *C. muris*) vollziehen ihre Entwicklung im Magen des Wirtes und infizieren die dort lokalisierten Drüsenzellen (ENEMARK 2002b). Die Sporozoiten runden sich ab und bilden innerhalb von 8 h die Trophozoiten, die gleichzeitig das erste intrazelluläre Entwicklungsstadium repräsentieren. Die Trophozoiten sind sphärische kernhaltige Merontenvorstadien von 3,1 x 3,2 μm Größe, aus denen ca. 4 h post infectionem die Typ-I-Meronten entstehen. Während dieser Phase der Merogonie finden mehrere Kernteilungen statt, die Kerne wandern zur Peripherie des Parasiten an die wirtszellabgewandte Seite. Die ersten Typ-I-Meronten, welche 8 Merozoiten enthalten, können 16 h post infectionem im Ileum gefunden werden und messen 4,8 x 4,3 μm . Die freiwerdenden bananenförmigen Merozoiten Typ I infizieren umliegende Epithelzellen. Ein Teil bildet erneut Typ-I-Meronten, ein anderer folgt dem weiteren Entwicklungszyklus, rundet sich ab und entwickelt mittels Kernteilung 4 weitere Merozoiten Typ II im Inneren der entstandenen Typ-II-Meronten. Die Merozoiten Typ II sind ebenfalls bananenförmig und besitzen zwei stumpfe Enden, sind 4,8 x 1,2 μm groß und können sich gleitend fortbewegen. Sie befallen erneut Enterozyten, in direkter Nachbarschaft der sie entlassenden Typ-II-Meronten. Die sich anschließende Gamogonie beginnt ca. 36 h p.i. und führt zur Entwicklung von Makrogamonten (5,3 x 5,2 μm) und Mikrogamonten (4,8 x 4,5 μm).

Ausgereifte Mikrogamonten beinhalten zwei bis 16 kompakte randständige Kerne, aus denen Mikrogameten entstehen. Makrogamonten konnten ab 48 h p.i. beobachtet werden und lassen unterschiedliche Einschlüsse, wie lichtbrechende Granula sowie schwarze kleine randständig gelegene Granula im Zytoplasma erkennen. Sie sind rund bis polymorph und reifen zu Makrogameten aus. Als Produkt der Vereinigung beider Gameten (Makro-u. Mikrogamet) entstehen ca. 72 h p. i. zwei Typen Oozysten im Inneren des Wirtes.

Die dickwandigen Oozysten (circa 80 %) verlassen nach vollendeter Sporulation die Enterozyten und passieren den Darmtrakt, bevor sie in die Außenwelt gelangen. Die dünnwandigen Oozysten (ca. 20 %), verbleiben im Darm und werden für die Autoinfektion des Wirtes verantwortlich gemacht (CURRENT u. REESE 1986, CURRENT u. GARCIA 1989).

2.2 Taxonomie und Historie

Der Wortstamm des Namens *Cryptosporidium* beinhaltet „kryptisch“, was soviel bedeutet wie „versteckt“ oder „verdeckt“. Damit ist das Fehlen der Sporozysten bzw. der Sporozystenhülle um die Sporozoiten gemeint, wie sie bei anderen Kokzidien vorkommt (CURRENT u. BLAGBURN 1990). In vielen Veröffentlichungen wird TYZZER als Erstbeschreiber der Kryptosporidien zitiert, obwohl es möglich ist, dass bereits 1895 CLARK Kryptosporidien in Mäusemägen entdeckt hat (TYZZER 1912, CURRENT u. BLAGBURN 1990).

Die Gattung *Cryptosporidium* gehört zum Unterstamm der Apikomplexa und vertritt innerhalb der Kokzidien eine eigene Familie (Abb. 1). Die Kokzidien sind zugleich die größte Gruppe der Apikomplexa und besitzen eine wichtige veterinär- und humanmedizinische Bedeutung. Der Stamm der Apikomplexa ist durch das Vorhandensein eines Apikalkomplexes gekennzeichnet, einer speziellen Gruppe von Organellen im Zellinneren am apikalen Pol der Sporozoiten. Der Apikalkomplex dient der Fortbewegung und ermöglicht das Eindringen in eine Wirtszelle (LEVINE 1984).

Reich:	Protozoen
Stamm:	Alveolata
Unterstamm:	Apikomplexa
Klasse:	Coccidea
Unterklasse:	Eucoccidia
Ordnung:	incertae sedis
Unterordnung:	Adeleida
Familie:	Cryptosporidiidae
Gattung:	<i>Cryptosporidium</i>
Spezies:	<i>C. andersoni</i> (Rind) <i>C. baileyi</i> (Vögel) <i>C. canis</i> (Hund) <i>C. felis</i> (Katze) <i>C. hominis</i> (Mensch) <i>C. meleagridis</i> (Vögel) <i>C. muris</i> (Maus) <i>C. nasorum</i> (Fisch) <i>C. parvum</i> (152 Säugetierarten) <i>C. saurophilum</i> (Reptilien) <i>C. serpentis</i> (Reptilien) <i>C. wrairi</i> (Meerschweinchen) <i>C. suis</i> (Schwein)

Abbildung 1: Systematik und Taxonomie von *Cryptosporidium spp.* nach TENTER (2006), CAREY et al. (2004), RYAN et al. (2004)

In den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts wurden neben *C. muris* noch 19 weitere Arten klassifiziert, von denen jedoch nur einige wenige bis heute ihre Gültigkeit behalten haben. Ein Organismus, welcher 1971 erstmals als Durchfallerreger beim Rind Erwähnung findet, ist die Spezies *C. parvum*. Es folgten zahlreiche Fallbeschreibungen, nach denen es sich um einen wichtigen Erreger neonataler Diarrhoen bei Rind, Schaf und Ziege handelt. Die erste dokumentierte Infektion eines Menschen wird auf 1976 datiert. Beschrieben wurden kurz anhaltende Durchfälle bei immunkompetenten Personen und schwerwiegende bis lebensbedrohliche Durchfälle bei Personen mit einem insuffizienten Immunsystem. Die Forschungsergebnisse aus den frühen achtziger Jahren zeigten keine oder nur eine geringe Wirtsspezifität der Kryptosporidien, und man vermutete, dass *Cryptosporidium* eine monospezifische Gattung sei (TZIPORI et al. 1980, WOODMANSEE u. POHLENZ 1983, TZIPORI 1983, AJI et al. 1991).

Später teilte man die beschriebenen 20 Spezies in vier Gruppen auf und ordnete diese bestimmten Wirtstierklassen zu: *C. nasorum* für Fische, *C. crotali* für Reptilien, *C. meleagridis* für Vögel und *C. muris* für Säugetiere (LEVINE 1980, TZIPORI et al. 1980, WOODMANSEE u. POHLENZ 1983, TZIPORI 1983, LEVINE 1984, AJI et al. 1991). Durch die Entschlüsselung des gesamten Genoms von *C. parvum* durch ABRAHAMSEN et al. (2004) und *C. hominis* durch XU et al. (2004) sind viele Unterschiede zu anderen Organismen des Stammes Apikomplexa bekannt geworden. Das komplette Genom dieses Parasiten umfasst nicht weniger als 9 Millionen Basenpaare, verteilt auf 8 Chromosomen. Kryptosporidien besitzen keinen Apikoplasten und nur ein degeneriertes Mitochondrium. Der Organismus gewinnt seine Energie durch Glykolyse, aber auch die Katalyse, Lagerung und Synthese von Polysacchariden sind Teil seines Nahrungsmetabolismus. Es wird vermutet, dass die besondere Lage des Parasiten „intrazellulär, aber extrazytoplasmatisch“, diesen effektiven Metabolismus ermöglicht und eine Energieaufnahme durch die Mikrovillimembran der Wirtszelle erfolgt (ABRAHAMSEN et al. 2004). Phänotypisch ähneln die Arten der Gattung *Cryptosporidium* den Kokzidien, phylogenetisch scheinen sie jedoch eher mit den *Gregarineae* verwandt zu sein (TENTER 2006).

Zwischen den Spezies innerhalb der Gattung *Cryptosporidium* gibt es nur geringe oder gar keine morphologischen Unterscheidungsmerkmale. Dies macht eine Zuordnung nach rein mikroskopischen Kriterien schwierig. Die Oozystengröße variiert zwischen 3 und 8 µm, wobei *C. nasorum* mit 4,3 x 3,3 µm der kleinste und *C. muris* mit 8,4 x 6,3 µm der größte Vertreter unter den verschiedenen Spezies sind (FAYER et al. 2000). Wurden ursprünglich Kryptosporidien nach ihrer Fähigkeit, einen bestimmten Wirt zu infizieren, klassifiziert, so erlangten in den letzten Jahren genetische Unterscheidungsmerkmale (Gene des COWP (*Cryptosporidium* Oocyst Wall Protein), des Apikalkomplexes und des Cytoskeletts, verschiedener Enzyme oder von Antigenen der Oozystenwand) zunehmend an Bedeutung. Mittels molekularbiologischer Techniken, wie Restriktionsfragmentanalyse (PENG et al. 1997) und PCR (MORGAN u. THOMPSON 1998, TSUSHIMA et al. 2003) wurden spezifische Merkmale der verschiedenen Spezies untersucht. Molekularepidemiologische Studien haben jedoch eine eindeutige Unterteilung von Isolaten der Spezies *C. parvum* in verschiedene Genotypen erbracht (MORGAN et al. 1999, XIAO et al. 1999).

Die Unterteilung in einen humanen und einen bovinen Genotyp erfolgte anhand von Polymorphismen in den Sequenzen für die rRNA-, Acetyl-CoA-Synthetase-, Polythreonin-, Ribonucleotidreductase- und β -Tubulin- Gene (CARRAWAY et al. 1996, PENG et al. 1997, MORGAN u. THOMPSON 1998) sowie für das COWP (NICHOLS et al. 1991). Der Mensch kann sich mit dem Humangenotyp (Genotyp 1) und mit dem Rindergenotyp (Genotyp 2) infizieren, während aus Rindern bisher ausschließlich der bovine Genotyp 2 isoliert wurde (MCLAUHLIN et al. 2000, ENEMARK et al. 2002a). Dieser bovine Genotyp kann in weitere 3 Subtypen, C1-C3 (ENEMARK et al. 2002a) bzw. vier Subtypen C1-C4 unterteilt werden (CACCIÒ et al. 2001). Neuere Untersuchungen konnten experimentell einen unterschiedlichen Tropismus der zwei Genotypen zu verschiedenen Wirtszellen nachweisen, wobei der Genotyp 1 nur humane Epithelzellen zu infizieren vermag (HASHIM et al. 2004). Die genetischen, biologischen und epidemiologischen Unterschiede zwischen den Genotypen 1 und 2 waren der Anlass für die Einführung einer neuen Spezies. Um die Bedeutung des Genotyps 1 für den Menschen hervorzuheben, wurde dieser als *C. hominis* neu klassifiziert (MORGAN-RYAN et al. 2002). Neuere Untersuchungen der verschiedenen Genotypen von *C. parvum* mittels Micro- und Minisatelliten-Marker lassen annehmen, dass es noch eine Vielzahl weiterer Subtypen mit einer Vielzahl verschiedener Allele gibt. Die Entschlüsselung der Bedeutung dieser Genmutationen ist noch in Arbeit. Die stetig steigende Anzahl bekannter Sequenzen verschiedener Genabschnitte, ist in einer Datenbank im World Wide Web (<http://CryptoDB.org>) zugänglich (MALLON et al. 2003, PUIU et al. 2004, HEIGES et al. 2006).

Immunsupprimierte Menschen scheinen für eine Vielzahl von Spezies und Genotypen von *Cryptosporidium* empfänglich zu sein. MORGAN et al. (2000) fanden beim Menschen neben den beiden *C. parvum*-Genotypen (Genotyp 1 und Genotyp 2) auch *C. felis* und *C. meleagridis*, die beiden letzteren in Stuhlproben von HIV-infizierten Personen. In einer umfangreichen Studie in England wurden *C. parvum*-Oozysten aus 5001 Stuhlproben genotypisiert, wobei 50 % dem Genotyp 1 (human) und 45 % dem Genotyp 2 (bovin) zugeordnet werden konnten. Ein Prozent der Stuhlproben wurden als andere Spezies oder Genotypen identifiziert, wovon 38 Fälle von *C. meleagridis*, drei Fälle von *C. felis* und ein Fall einer *C. canis*-Infektion nachgewiesen werden konnten (CHALMERS et al. 2003). Auch in anderen Studien waren Stuhlproben von HIV-Infizierten positiv für *C. canis* und *C. felis* (PIENIAZEK et al. 1999).

In einer weiteren Untersuchung waren 37,8 % der humanen Stuhlproben mit *C. parvum* des Genotyp 1 und 61,5 % mit dem Genotyp 2 positiv (MCLAUCHLIN et al. 2000). In einer britischen Untersuchung kehrte sich das Verhältnis um, und aus 191 positiven Stuhlproben wurden 60 % als *C. hominis* (Genotyp 1) und 40 % als *C. parvum* (Genotyp 2) identifiziert (HUNTER et al. 2004).

2.3 Epidemiologie

2.3.1 Kryptosporidiose als Zoonose

Die Kryptosporidiose des Menschen ist eine meldepflichtige Zoonoseerkrankung. Die Infektion erfolgt durch die orale Aufnahme infektiöser Oozysten der Spezies *C. parvum*. Es konnten jedoch auch verschiedene weitere Spezies (*C. meleagriditis*, *C. canis*, *C. felis*) aus dem Stuhl von Patienten isoliert werden (CHALMERS et al. 2003, PIENIAZEK et al. 1999) sodass verschiedene Tierarten bei der Übertragung auf den Menschen eine Rolle spielen. *C. hominis* wird ausschließlich von Mensch zu Mensch übertragen. Das Bewusstsein um die Bedeutung der Erkrankung hat seit dem Bekanntwerden der ersten massiven Ausbrüche Anfang der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts zugenommen.

Zu den möglichen Übertragungswegen gehört der direkte Kontakt des Menschen zu infizierten Tieren bzw. Tierfäzes. In Asien wird die Möglichkeit diskutiert, dass Hausschweine eine Ansteckungsquelle für den Menschen darstellen könnten (YU u. SEO 2004). Von epidemiologischer Bedeutung ist der Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln wie Frischmilch, rohe Würste, Obst, Gemüse, Muscheln und Fruchtsäften (SLIFKO et al. 2000b). Die orale Aufnahme von oozystenhaltigem Kot als Schmierinfektion in Kindertageseinrichtungen und Krankenhäusern wurde beschrieben (Übersicht bei POHLENZ 1987, JOACHIM 2004). Die Infektionsdosis, die ausreicht, um einen gesunden Erwachsenen zu infizieren, wurde experimentell an freiwilligen Probanden ermittelt und mit 30 Oozysten angegeben (CURRENT u. BLAGBURN 1990, DUPONT et al. 1995), jedoch scheint es Unterschiede zwischen verschiedenen Isolaten zu geben, welche mit ihrer geographischen Herkunft im Zusammenhang stehen (OKHUYSSEN u. CHAPPELL 2002). Die Kontamination von Oberflächenwässern, die als Trinkwasserquelle dienen, mit Oozysten von *C. parvum* wurde in verschiedenen Ländern nachgewiesen, und der direkte Zusammenhang mit Kryptosporidiose beim Menschen gilt als belegt (SMITH u. ROSE 1998, MEAD et al. 1999, LECHEVALLIER et al. 2003).

Ein direkter Nachweis von Oozysten im Wasser ist äußerst aufwändig und kann nicht für die laufende Trinkwasseruntersuchung herangezogen werden (WILLMITZER 1997). In einer sechsjährigen Gewässeruntersuchung in England waren in 11,4 % der Proben Kryptosporidien-Oozysten nachweisbar (SMITH et al. 2002). Bei dem bisher bedeutsamsten Ausbruch in Milwaukee (USA) im Jahre 1993 erkrankten rund 400.000 Menschen innerhalb kürzester Zeit an Kryptosporidiose durch die Aufnahme von kontaminiertem Trinkwasser (MACKENZIE et al. 1995). FAYER et al. (2000) listen 55 endemische Ausbrüche zwischen 1984-1999, davon die meisten in England und Nordamerika (FAYER et al. 2000). Ende der neunziger Jahre des vorigen Jahrhunderts hielt man *Cryptosporidium* für den wichtigsten Kontaminanten des Wassers (BRASSEUR 1997, UGUEN et al. 1997). Jeder Nachweis von infektiösen Oozysten in Trinkwasser ist vom hygienischen Standpunkt aus bedenklich (CAREY et al. 2004).

Bei immunsupprimierten Menschen (v. a. AIDS-Patienten) kann die Infektion zu lebensbedrohlichen Erkrankungen führen, da bis heute keine zuverlässige Medikation zur Verfügung steht (SOAVE u. ARMSTRONG 1986, GRIFFITHS et al. 1994). In den USA treten schätzungsweise 300.000 Fälle nachgewiesener Kryptosporidiosen pro Jahr auf, wovon 90 % auf infiziertes Trinkwasser oder Kontakt mit infizierten Personen zurückzuführen sind (MEAD et al. 1999). In Australien erkrankten 1997/1998 innerhalb von vier Monaten über 1000 vor allem junge Menschen nachweisbar an einer Kryptosporidiose, und es konnte ein Zusammenhang der Erkrankung mit dem Aufenthalt in Schwimmbädern nachgewiesen werden (PUECH et al. 2001). In Deutschland werden alle gemeldeten Fälle nachgewiesener Kryptosporidiose des Menschen im Robert-Koch-Institut registriert und im Infektionsepidemiologischen Jahrbuch veröffentlicht (www.rki.de). Die Summe aus allen Bundesländern wird darin für 2003 mit 885 und für 2004 mit 935 Erkrankungen angegeben. Im darauffolgenden Jahr wurde ein Anstieg um 40 % auf 1.309 registrierte Fälle verzeichnet. Somit stieg im Jahr 2005 bundesweit die Inzidenz der Krankheit im Vergleich zum Vorjahr von 1,1 auf 1,6 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die Zahl registrierter Fälle von Kryptosporidiose mit Sicherheit niedriger ist, als die tatsächliche Anzahl infizierter Personen, da gerade bei immunkompetenten Erwachsenen die Infektion oft unbemerkt abläuft oder die Symptome so gering sind, dass sie keiner ärztlichen Konsultation bedürfen (PUECH et al. 2001).

2.3.2 Kryptosporidiose beim Rind

Die Gattung *Cryptosporidium* kann ein breites Wirtsspektrum infizieren (152 Säugetierarten sind als empfänglich bekannt) und schon früh wurde die große Bedeutung der Nutztiere als Infektionsreservoir erkannt (FAYER et al. 1997, FAYER et al. 2000).

Alle Nutztiere (Schaf, Schwein, Ziege, Pferd) sind empfänglich, aber auch Haustiere (Hund, Katze), Labortiere (Kaninchen, Meerschweinchen, Ratte, Maus), Wildtiere (Reh, Eichhörnchen, Waschbär), Reptilien und Fische zählen zum Wirtsspektrum dieser Protozoen (TZIPORI 1988).

In der Landwirtschaft verursacht Kryptosporidiose in der Kälberaufzucht weltweit hohe Verluste. Vor allem Kälber im Alter von 8-14 Tagen sind von der *C. parvum*-Infektion betroffen (HENRIKSEN und KROGH 1985). Die Ausscheidung von Oozysten wurde auch bei drei Tage alten Kälbern beobachtet, was darauf schließen lässt, dass sie bereits kurz nach der Geburt empfänglich für die Infektion sein können (DE GRAAF et al. 1999).

Eine fünfjährige Prävalenzstudie in Deutschland anhand von Laboruntersuchungen bei Kälbern bis zu 6 Monaten ergab 19 bis 36 % positive Tiere (JOACHIM et al. 2003b). Bei einer Untersuchung von 40 Kälbern mit Durchfall in Süddeutschland traten Kryptosporidien (41,6 %) als häufigste Erreger auf, zweithäufigste Erreger waren Rotaviren (35,4 %) (OELMAIER 2002). In einem Extremfall büsste ein Bestand 58 % seiner Kälber durch Kryptosporidiose ein (GÖBEL 1991). In einer Langzeituntersuchung aus England wird die Prävalenz mit 9 bis 52 % angegeben (STURDEE et al. 2003).

Die Übertragung der Infektion erfolgt von Kalb zu Kalb durch Belecken sowie über kontaminiertes Futter, Personal, Geräte und Milchaustauscher, aber auch andere Tierarten (Mäuse, Katzen, Schaflämmer und Ziegen) können den Erreger einschleppen. In mehreren Arbeiten wird die Hausfliege (*Musca domestica*) als Transportvektor für *C. parvum* diskutiert, da Oozysten auf dem Exoskelett und im Darm der Fliegen mittels Immunfluoreszenztechnik und Polymerasekettenreaktion nachgewiesen werden konnten (GRACZYK et al. 1999, CLAVEL et al. 2002). Beim Rind beträgt die Präpatenz 2-4 Tage, die Patenz 12-14 Tage. Nach überstandener Infektion besitzen die Tiere eine lebenslange Immunität, welche allerdings keinen vollständigen Schutz vor Reinfektionen darstellt (HARP et al. 1989, GÖBEL 1991).

Kälber, die Kolostrum aufgenommen haben, weisen schon am ersten Lebenstag *C. parvum*-spezifische Antikörper (v.a. IgG und IgM) im Serum auf, was auf eine kolostrale Übertragung von maternalen Antikörpern schließen lässt (HARP et al. 1989, MOSIER et al. 1992, QUÍLEZ et al. 2002). Ihnen wird eine lokale, passive Immunitätssteigerung im Darm zugesprochen, weshalb die in der Tierschutz-Nutztier-Verordnung (vom 25. Oktober 2001) enthaltene Forderung, Kälbern bis spätestens vier Stunden nach der Geburt Kolostrum zu verabreichen, gerechtfertigt ist. Dies schützt das Kalb üblicherweise jedoch nicht vor einer Erkrankung, da der humoralen Immunität eine untergeordnete Bedeutung zukommt. Der experimentelle Einsatz von bovinem Trockenkolostrum zeigte weder prophylaktisch noch therapeutisch einen nachweisbaren Erfolg (OELMAIER 2002).

Genauere Untersuchungen von Oberflächengewässern in Großbritannien zeigten eine höhere Kontamination dort, wo Rinderherden gehalten werden, mit einem jahreszeitlichen Gipfel in Herbst und Winter (BODLEY-TICKELL et al. 2002). Dies entspricht auch der höchsten Prävalenz im Jahresverlauf der Kryptosporidiose bei Rindern (STURDEE et al. 2003).

Neben der Jahreszeit spielen Herdendichte, Alter der Tiere sowie Weidemanagement eine wichtige Rolle. Je höher der Anteil junger Kälber (< 2 Monate) in einem Bestand ist, umso größer ist die Prävalenz innerhalb einer Herde (ATWILL et al. 1999).

Beim Rind werden drei Arten unterschieden: *C. parvum* ist vor allem im Jejunum und im Ileum anzutreffen, während *C. muris* und *C. andersoni* das Abomasum befallen. *C. andersoni* wird als möglicher Verursacher einer Gastritis beim älteren Rind diskutiert (LINDSAY et al. 2000a). *C. parvum* ist die am häufigsten vertretene Spezies beim Saugkalb; Mischinfektionen mit anderen Arten (*C. andersoni*) kommen vor (GÖBEL 1991, SLIFKO et al. 2000b, ENEMARK et al. 2002b).

2.4 Pathogenese und Pathologie

2.4.1 Mensch

Bei immunkompetenten Personen kann die Infektion mit *C. parvum* oder *C. hominis* zu einer selbstlimitierenden Diarrhoe von 3-20 Tagen Dauer führen. Im Gegensatz dazu verursacht die Kryptosporidiose bei immunsupprimierten Patienten in vielen Fällen lang anhaltende lebensbedrohliche Erkrankungen (CURRENT u. GARCIA 1991).

Die Symptome sind choleraähnlich mit Bauchkrämpfen, Fieber und großen Flüssigkeitsverlusten (bis zu 17 Liter pro Tag) bedingt durch einen wässrig-schaumigen Durchfall (POHLENZ 1987, CURRENT u. GARCIA 1991). Die Infektion findet hauptsächlich im distalen Dünndarm statt, jedoch können Läsionen gelegentlich auch in Kolon und Zäkum gefunden werden (TYZZER 1912, ANGUS 1987, POHLENZ 1987).

Trotz der wenig invasiven Lebensweise des Parasiten verursacht er eine Entzündung sowie Zellschäden an der Darmwand, die eine Reihe von Entzündungsmediatoren wie Cytokine freisetzen und Entzündungszellen des Wirtes anlocken (LAURENT et al. 1998, LAURENT et al. 1999). Der Effekt von *C. parvum* auf die Darmzellen wurde *in vitro* anhand von polarisierten Epithelzellen studiert. Die Infektion mit Oozysten führte zu einer dosisabhängigen Reduzierung des elektrischen Widerstandes über den gesamten Monolayer (ADAMS et al. 1994). Mit Hilfe eines Tiermodells konnte an neonatalen Schweinen eine Atrophie der Mikrovilli, eine Krypthyperplasie sowie eine Zunahme der Zahl an Entzündungszellen in der Lamina propria nachgewiesen werden, bedingt durch die Ansiedlung von Entwicklungsstadien in der Mukosa (ARGENZIO et al. 1990).

Die geringe Absorption von Natrium und Wasser sowie eine Zunahme der Chloridsekretion wurden ebenfalls als Ursache für den Durchfall beschrieben. Auf der Suche nach Virulenzfaktoren wurden in den letzten Jahren einige Moleküle charakterisiert, welche für die Adhäsion an die Wirtszelle (CSL, gp900, p23, cp47, CPS-500), den Transport von Ionen (ATP-Bindungskaskade) und für die Exzystierung (Serinprotease, Aminopeptidase) verantwortlich gemacht werden. Die Produktion eines eigenen Toxins konnte bisher nicht nachgewiesen werden, jedoch zeigten In-Vitro-Studien die zellschädigenden Eigenschaften von *C. parvum*, und es werden als Auslöser, ähnlich wie bei Bakterien, spezifische Proteine (Phospholipasen, Proteasen, Hämolyse) vermutet (OKHUYSEN u. CHAPPELL 2002).

Die Erkrankung beschränkt sich nicht allein auf den Gastrointestinaltrakt. Es wurde über Fälle berichtet, in denen der Respirationstrakt oder die Gallenblase von Kryptosporidien befallen waren (CURRENT u. BLAGBURN 1990). HIJAWI et al. (2001) führten diese Infektionen auf die Besonderheit der Autoinfektionen im Entwicklungszyklus des Parasiten zurück. Der genaue Infektionsweg der Parasiten im Körper bleibt dabei ungeklärt. Experimentelle Infektionen von Konjunktiven, Trachea und Uterus an Versuchstieren sind ebenfalls beschrieben (HEINE et al. 1984, LIEBLER et al. 1986).

Infizierte man künstlich immunsupprimierte Ratten mit Oozysten von *C. parvum*, so entwickelten diese vier Tage danach eine respiratorische Kryptosporidiose (MEULBROEK et al. 1991).

2.4.2 Tier

Die Kryptosporidiose ist eine Jungtiererkrankung, der die größte Bedeutung in der Rinderhaltung zukommt. Bei anderen Säugetieren (Pferd, Hund, Katze, Schwein) verläuft die Infektion meist inapparent (TZIPORI 1988). Ein massiver Befall kann zu klinischen Symptomen führen (MEHLHORN et al. 1993). In der Mehrzahl der Fälle führt eine Infektion mit Kryptosporidien beim wenige Tage alten Kalb zu einem wässrigen, profusen Durchfall, welcher bis zu zwei Wochen anhält und Fieber und Koliken auslösen kann. Die Pathogenese dieser Erkrankung basiert auf der Besiedlung des Darmtraktes von Jejunum bis Zäkum, der Zerstörung der Mikrovilli sowie entstehenden Epithelzelldefekten und Zottenatrophie. Die darauf folgende Maldigestion und Malabsorption verursachen eine selbstlimitierende Diarrhoe, welche mit erheblichem Flüssigkeitsverlust und Exsikkose einhergehen kann (GÖBEL 1991). Beim Kalb wird der Kot am 3.-5. Tag p.i. wässrig und verfärbt sich hellgelb. Erst am 7.-10. Tag p.i. wird der Kot wieder pastös, die Oozystenausscheidung dauert meist noch bis zum 10.-12.Tag an (POHLENZ 1987). In der pathologischen Untersuchung fallen vor allem die vergrößerten und ödematisierten Darmlymphknoten auf, die Dünndarmschlingen im mittleren und hinteren Drittel sind hyperämisch bis zyanotisch. Das Zäkum und das Ileum sind oft dilatiert und mit einem gelblichen, wässrigen, schleimigen Inhalt gefüllt (POHLENZ 1987).

Hypothetisch ist bisher die Frage zur Rolle der Darmflora beim Erlangen einer Altersresistenz. HARP (2003) hält es für möglich, dass bestimmte Substanzen (Bakterien, Enzyme, toxische Stoffe), die erst ab einem bestimmten Alter im Darm vorhanden sind, eine Infektion mit *C. parvum* verhindern können. Kryptosporidiose wird von einigen Autoren als eine multifaktoriell bedingte Infektion gesehen, häufig vergesellschaftet mit viralen und bakteriellen Erkrankungen (HENRIKSEN u. KROGH 1985) sowie in Zusammenhang mit schlechten Haltungs- und Hygienebedingungen. Monoinfektionen haben gezeigt, dass *C. parvum* für das Kalb einen primär pathogenen Erreger darstellt (ANGUS 1987, POHLENZ 1987, DE GRAAF et al. 1999), wobei sich die Klinik verschlimmert, sobald sich Sekundärinfektionen ergeben (de GRAAF 1999).

Im Schweinmodell zeigten Tiere bei gleichzeitiger Infektion mit Kryptosporidien und Rotaviren eine verlängerte Oozystenausscheidung, signifikante Gewichtseinbußen und veränderte Blutchemie im Vergleich zu Schweinen, die nur mit Kryptosporidien infiziert worden waren. Daraus können additive oder synergistische Effekte im Krankheitsgeschehen abgeleitet werden (ENEMARK et al. 2003).

2.5 Therapie und Prophylaxe

2.5.1 Therapie beim Menschen

Eine effektive Therapie der Kryptosporidiose ist besonders dann sehr schwierig, wenn sie immunsupprimierte Patienten (v. a. HIV-Patienten) betrifft. So ist bis heute kein zuverlässig wirksames Medikament verfügbar, obwohl zahlreiche Therapeutika, vor allem Antibiotika, *in vitro* und *in vivo* auf ihre Wirksamkeit gegen Kryptosporidiose beim Menschen getestet wurden. Bis auf einige Ausnahmen (Monensin, Toltrazuril, Halofuginon, Paromomycin, Nitazoxanid) zeigten die meisten Substanzen *in vitro* keinen ausreichenden Hemmeffekt (MCDONALD et al. 1990, REHG 1991, BRASSEUR et al. 1991, ARMSON et al. 1999b). Der Wirkmechanismus des Aminoglycosidantibiotikums Paromomycin wurde anhand von transformierten Caco-2- und MDCK-Zellen genauer studiert. Danach wurden keine erhöhten Paromomycin-Spiegel im Cytoplasma der Zellen gemessen und die Autoren vermuten den Wirkungsort an der apikalen Wirtszellmembran sowie in der parasitophoren Vakuole (GRIFFITHS et al. 1998).

Verschiedene synthetische Peptide wurden auf ihre Fähigkeit Oozysten oder Sporoziten zu inaktivieren, untersucht. Sporoziten sind aufgrund ihrer Membranstruktur leichter angreifbar als die dickwandigen Oozysten. Die verschiedenen Peptide interagieren eventuell mit Oberflächenmolekülen, die für Kontakt, Invasion und intrazelluläre Entwicklung verantwortlich sind. HIV-Patienten, die Rifabutin (ein mikrobielles Makrolidantibiotikum) erhalten hatten, zeigten ein signifikant geringeres Risiko, eine Kryptosporidiose zu entwickeln (FICHTENBAUM et al. 2000). Buforin und Nitazoxanid bewirkten in Kombination mit Azithromycin und Minocycline eine In-vitro-Hemmung des Parasiten von 84-90 % (GIACOMETTI et al. 2000, GIACOMETTI et al. 2001). Eine Übertragung der Ergebnisse von In-Vitro-Versuchen auf die Situation *in vivo* ist schwierig. Vielmehr zeigten verschiedene Substanzen, wie z.B. Nitazoxanid, in der Zellkultur einen kryptotoxischen Effekt, aber keine Wirkung im Tierversuch (THEODOS et al. 1998).

Eine passive Antikörper-Therapie in Form einer oralen Immunisierung mit bovinem Kolostrum, kolostralen Antikörpern, monoklonalen Antikörpern oder humanen Plasmaantikörpern wurde ebenfalls in zahlreichen Studien getestet, durchbrechende Erfolge blieben bislang jedoch aus (CRABB 1998). Im Widerspruch dazu steht eine Veröffentlichung von RUMP et al. (1992), in der beschrieben wird, dass die Verabreichung von bovinen Immunglobulinen an AIDS-Patienten die Ausscheidung von Oozysten und die Intensität des Durchfalls reduzierte.

2.5.2 Prophylaxemaßnahmen beim Menschen

Um das Risiko einer zoonotischen Übertragung auf den Menschen zu minimieren, sehen ATWILL et al. (1999) vier Ansatzmöglichkeiten, welche zum Teil auch in die Praxis umgesetzt werden:

1. Vorkommen und Grad der Oozystenausscheidung bei Kälbern reduzieren
2. Reduzierung der Menge an Gülle, welche mit Wasserressourcen in Kontakt kommen kann
3. Reduktion der Vitalität/Infektiosität der Oozysten, bevor sie mit Wasserressourcen in Kontakt kommen können
4. Reduktion der Anzahl von Rindern in Trinkwassergewinnungsgebieten

Flüssigmist stellt ein potenzielles Risiko der Einbringung von Kryptosporidien ins Trinkwasser dar, da diese und andere darin enthaltene Krankheitserreger den Bodenfilter durchdringen und ins Grundwasser gelangen können. Dies ist eine entscheidende Begründung für das Ausbringverbot von Flüssigmist in der engeren Schutzzone von Wasserschutzgebieten. In einigen Gebieten, speziell dort, wo großflächige Wasserschutzgebiete ausgewiesen sind, stellt diese Auflage eine besondere Härte für die betroffenen Landwirte dar. Aus diesem Grund wurden Forschungsprojekte initiiert, welche verlässliche Inaktivierungsverfahren von Gülle auch in Hinblick auf Kryptosporidien entwickeln sollten (DOLL et al. 1999). Wenig Bedeutung wurde bisher der Tatsache beigemessen, dass Mäuse und Ratten ein natürliches Erregerreservoir für *C. parvum* darstellen, da neben dem „Maus“-Genotyp auch der bovine Genotyp aus deren Kot identifiziert werden konnte (RYAN 2003). Im Gegensatz dazu lassen sich nur neugeborene oder immunsupprimierte Kaninchen und Meerschweinchen mit dem humanen oder dem bovinen Genotyp von *C. parvum* experimentell infizieren (PETRY 2000).

2.5.3 Therapie beim Kalb

Halofuginon (Halocur[®], Intervet) reduziert die Oozystenausscheidung und verbessert das Allgemeinbefinden (Diarrhoe, Dehydration) bei Kälbern signifikant (JOACHIM et al. 2003b). Das ionophore Polyätherantibiotikum Lasolocid-Natrium zeigt ebenfalls Wirkung gegen den Erreger und ist in der Schweiz als Futterzusatz (Bovatec[®]) zugelassen. Neben der Verabreichung eines Antikokzidioms wird die symptomatische Behandlung mit Elektrolyt-Glucoselösungen empfohlen, um das Flüssigkeitsdefizit auszugleichen (LUGINBÜHL u. PFISTER 1996).

2.5.4 Prophylaxemaßnahmen beim Kalb

Ein strenges Herdenmanagement, wie die Absonderung der Abkalbekühe während des Geburtsvorganges sowie die sofortige Unterbringung der Kälber in einem gesonderten Stallgebäude, sind geeignete Maßnahmen, um einen Krankheitsausbruch zu verhindern (LUGINBÜHL u. PFISTER 1996). Darüber hinaus spielen Hygienemaßnahmen, wie eine gründliche Stalldesinfektion z.B. mittels Dampfstrahler eine ebenso große Rolle (ANGUS 1987). Möglich, wenn auch in der Rinderhaltung vergleichsweise weniger verbreitet, ist die Anwendung chemischer Deinfektionsmaßnahmen. Dabei hat das zur Bekämpfung der Geflügelkokzidien bewährte Produkt Neopredisan[®] (Menno Chemie, Norderstedt) die besten Ergebnisse erzielt, da es bereits in einer Konzentration von 3 % und einer Einwirkzeit von 30 min. starke Lysiseffekte auf die Oozystenwand zeigt (BÖSE 1998). Die vitalitätsreduzierende Wirkung von Neopredisan[®] *in vitro* wurde von ECKERT (2001) mittels PCR und Immunfluoreszenztechnik nachgewiesen. Eine Behandlung der Oozysten mit einer 4 % igen Neopredisanlösung über 120 min reduzierte die nachweisbaren Entwicklungsstadien in der Zellkultur auf durchschnittlich 0,42 Foci (fluoreszierende Entwicklungsstadien) gegenüber 100,45 Foci in der Positivkontrolle.

2.6 Methoden zum Nachweis von *C. parvum*

2.6.1 Nachweis aus Kotproben

2.6.1.1 Mikroskopischer Nachweis und Färbetechniken

Der direkte Parasitennachweis aus dem Kot mittels Flotation und anschließender Hellfeld- oder Phasenkontrastmikroskopie ist mit dem Risiko eines falsch negativen Ergebnisses verbunden.

Sind die detektierten Oozysten nicht größer als $5,0 \times 4,5 \mu\text{m}$, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um *C. parvum* und nicht um *C. andersoni* oder *C. muris* handelt (LINDSAY et al. 2000a, NYDAM et al. 2002). HENRIKSEN und POHLENZ (1981) beschrieben die modifizierte Ziehl-Neelsen Technik, eine Färbemethode, welche bis heute ihre Anwendung findet. In dem mit Karbolfuchsin und Malachitgrün gefärbten Ausstrich heben sich die Kryptosporidien rot von dem ansonsten grünen Hintergrund ab. Die Färbung nach HEINE (1982) mittels Karbolfuchsin ist hinsichtlich Zeitaufwand und Genauigkeit im Nachweis von Oozysten im Kotasstrich anderen Färbetechniken überlegen.

2.6.1.2 Immunologische Nachweisverfahren

Neben den Färbetechniken konnten noch eine Reihe immunologischer Antigennachweisverfahren, wie z.B. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) und IFAT (Immunfluoreszenz-Antikörper-Test) etabliert werden. Die Nachweisgrenzen liegen bei 1×10^3 Oozysten für den indirekten IFAT und bei 3×10^5 Oozysten für den ELISA (ANUSZ et al. 1990). Anhand von humanen Stuhlproben sowie bovinen Kotproben wurden unterschiedliche Labormethoden zum Nachweis von *C. parvum* miteinander verglichen. Die Überlegenheit von immunologischen Nachweisverfahren, wie IFAT und MEA (Monoklonal-Enzymassay) bezüglich Sensitivität und Spezifität gegenüber herkömmlichen Färbetechniken wurden in mehreren Arbeiten belegt (QUÍLEZ et al. 1996, HARRINGTON u. KASSA 2002, CHALMERS et al. 2002). Der Nachweis von Serum-IgG mittels ELISA ist für Prävalenzstudien geeignet, gibt aber keinen Überblick über den aktuellen Infektionsstatus beim Rind und kann nicht die Untersuchung von Kotproben ersetzen (NYDAM et al. 2002).

2.6.1.3 Nachweis mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR (Polymerasekettenreaktion) ermöglicht den Nachweis von 80-90 Oozysten pro Gramm Kot und ist damit ein sehr sensitives Verfahren (WEBSTER et al. 1993). In einer Vergleichsstudie mit einem Enzym-Immunoassay (EIA) sowie einem direkten Fluoreszenz-antikörper-Nachweis (DFA) verbesserte die PCR die Detektionsrate von Oozysten in humanen Stuhlproben nicht signifikant, obwohl die Sensitivität der PCR mit 91-99 % auch hier sehr hoch lag (BIALEK et al. 2002). Dennoch werden molekulartechnische Nachweisverfahren wie PCR und RT-PCR als zuverlässig und zukunftsweisend gesehen, nicht zuletzt deshalb, weil die Darstellung von bestimmten DNA-Abschnitten die Genotypisierung der Parasiten ermöglicht (CAREY et al. 2004, NAJDROWSKI 2006).

2.6.2 Nachweis in Umweltproben

Ein Problem bei der Untersuchung von Umweltproben ist die geringe Dichte der darin enthaltenen Oozysten und damit verbunden die große Menge zu untersuchenden Materials, die jedoch erforderlich ist, um ein Risiko für den Verbraucher auszuschließen. Obwohl in der europäischen Gesetzgebung keine konkrete Untersuchung des Trinkwassers auf Kryptosporidien vorgeschrieben ist, wird verlangt, dass Trinkwasser „frei von allen Mikroorganismen, Parasiten und Substanzen in Konzentrationen, die die Gesundheit des Menschen potentiell gefährden, zu sein hat...“ (Europäische Richtlinie 98/83/EC). Großbritannien ist das einzige Land in der Europäischen Union, das eine Untersuchung auf Kryptosporidien per Gesetz vorschreibt. In Anlehnung an Großbritannien und die USA haben auch andere Länder Standardmethoden zur Untersuchung von Trinkwasser erarbeitet. Diese beruhen hauptsächlich auf der Filtrierung, Zentrifugation, IMS (immunomagnetic separation) zur Reinigung, Antikörpermarkierung zur Detektion und einer Quantifizierung, die manuell-mikroskopisch oder mittels Laser Scanning Zytometrie durchgeführt werden kann (DI GIOVANNI et al. 1999, DE ROUBIN et al. 2002). In einer Arbeit von BENNETT et al. (1999) wurden verschiedene Methoden der Quantifizierung von Oozysten im Trinkwasser parallel getestet. Im Vergleich mit anderen Methoden zeigt die Durchflusszytometrie auch bei Konzentrationen von 10^2 - 10^3 Oozysten/ml die geringsten Standardabweichungen (BENNETT et al. 1999). Bei der Detektion mittels polyklonaler oder monoklonaler Antikörper muss die Tatsache Berücksichtigung finden, dass die Epitope der Oozystenwand labil gegen oxidative Einflüsse und Chlorbehandlungen sind. Die vier von MOORE et al. (1998) getesteten kommerziell erhältlichen Antikörper erkannten alle den selben Typ immundominanter Epitope auf der Oozystenwand. Bei der Anwendung der reverse transcription-PCR zum Nachweis von mRNA wurde das Gen des Hitzeschockproteins hsp 70 amplifiziert und ermöglichte den Nachweis von Einzeloozysten aus Wasserproben, aber die Spezifität für *C. parvum* war nicht immer gegeben (ROCHELLE et al. 2001).

Einen Fortschritt in der Untersuchung von Gewässern auf Oozysten in Bezug auf den Nachweis vitaler Oozysten sieht SMITH et al. (2002) in der kombinierten Anwendung von monoklonalen Antikörpern, welche mit Hüllantigenen der Oozysten reagieren, und der Verwendung des Fluorogens 4',6'-Diamidino-2-phenyl-indol (DAPI), welches mit den Kernen von Sporozoitinteragiert. Dadurch konnte er nachweisen, dass 56,6 % der in Gewässerproben gefundenen Oozysten auch vitale Sporozoitinterhielten.

2.7 Methoden zur Vitalitätsabschätzung

2.7.1 Tierversuch

Der Tierversuch dient vor allem dem Nachweis einer erfolgreichen Inaktivierung von *C. parvum*-Oozysten. Hierfür werden am häufigsten BALB/c-Mäuse und CD-1 Mäuse, aber auch Swiss OF1, C57BL/6 und andere Inzuchtstämme verwendet. Der Tierversuch bietet den Vorteil, eine natürliche Infektion simulieren zu können, er ist jedoch aufwändig und teuer. Außerdem ist es sehr schwer, quantitative Aussagen über die Stärke einer Infektion zu machen (JOACHIM et al. 2003a). Das kleinste Inokulum, das benötigt wird, um eine Infektion auszulösen, beträgt 1000 Oozysten (PEETERS et al. 1989). Das Mäusemodell kann auch zur Passagierung von Oozysten verwendet werden, jedoch ist die Ausbeute eher gering (PETRY et al. 1995). Verglichen mit anderen Vitalitätsassays (Vitalfärbung, Exzystierung), liefert die Infektion von Mäusen die zuverlässigsten quantitativen Aussagen über die Vitalität von Oozysten (BLACK et al. 1996).

2.7.2 Exzystierung

Obwohl sich Gallensalze und Pankreasenzyme positiv auf die Exzystierungsrate der Oozysten auswirken, genügt auch eine wässrige Lösung unter Zufuhr von Wärme, um die Freisetzung der Sporozoitien zu initiieren (FAYER u. LEEK 1984). Optimale Exzystierungsraten werden unter dem Einfluss des Gallensalzes Natriumtaurocholat (5,25 %) bei 37 °C und einer Inkubationsdauer von 60 min erreicht. Die Exzystierungsrate ist abhängig von Temperatur, Zeit und pH-Wert (FAYER u. LEEK 1984, WOODMANSEE 1987).

Zur Vitalitätsabschätzung mittels In-Vitro-Exzystierung der Oozysten wird diese durch Natriumtaurocholat und Trypsin initiiert und nach einer Inkubation mindestens 100 Oozysten auf einem Objektträger mikroskopisch auf eine erfolgte Exzystierung hin untersucht.

Man geht dabei von der Annahme aus, dass exzystierte Oozysten vital und infektiös, nicht exzystierte Oozysten hingegen tot sind. Ein Vergleich der Inaktivierung, gemessen anhand der Exzystierungsrate und mittels Zellkulturassays, liefert aber keine Übereinstimmung in den Ergebnissen. Die Exzystierung überschätzt unter Umständen die Infektiosität von Oozysten, da *in vitro* exzystierte Oozysten nicht zwingend infektiös sein müssen (FINCH et al. 1993, CHAURET et al. 2001). Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass auch *in vitro* nicht exzystierende Oozysten in der Lage sind, Mäuse zu infizieren. Exzystierung allein stellt also keinen geeigneten Parameter zur Vitalitätsbestimmung von Oozysten dar (NEUMANN et al. 2000a).

2.7.3 Vitalfärbungen

Die Fähigkeit zur Aufnahme von Fluorochromen wie DAPI (Diamidino-2-phenylindol) oder PI (Propidiumiodid) in die Oozysten wird als eine weitere Möglichkeit der Vitalitätsbeurteilung von Kryptosporidien beschrieben. DAPI kann durch intakte Zellmembranen hindurchwandern und in die AT-reichen Regionen der DNA interkalieren. Der Vorteil dieser Färbung liegt in der Ansammlung des Farbstoffes in den Zellkernen der Sporozoitien und der damit verbundenen Unabhängigkeit von der Beschaffenheit der Probe bzw. der Oozystenhüllen. Dabei ist mit abnehmender Vitalität eine Abnahme der DAPI-positiven Oozysten zu beobachten. (GRIMASON et al. 1994). PI-positive Oozysten enthalten Sporozoitien mit einer gerissenen oder beschädigten Membran und sind als tot anzusehen (CAMPBELL et al. 1992). Die Vitalität von Oozysten kann über den Prozentsatz DAPI+/PI-fluoreszierender Oozysten abgeschätzt werden (SLIFKO et al. 1998). JENKINS et al. (1997) konstatierte hingegen, dass die Aufnahme von Farbstoffen in die Oozyste weniger eine Aussage über deren metabolische Aktivität als vielmehr nur über den Zustand ihrer Hülle zulässt.

Im Vergleich mit der Exzystierung und dem Mausmodell überschätzt die Färbetechnik die Exzystierungsrate bzw. Infektiosität der Oozysten, allerdings erzielten CAMPBELL und Mitarbeiter (1992) in Versuchen eine gute Korrelation ($r=0,997$) zwischen Vitalfärbung und Exzystierung. Die Fähigkeit der Oozysten, die fluoreszierenden Farbstoffe SYTO-9 und SYTO-59 aufzunehmen, kann über eine Durchflusszytometrie gemessen werden und korreliert mit den parallel durchgeführten Mäuseinfektionsversuchen (NEUMANN et al. 2000b).

2.7.4 In-Vitro-Kultivierung

Eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen wurde zur Kultivierung der Kryptosporidien *in vitro* erfolgreich eingesetzt (Tab. 1), wobei sich in den letzten Jahren einige Standardsysteme durchgesetzt haben.

Tabelle 1: Zelltypen, die zur In-Vitro-Kultivierung von Kryptosporidien eingesetzt werden.

<u>Zelltyp</u>	<u>Quelle</u>
HRT-Human rectal tumor	WOODMANSEE u. POHLENZ (1983)
HFL-human fetal lung	CURRENT u. HAYNES (1984)
PCK-primary chicken kidney	CURRENT u. HAYNES (1984)
PK-10 -porcine kidney cells	CURRENT u. HAYNES (1984)
MDCK- Mardin-Darby canine kidney cells	LUMB et al. (1988)
L929-Mouse fibroblast cells	MCDONALD et al. (1990)
LGA-Lewis rat small intestine carcinoma cells	BONNIN et al. (1990)
HT29.74-human colon adenocarcinoma cells	FLANIGAN et al. (1991)
CCL-6-human embryonic intestine 407 cells	KUHLS et al. (1991)
RL95-2-human endometrial carcinoma cells	RASMUSSEN et al. (1993)
T84-human colon carcinoma cells	ADAMS et al. (1994)
BFTE-bovine fallopian tube epithelial cells	YANG et al. (1996)
HCT-8-human colonic tumor cells	UPTON et al. (1994)
BS-C-1-green monkey kidney cells	DENG u. CLIVER (1998)
VELI-rabbit auricular chondrocytes	LACHARME et al. (2004)

Bemerkenswerte Ergebnisse erzielten CURRENT und HAYNES (1984), als ihnen die Reproduktion des gesamten Entwicklungszyklus von *C. parvum* in drei verschiedenen Zelllinien gelang. Nach einer Inkubationsdauer von drei Tagen konnten die ersten sporulierten Oozysten in der Zellkultur erkannt werden und deren Infektiosität *in vivo* an Swiss Webster Mäusen belegt werden.

In Versuchen zur Etablierung bestimmter Zelllinien als In-Vitro-Modell für *C. parvum* konnten auch in CaCo-2-Zellen (BURAUD et al. 1991), HT29.74-Zellen (AJI et al. 1991, RASMUSSEN et al. 1993), MDCK-Zellen (GUT et al. 1991) und HCT-8-Zellen (HIJAWI et al. 2001) der Entwicklungszyklus von *C. parvum* teilweise oder komplett nachgewiesen werden. Die Etablierung des kompletten Entwicklungszyklus *in vitro* erlaubt es, die Wirts-Erreger-Interaktionen zu studieren, ermöglicht die Kultivierung des Parasiten für immunologische, biochemische und molekulare Studien und kann zur Evaluierung von Therapeutika spezifisch für ein bestimmtes Entwicklungsstadium verwendet werden (HIJAWI et al. 2001). Einen direkten Vergleich verschiedener Zelllinien führten GUT et al. (1991) sowie ROSALES et al. (1993) durch. Dabei waren die MDCK am empfänglichsten für bovine *C. parvum*-Oozysten. In Bezug auf die Infektionsrate wurden keine Unterschiede zwischen den Zelltypen HCT-8, CaCo-2 und HT29 gefunden (MAILLOT et al. 1997). Zu einem anderen Ergebnis führten die vergleichenden Untersuchungen von UPTON et al. (1994); sie verglichen 11 permanente Zelllinien, die alle epithelähnliche Eigenschaften haben, eine Mikrovillimembran ausbilden oder Mucin produzieren. Demnach zeigten HCT-8-Zellen die besten Eigenschaften, gemessen an der Anzahl der Entwicklungsstadien in der Kultur. In zahlreichen folgenden Arbeiten setzte sich die Verwendung der HCT-8-Zellen gegenüber anderen Zelllinien durch (WOODS et al. 1995, SLIFKO et al. 1997, ARMSON et al. 1999a, LINDSAY et al. 2000b, PHELPS et al. 2001). Da sich die morphologischen Merkmale der verschiedenen Entwicklungsstadien in der Zellkultur nicht von den *in vivo* bei AIDS-Patienten beschriebenen unterscheiden, scheint mit der Zellkultur ein geeignetes Medium für die Erforschung der Kryptosporidiose *in vitro* vorzuliegen (FLAGINAN et al. 1991). Es ist möglich, Sporoziten zu isolieren und zur Zellkultur zu geben (HAMER et al. 1994, FAVENNEC et al. 1994) oder aber die Zellen direkt mit Oozysten zu infizieren (FLANIGAN et al. 1991, SLIFKO et al. 1999).

Nach einer Veröffentlichung von HIJAWI et al. (2004) ist es auch möglich, die Entwicklung von *C. parvum* in einem zellfreien Medium zu beobachten. Die Reproduktion des Versuches gelang anderen Wissenschaftlern jedoch nicht (GIROUARD et al. 2006).

Vergleiche zwischen dem Zellkulturassay und Mäuseversuchen zeigten eine enge Korrelation der beiden Infektionsmodelle. Die Oozystenmenge, die notwendig war, um 50 % der Zellen zu infizieren, war niedriger als die ID₅₀ von BALB/c Mäusen, weshalb angenommen wird, dass HCT-8-Zellen empfänglicher für Infektionen sind als Mäuse (SLIFKO et al. 2002).

Der entscheidende Vorteil der Zellkultur gegenüber dem Tierversuch liegt neben ethisch-moralischen Kriterien in dem direkten Infektionsnachweis und der genaueren quantitativen Auswertbarkeit (JOACHIM et al. 2003a). Mit Zellkulturen ist es möglich, mit relativ geringem Aufwand eine große Anzahl von potentiellen Therapeutika zu testen. Auf der Suche nach geeigneten Verbindungen zur Inaktivierung von Entwicklungsstadien wurden 71 Stoffe an infizierten HCT-8-Zellen getestet (ARMSON et al. 1999a,b).

Das derzeit vorhandene Modell zur In-vitro-Kultivierung von Kryptosporidien stellt eine sinnvolle Hilfe in der Testung von potentiellen Therapeutika, Desinfektionsmitteln und in der Erforschung von biologischen Charakteristika (Genexpression, Proteinbiochemie) dar (WOODS et al. 1995, ARROWOOD et al. 2002). Das Verfahren besitzt auch eine höhere Sensitivität als andere Vitalitätsassays (CHAURET et al. 2001).

2.7.4.1 Exzystierungshilfen

Voraussetzung für eine erfolgreiche In-Vitro-Kultivierung ist die Exzystierung von vitalen Sporozoiten. Der Mechanismus, der diesen wichtigen Vorgang auslöst, ist noch nicht genau bekannt; es wird jedoch vermutet, dass proteolytische Enzyme der Sporozoiten dafür verantwortlich sind und/oder äußere chemische oder physikalische Faktoren die Nahtstelle der Oozystenwand auflösen (HIJJAWI 2006).

Die meistverwendeten Exzystierungshilfen sind Gallensalze (v. a. Natriumtaurocholat) und Natriumhypochlorit. Beide Substanzen reagieren mit der Oozystenwand und scheinen so die Exzystierung der Sporozoiten zu begünstigen. Oozysten, die nicht vorbehandelt wurden, exzystieren ebenfalls, jedoch zu einem wesentlich geringeren Prozentsatz (FAYER et al. 1984, CURRENT u. GARCIA 1991, UPTON et al. 1994). SIMMONS und SOBSEY (2003) testeten verschiedene Konzentrationen von Natriumtaurocholat an verschiedenen Zelllinien und fanden heraus, dass Konzentrationen über 0,5 % in RPMI-1640 die Zellen schädigen. Natriumtaurocholat in Konzentrationen von 0,375 % hatte keinen negativen Einfluss auf die Vitalität von HCT- und MDCK-Zellkulturen und führte bei einer Inkubation von zwei Stunden zu einer signifikanten Steigerung der Exzystierungsrate der Oozysten (GOLD et al. 2001). Ein positiver Effekt von Galle auf die Infektionsrate von *C. parvum in vitro* wurde beschrieben, jedoch waren die Ergebnisse nicht verlässlich reproduzierbar (VERDON et al. 1997).

2.7.4.2 Alter der verwendeten Oozysten

Bei der Einsaat in die Zellkultur sollten die Oozysten jünger als 3 Monate sein (FLANIGAN et al. 1991, SLIFKO et al. 1998 u.1999, HIJAWI et al. 2001, SIMMONS et al. 2003). Mit zunehmendem Alter der Oozysten sinkt deren Exzystierungsrate (UPTON et al. 1994, SLIFKO et al. 1999).

Bei der Aufbewahrung der Oozysten im Kot unter Zusatz von Kaliumdichromat (5 % wt/vol) bei 4 -8 °C behalten die Parasiten ihre Infektiosität über eine längere Zeit (>6 Monate) (ARROWOOD 2002). TZIPORI und WIDMER (2000) halten die begrenzte Vitalität der Oozysten für ein großes Hindernis bei der Aufklärung von genetischen Charakteristika und Untersuchungen zu Infektiosität, Wirtsspezifität und Virulenz, da vitale Oozysten, die wiederholte Tierpassagen erfordern, genetisch verändert sein könnten.

2.7.4.3 Auswertung infizierter Zellkulturen

2.7.4.3.1 Färbungen

Für den Nachweis einer erfolgten Infektion in der Zellkultur sowie die Quantifizierung einzelner Entwicklungsstadien wurden verschiedene Färbungen wie die Giemsa-, Papanicolaou-, Acid-fast- und die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung getestet und zum Nachweis einer erfolgten Infektion angewendet (ROSALES et al. 1993, LAWTON et al. 1997). Einige Autoren bevorzugen die HE-Färbung, da sich die Entwicklungsstadien mit dieser Methode sicherer von den Zellen unterscheiden ließen, als dies bei den im Vergleich dazu getesteten Färbungen möglich war (FLANIGAN et al.1991, ARROWOOD et al. 2002).

2.7.4.3.2 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopische Auswertung infizierter Zellen liefert vor allem bei der morphologischen Analyse einzelner Entwicklungsstadien, aber auch zur Erforschung der Erreger-Wirts-Interaktion, wertvolle Ergebnisse. Die Präparation der Schnitte ist aufwändig und das Verfahren für eine quantitative Auswertung von Zellkulturen nicht geeignet (LUMB et al. 1988, FLANIGAN et al. 1991, HAMER et al. 1994, LAWTON et al. 1996).

2.7.4.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Eine Methode von hoher Spezifität zum Nachweis von *C. parvum* in der Zellkultur, aber auch in natürlichen Gewebeproben (JENKINS et al. 1998b), stellt die PCR dar. Verschiedene Arbeitsprotokolle beschreiben die Amplifikation von DNA, welche abhängig vom gewählten Abschnitt den spezifischen Nachweis von *C. parvum* liefern sollen (MORGAN et al. 1998, PETRY et al. 1998). Für niedrige Infektionsdosen (10^1 - 10^2) ist die PCR jedoch weniger verlässlich als die Immunfluoreszenz (ROCHELLE et al. 1997, JOACHIM et al. 2003a). Demgegenüber stellt die Realtime-PCR ein hoch sensitives und leistungsfähiges Verfahren dar, dass für den quantitativen Nachweis von *C. parvum in vitro* und *in vivo* eingesetzt werden kann (HIGGINS et al. 2001, MACDONALD et al. 2002, CAI et al. 2005, GODIWALA et al. 2006).

2.7.4.3.4 Immunfluoreszenz und Lumineszenz

Die Detektion intrazellulärer Parasitenstadien mittels fluoreszeingekoppelter Antikörper wurde in verschiedenen Arbeiten beschrieben (VERDON et al. 1997, SLIFKO et al. 1999, ROCHELLE et al. 2002). Während anfänglich polyklonale Antikörper aus hyperimmunisierten Tieren (Pferd, Ratte) im Labor hergestellt werden mussten (FAVENNEC et al. 1994, GARGALA et al. 1999), sind heute verschiedene Antikörper, konjugiert und unkonjugiert, kommerziell erhältlich. Diese Antikörper reagieren laut Herstellerangaben alle mit den Epitopen von Sporoziten sowie intrazellulären Entwicklungsstadien in der Zellkultur (GUT et al. 1991, SLIFKO et al. 1997). Die Kreuzreaktion zwischen den Epitopen von Sporoziten und anderen Entwicklungsstadien (Merozoiten und Gametozyten) beobachteten auch CAMERO et al. (1999) bei der Herstellung von monoklonalen Antikörpern über Maushybridomzelllinien. Verglichen mit der Giemsa-Färbung liefert der IFAT mehr intrazelluläre Stadien pro Sichtfeld und lässt diese bedingt durch den erhöhten Kontrast deutlicher sichtbar werden (DENG and CLIVER 1998). Um die Hintergrundlumineszenz weiter zu reduzieren sowie unspezifische Bindungsreaktionen der Antikörper zu verhindern, empfiehlt es sich, der Antikörperverdünnung bovines Serumalbumin (1%) zuzufügen (RODGERS 1995, PUECH et al. 2001).

Eine Einzeloozysteninfektion führte nach 24 h Inkubation zu keinem Infektionsnachweis, die Verlängerung der Inkubationszeit auf 48 h erzielte 0-63 Foci pro Zellkultur (SLIFKO et al. 1997).

Bedingt durch die stattfindenden Autoinfektionen wird eine Quantifizierung größerer Inokulumdosen (10^4 - 10^5) bei längeren Inkubationszeiten (48 h) immer schwieriger. So lagen die Variationskoeffizienten nach 24 h Inkubation bei durchschnittlich 29,7 % und nach 48 h bei 98,3 %. Aus diesem Grund bedienten sich SLIFKO et al. (1998) in nachfolgenden Studien der MPN (most probable number)- Methode, einer statistischen Erfassung nach dem ja/nein-Prinzip. Nach dem Vergleich der verschiedenen Inkubationszeiten zieht SLIFKO et al. (1998) die Möglichkeit in Betracht, dass Exzystierung, Infektion und Vermehrung der Parasiten zeitlich nicht synchron verlaufen. In einem Vergleich von fünf verschiedenen Vitalitätstests (FDM, Exzystierung, DAPI/PI, Tierversuch) mit acht verschiedenen Oozystenchargen wurde gezeigt, dass die geschätzte Vitalität bei der Exzystierung, der Vitalfärbung und der Sporozoitenzählung signifikant höher war als die in der Zellkultur, die Ergebnisse aus dem Tierversuch aber denen der Zellkultur entsprachen. Auch die einzelnen Chargen unterschieden sich signifikant voneinander (SLIFKO et al. 1999).

Nach SLIFKO et al. (1997) sind Foci, die im IFAT an Zellkulturen dargestellt werden können, helle, apfelgrün leuchtende, runde bis ovoide Punkte unterschiedlichen Durchmessers (Tab. 2), welche sich gut vom schwarzen Hintergrund abheben und meist als Konglomerat von mehreren Foci (Cluster) eng nebeneinander liegen. Jeder einzelne Focus steht für ein intrazelluläres Entwicklungsstadium von *C. parvum*.

Tabelle 2: Beschreibung der intrazellulären Stadien von *C. parvum* nach SLIFKO et al. (1997)

<u>Inkubationszeit</u>	<u>Größe Foci (µm)</u>	<u>Entwicklungsstadium</u>
90 min.	2,4	Trophozoit
12 h	2,4-4,8	Meront Typ I
24 h	2,4-4,8	Meront Typ II
	3,0-3,5	Mikrogametozyt
	4,8-6,0	Makrogametozyt

Zur Detektion von *C. parvum* in MDCK-Zellkulturen wurden zwei dem IFAT ähnliche Verfahren entwickelt und getestet. Bei dem Chemiluminescence Immunoassay (CLIA) wird die von einem fluoreszenzmarkierten Antikörper abgegebene Lichtaktivität mittels eines Luminometers gemessen.

Die so ermittelten relative Lichteinheiten (RLU) korrelieren mit der Anzahl gebundener Antikörper in der Zellkultur und mit der Menge inokulierter Oozysten (YOU et al. 1996, YOU et al. 1998). Demgegenüber wird im Verfahren des Chemiluminescence Immunofocus Assay (CIFA) das abgegebene Lichtsignal der Foci auf einem lichtempfindlichen Film festgehalten. Auf den entwickelten Filmen waren die Foci als dunkle Punkte vor hellem Hintergrund zu sehen und in der Verdünnungsstufe 10^2 mit bloßem Auge zählbar (SIMMONS u. SOBSEY 2003).

DENG and CLIVER (1998) geben an, neu gebildete intrazelluläre Oozysten bereits nach 24 h p. i. gesehen zu haben. Die Infektion in diesen Versuchen erfolgte mit aufgereinigten Sporozoiten, der Nachweis der intrazellulären Parasiten wurde mittels IFAT durchgeführt. Die von den genannten Autoren verwendete Zelllinie BS-C-1 (green monkey kidney cells) unterscheidet sich von der in einem anderen Experiment verwendeten Human-Fetal-Lung-Zelllinie (HFL), in denen nach CURRENT and HEYNES (1984) erst 72 Stunden p. i. Oozysten gefunden wurden.

Quantifizierung der intrazellulären Parasiten

Die Anzahl der in einer Zellkultur gebildeten Entwicklungsstadien hängt neben dem Alter der Oozysten und dem Zelltyp auch von der Menge der eingesäten Parasiten und ihrer Kontaktzeit mit den Zellen ab. Ein Maximum an intrazellulären Entwicklungsstadien wird nach 18-24 h Inkubation erreicht. Inokulumdosis und Anzahl Entwicklungsstadien korrelieren eng miteinander (VERDON et al. 1997, JOACHIM et al. 2003). Wenn die Anzahl inokulierter Oozysten in der Zellkultur zu groß ist, kommt es jedoch zu Zellschädigungen und einer damit verbundenen Abnahme gemessener Entwicklungsstadien (UPTON 1997).

Neben den bereits beschriebenen Färbungen und Antikörpermarkierungen wurden eine Reihe unterschiedlicher Methoden zur Quantifizierung der Parasiten in der Zellkultur entwickelt.

Das einfachste Verfahren zur Auswertung infizierter Monolayer ist das Auszählen der gebildeten Entwicklungsstadien im Nomarski-Interferenz-Kontrastmikroskop bei 1000facher Vergrößerung (UPTON et al. 1994). Dabei wird ein Cluster von Entwicklungsstadien als ein infektiöser Focus betrachtet, weil man davon ausgeht, dass eng beieinander liegende Entwicklungsstadien alle das Produkt einer infektiösen Oozyste darstellen (ROCHELLE et al. 2001).

Ein weiterer Ansatz zum quantitativen Nachweis von *C. parvum* in der Zellkultur bedient sich der Messung des Metaboliten [H⁺]-Uracil, den Kokzidien und andere Organismen aus Uridin und Deoxyuridin bilden. Die Methode war jedoch nicht erfolgreich, da nur sehr geringe Mengen Uracil messbar waren. Dies stellt unter Umständen eine Besonderheit im Metabolismus von Kryptosporidien im Vergleich zu anderen Kokzidien dar (UPTON et al. 1991).

Eine Formel von AUGUSTINE (1980) ermöglicht die Auszählung der Entwicklungsstadien pro Quadratmillimeter Zellkultur: Stadien pro mm² = [(Summe Entwicklungsstadien aus 30 Sichtfeldern)/(KxPC)], wobei PC die durchschnittliche Konfluenz und K eine Konstante für die untersuchte Fläche ist. Die Formel, für Eimerien in der Zellkultur entwickelt, wurde auch erfolgreich auf die Kryptosporidien angewendet (ARROWOOD et al. 2002).

Neben dem Auszählen der Foci unter dem Fluoreszenzmikroskop (ECKERT 2001) bedienen sich einige Wissenschaftler des MPN-Verfahrens zur quantitativen Auswertung intrazellulärer Entwicklungsstadien (SLIFKO et al. 1998, 1999, SIMMONS u. SOBSEY 2003). Dieses Analyseverfahren basiert auf einer statistischen Annahme, welche nach Vorgabe der Oozystendosis und Anzahl positiver Zellkulturen mittels eines Rechenprogrammes die theoretische Anzahl Foci ermittelt. Über eine weitere Formel (MPN pro ml/mikroskopisch ermittelte Anzahl Oozysten pro Charge) kann die Infektiosität der Oozysten in Prozent ermittelt werden.

Die Identifikation der intrazellulären Stadien kann neben der Markierung mit Fluorochromen (FITC, TRITC, Phycoerythrin, Texas Red) auch auf enzymvermitteltem Weg ablaufen (Chemiluminescence Assay). Die enzymatische Umsetzung (Oxidation) von Chromogenen und Substrat (Streptavidin) kann in einem Luminometer als RLU gemessen werden und umgeht so eine zeitaufwändige Mikroskopie. Das Verfahren ist spezifisch und relativ sensitiv (2 x 10³ Oozysten) und kann zur Inaktivitätsmessung angewendet werden (YOU et al. 1996, SIMMONS u. SOBSEY 2003).

Mit einem Mikrotiter-ELISA kann über die optische Dichte die Anzahl der intrazellulären Stadien gemessen werden und so die Inokulationsmenge an infektiösen Oozysten bestimmt werden (WOODS et al. 1995).

2.8 Digitale Bildanalyse

In der Tiermedizin findet die computergestützte Bildanalyse zur morphologischen Untersuchung von Organstrukturen ihre Anwendung. Ein Beispiel dafür ist die Erforschung des Differenzierungsprozesses im Bereich der Wachstumsplatte an den Gelenken von Puten. Dabei wurden gefärbte Paraffinschnittpräparate mikroskopisch beurteilt und mithilfe der Bildanalysesoftware QUANTIMED Q 500C (LEICA CAMBRIDGE Ltd.) vermessen (KORFMANN 2004). In einer anderen Arbeit kam das Bildverarbeitungsprogramm LUCIA M bei der Vermessung von Zellkernen aus Herzmuskelzellen zum Einsatz (STARKE 1997). Die bekannteste Bildanalysesoftware ANALYSIS (Firma SIS, Münster, Westfalen) wurde für die halbautomatische und automatisierte Auswertung von histologischen Plazentaschnitten von Schafen verwendet. Diese konnten nicht in jedem Fall die interaktive Messung ersetzen, da sie nur bei eindeutigen Graustufen und kontrastreichen Bildern anwendbar sind (SCHWICKERT 2002).

Die Bildanalyse kann auch zur Auswertung von bewegten Bildern eingesetzt werden. Anhand von Videoaufnahmen wurde mit Hilfe des Bildanalyseystems „DOTFINDER“ (Dotfinder 8bw, Jander Videometric Products, Weiterstadt) die räumliche Verteilung von Laborratten auf der Käfigfläche ermittelt. Über eine „Screen-Maschine“ (FAST Electronic GmbH) wurde das Videobild auf den Computermonitor übertragen. Die Käfigfläche wurde virtuell in entsprechende Felder unterteilt. Ein Programmpaket „ZAMPANO“ (Zeitreihen-Analysen, Messwertlisten-Processing, Ausführung nutzungsgesteuerter Operationen von J. Wolffgramm, Freie Universität Berlin) misst die Zeitspanne zwischen dem Überschreiten von zwei Feldgrenzen und ordnet die Aufenthaltszeit in Sekunden dem jeweiligen Feld zu. So erhält man die Ortskoordinatenzeit, aus denen man erkennen kann, wann welches Feld betreten und verlassen wurde. Zusätzlich wurde anhand von Käfigfotografien die Verteilung von Kotboli, Harn, Zellstoff und Futterpellets bestimmt. Auf jede Fotografie wurde eine passende Schablone mit Felderaufteilung gelegt, so dass die Kotboli pro Feld ausgezählt werden konnten (DOERING 1999).

Eine halbautomatische Messroutine (Quips, LEICA GmbH, Bensheim) ermöglichte die interaktive Klassifizierung von *Eimeria* spp. vom Schwein (DAUGSCHIES et al. 1999). In einem ersten interaktiven Schritt wurden morphologische Daten wie Länge, Breite, Form und Farbe der Oozyste erfasst (Quantimet 500 und QWin, LEICA GmbH, Bensheim).

Damit die Messroutine die verschiedenen Spezies differenzieren konnte, wurden anhand von morphologischen Daten Gruppen gebildet, z. B. G 1 – G 3, und von DAUGSCHIES et al. (1999) Formeln erstellt, die die Zugehörigkeit einzelner Spezies zu einer Gruppe errechnet. In über 97 % der Fälle konnte so eine korrekte Zuordnung erfolgen.

2.9 Inaktivierung von *C. parvum*-Oozysten

2.9.1 Physikalische Methoden

Die massiven Kryptosporidioseausbrüche der letzten Jahre haben die Bemühungen, geeignete Inaktivierungsverfahren für Oozysten zu finden, forciert. Zahlreiche Arbeiten beschäftigen sich mit der temperaturabhängigen Vitalität dieser Dauerstadien. Schnelles Einfrieren führt zum Abtöten der Oozysten, im Gegensatz zum langsamen Einfrieren, mit dem Oozysten in der Umwelt natürlicherweise konfrontiert werden (ROBERTSON et al. 1992). Experimentell infizierte Mäuse zeigten keine Entwicklungsstadien in den Epithelzellen des Darmes, wenn die Oozysten für 1 h bei -70 °C eingefroren waren. Bei Temperaturen bis -15 °C blieb jedoch ein Teil der Oozysten infektiös (FAYER et al. 1996b).

Kryptosporidien sind gegenüber hohen Temperaturen, die kurz auf sie einwirken, sehr resistent. Erst Temperaturen ab 72,4 °C über 1 min. inaktivierten die Oozysten so, dass sie nicht mehr für Mäuse infektiös waren (FAYER 1996b). Um die Überlebenszeit der Parasiten zu testen, wurden Oozysten bei verschiedenen Temperaturen (-20 °C bis 23 °C) über 14 Tage in gefiltertem Flusswasser gelagert und ein In-vitro-Modell basierend auf HCT-8-Zellen und Immunfluoreszenz eingesetzt. Die Infektiosität, gemessen als fluoreszierende Foci, nahm bei allen Proben im Verlauf der Studie kontinuierlich ab. Nach 14 Tagen war das Flusswasser, dass bei -20° C und 21-23 °C gelagert wurde, frei von infektiösen Dauerstadien (POKORNY et al. 2002).

Zur thermischen Inaktivierung von Oozysten in Flüssigmist (Gülle) wurden verschiedene Methoden erprobt. Beim Verfahren der aerob-thermophilen Stabilisierung wird in den Bioreaktor Luftsauerstoff eingetragen. Die dadurch erhöhte Stoffwechselaktivität bedingt den Abbau der organischen Substanzen. Gleichzeitig wird der Flüssigmist bis über 68 °C erhitzt und verbleibt für mindestens 48 Stunden in der Anlage.

Die parasitologische Voruntersuchung konnte zeigen, dass mit Durchlaufen einer 12-stündigen Aufheizphase (35 °C - 45 °C) und dem Erreichen der Endtemperatur von 55 °C, die über mindestens 12 Stunden gehalten wird, zuverlässig alle Kryptosporidien abgetötet werden. Die eintägige Behandlung von Gülle ausschließlich im mesophilen Biogasfermenter (38 °C) führt nicht zu einer ausreichenden Hygienisierung, da der überwiegende Teil der Dauerstadien vital bleibt. Auch eine einphasige Hochtemperaturbehandlung im thermophilen Biogasfermenter bei 48 °C – 58 °C führt nur zu einer Reduzierung der Oozysten um zwei bis drei Zehnerpotenzen. Den Prozess der Pasteurisierung (65 °C -70 °C) mit einer einstündigen Einwirkzeit ergaben keinen Hinweis auf das Vorhandensein von vitalen Kryptosporidien (OECHSNER et al. 2003).

Eine Anwendung für die thermische Inaktivierung von Oozysten ist die Pasteurisierung von Apfelsaft bei 70 bis 71 °C. Bei einer Einwirkdauer von nur 5 sec wurde eine Inaktivierung von 99,999 % der Oozysten erreicht, gemessen in einem Vitalitätsassay mittels Zellkultur und Immunfluoreszenztechnik (DENG u. CLIVER 2001). Milch und Trinkwasser wurden mit 10^8 Oozysten pro Liter experimentell kontaminiert und anschließend bei 71,7 °C für 15 Sekunden pasteurisiert. Auf diese Weise behandeltes Material war nicht mehr infektiös für Mäuse (HARP et al. 1996).

Um möglicherweise in Fruchtsäften enthaltene Oozysten auf physikalischem Weg unschädlich zu machen, wurde die Wirkung von hydrostatischem Druck (HPP) auf die Parasiten untersucht. Dabei konnte ein Druck von $5,5 \times 10^8$ Pa über 60 sec. eine Inaktivierungsrate von > 99,9 % erreichen. Diese Methode ermöglicht es, die Nachteile von großer Hitzeeinwirkung auf Säfte zu umgehen (SLIFKO et al. 2000a). Inaktivierung mit Gamma-Strahlung (400 Gy) verhinderte eine experimentelle Infektion mit 10^5 Oozysten bei 21 Tage alten Kälbern (JENKINS et al. 2004). Die Inaktivierung von *C. parvum* in frischem Apfelsaft gelang ebenfalls durch die Anwendung von $14,32 \text{ mJ/cm}^2$ UV-Strahlung (HANES et al. 2002). Auch andere Autoren zählen die UV-Strahlung zu den Inaktivierungsverfahren, die alternativ zur chemischen Desinfektion von Trinkwasser eingesetzt werden könnte (CRAIG et al. 2001).

Besonders empfindlich sind Oozysten gegen Austrocknung. Eine Lufttrocknung bei Raumtemperatur für nur 1 Stunde führte zu einer Inaktivierung von 80 % der Oozysten (ROBERTSON et al. 1992).

2.9.2 Chemische Methoden

C. parvum-Oozysten sind gegen herkömmliche Desinfektionsmittel wie Chlor und Monochloramin resistent (CAMPBELL et al. 1982, TZIPORI 1983, KORICH et al. 1990). Ebenso unzureichend ist die Wirkung von krankenhausblichen Desinfektionsmitteln wie Polyvinylpyrrolidon-Jod (10 %), Phenol (10 %) und Glutaraldehyd (2,5 %) (WILSON u. MARGOLIN 1999). Chlordioxid (ClO_2) wirkt stärker oxidierend als freies Chlor und zeigt in Zellkulturversuchen eine Inaktivierung von *C. parvum*-Oozysten um 2 log-Stufen. Bei der Untersuchung der Resistenz gegen Inaktivierung mit Chlordioxid gab es signifikante Unterschiede zwischen Oozysten aus verschiedenen Quellen (CHAURET et al. 2001).

Eine weitere Inaktivierungsmethode vor allem zur Trinkwasserhygienisierung ist die Ozonanwendung. Ozon produziert freie Radikale, die die Oozystenwand und die DNA angreifen. Der Erfolg einer gekoppelten Behandlung mit Monochloraminen und Ozon steht in direktem Zusammenhang zur Temperatur; je höher die Umgebungstemperatur, um so größer die Inaktivierungsrate der Oozysten (KORICH et al. 1990, DRIEDGER et al. 2001). In zahlreichen Modellen wurde für die Ozonbehandlung eine *Ct*-Gleichung erstellt, welche die Inaktivierung von Oozysten durch chemische Desinfektion beschreibt (C = Konzentration von Ozon in mg/l \times t = Zeit in Minuten). Ziel ist es, eine Inaktivierung um mindestens 2 log-Stufen zu erreichen, abhängig vom Grad der Kontamination des Trinkwassers.

Der Zusatz von 0,025 % Wasserstoffperoxid zu verschiedenen Säften reduzierte die Entwicklung von Kryptosporidien in Zellkulturen um über 5 log-Stufen. Dieses Verfahren allein oder in Kombination mit anderen Inaktivierungsverfahren könnte unpasteurisierte Säfte dekontaminieren (KNIEL et al. 2003). Dem widersprechen Ergebnisse einer Studie mit Wasserstoffperoxid in Konzentrationen von 6 bzw. 7,5 %, welche eine mäßige Wirkung über 3 log-Stufen gezeigt hatten (BARBEE et al. 1999).

Ammoniak (NH_3) in Konzentrationen von 0,007-0,148 Mol ergab signifikante Inaktivierungsraten von *C. parvum*-Oozysten, gemessen mittels DAPI/PI-Färbung und Exzystierung. Da Ammoniak als natürliches Abbauprodukt von Harnstoff in der Rinderhaltung anfällt, könnte diese Verbindung einen Weg der Prävention oder der natürlichen Bekämpfung des Parasiten darstellen (JENKINS et al. 1998a).

Gasförmiges Ammoniak, Ethylenoxid und Methylbromid werden ebenfalls als potentielle Desinfektionsmittel für Boden, Räume, Werkzeuge und Instrumente diskutiert, nachdem damit behandelte Oozysten keine Infektion in BALB-Mäusen auslösen konnten (FAYER et al. 1996a).

3 Tiere, Material und Methoden

3.1 Materialliste

3.1.1 Geräte

Sterilwerkbank HERAsafe KS12 (Kendro, Hanau)

Tiefgefrierschrank -80°C (Kendro, Hanau)

Begasbarer Brutschrank APT Line CB (Binder, Tuttlingen)

Metaboliekäfig mit getrenntem Kot-Harn-Auffangbehälter

Mikroskop (Leica DMLB) mit Phasenkontrast, UV-Lampe, Filter L5 (491 nm-515 nm) von Leica Microsystems GmbH, Bensheim

PC (Leica Q 500IW) von Leica Microsystems GmbH, Bensheim

Software (Leica QWin Standard V.3) von Leica Microsystems GmbH, Bensheim

Digitalkamera (Leica DC 200) von Leica Microsystems GmbH, Bensheim

Zentrifuge (Megafuge 2.0R, Heraeus, Hanau)

Zentrifuge (Mikro 20, Hettich GmbH, Tuttlingen)

Zentrifuge (Rotina 46, Hettich GmbH, Tuttlingen)

Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg)

Wasserbad W 270 (Mettler, Schwabach)

Vortexer (REAX top, Heidolph, Schwabach)

Absaugtechnik für Medien (VacuSafe, Integra Biosciences, Fernwald)

Magnetrührer (MR 3001, Heidolph, Schwabach)

Zählkammer nach Neubauer (Heiland, Hamburg)

Handzähler (Roth, Karlsruhe)

Zeitmesser

Absaugtechnik-Flaschen 1l (Roth, Karlsruhe)

Sieb mit Maschenweite 250 µm (Fritsch, Idor-Oberstein)

Tränkeeimer

Eimer zum Auffangen von Kot/Harn

Messbecher 500 ml

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser 24 x 60 mm (Roth, Karlsruhe)
Objektträger 26 x 76 cm (Roth, Karlsruhe)
Plastikzentrifugenröhrchen 10 ml, 15 ml, 50 ml (TPP-Products, Trasadingen, Schweiz)
Zellkulturflasche 75 cm² Typ W270 (TPP-Products, Trasadingen, Schweiz)
Kryoröhrchen (TPP-Products, Trasadingen, Schweiz)
1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen (Roth, Karlsruhe)
Kolbenhubpipetten PreCision[®] 100µl - 1000µl (Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf)
Pipettenspitzen (Roth, Karlsruhe)
Einmalhandschuhe (Roth, Karlsruhe)
Glaspasteurpipetten (Roth, Karlsruhe)
Pipettierhilfe Pipetus-akku (Hirschman Laborgeräte, Eberstadt)
Labtek-chamber Slides[®] 8 wells (Nunc, Worms)
Glasküvette (Heiland, Hamburg)
Styroporschachtel
Skalpell, Pinzette
Dunkelbox (kleine Pappschachtel)

3.1.3 Reagenzien

Nagellack, klar
Methanol , 70 % (Roth, Karlsruhe)
anti-Maus-IgG-FITC-Antikörper (Sigma, Taufkirchen)
Fluoreszenzeinbettmittel (Prof.Dr.U. Mackenstedt, Universität Hohenheim, Institut für Zoologie, Fachgebiet Parasitologie)
4b4-Antikörper (Prof.Dr.U. Mackenstedt, Universität Hohenheim, Institut für Zoologie, Fachgebiet Parasitologie)
Polyklonale Antikörper (A600 FLR 20x, Waterborne, New Orleans, LA, USA)
HCT-8 Zellkulturen (Dr. Petry, Medizinische Mikrobiologie, Universität Mainz)
Natriumtaurocholat (Sigma, Taufkirchen)
Trypsin-10fach Konzentrat (PAA, Cölbe)
Accutase[®] (PAA, Cölbe)
Essigsäure, 1 % in Wasser (Applichem, Münster)
Natriumpyruvat, 100mM Lösung (PAA, Cölbe)
Ziegennormalserum (NGS) (Sigma, Taufkirchen)

Fötale Kälberserum (FKS) (PAA, Cölbe)

N₂ (liq) (Messer, Griesheim)

Dimethylsulfoxid (DMSO) (Roth, Karlsruhe)

RPMI-1640, Rohmedium (PAA, Cölbe)

Ethanol (vergällt, 70 %), Bundesmonopolverwaltung für Brandwein Wittenberg

Leitungswasser

Destilliertes Wasser

Gentamycin, 10 mg/ml (PAA, Cölbe)

Flockeneis (eigene Herstellung)

Infektionsmaterial, Oozysten

Diethylether (Roth, Karlsruhe)

Immersionsöl

Karbolfuchsin (Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig)

1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octane (DABCO) (Sigma, Taufkirchen)

Natriumhypochlorit, 12% freies Chlor (Roth, Karlsruhe)

Verdünnungspuffer (PBS mit 1 % BSA, 10% NGS)

Überschichtungspuffer (9000 mg Glycerin, 800 mg PBS, 200 mg

1,4 Diazabicyclo(2.2.2)octane (DABCO)

Gesättigte Kochsalzlösung (Dichte 1,18-1,24)

PBS, steril (10fach konzentriert: 80g NaCl, 2g KCl, 14,4g Na₂HPO₄, 2,4g KH₂PO₄, ad 1l destilliertes Wasser, pH 7,4 , vor Gebrauch 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnen)

Penicillin-Streptomycin, 100fach Konzentrat: 10000U/ml Penicillin G, 10 mg/ml Streptomycin in 0,9 % Natriumchloridlösung (PAA, Cölbe)

3.2 Passagierung von *C. parvum* –Oozysten im Kalb

Ziel dieses Arbeitsschrittes ist die Bereitstellung möglichst vieler Oozysten des jeweiligen Stammes, mit denen nach deren Aufreinigung die Zellkulturen infiziert werden können. Die experimentelle Infektion eines männlichen Kalbes, aufgestellt in einem Metaboliekäfig empfiehlt sich, da es das getrennte Auffangen von Kot und Harn ermöglicht. Am 4. Tag nach der Aufstallung wurde das Kalb mit 1×10^7 Oozysten, welche aus einer aufgereinigten Kotprobe eines Aufzuchtbetriebes stammten, *per os* infiziert. Von Beginn der Ausscheidung an wurde der Kot aufgefangen und bis zur Aufreinigung kühl gestellt. Um den Gesundheitsstatus des Kalbes kontrollieren zu können, wurde es morgens und abends einer allgemeinen klinischen Untersuchung unterzogen. Außerdem fand eine tägliche Überprüfung des Kotes auf Kryptosporidien-Oozysten mittels Heine-Färbung (siehe Kapitel 3.3) statt.

3.3 Nachweis von Oozysten im Kot mittels Heine-Färbung

Ein einfaches und Zeit sparendes Verfahren zum Nachweis von Oozysten im Kot ist die Färbung nach HEINE (1982) mittels Karbolfuchsin. Dafür wurde von dem zu untersuchenden Kot etwas Material auf einen Objektträger (26 x 76 cm) verbracht und mit einem Tropfen Karbolfuchsin vermischt. Ein weiterer Objektträger wurde aufgelegt und mit ihm der Kot auf dem ersten Objektträger verrieben, sodass ein dünner gleichmäßiger Ausstrich entstand. Der erste Objektträger wurde luftgetrocknet, der zweite verworfen. Zur mikroskopischen Untersuchung wurde auf das getrocknete Präparat ein Tropfen Immersionsöl gegeben und ein Deckgläschen (24 x 60 cm) aufgelegt. Bei 400-facher Vergrößerung stellten sich die Oozysten als helle, lichtbrechende, kreisrunde Gebilde in einem insgesamt rosa angefärbten Hintergrund dar (Abb. 2).

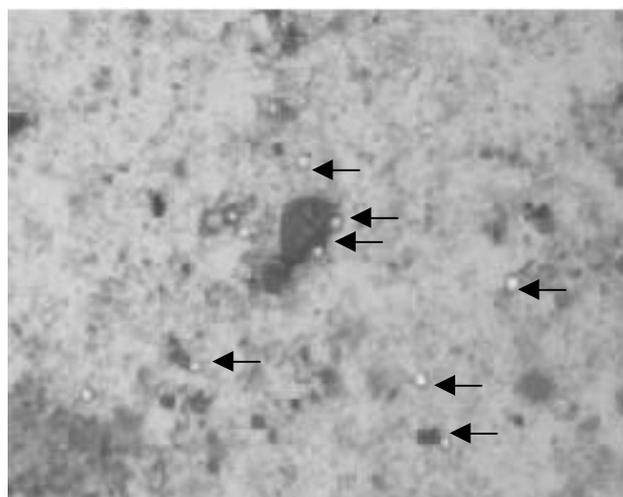


Abbildung 2: Oozysten (Pfeile) in der Heine-Färbung

3.4 Aufreinigung der Oozysten und Isolatbestimmung

Für die eigenen Versuche wurden insgesamt drei Feldisolate, welche aus drei verschiedenen Betrieben (I - III) stammten, verwendet. Von allen drei Feldisolaten wurden je zwei verschiedene DNA-Sequenzen (295 bp aus dem 18si-Gen der ribosomalen DNA (MORGAN et al. 1999) und 650 bp aus Cp3.4 Gen; Glykoprotein aus Oozystenwand (STURMAUM et al. 2003) zur Genotypisierung am IZKF¹⁾ untersucht.

Das von NAJDROWSKI (2006) beschriebene Verfahren zur Oozystenaufreinigung aus dem Kot wurde verwendet. Im ersten Schritt wurden die Oozysten durch Abzentrifugieren der flüssigen Kotbestandteile in einem Sediment angereichert. Für die weitere Reinigung der Parasiten wurden diese zusammen mit Diethylether vermischt und nach erneuter Zentrifugation deren Verbleib im Sediment mikroskopisch nachgewiesen. Der Ether wurde in drei Waschschritten mit Wasser entfernt und die Oozystensuspension im Verhältnis 20:1 mit Natriumhypochloritlösung (Chlorbleiche) verdünnt und auf Flockeneis inkubiert. Die durch Zentrifugation wiedergewonnenen Oozysten wurden in drei Waschschritten von Natriumhypochloritresten gereinigt und anschließend in einer gesättigten Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Nach der Überschichtung mit kaltem Leitungswasser sammelten sich die Oozysten in einer Phase zwischen beiden Flüssigkeiten (Interphase) und konnten abpipettiert werden. Vor der Lagerung der Oozysten im Kühlschrank (4 °C) wurden der Suspension 2 % Penicillin-Streptomycin (100 U/ml Penicillin G, 0,1 mg/ml Streptomycin in 0,9 % Natriumchloridlösung) zugefügt.

3.5 Zählen der Oozysten zum Einstellen der Infektionsdosis

Die Oozystensuspension wurde auf dem Vortexer gut gemischt. Zum Befüllen der Neubauer-Zählkammer wurden ca. 10 µl Oozystensuspension vorsichtig am Rand des Deckgläschens einpipettiert. Die Auszählung aller vier Eckquadrate erfolgte unter dem Lichtmikroskop bei 400-facher Vergrößerung, und die Berechnung der Menge Oozysten/ml Suspension wurde anhand einer Formel ermittelt:

Summe aller Eckquadrate : 4 = durchschnittliche Anzahl Oozysten eines Eckquadrates

Durchschnittliche Anzahl der Oozysten pro Eckquadrat x 10.000= Oozysten/ml

¹⁾ Interdisziplinäres Zentrum für klinische Forschung der Universität Leipzig

3.6 Bestimmung der Exzystierungsrate

Eine Million Oozysten wurden in 50 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) suspendiert und 10 min bei 2500 x g zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in 1 ml Exzystierungsflüssigkeit (0,4 % (w/v) Natriumtaurocholat in RPMI-Zellkulturmedium, steril) überführt und das Röhrchen im Wasserbad bei 37 °C für 90 min inkubiert. Anschließend wurde die Probe auf Eis gestellt, ein Tropfen auf einen Objektträger pipettiert und bei 400-facher Vergrößerung im Phasenkontrast mikroskopisch ausgewertet, indem in jedem Sichtfeld alle intakten Oozysten und Oozystenhüllen gezählt wurden (zusammen mindestens 100).

Die Berechnung der prozentualen Exzystierung erfolgte nach der Formel:

$$\text{Exzystierung (\%)} = \frac{\text{Anzahl Oozystenhüllen}}{\text{Anzahl Oozystenhüllen} + \text{Anzahl intakte Oozysten}} * 100$$

3.7 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einfrieren von HCT-8 Zellen

Die Zellen wurden wie unter 3.10 beschrieben trypsinisiert und bei 96 x g für 5 min. zentrifugiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde das Pellet in PBS aufgenommen und in der Neubauer-Zählkammer deren Dichte ermittelt. Zum Einfrieren wurden die Zellen auf 3-5 x 10⁶ Zellen/Kryoröhrchen eingestellt, und 900 µl der Zellsuspension wurden zusammen mit 100 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) in Kryoröhrchen pipettiert und durch Schwenken gemischt. Die Röhrchen wurden in einer Styroporschachtel für 24 h bei - 80 °C eingefroren und danach in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff überführt.

Auftauen der HCT-8 Zellen

Die Kryoröhrchen wurden im Wasserbad oder bei Raumtemperatur aufgetaut, abgetrocknet und mit 70 %igem vergälltem Ethanol abgerieben. Unter der Sterilwerkbank wurde die Zellsuspension in 9 ml RPMI-Medium resuspendiert und durch Schwenken vermischt. Um das Gefriermedium zu entfernen, wurden die Zellen 5 min bei 150 x g zentrifugiert und der Überstand absaugt. Das Zellpellet wurde erneut in RPMI-Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt. Das Wachstum der Zellen wurde 24 h nach Inkubation im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ mikroskopisch kontrolliert.

3.8 Zählen von HCT-8 Zellen

Die Zellen wurden wie unter 3.10 beschrieben passagiert und das Medium bei $96 \times g$ für 5 min. zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 1 ml RPMI-Medium gut suspendiert und davon 10 μ l zusammen mit 90 μ l Essigsäure (1 %) in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Auszählung aller vier Eckquadrate erfolgte unter dem Lichtmikroskop bei 400-facher Vergrößerung, und die Berechnung der Zellen pro ml erfolgte nach der Formel:

Summe aller Eckquadrate : 4 = durchschnittliche Anzahl Zellen eines Eckquadrates

Durchschnittliche Anzahl der Zellen pro Eckquadrat $\times 10.000 =$ Zellen/ml

3.9 Der *Cryptosporidium*-Zellkulturassay im Überblick

Der Ablauf des Zellkulturassays ist in Abbildung 3 dargestellt. Die einzelnen Schritte werden in den folgenden Kapiteln behandelt.

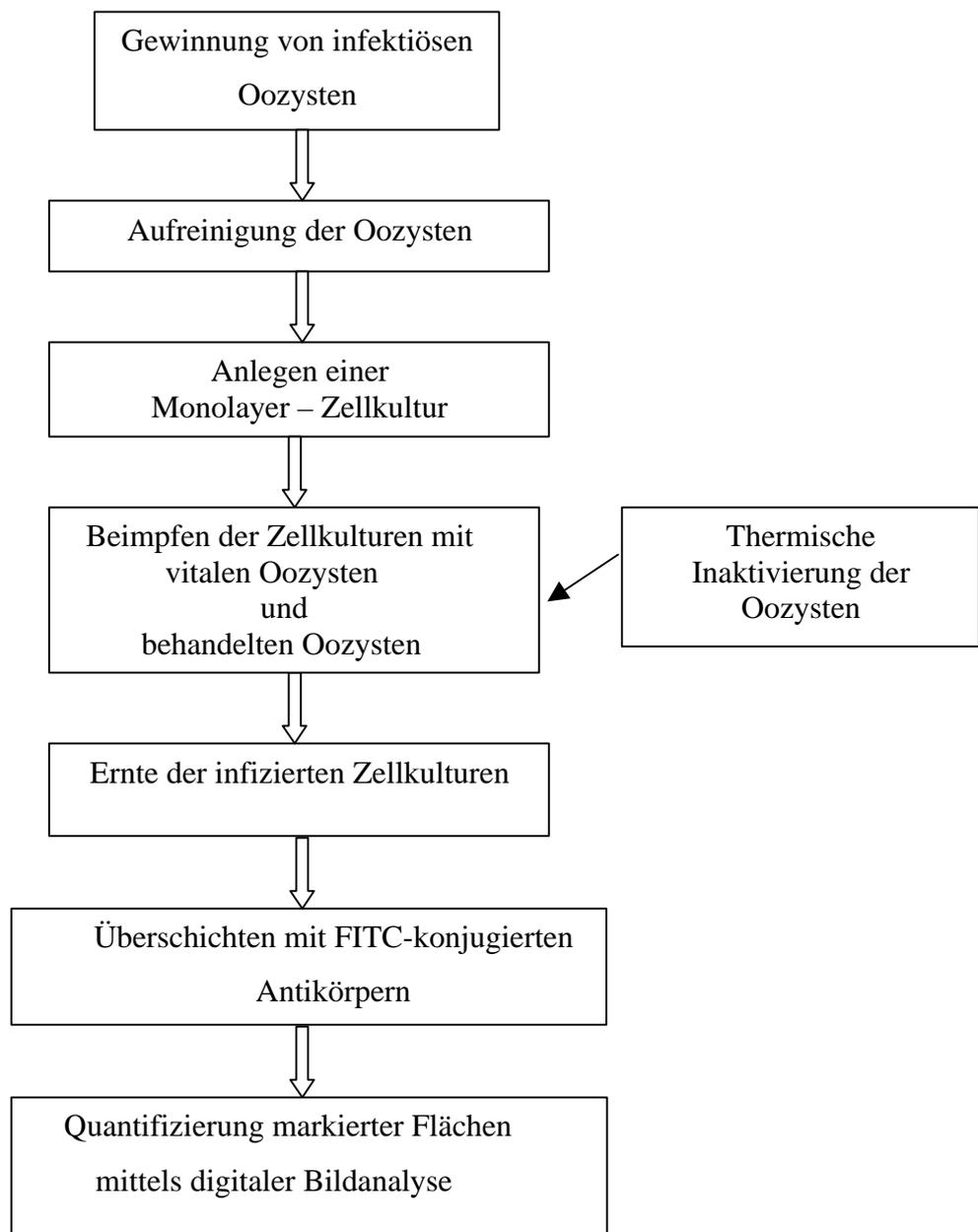


Abbildung 3: Fließdiagramm des *Cryptosporidium*-Zellkulturassays

Folgende Parameter wurden für den Versuchsaufbau und die Auswertung festgelegt (Tab. 3):

Tabelle 3: Rahmenbedingungen des *Cryptosporidium*-Zellkulturassays

Parameter	
Alter der Oozysten	< 3 Monate
Exzystierungsrate	> 75 %
Anzahl eingesäter Oozysten	10^6 – 10^1
Inkubationsdauer der Kultur	24 h
Exzystierungshilfen	Natriumtaurocholat (0,4 %) für 1 h
verwendete Antikörper	A600 FLR oder 4b4 -AK
Vergrößerung (Objektiv)	400 fach
Kameraeinstellung-Belichtung	1 sec
Systemkonfiguration-Auflösung	1272 x 1016 Pixel (Höhe x Breite)
Messrahmen	ca. 84.000 μm^2
Kalibrierung	1 Pixel = 0,26 μm
Detektionsschwellwert	abhängig von Bildqualität (siehe 4.3.6)
Teilchenakzeptanzkriterien	2,0–15 μm Durchmesser

3.10 Anlegen der Zellkultur

RPMI –Arbeitsmedium

Für 500 ml Arbeitsmedium werden benötigt:

440 ml	RPMI-Grundmedium
50 ml	FKS
5 ml	Natriumpyruvat 1 mM (Stammlösung 1:100 in RPMI-Rohmedium verdünnt)
5 ml	Penicillin 100 U/ml + Streptomycin 0,1 mg/ml (Stammlösung 1:100 in RPMI-Rohmedium verdünnt)

Alle Zutaten wurden unter sterilen Bedingungen zusammengefügt und das resultierende Arbeitsmedium bei 4 °C max. 1 Woche gelagert.

Durchführung:

Anlegen einer HCT-8-Zellkultur in einer 75 cm² Zellkulturflasche

In eine Zellkulturflasche (75 cm²) wurden 15 ml auf Raumtemperatur erwärmtes RPMI-Arbeitsmedium und 1×10^6 HCT-8-Zellen pipettiert.

Die Beschriftung der Kulturflaschen enthielt neben dem Datum und dem Zelltyp auch die Anzahl der Passagen nach dem Auftauen der HCT-8-Zellen. Nach zwei Tagen wurde das Medium gewechselt und das Wachstum der Zellen mikroskopisch beurteilt.

Anlegen von HCT-8-Zellkulturen in Labtek-chamber Slides[®]

Unter der Sterilwerkbank wurden je 350 μ l Arbeitsmedium und 2×10^5 Zellen pro Vertiefung in die achtkammrigen Labtek-chamber Slides[®] (Abb. 4) vorgelegt. Nach einer Inkubationszeit von 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ hatte sich ein Monolayer gebildet, dessen Konfluenz ca. 80 % bis 90 % betrug. Die verwendeten Zellen wurden nicht öfter als 15 Passagen nach ihrem Auftauen verwendet, da es danach zu Ablösungen beim Ernten der infizierten Kulturen kam.

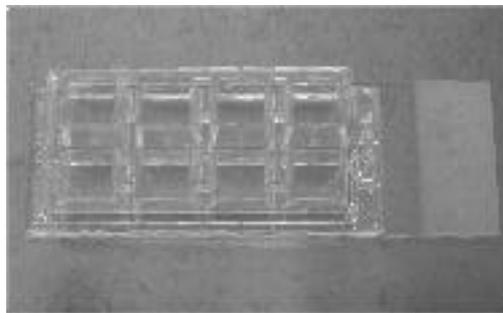


Abbildung 4: Labtek-chamber Slide[®]

3.11 Passage von HCT-8 Zellen

Alle zwei bis drei Tage, sobald die Zellen eine Konfluenz von 80 - 90 % erreicht hatten, wurde eine Passage durchgeführt. Nach dem Absaugen des alten Mediums aus der 75 cm² Zellkulturflasche wurden die Zellen zwei mal mit PBS gewaschen, indem 10 ml vorgewärmte (37 °C) PBS-Lösung in die Zellkulturflasche pipettiert, die Flasche kurz geschwenkt und das PBS wieder abgesaugt wurde. Das Ablösen des dichten Zellrasens erreichte man durch Aufbringen von 4 ml Accutase[®] oder Trypsin (10-faches Konzentrat 1:10 in PBS verdünnt) nach Inkubation im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂). Unter dem Mikroskop fand nach ca. 20 min eine Kontrolle des Ablöseprozesses statt, wobei sich dieser durch leichtes Schlagen gegen die Flasche beschleunigen ließ. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 6 ml warmem RPMI-Arbeitsmedium verdünnt und gleichzeitig durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren die Zellen voneinander gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt, wie unter 3.8 beschrieben gezählt und 1×10^6 Zellen in eine neue Zellkulturflasche zusammen mit 15 ml frischem Medium pipettiert. Am folgenden Tag wurde das Anwachsen der Zellen mikroskopisch beurteilt.

3.12 Infektion der Zellen

Die aus dem Kot aufgereinigten und in der Neubauer-Kammer gezählten Oozysten wurden in einer Verdünnungsreihe von 10^6 - 10^1 Oozysten pro 100 μ l in PBS resuspendiert. Unter der Sterilwerkbank wurden die HCT-8-Monolayer vor ihrer Infektion einmal mit PBS gewaschen und in jede Kammer 100 μ l Natriumtaurocholat (0,8 % in RPMI-Arbeitsmedium) pipettiert. Vor der Einsaat wurden die Oozysten für mindestens 5 sec auf dem Vortexer suspendiert. Anschließend wurden je 100 μ l auf die Zellkultur gegeben und die Zellkulturen nach dem gewünschten Schema infiziert. Nach Ablauf der einstündigen Inkubation wurden zur Verdünnung des Exzystierungsmittels 300 μ l RPMI-Arbeitsmedium zugegeben, und die infizierten Zellkulturen wurden für weitere 24 h im Brutschrank belassen. In einem Vorversuch wurde getestet, ob es unter dem Einfluss eines Schüttlers (Rotamax[®]) zu einer gleichmäßigeren Verteilung der Oozysten auf der Zellkultur kommt. Hierfür wurde das Labtek-chamber Slide[®] unmittelbar nach der Inokulation mit Oozysten für 5 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler kreisförmig bewegt.

3.13 Ernte infizierter Kulturen

Von den infizierten Zellkulturen wurde zunächst das Medium abgesaugt und durch zweimaliges Waschen mit PBS leere Oozystenhüllen, nichtexzystierte Oozysten und Zelldetritus entfernt.

Das Fixieren der Kulturen geschah nach vorsichtigem Abheben der Plastikaufsätze von den Labteks für eine Dauer von 10 min in einer Glasküvette, welche mit 70 % Methanol befüllt war. Anschließend wurden die Zellen für 5 min mit 10 % Ziegennormalserum (NGS) in PBS geblockt.

3.14 Markierung der intrazellulären Stadien

3.14.1 Polyklonale Antikörper

Bei dem verwendeten polyklonalen Antikörper (pAk) handelte es sich um kommerziell hergestelltes, mit Fluorescein-5-EX-Succinimidylester konjugiertes Ratten-IgG, das nach Immunisierung von Ratten durch Infektion mit *C. parvum*-Oozysten gewonnen wurde (Waterborne Inc., New Orleans, USA).

Durchführung:

Die fixierten Zellkulturen wurden gemäß Herstellerangaben mit den 1:20 verdünnten Antikörpern überschichtet. Für ein vollständiges Labtek-chamber Slide[®] wurde ein Volumen von 1 ml benötigt. Zur Bindung der Antikörper wurde das Labtek in eine Dunkelbox verbracht und für ca. 60 min darin belassen. Danach wurde eine Glasküvette mit PBS gefüllt, und die Zellkulturen wurden für 2 x 10 min zur Entfernung ungebundener Antikörper darin gewaschen. Vor dem Aufbringen des Überschichtungspuffers musste die Gummiumrandung, welche die einzelnen Kammern voneinander trennt, vorsichtig entfernt werden. Für diesen Arbeitsschritt bewährte sich die Zuhilfenahme von Skalpell und Pinzette. Der Überschichtungspuffer musste sparsam verwendet werden, um ein „Schwimmen“ des anschließend aufgelegten Deckglases zu verhindern. Zur Fixierung des Deckglases wurden die Ränder des Deckglases dünn mit Nagellack bestrichen. Um eine optimale Auswertung des Versuches zu sichern, wurde der Objektträger umgehend mikroskopiert, da die Leuchtkraft der Fluorochrome nur für ca. eine Stunde erhalten blieb.

3.14.2 Monoklonale Antikörper ²⁾

Der monoklonale Antikörper (mAk) wurde an der Universität Hohenheim, Institut für Zoologie, Fachgebiet Parasitologie, hergestellt. Dafür wurden weibliche BALB/c-Mäuse mehrfach mit einer Mischung aus exzystierten und nicht-exzystierten *Cryptosporidium-parvum*-Oozysten immunisiert. Die Maus mit dem höchsten Antikörpertiter wurde ausgewählt und deren Milzzellen mit Mausmyelomzellen fusioniert. Die Antikörper der erhaltenen Hybridome wurden im Immunfluoreszenztest auf ihre Reaktion mit Sporozoiten getestet und die Zellen weitergezüchtet bzw. durch „Limiting Dilution“ einmal kloniert. Nach Kreuzreaktionstests wurde die 4b4-Zelllinie für weitere Klonierungen zur Herstellung der monoklonalen Zellen ausgewählt. Der Kulturüberstand der 4b4-Zellen konnte direkt und unverdünnt in den Immunfluoreszenztests zum Nachweis von *Cryptosporidium*-Stadien eingesetzt werden.

Durchführung:

Die fixierten Zellen wurden mit den mAk unverdünnt überschichtet und zur Reaktion für 45 min. bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, folgten 3 x 2 min Waschungen in einer mit frischem PBS gefüllten Glasküvette.

²⁾ für die Überlassung wird Frau Prof. Dr. U. Mackenstedt gedankt

Der sekundäre Antikörper, ein anti-Maus-IgG-Fluoreceinisothiocyanat-Konjugat aus Ziegen, musste 1:200 in PBS verdünnt werden, bevor es auf die Zellen pipettiert werden konnte. Das so überschichtete Präparat wurde erneut für 45 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert und im Anschluss 2 x 5 min in PBS gewaschen. Da einige Bestandteile (Zucker, Kälberserum) der Antikörperlösung von begrenzter Haltbarkeit sind, wurde eine Aliquotierung der Gesamtmenge in Portionen von 1 ml durchgeführt und das Konjugat bis zu seinem Gebrauch im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

3.15 Beschreibung der einzelnen Versuche

3.15.1 Überprüfung der Reproduzierbarkeit

Sechs Zellkulturen eines Labteks wurden jeweils mit derselben Anzahl Oozysten ($10^3 - 10^6$) infiziert (Abb. 5) und ausgewertet. Als Infektionsmaterial wurden Oozysten aus einem Feldisolat (Betrieb I) verwendet, die alle jünger als 3 Monate waren und Exzystierungsraten über 75 % lieferten.

10^6	10^6	10^6	NK	10^5	10^5	10^5	NK
10^6	10^6	10^6	NK	10^5	10^5	10^5	NK
10^4	10^4	10^4	NK	10^3	10^3	10^3	NK
10^4	10^4	10^4	NK	10^3	10^3	10^3	NK

Abbildung 5: Infektionsschema der Labtek-chamber Slide[®]

NK= Negativkontrolle (keine Oozysten)

3.15.2 Vergleich von Feldisolaten

In einem weiteren Versuch wurden drei verschiedene Feldisolate untersucht. Die frischen Kotproben aus den Betrieben I (Sachsen), II (Thüringen) und III (Niedersachsen) wurden aufgereinigt und die Oozysten wie unter 3.4 beschrieben gewonnen. Alle verwendeten Proben waren bei Einsaat in die Zellkulturen jünger als 3 Monate und wiesen Exzystierungsraten von mindestens 75 % auf. Die Oozysten wurden in einer Verdünnungsreihe von 10^6 - 10^2 auf die Zellkulturen gegeben und die fluoreszierenden Foci und Flächen der drei Isolate miteinander verglichen.

3.15.3 Vergleich verschiedener Antikörper

Am Institut für Zoologie (Fachgebiet Parasitologie) der Universität Hohenheim wurden monoklonale Antikörper zur Markierung der Entwicklungsstadien von *C. parvum* entwickelt. Die Eignung dieser Antikörper für die Vitalitätsabschätzung der Oozysten sollte in diesem Versuch vergleichend zu den kommerziell erhältlichen polyklonalen Antikörpern (A600 FLR, Fa. Waterborne®) getestet werden. Dafür wurden in drei aufeinanderfolgenden Versuchen jeweils 6 infizierte Zellkulturen (insgesamt 36 Zellkulturen) mit den verschiedenen Antikörpern überschichtet und ausgewertet.

3.15.4 Thermische Inaktivierung von Oozysten

Die vorher auf ihre Infektionsdosis eingestellten Oozysten (Isolat I-III) wurden in PBS für die vorgesehene Zeit bei der vorgegebenen Temperatur im Thermomixer belassen und vor der Infektion der Zellen abgekühlt, um eine Schädigung des Zellrasens durch höhere Temperaturen der Oozystensuspension zu vermeiden.

Versuchsordnung

Fünfzehn Zellkulturen wurden mit je 10^5 thermisch inaktivierten Oozysten infiziert. Die Inaktivierung erfolgte für die Zeit von 1 h im Thermomixer in folgenden Abstufungen:

40 °C, 42 °C, 44 °C, 46 °C, 48 °C, 50 °C sowie über 4 h bei 55 °C

Eine Negativkontrolle ohne Oozysten und eine Positivkontrolle mit 10^5 unbehandelten Oozysten wurden auf jedem Labtek mitgeführt.

3.16 Auswertung infizierter Zellkulturen

Die Quantifizierung intrazellulär gebildeter Entwicklungsstadien sollte mithilfe der digitalen Bildanalyse getestet und optimiert werden. Beschreibungen aus der Literatur wurden zum Auffinden und Auswerten der fluoreszierenden Parasiten herangezogen. Die hier verwendete Software (Leica QWin, Version 2.3), wird zur quantitativen Mikroskopie hauptsächlich in der Metallurgie, aber auch in der Kriminologie, Biologie und Medizin eingesetzt, wo sie durch exakte Messung von Grauwerten und geometrischen Formen die traditionelle subjektive Mikroskopie ersetzt. Leica QWin ist ein leistungsfähiges und umfangreiches Computerprogramm, das auf der Benutzeroberfläche von Microsoft Windows basiert und mit anderen Programmen (z.B. Microsoft Excel) verknüpft werden kann.

Vom Öffnen eines Bildes bis zum Ausdruck der Ergebnisse wurden die in Abb. 6 dargestellten Arbeitsschritte durchgeführt. Sie werden in den folgenden Kapiteln näher erläutert.



Abbildung 6: Fließdiagramm der digitalen Bildanalyse

3.16.1 Mikroskopische Betrachtung und Aufnahme von Fluoreszenzbildern

Bevor mit der Aufnahme von Fluoreszenzbildern begonnen wurde, erfolgte die Überprüfung der Grundeinstellung der Software.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Einstellungen gewählt:

Größe des Bildrahmens (Pixel) :	1272 x 1016
Größe des Messrahmens (μm^2) :	84.000
Kalibrierung:	1 Pixel = 0,26 μm
Vergrößerung :	400 x

Die Aufnahmen wurden als Graubilder im *.tif-Format gespeichert, welches eine verlustlose Komprimierung sichert. Die Belichtungszeit wurde bei der Bildvorschau bzw. der Aufnahme des ersten Bildes innerhalb eines Versuches eingestellt und musste, bedingt durch den schwarzen Hintergrund, entsprechend lang (ca. 1 sec) gewählt werden.

Aufgenommen wurden 10 zufällig gewählte Blickfelder von jeder infizierten Zellkultur. Um einen repräsentativen Querschnitt einer Zellkultur zu erhalten, wurde diese beginnend in der linken oberen Ecke mäanderförmig durchmustert und möglichst nur zum Drehen der Mikrometerschraube (Feintrieb) durch das Okular betrachtet. Auf diese Art sollte sichergestellt werden, dass die Bildauswahl randomisiert erfolgt und nicht willkürlich vom Betrachter abhängt. Im Verlauf der Arbeit wurde dieses Zufallsprinzip teilweise durchbrochen, nämlich dann, wenn für Inaktivierungsstudien geringe Inokulationsdosen (10^2 und 10^1) getestet werden sollten. In solchen Fällen wurde die gesamte Kultur beginnend mit einer kleineren Vergrößerung (Übersicht) auf das Vorhandensein von Entwicklungsstadien durchsucht.

3.16.2 Graubildverarbeitung

Die Graubildverarbeitung umfasst verschiedene Funktionen, die die Bildqualität verbessern, wie z. B. Bildreinigung, Lookup-Tabelle (LUT)-Transformation, Filterung und Bildbearbeitung. Für die hier erstellten Analysen wurde eine LUT-Transformation in jedem Bild angewendet. In diesem Dialogfeld werden Bilder mit Pixelfunktionen wie Quadrat, Wurzel, Autokontrast transformiert, die in einer LUT enthalten sind.

Für die Funktion „Autokontrast“ werden die Minimum- und Maximumgrauwerte des Eingabebildes miteinander verrechnet, um die Kontrasterweiterung zu erreichen. Optisch erscheint das Bild dadurch geschärft.

3.16.3 Digitale Markierung der intrazellulären Entwicklungsstadien

Nach dem Öffnen des gewünschten Bildes wurden die Bereiche innerhalb des Meßrahmens detektiert, welche in die Berechnung einfließen sollen, wobei man unter „Detektion“ die Auswahl und digitale farbliche Markierung dieser Bereiche versteht. Mit diesem Verfahren wird das originäre Bild in ein Binärbild (Abb. 7) umgewandelt. Praktisch geschieht dies durch das manuelle Setzen eines Schwellenwertes. Der Schwellenwert gibt an, welche Grautöne, abhängig von der Helligkeit einzelner Pixel, in die Detektion einbezogen werden.

Der hier verwendete 8-bit-Wandler erfasst insgesamt 255 Grautöne. Der Wert „0“ entspricht einem weißen Bildpunkt, der Wert „255“ markiert alle schwarzen Bildbereiche.

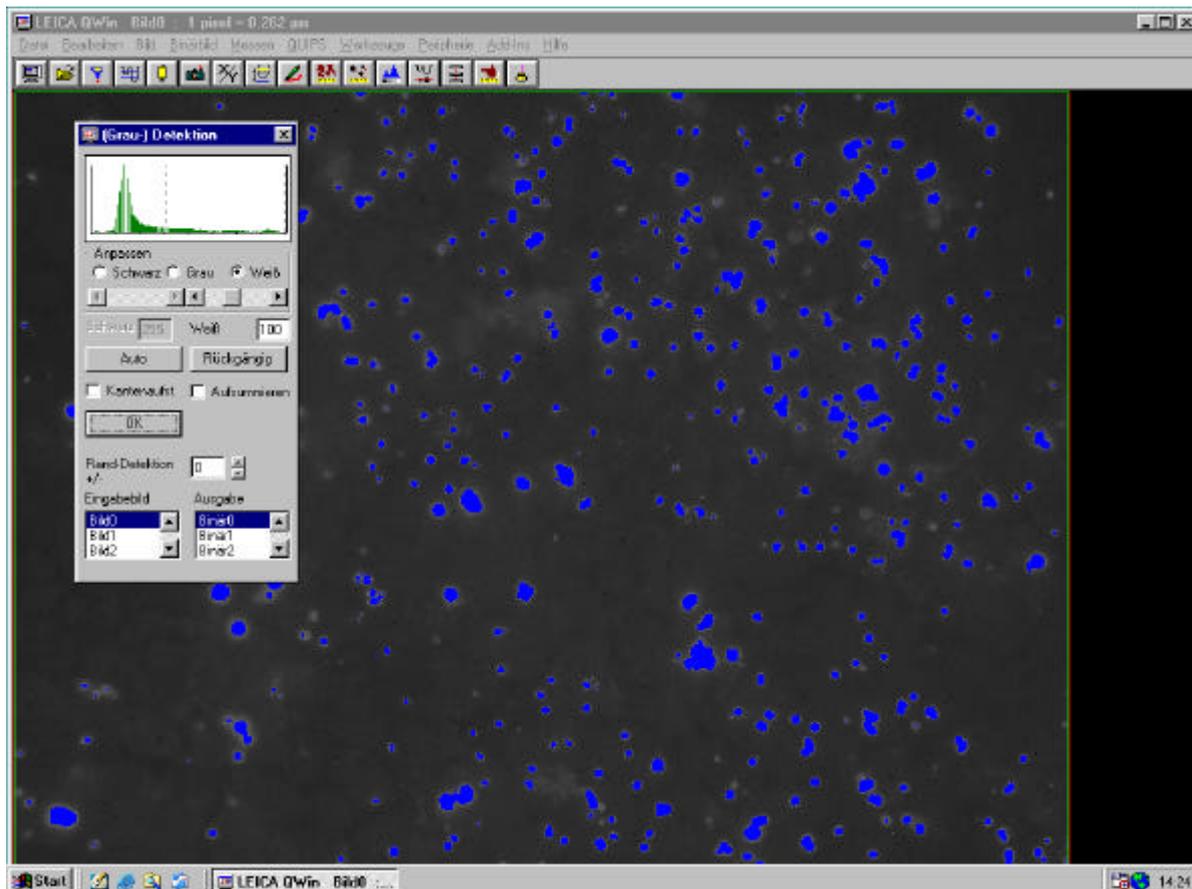


Abbildung 7: Benutzeroberfläche von Leica QWin mit binär dargestellten intrazellulären Entwicklungsstadien von *C. parvum*

3.16.4 Binärbildbearbeitung

Unter der Binärbildbearbeitung versteht man das Ausfiltern unerwünschter Objekte durch Reinigung, Identifizierung und die Binärsegmentierung. Die Entwicklungsstadien lagen oft als Cluster eng beieinander, was eine „Verschmelzung“ zu einem größeren Teilchen in der Immunfluoreszenz zur Folge hatte. Um diese Bereiche für die Teilchenzählung zu trennen, wurde bei jedem Bild eine Teilchensegmentierung (Binärsegmentierung) für Objekte, die größer als $6\ \mu\text{m}$ waren, vorgenommen.

3.16.5 Messung mit QWin

Für die Bildanalyse stehen bei QWin von Leica drei Hauptarten der Messung zur Verfügung. Messungen, die die Eigenschaften eines kompletten Bildes beschreiben, werden Feldmessungen genannt, weil sie einen summierten Wert für alle Objekte innerhalb des Messrahmens darstellen. Ein Beispiel für die Feldmessung ist die Bestimmung der Gesamtfläche aller detektierten Objekte.

Die Teilchenmessung wird angewendet, wenn das Bild diskrete Objekte enthält, die gezählt und nach morphologischen Kriterien differenziert werden sollen. Um schnell Messungen von Linienlängen, Distanzen und Ausrichtungen zu erhalten, kann man die Interaktive Messung verwenden.

Für die Definition der geeigneten Parameter wurden zunächst Einzelbilder ausgedruckt, die Entwicklungsstadien manuell gezählt und mit dem Ergebnis der digitalen Bildanalyse verglichen. Im Dialogfeld Teilchenmessung wurde der Befehl „Zählfahnen“ aktiviert. An jedes in die Messung integrierte Objekt setzt das Programm automatisch eine Markierung. Dadurch kann nach der Messung überprüft werden, ob wirklich alle in Frage kommenden Areale in der Messung enthalten waren und ob die eingestellten Akzeptanzkriterien sowie die Binärsegmentierung optimal gesetzt wurden.

Die Bilder können einzeln detektiert und vermessen werden, was den Vorteil einer größeren Messgenauigkeit bietet. Um eine Vielzahl von Bildern effizient auswerten zu können, wurde ein Messalgorithmus entwickelt und zum automatischen Ablauf in Form einer Messroutine programmiert (Leica QUIPS). Die Anwendung der selbsterstellten Routine wurde anhand von 170 Bildern getestet.

Ob ein Teilchen, das den Messrahmen überschneidet, mit in die Berechnung einfließt, hängt von seiner Form und Lage sowie der verwendeten Messart ab. Bei der Feldmessung wird jedes Teilchen, dessen Zählpunkt (FCP = Feature Count Point) innerhalb des Messrahmens liegt, berücksichtigt, wobei der FCP dem letzten Pixel am rechten unteren Rand eines Objektes entspricht. Die Teilchenmessung erfasst nur Objekte, die innerhalb des Messrahmens enden.

3.16.6 Geometrische Filterung

Nach dem Messen kann durch das Setzen von Teilchenakzeptanzkriterien die Auswahl der akzeptierten Partikel auf bestimmte geometrische Formen einer definierten Größe beschränkt werden. Dieser Analyseschritt wird als geometrische Filterung bezeichnet. Um kleinere Artefakte auszuschließen, wie sie beim IFAT häufig vorkommen, wurden die Akzeptanzkriterien auf äquivalente Kreise von 2 – 15 µm Durchmesser eingestellt. Die obere Grenze wurde empirisch gewählt, um die eng beieinander liegenden Entwicklungsstadien mit erfassen zu können (Clusterbildung).

Die untere Grenze entspricht dem Durchmesser eines fluoreszierenden Trophozoiten nach der Beschreibung von SLIFKO et al. (1997).

3.17 Statistische Methoden

Zur statistischen Auswertung wurden SPSS (SPSS[®] Inc., Chicago, Version 11.5) sowie Microsoft[®] Excel 2000 (Microsoft Corporation) verwendet. Alle Daten wurden auf Normalverteilung geprüft (Shapiro-Wilk-Test und Kruskal-Wallis-Test). Der Versuch, über eine Log-Transformation eine Normalverteilung zu erreichen, gelang nicht. Deshalb wurde mit nichtparametrischen Tests gearbeitet.

Die Korrelationen wurden nach Spearman und die Signifikanzen mit dem Mann-Whitney-U-Test für unabhängige sowie dem Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben berechnet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wurde als signifikant und von $p \leq 0,01$ als hoch signifikant eingestuft.

4 Ergebnisse

4.1 Gewinnung von *C. parvum*-Oozysten

4.1.1 Passagierung im Kalb

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier Kälber aufgestellt und am 3. Lebenstag mit 1×10^7 Oozysten der Feldisolate I, II oder III oral infiziert, wobei das Isolat III zweimal in verschiedenen Kälbern passagiert wurde. Die Ausscheidung der Oozysten begann bei allen Kälbern am 4. Tag p. i. und ab dem 5. oder 6. Tag setzten die Symptome einer Diarrhoe ein. Der wässrige Kot, welcher Schleimhautbestandteile des Darmes, aber keine Blutbeimengungen enthielt, wurde über 4-5 Tage in Eimern gesammelt und bis zur Aufreinigung der Oozysten im Kühlschrank gelagert. Die klinische Untersuchung der Kälber zeigte zu keinem Zeitpunkt der Aufstallung Abweichungen von physiologischen Werten, mit Ausnahme der Kotkonsistenz. Ab dem 11. oder 12. Tag p. i. nahm die Ausscheidung von Oozysten stark ab; in der Heinefärbung waren nur noch vereinzelte Oozysten sichtbar. Die Kälber wurden ab diesem Zeitpunkt auf Stroh gestellt und es wurde kein Kot mehr gesammelt.

4.1.2 Aufreinigung und Isolatbestimmung

Die Aufreinigung gelang mühelos über die Etherauftrennung, anschließende Chlorbleiche mit Natriumhypochlorit und die endgültige Gewinnung mittels Salzflotation. Die Ausbeute an Oozysten durch eine Passage im Kalb belief sich bei allen drei Feldisolaten auf ca. 2×10^9 Oozysten.

Der Vergleich der Sequenzen des 18s-rDNA-Gens mit dem von MORGAN et al. (1999) publizierten bovinen Isolat C1 (Gen accession number AF 108864) brachte eine 100 %ige Übereinstimmung in den sequenzierten 284 Basenpaaren. Gleiches traf auch auf den zweiten sequenzierten Genabschnitt zu, dem Cp3.4-Gen aus dem Glykoprotein der Oozystenwand im Vergleich mit den von STURBAUM et al. (2003) veröffentlichten Sequenzen des bovinen Genotyps 2 (Gen accession number AF 527860).

4.2 Bestimmung der Exzystierungsrate der Oozysten

Die Exzystierungsrate der Oozysten wurde vor jedem Versuch routinemäßig überprüft und die Oozysten nur dann für die Versuche verwendet, wenn mindestens 75 % der Oozysten unter den gegebenen Bedingungen exzystierten. Bei frischen Oozysten (Feldisolaten) lag die Exzystierungsrate innerhalb der vorgesehenen Verwendungsdauer von 3 Monaten zuverlässig über 75 %. Probleme ergaben sich mit einem Stamm aus Betrieb III, der nach der 2. Passagierung im Kalb nur noch Exzystierungsraten von ca. 30 % zeigte. Dieser Stamm wurde nicht weiter für Vitalitätstests verwendet.

4.3 Zellkultur

4.3.1 Anlegen und Passagieren der Zellkulturen

Die HCT-8-Zellen zeigten ein verlässliches Wachstum und ließen sich problemlos im Abstand von 3-4 Tagen passagieren. Die Verteilung der Zellen auf den Flächen der Kammern war jedoch oft unregelmäßig. Randständig zeigten die Zellen ein stärkeres Wachstum als in der Mitte. Die Haftung der Zellen am Boden der Kammern ließ nach ca. 15 Passagen erheblich nach. Der Gebrauch von Accutase[®] brachte im Vergleich zu dem Enzym Trypsin keine Vorteile bei der Passagierung. Je nach Dichte des Zellrasens wurde eine Inkubation von 20-30 min gewählt. Im Verlauf der Arbeit wurden die Zellen zweimal mittels Kultur und PCR auf Mykoplasmen in einem externen Labor mit negativem Ergebnis getestet.

4.3.2 Infektion der Zellkulturen

Die Monolayer wurden mit Oozysten infiziert, sobald die geschätzte Konfluenz 80 - 90 % betrug. Bei einer Einsaat von 2×10^5 HCT-8-Zellen pro Kammer war dies nach rund 48 h der Fall. Bei einer Einsaat von 10^6 unbehandelten Oozysten kam es gelegentlich zu einem zytotoxischen Effekt. Bedingt durch die hohe Infektionsdosis lösten sich unregelmäßig Zellen aus dem Verband ab und der Monolayer konnte nicht ausgewertet werden.

Der Einsatz eines Schüttlers (Rotamax[®]), auf welchem die Labtek-chamber Slides[®] unmittelbar nach der Inokulation mit Oozysten für 5 min bei Raumtemperatur kreisförmig bewegt wurden, hatte keinen Einfluss auf die Verteilung der Oozysten bzw. der Entwicklungsstadien in der Zellkultur.

4.3.3 Ernte der Zellkulturen und Nachweis der Entwicklungsstadien

Eine Optimierung der Bildqualität konnte durch die Reduzierung der Menge aufgetragenen Überschichtungspuffers, dem Blocken nach der Fixierung mit 10 % NSG in PBS für 5 min sowie durch Wechseln der PBS-Lösung nach jedem Waschgang zum Entfernen ungebundener Antikörper erreicht werden (Abb. 8). Das Alter des verwendeten Überschichtungspuffers schien ebenfalls einen Einfluss auf die Qualität der Darstellung mittels IFAT zu besitzen. Deshalb wurde er nur für jeweils 4 Wochen verwendet.

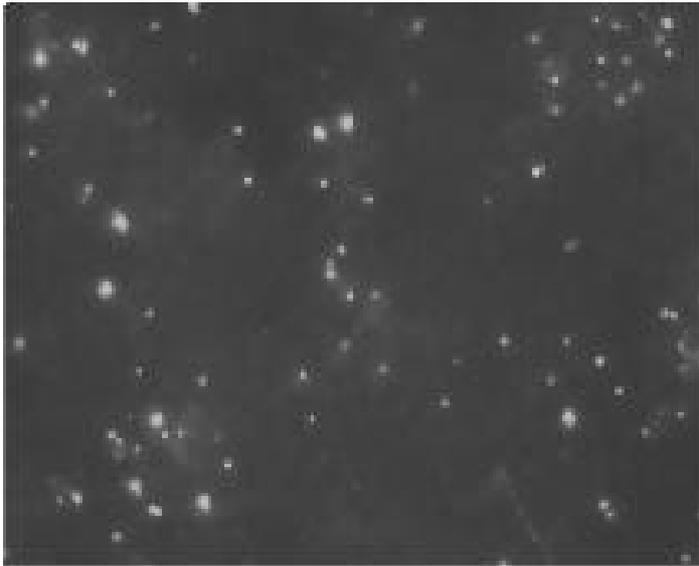


Abbildung 8: hohe Bildqualität, deutlich abgesetzte Foci (weiß) vor schwarzem Hintergrund

4.4 Überprüfung der Reproduzierbarkeit

Sechs Zellkulturen eines Labteks wurden jeweils mit derselben Anzahl Oozysten infiziert und mittels digitaler Bildanalyse einzeln ausgewertet. Als Infektionsmaterial wurden Oozysten aus einem Feldisolat (I) verwendet, die alle jünger als 3 Monate waren und Exzystierungsraten über 75 % lieferten.

Die absoluten Werte der Foci und Flächen unterschieden sich von Zellkultur zu Zellkultur (Tab. 4), wobei diese Unterschiede in den Infektionsdosen 10^5 und 10^6 signifikant waren (Anhangstabelle 1).

Tabelle 4: Summen der Foci und Flächen aus je 10 Einzelbildern

Infektionsdosis	Zellkultur	Fläche (mm²)	Foci
10^3	1	98,5	8
10^3	2	623,8	60
10^3	3	125,8	18
10^3	4	487,7	39
10^3	5	223,4	29
10^3	6	570,7	60
10^4	1	1394,5	119
10^4	2	585,1	96
10^4	3	826,0	71
10^4	4	1044,1	97
10^4	5	1173,3	104
10^4	6	1715,3	105
10^5	1	6050,3	565
10^5	2	7354,4	682
10^5	3	4013,8	354
10^5	4	6241,6	558
10^5	5	4498,1	381
10^5	6	4407,4	515
10^6	1	26299,8	2098
10^6	2	16821,1	1845
10^6	3	11651,2	1223
10^6	4	8112,6	866
10^6	5	6462,5	737
10^6	6	17443,4	1725

Der gerundete Mittelwert der Anzahl der Foci (Summe aus 10 Bildern) aus sechs Zellkulturen betrug bei einer Infektionsdosis von 10^6 Oozysten 1416 ($s = 556,0$). Dabei verteilten sich die Foci auf einer Fläche von $14.465,1 \mu\text{m}^2$ ($s = 7304,7$). Bei 10^5 eingesäten Oozysten verringerte sich die Focianzahl auf 509 ($s = 123,2$) und die Fläche auf $5427,6 \mu\text{m}^2$ ($s = 1316,6$). Die durchschnittliche Anzahl der Foci, die durch ein Inokulum von 10^4 Oozysten erzeugt wurden, betrug 99 ($s = 15,9$) entsprechend einer Fläche von $1123,1 \mu\text{m}^2$ ($s = 402,7$). Eine Einsaat von 1000 Oozysten produzierte 36 ($s = 21,5$) detektierte Foci und $355,0 \mu\text{m}^2$ ($s = 233,3$) fluoreszierende Fläche (Anhangstabelle 2). In Abbildung 15 sind die Summen aus 10 Blickfeldern der sechs Zellkulturen jeder Infektionsdosis nebeneinander dargestellt. Der niedrigste Variationskoeffizient wurde bei einer Einsaat von 10^5 Oozysten (24,3 %) erreicht und die größte Abweichung mit der Infektionsdosis von 1000 Oozysten (65,7 %)(Abb. 9).

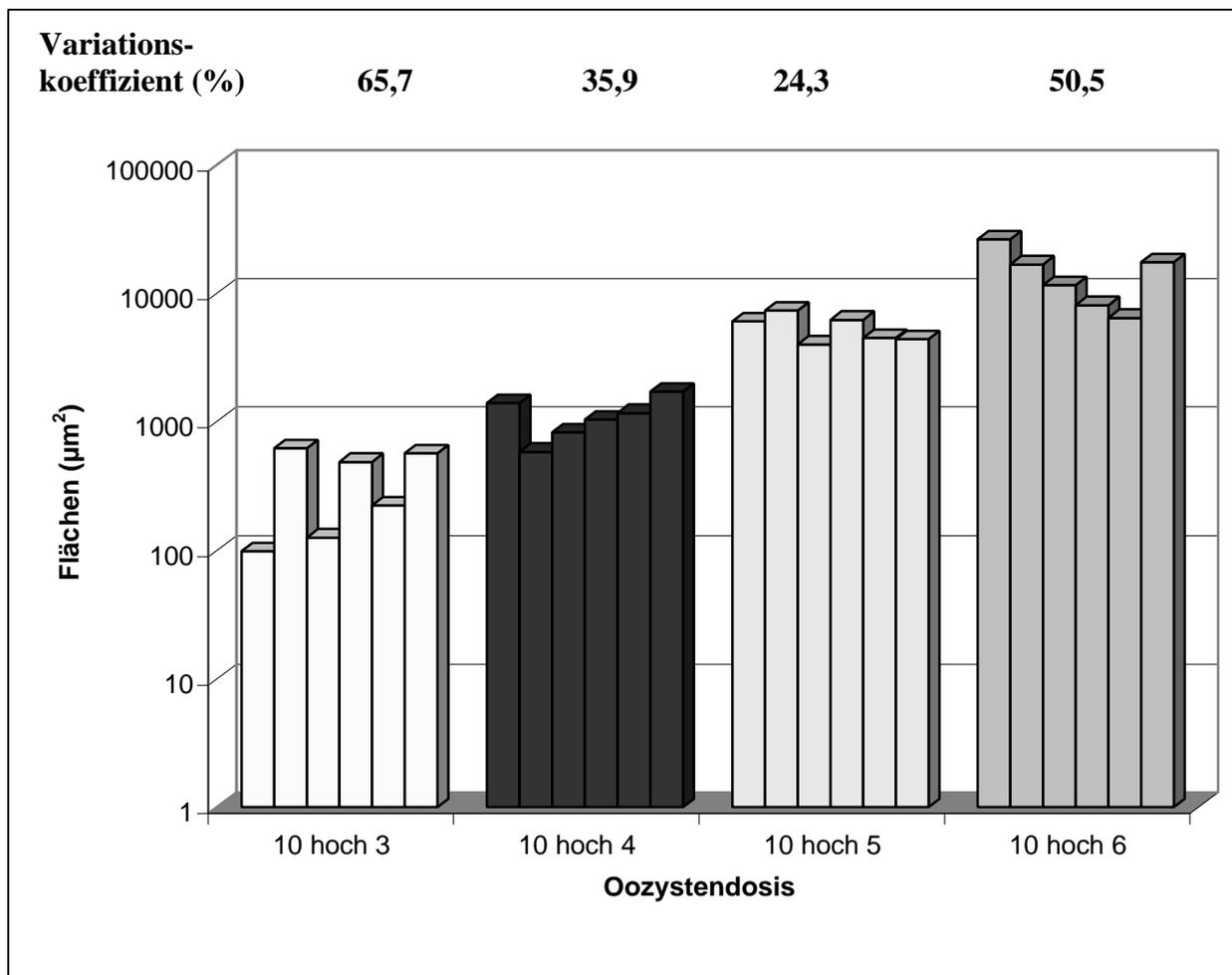


Abbildung 9: Vergleich der Flächen (Summen aus 10 Bildern) von 6 Zellkulturen je Infektionsdosis

Die Korrelationen zwischen den Infektionsdosen und den resultierenden Foci ($r_s = 0,97$) und Flächen ($r_s = 0,96$) sind hochsignifikant (Abb. 10). Vergleicht man die Ergebnisse der Flächenmessung mit der Focimessung, so ergibt sich ebenfalls eine hochsignifikante Korrelation ($r_s = 0,99$).

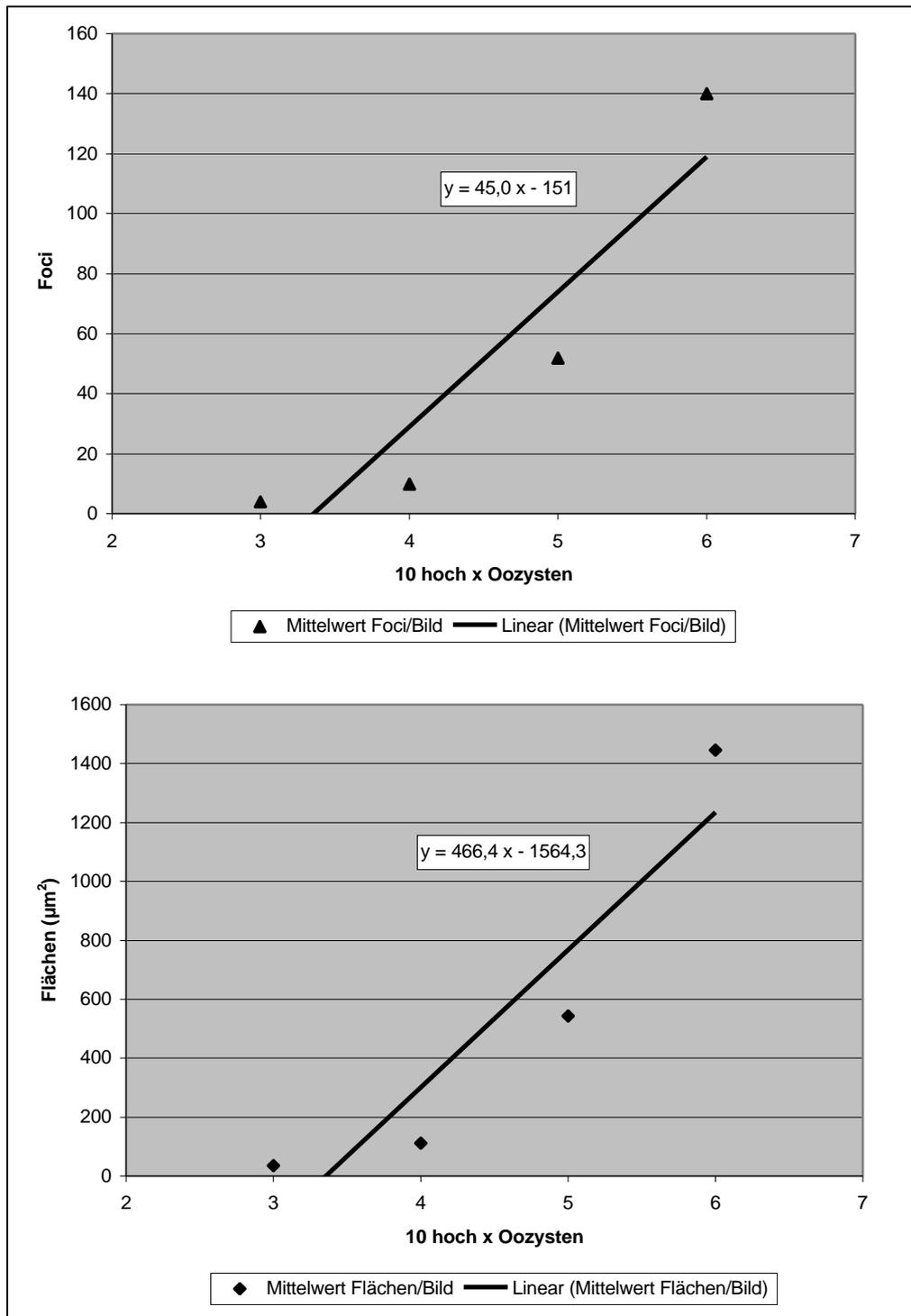


Abbildung 10: Korrelation zwischen Infektionsdosis und Flächen bzw. Foci (Mittelwerte aus jeweils 6 Kulturen einer Verdünnungsstufe)

4.5 Vergleich von Feldisolaten

In den Infektionsdosen von 10^6 bis 10^4 Oozysten waren in abnehmenden Dichten Entwicklungsstadien in jeder Zellkultur nachweisbar. Wurden die Zellkulturen mit 1000 Oozysten infiziert, konnten ebenfalls bei allen drei Isolaten Infektionen in der Zellkultur nachgewiesen werden, die Ergebnisse für diese Infektionsdosis der Isolate I und II gelangten jedoch nicht in die Auswertung, da die Entwicklungsstadien nicht in zufällig gewählten Blickfeldern, wie dies bei dem Isolat III der Fall war, erfasst wurden, sondern aufgrund ihrer geringen Zahl gezielt gesucht werden mussten (Tab. 5).

Tabelle 5: Foci und Flächen nach Inokulation von HCT-8-Zellen mit den Isolaten I,II und III

Oozysten	Isolat I		Isolat II		Isolat III	
	Foci	Flächen	Foci	Flächen	Foci	Flächen
10^6	2459	31.567,5	1886	21.538,8	2225	29.342,9
10^5	484	5644,5	595	7595,9	1784	17.473,1
10^4	92	874,3	149	1503,2	611	5556,1
10^3	0	0	0	0	127	830,5
10^2	0	0	0	0	0	0

Foci und Flächen = jeweils Summe aus 10 Einzelbildern

Es bestand in allen Versuchen eine signifikante Korrelation zwischen der Infektionsdosis und den ermittelten Foci bzw. Flächen. Die Messergebnisse der Foci und Flächen korrelierten ebenfalls signifikant miteinander (Anhangstabelle 3). Die in Abb. 11 dargestellten Regressionsgeraden zeigen den Zusammenhang zwischen der Infektionsdosis Oozysten und den Summen der erzeugten Foci aus 10 Einzelbildern. Die Regression für Isolat III verläuft steiler als die der Isolate I und II.

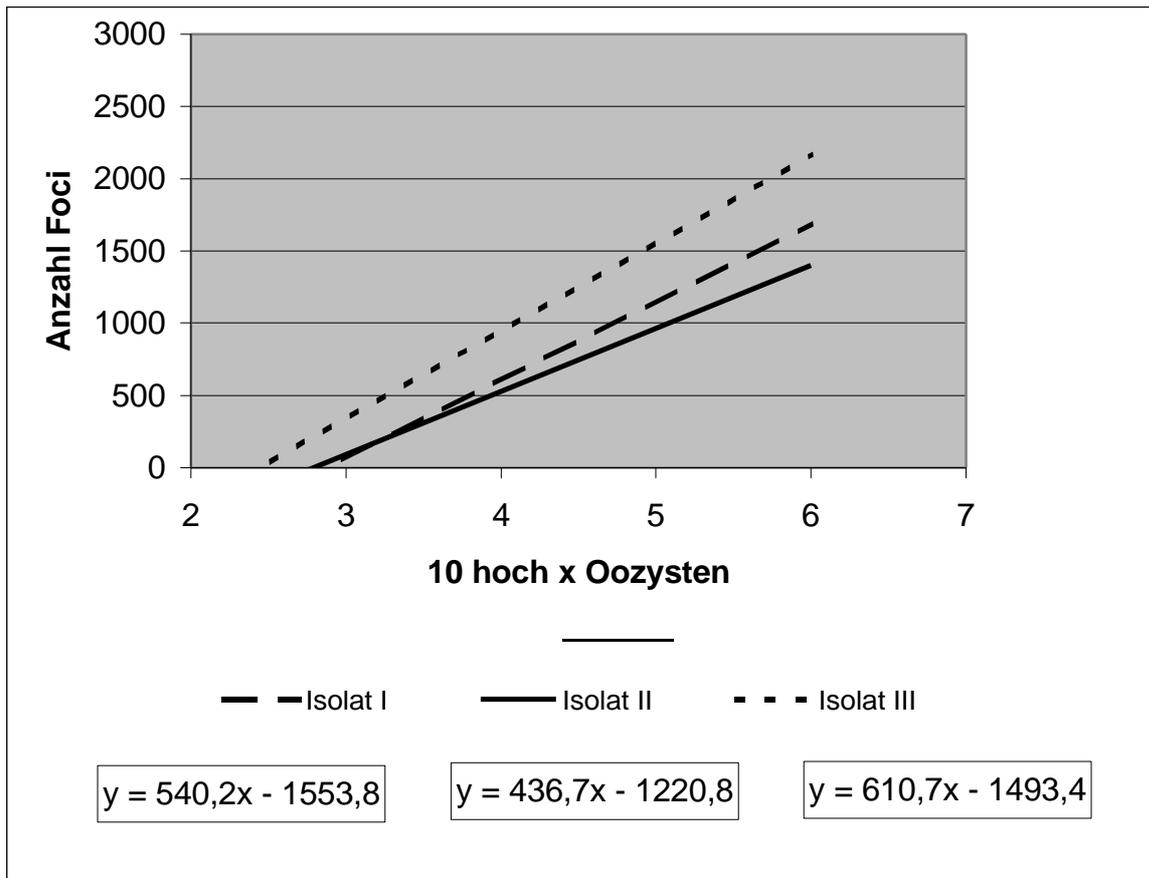


Abbildung 11: Vergleich verschiedener Feldisolate - Anzahl Foci (Summe aus 10 Bildern) im Verhältnis zur Infektionsdosis

4.6 Vergleich verschiedener Antikörper

Ein monoklonaler Antikörper (4b4) und ein polyklonaler Antikörper (A600 FLR Fa. Waterborne®) wurden vergleichend untersucht. Es wurden insgesamt 36 Zellkulturen, verteilt auf 6 Labtek-Chamber Slides, mit 10^6 - 10^1 Oozysten des Isolates III infiziert. Für den Vergleich wurden in drei aufeinander folgenden Versuchen (V1-V3) jeweils 6 Zellkulturen mit dem monoklonalen und 6 Zellkulturen mit dem polyklonalen Antikörper überschichtet und ausgewertet. Gleichzeitig wurde geprüft, ob eine statistische Korrelation zwischen Foci- und Flächenmessung besteht, um in folgenden Versuchen die Messungen auf einen der beiden Parameter beschränken zu können. Die absoluten Werte unterschieden sich von Versuch zu Versuch (Anhangstabelle 6). Die Anzahl Flächen/Foci enthaltender Bilder stieg mit zunehmender Infektionsdosis kontinuierlich an (Anhangstabelle 7). Der prozentuale Anteil positiver Bilder lag im Mittel zwischen 55,0 % und 71,7 % (Anhangstabelle 8). Die im Anhang 9 angegebenen Korrelationen zwischen der jeweiligen Infektionsdosis und den gemessenen Flächen/Foci sind für beide Antikörper signifikant. Die Abb. 12 und 13 zeigen die gute Übereinstimmung der Ergebnisse aus dem Vergleich beider Antikörper sowie die enge Korrelation zwischen der Focizählung und der Flächenmessung ($p < 0,01$; $r_s = 0,99$). In den Medianwerten aus V1-V3 ergab sich nur für die Dosis von 10^5 Oozysten ein signifikanter Unterschied ($p = 0,038$) zwischen den getesteten Antikörpern (Tab. 6).

Tabelle 6: Vergleich der Medianwerte Foci/Flächen aus V1-V3

Oozysten	Foci		Fläche	
	pAK	mAK	pAK	mAK
10^1	0	0	0	0
10^2	0	0	0	0
10^3	140	215	1087,6	1571,8
10^4	845	1130	6615,1	8558,2
10^5	2005	2405	14701,9	16368,1
10^6	2679	2670	2006,6	20869,2

grau hinterlegt: sign. Unterschied ($p = 0,038$)

pAK= polyklonaler Antikörper

mAK= monoklonaler Antikörper

Durch einen Vergleich der Foci und Flächen aus drei Versuchen hinsichtlich signifikanter Unterschiede wurde die Reproduzierbarkeit der Methode erneut untersucht. Dabei ergaben sich bei der Focimessung 9 signifikante Unterschiede von 36 Vergleichen und bei der Flächenmessung 10 signifikante Unterschiede von 36 Vergleichen (Anhangstabelle 10).

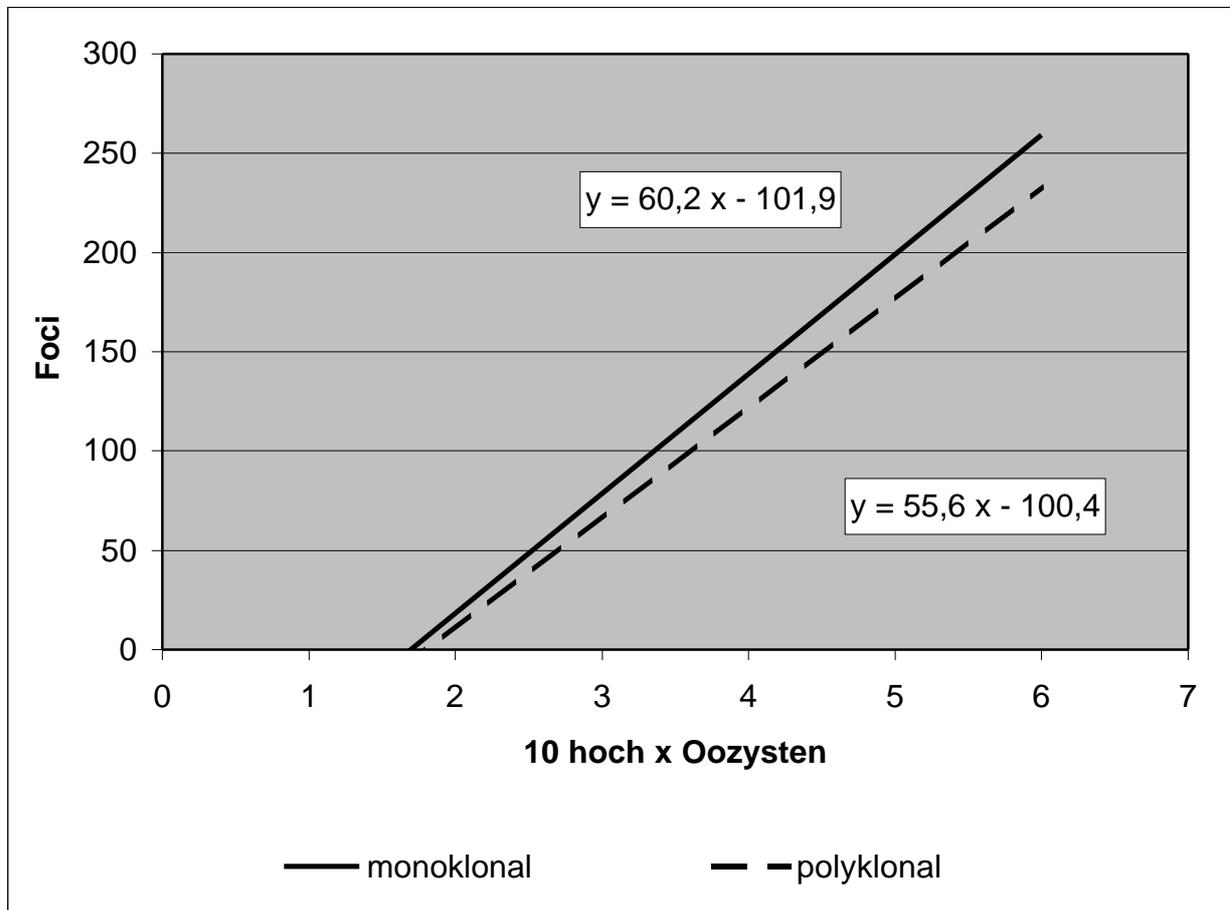


Abbildung 12: Darstellung der gemessenen Foci/Bild im Verhältnis zur Infektionsdosis

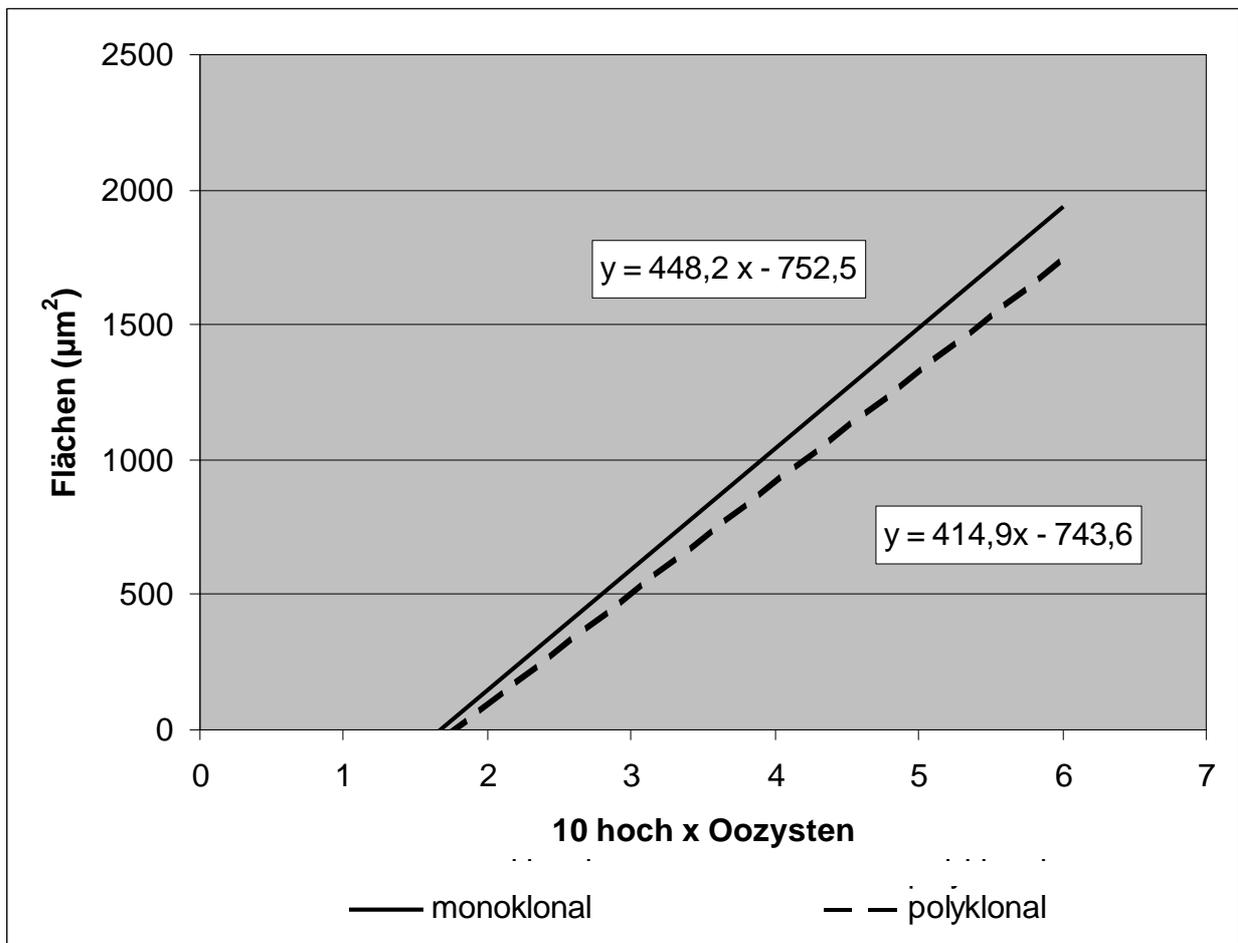


Abbildung 13: Darstellung der gemessenen Flächen/Bild im Verhältnis zur Infektionsdosis

4.7 Inaktivierung von Oozysten: Einfluss der Temperatur auf die Infektiosität

In einem weiteren Experiment sollte der Einfluss der Temperatur auf die Infektiosität der Oozysten getestet werden. Ziel dabei war es, herauszufinden, bei welchen Temperaturen es zu einer Inaktivierung der Oozysten kommt und ob geringe Temperaturunterschiede einen Einfluss auf die Ergebnisse besitzen.

In den beiden Versuchen 1 (Isolat III) und 2 (Isolat I) nahmen die gemessenen Flächen mit steigender Inkubationstemperatur kontinuierlich ab (Tab. 7). Dabei überstiegen die gemessenen Flächen aus Versuch 1 signifikant ($p = 0,03$) die aus Versuch 2. In einer Kalotte (Versuch 1) kam es zum Ablösen der Zellen, weshalb die Temperaturstufe 48 °C nicht in die Auswertung einbezogen wurde.

Im ersten Versuch lagen die Werte der mit 40 °C, 42 °C und 44 °C behandelten Oozysten mindestens so hoch wie die der Kontrolle (unbehandelte Oozysten) (Abb.14). Im zweiten Versuch wurden für alle Inkubationstemperaturen weniger Entwicklungsstadien nachgewiesen, als in der Positivkontrolle (Abb. 14). Um abzuklären, ob die thermische Behandlung der Oozysten bei 40 °C zu einer reduzierten Infektiosität gegenüber der Kontrolle führt, wurden drei weitere Zellkulturen unter den selben Bedingungen infiziert. Wie die Werte in Tabelle 7 zeigen, waren in allen drei Wiederholungen (Versuch 3-5, Isolat III) die gemessenen Flächen der thermisch behandelten Oozysten kleiner als die der unbehandelten.

Die Erhitzung der Oozysten auf 50 °C über eine Stunde führte nicht zu einer völligen Abtötung der Parasiten, sondern bewirkte lediglich eine Reduktion der intrazellulären Entwicklungsstadien um 87,2 % (Versuch 1) und 99,8 % (Versuch 2) gegenüber der Positivkontrolle. Dem gegenüber konnten bei einer Behandlung der Oozysten für 4 h bei 55 °C keine Entwicklungsstadien mehr in der Zellkultur gefunden werden (Abb. 15). Um eine Einschätzung über die Sensitivität der Methode zu ermöglichen, wurden die Ergebnisse der verschiedenen Temperaturen stufenweise miteinander verglichen. Der Test auf signifikante Unterschiede zwischen zwei Temperaturstufen (2 °C Unterschied) lieferte teils signifikante und teils nichtsignifikante p-Werte. Bei höheren Temperaturunterschieden (4 °C) wurden hochsignifikante Unterschiede ($p=0,01$) festgestellt (Anhangstabelle 11).

Tabelle 7: Mittelwerte Flächen pro Bild aus Versuchen mit Oozysten die thermisch inaktiviert wurden

Temperatur	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Versuch 5
40 °C, 1 h	1757,6	656,7	1955,9	2366,3	1987,0
42 °C, 1 h	1398,6	610,5	/	/	/
44 °C, 1 h	1161,7	131,1	/	/	/
46 °C, 1 h	279,0	74,7	/	/	/
48 °C, 1 h	/	20,5	/	/	/
50 °C, 1 h	141,5	2,1	/	/	/
55 °C, 4 h	0,0	0,0	/	/	/
Kontrolle	1105,9	938,4	2139,0	2584,2	2853,9

Mit steigender Temperatur sank die in der Voruntersuchung ermittelte Exzystierungsrate der Oozysten kontinuierlich. Die bei 50 °C über 1h inaktivierten Oozysten exzystierten nur noch zu 10 %, und die mit 55 °C über 4 h inkubierten waren vollständig inhibiert (Anhangstabelle 12).

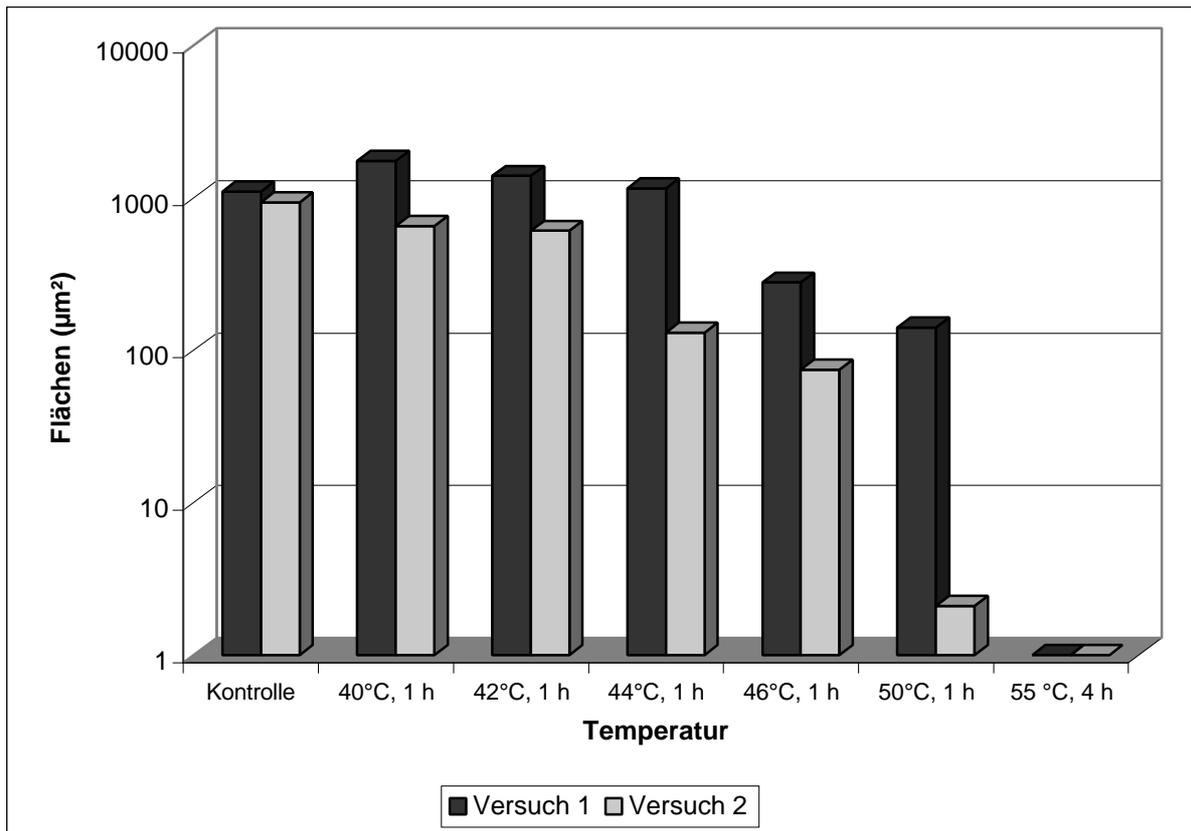


Abbildung 14: Mittelwerte Flächen der intrazellulären Entwicklungsstadien in Abhängigkeit von der Temperatur (°C), mit der die Oozysten behandelt wurden

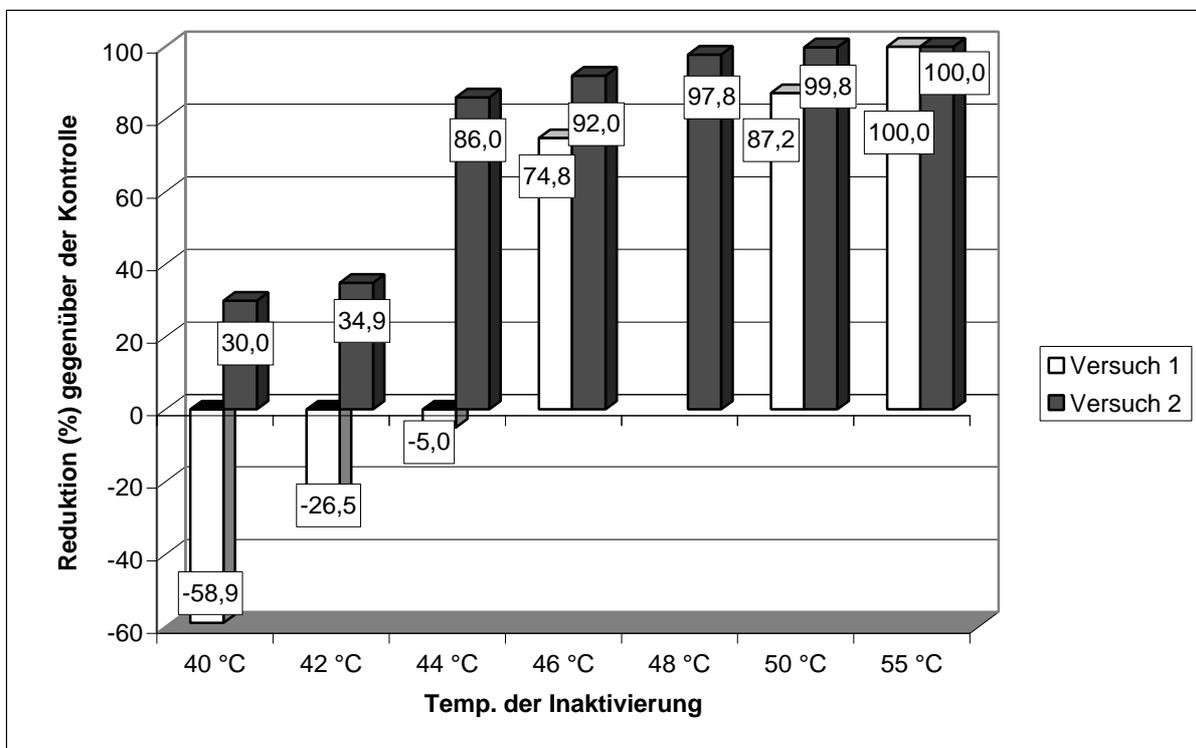


Abbildung 15: errechnete Reduktion (%) der Flächen intrazellulärer Entwicklungsstadien von thermisch behandelten Oozysten bei 40 °C bis 55 °C

4.8 Digitale Bildanalyse mit Leica QWin

4.8.1 Einzelbildanalyse

Die aufgenommenen Bilder wurden einzeln nacheinander geöffnet und mit dem in Abb. 16 gezeigten Ablauf analysiert. In den Abbildungen 17 und 18 wird jeweils das selbe Beispielbild gezeigt, wobei die Abbildung 17 das Graubild vor der Detektion und die Abbildung 18 nach der Detektion darstellt.

1. Öffnen des Bildes
2. Gleichsetzen von Bild – und Messrahmen
3. Bild \Rightarrow LUT-Transformation \Rightarrow Autokontrast
4. Bild \Rightarrow Detektion \Rightarrow Schwellwert einstellen
5. Binärbild \Rightarrow Binärsegmentierung
6. Messen \Rightarrow Teilchenmessung (Anzahl, Flächen)
7. Übertragung der Ergebnisse in Excel-Tabellen

Abbildung 16: Arbeitsschritte der Einzelbildanalyse

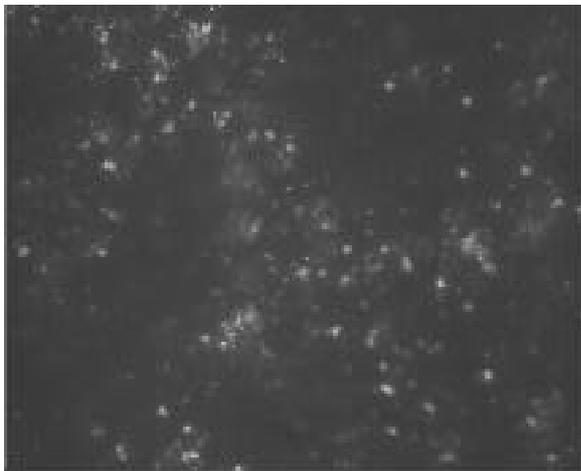


Abbildung 17: Graubild vor der Detektion, Entwicklungsstadien von *C. parvum* (weiße Bereiche) in einer HCT-8-Zellkultur

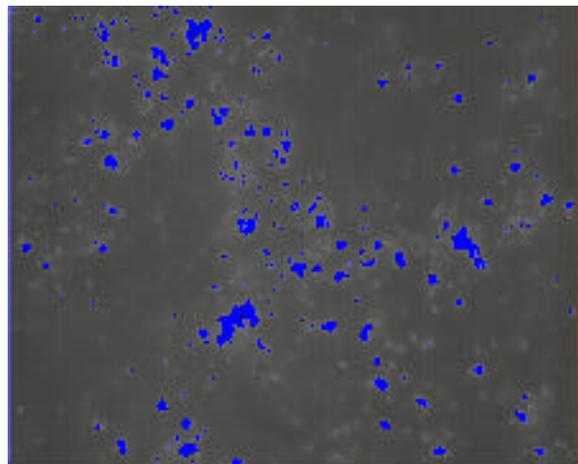


Abbildung 18: Binärbild detektierter Entwicklungsstadien von *C. parvum* (blaue Bereiche) in einer HCT-8-Zellkultur

4.8.2 Erstellen einer Messroutine

Um den zeitlichen Aufwand der digitalen Bildanalyse zu verkürzen, wurde eine automatische Messroutine in der Programmiersprache QUIPS geschrieben (Anhang 13). Diese beinhaltet das chronologische Öffnen von Bildern ab einem gewünschten Startbild, die LUT-Transformation zur Kontrastverstärkung der Bilder, Teilchenakzeptanzkriterien ($3,99 - 29,99 \mu\text{m}^2$) zum Ausschluss von Artefakten und die Flächenmessung der detektierten Bereiche innerhalb eines Bildes. Das Festlegen eines geeigneten Schwellenwertes erfolgt interaktiv, d.h. nach dem Öffnen des ersten Bildes erscheint auf dem Monitor ein Fenster, welches das Eintragen eines Schwellenwertes verlangt. Alle Ergebnisse werden nach Abschluß der Messung in einem Ergebnisfenster tabellarisch angezeigt und können direkt ausgedruckt werden. Am Ende der Auflistung fügt das Programm automatisch eine statistische Analyse der Einzelergebnisse ein (Anhangstab.14). Diese halbautomatische Routine wurde anhand von 170 Bildern getestet. Die Abweichung der Ergebnisse aus der automatischen Messung betragen abhängig vom Versuch zwischen 2,3 und 95,9 % und im Mittelwert 23,8 % (Tab. 8). Der statistische Vergleich der Einzelwerte aus 17 Zellkulturen lieferte 9 nicht signifikante und 8 signifikante Ergebnisse, wovon drei genau $p=0,05$ erreichten (Anhangstab. 15).

Tabelle 8: Vergleich von gemessenen Flächen (jeweils Summe aus 10 Bildern) der Einzelbildanalyse und der Messroutine

Versuch	Oozystendosis	Einzelbildanalyse	Messroutine	Abweichung (%)
1	10^6	26946,8	23355,1	-13,3
	10^5	15413,5	23746,9	54,1
	10^4	7757,1	9135,2	17,8
2	10^6	20042,2	26859,4	34,0
	10^5	14012,2	13686,9	-2,3
	10^4	9080,4	10689,6	17,7
3	10^6	14154,2	25549,7	80,5
	10^5	9420,6	8634,3	-8,3
4	10^6	22076,2	29728,8	34,7
	10^5	22501,2	31751,9	41,1
	10^4	8454,0	7105,7	-15,9
5	10^6	20653,6	40457,6	95,9
	10^5	19858,0	30613,1	54,2
	10^4	9902,4	13880,7	40,2
6	10^6	16658,8	15979,3	-4,1
	10^5	10941,5	9678,3	-11,5
	10^4	5995,6	5418,4	-9,6
mittlere Abweichung in %				23,8

Über die Auswertung der Ergebnisse innerhalb einer Messart kann die prozentuale Reduktion gebildeter Entwicklungsstadien zwischen zwei aufeinanderfolgenden Infektionsstufen (1 log-Stufe) miteinander verglichen werden. Dies ist auch im Hinblick auf die Anwendung der Methode für Inaktivierungsversuche sinnvoll. Die höchste Infektionsdosis (10^6 Oozysten) wurde aufgrund des Crowding-Effekts in den Zellkulturen nicht in diese Berechnung mit einbezogen. Die Einsaat von 1 Mio. Oozysten lieferte nicht zuverlässig mehr nachweisbare Entwicklungsstadien, als die nächst niedrigere Infektionsdosis von 10^5 Oozysten (Tab. 8, Versuch 4). Da nach einer Inkubation von 24 h theoretisch alle HCT-8-Zellen mit Entwicklungsstadien infiziert sind, können nicht alle vorhandenen Entwicklungsstadien nachgewiesen werden.

Bei der Einzelbildanalyse wurde zwischen den Infektionsstufen 10^5 und 10^4 eine mittlere Reduktion von 48,5 % (+/- 8,8) aus fünf verschiedenen Versuchen errechnet. Die Ergebnisse der erstellten Messroutine lieferten für die selben Bilder als Mittelwert 51,9 % (+/- 18,6) weniger Entwicklungsstadien. Der Variationskoeffizient fiel bei dieser Messung jedoch fast doppelt so hoch aus, wie bei der Einzelbildanalyse (Tab. 9).

Tabelle 9: Vergleich von gemessenen Flächen aus der Einzelbildanalyse und der Messroutine – Unterschied (%) zwischen 1-log-Stufe Oozysten

Versuch	Vergleich Oozystendosis	% Flächen in der niedrigeren Dosis	
		Einzelbildanalyse	Messroutine
1	10^5-10^4	49,7	61,5
2	10^5-10^4	35,2	21,9
4	10^5-10^4	62,4	77,6
5	10^5-10^4	50,1	54,7
6	10^5-10^4	45,2	44
Mittelwert (%)		48,5 (+/- 8,8)	51,9 (+/- 18,6)
Variationskoeffizient (%)		18,1	35,8

5 Diskussion

Im Rahmen der hier beschriebenen Arbeit wurde eine Methode etabliert, die eine quantitative Einschätzung der Vitalität von *C. parvum*-Oozysten ermöglicht. Dabei handelt es sich um potentiell infektiöse Dauerstadien, die bereits vor der Ausscheidung vollständig zum infektiösen Stadium entwickelt sind und über verschiedene Wege auf Mensch und zahlreiche Tierarten übertragen werden können. Aufgrund der geringen Größe des Parasiten lassen mikroskopische Untersuchungen der Morphologie keine Aussagen über Vitalität oder Infektiosität zu. Die Vitalfärbung und die Bestimmung der Exzystierungsrate konnten sich zur Vitalitätsbestimmung nicht durchsetzen, weil sie nur unzureichend genau sind (CHAURET et al. 2001). Der Tierversuch ist teuer, aufwändig und ethisch nur schwer zu rechtfertigen, da der Erreger seit Mitte der 80er Jahre erfolgreich in verschiedenen Zellkultursystemen angezüchtet wird. Bei den in der Literatur beschriebenen In-vitro-Kultivierungen wurden die intrazellulären Entwicklungsstadien unter dem Mikroskop manuell ausgezählt oder die Zellkulturen nach negativen und positiven Gesichtsfeldern statistisch ausgewertet. Eine exakte Messung der sichtbaren Flächen intrazellulärer Entwicklungsstadien wurde bisher nicht beschrieben. Mit Hilfe der hier vorgestellten digitalen Bildanalyse konnte eine quantitative Vitalitätsbestimmung *in vitro* kultivierter Parasiten etabliert werden.

5.1 In-vitro-Kultivierung von *C. parvum*

Eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst die Anzahl sich bildender Entwicklungsstadien in einer Zellkultur. Die Verwendung von HCT-8-Zellen für die In-vitro-Kultivierung von *C. parvum* wird von zahlreichen Autoren empfohlen (UPTON et al. 1994, SLIFKO et al. 1997, ARMSON et al. 1999, HIJAWI et al. 2001, PHELPS et al. 2001, NAJDROWSKI 2006) und kann auch ausgehend von der eigenen Erfahrung als geeignet beurteilt werden. Ein weiteres Kriterium ist die Zusammensetzung des Zellkulturmediums. YU et al. (2000) konnten zeigen, dass die Anzahl nachgewiesener Parasiten pro 25 Sichtfelder um 20 % zunahm, wenn die Menge an Pyruvat im Zellkulturmedium um 0,5 mM erhöht wurde.

Zu ähnlichen Ergebnissen führten die Untersuchungen von UPTON et al. (1994), der ebenfalls den Einfluss verschiedener Supplemente des RPMI-1640-Zellmediums auf die Anzahl intrazellulärer Entwicklungsstadien untersuchte. Die Zusammensetzung des in dieser Studie verwendeten Zellkulturmediums basiert auf der Erfahrung von ECKERT (2001) und NAJDROWSKI (2006). Es gewährleistete zuverlässig die Versorgung der Zellen mit den benötigten Nährstoffen und ließ sich problemlos bei 4 °C für 3 – 4 Tage lagern.

Mit steigendem Alter des Infektionsmaterials sinkt die Exzystierungsrate der Oozysten. Die Anzahl der sich in der Zellkultur bildenden Entwicklungsstadien nimmt ebenfalls ab (UPTON et al. 1994, SLIFKO et al. 1999). Um diesen Umstand zu berücksichtigen, verwendeten ECKERT (2001) und ARGENZIO et al. (1990) für ihre Versuche Oozysten, die nicht älter als drei Monate waren und FLANIGAN et al. (1991) solche, die nicht älter als zwei Monate waren. UPTON et al. (1997) empfiehlt sogar die Verwendung von maximal sechs Wochen alten Oozysten, die eine Exzystierungsrate von mindestens 70 % zeigen. In den vorliegenden Versuchen wurden Oozysten verwendet, die bei Einsaat nicht älter als drei Monate waren und mindestens zu 75 % exzystierten. Es wurden bisher keine Studien zum genauen Einfluss des Alters der Oozysten auf ihre Infektiosität *in vitro* veröffentlicht. Dennoch scheint dieser Punkt bedeutsam genug zu sein, um bei der Versuchsbeschreibung Erwähnung zu finden (WEIR et al. 2002).

Die Bestimmung der Exzystierungsrate wird von einigen Autoren empfohlen (SLIFKO et al. 1997, DENG und CLIVER 1998). Sie überschätzt jedoch die tatsächliche Infektiosität der Oozysten (SLIFKO et al. 1998). Eine mögliche Ursache, die diese Tatsache erklären könnte, ist die ungewisse Vitalität der freigesetzten Sporozoiten. Außerdem kann nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass auch alle Sporozoiten eine Wirtszelle finden und in diese eindringen. Um die Bedingungen der Exzystierung möglichst identisch zu gestalten, wurde dieselbe Konzentration des Exzystierungsmediums (0,4 % Natriumtaurocholat in RPMI-1640) zur Voruntersuchung wie zur Exzystierung auf den HCT-8-Zellen verwendet. Die eingesetzte Konzentration Natriumtaurocholat hat nachgewiesenermaßen keinen schädigenden Einfluss auf HCT-8-Zellen, es erleichtert aber die Exzystierung der Oozysten (GOLD et al. 2001). Darüber hinaus unterstützt der Zusatz von Gallensalz die Bemühungen, mit der In-vitro-Kultivierung die In-vivo-Bedingungen zu imitieren. Das Exzystierungsmedium wurde für eine Stunde auf den Zellen belassen, da in diesem Zeitsraum die meisten Oozysten ihre Sporozoiten freisetzen (WOODMANNSEE 1987).

Anschließend wurde das Gallensalz entfernt und durch frisches RPMI-Arbeitsmedium ersetzt, um jeden störenden Einfluss auf die weitere Entwicklung des Parasiten auszuschließen.

Ein weiterer Punkt der Versuchsanordnung, der die Anzahl von Entwicklungsstadien in einer Zellkultur beeinflusst, ist die Dauer der Inkubation. Hier deckt sich die eigene Erfahrung mit den von SLIFKO und Mitarbeitern (1997) veröffentlichten Ergebnissen. Nach einer vierundzwanzigstündigen Inkubation konnten die Foci gut quantifiziert werden und korrelierten gut mit der Anzahl eingesäter Oozysten. Bei längeren Inkubationszeiten (48 h) kam es bedingt durch Autoinfektionen zu einer massiven Besiedlung der Zellkulturen und die Quantifizierung der Foci war schwieriger. SLIFKO et al. (1997) konnten nach einer achtundvierzigstündigen Inkubation 380 % mehr Foci nachweisen, als nach einer vierundzwanzigstündigen Bebrütung. Andererseits kann eine längere Inkubationsdauer für niedrige Infektionsdosen oder für Inaktivierungsstudien von Vorteil sein, wenn man z.B. eine vollständige Inaktivierung nachweisen möchte.

Die beschriebenen Parameter (Zelllinie, Zellkulturmedium, Alter der Oozysten, Exzystierungsmedium, Inkubationsdauer) können die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beeinflussen und wurden vor Beginn der Versuche festgelegt und im weiteren Verlauf nicht mehr verändert.

Die unterste Nachweisgrenze bei der In-vitro-Kultivierung wird mit 10 Oozysten angegeben (ECKERT 2001, NAJDROWSKI 2006). Dies gelang sowohl bei der Foci-Detection-Methode als auch bei dem mit PCR geführten Nachweis. Die Sicherheit der mit dieser niedrigen Inokulationsdosis erzielten Ergebnisse muss jedoch kritisch beurteilt werden. ECKERT (2001) konnte 0,05 (+/- 0,10) Foci nachweisen und SLIFKO et al. (1997) gibt ihre Ergebnisse als nicht reproduzierbar an. Auch in der PCR gelang der Nachweis nur in drei von zehn Fällen (NAJDROWSKI 2006). In den vorliegenden Versuchen lag die unterste Nachweisgrenze bei 100 Oozysten. Theoretisch müsste auch eine einzelne vitale Oozyste mit dieser Methode nachweisbar sein, die Einzeloozysteninfektion gestaltet sich jedoch schwierig in der Handhabung und im Nachweis auf einer Zellkultur der Fläche von 0,7 cm². Solche Versuche sollten in einer 96-well-Platte durchgeführt werden, die den Vorteil einer kleineren Untersuchungsfläche bietet.

5.2 Überprüfung der Reproduzierbarkeit

In einem ersten Versuch sollte die hier beschriebene Methode auf ihre Reproduzierbarkeit getestet werden. Dafür wurden sechs Zellkulturen mit derselben Charge Oozysten und derselben Infektionsdosis zeitgleich inkubiert und ausgewertet. Bei jedem Ansatz wurden positive und negative Kontrollen mitgeführt. Die ausgewerteten Kulturen wiesen große Unterschiede in der Anzahl der Foci und der gemessenen Flächen innerhalb einer Infektionsdosis auf. In einem Ansatz überstieg bei der Einsaat von 1000 Oozysten die Summe Foci aus 10 Blickfeldern einer Zellkultur die einer anderen um mehr als das sechsfache. Die errechneten Variationskoeffizienten waren in allen Infektionsdosen recht hoch (Foci: 16,1 % - 59,7 %; Flächen: 24,3 % - 65,7 %) und die Überprüfung der Einzelwerte ergab signifikante Unterschiede von Zellkultur zu Zellkultur (Anhangstabelle 1). Der Variationskoeffizient für die Flächenmessung war bei einem Inokulum von 10^3 Oozysten am höchsten (65,7 %) und bei 10^5 eingesäten Oozysten am niedrigsten (24,3 %). Bedenkt man den exponentiellen Verlauf der Entwicklung der Kryptosporidien, so wird schnell deutlich, dass selbst geringe Abweichungen bei der Menge inokulierter Parasiten nach 24 Stunden Inkubationszeit einen maßgeblichen Einfluss auf die Ergebnisse haben. Obwohl die jeweiligen Infektionsdosen ausgehend von einer Stammlösung hergestellt wurden, kann trotz gründlichen Vermischens der Oozystensuspension gerade bei niedrigen Oozystendosen nicht genau vorhergesagt werden, wie viele Oozysten sich tatsächlich in 100 µl Lösung befinden und auf die Zellkultur gelangen.

Vergleicht man die Variationskoeffizienten aus verschiedenen Publikationen, so fällt auf, dass diese bei allen beschriebenen Methoden hoch waren (Tab. 10). SLIFKO et al. (1998) erzielte in ihren Versuchen mit dem angewandten Statistikrechenprogramm ICR für Most Probable Numbers (MPN) die niedrigsten Abweichungen.

Tabelle 10: Verfahren zur Auswertung *C. parvum*-infizierter Zellkulturen

Autor (Jahr)	Methode	Auswertung	Variationskoeffizient (%)
UPTON et al. (1994)	Nomarski- Interferenz-Kontrast	Auszählen von 25 BF	23,3–46,7
SLIFKO et al. (1997)	IFAT	Auszählen von BF	12,9–52,5
MAILLOT et al. (1997)	IFAT	Auszählen von 10 BF	12,9–60,0
SLIFKO et al. (1998)	IFAT	MPN-pos./neg. Felder	0,03–19,3
ECKERT (2001)	IFAT	Auszählen von BF	33,6

BF: Blickfelder

Eine Möglichkeit den Variationskoeffizienten zu reduzieren, ist die Erhöhung der Anzahl aufgenommener Bilder pro Zellkultur; da bei 10 Blickfeldern von jeweils $0,084 \text{ mm}^2$ aus der Gesamtfläche einer Zellkultur von 70 mm^2 nur ein Ausschnitt von 1,2 % in die Auswertung gelangt. Dies entspricht einer Auswahl von nur 10 Bildern aus 833 möglichen Blickfeldern.

Die Dichte des gebildeten Zellrasens auf der $0,7 \text{ cm}^2$ großen Fläche einer Labtek-Kammer hängt neben der Menge auch von dem Alter eingesäter Zellen ab und könnte die Ergebnisse ebenfalls beeinflusst haben. Obwohl in jede Kammer der Labteks die gleiche Menge HCT-8-Zellen (2×10^5) eingesät wurde, kam es doch zu unterschiedlichem Wachstumsverhalten. Je älter die Zellen wurden, umso unregelmäßiger wuchsen sie in den Kammern. Dies zeigte sich in einem starken randständigen Wachstum und wenigen Zellverbänden in der Mitte.

Die Umrechnung der Anzahl Foci aus 10 Einzelbildern auf die gesamte Fläche der infizierten Zellkultur ermöglicht folgende Aussage: Eine definierte Menge Oozysten hat in 24 h eine theoretische Anzahl von Entwicklungsstadien produziert. Diese Rechnung erlaubt den Vergleich der hier vorgestellten Ergebnisse mit denen von SLIFKO et al. (1997), da die verwendeten Methoden in weiten Teilen übereinstimmen.

SLIFKO et al. (1997) errechneten nach einer 24-stündigen Inkubationszeit bei einer Inokulationsdosis von 1000 Oozysten 512 Foci auf der Fläche einer Zellkultur. Die Anzahl

erzeugter Foci pro Zellkultur fiel in unseren Versuchen deutlich höher aus als in den von SLIFKO et al. (1997) durchgeführten Arbeiten. Bei einer Einsaat von 1000 Oozysten für das Isolat aus Betrieb I ergaben sich aus $n = 6$ Zellkulturen durchschnittlich 2972 Foci pro Kultur. Für die Abweichungen in den Ergebnissen kann eine Vielzahl von Faktoren verantwortlich sein. Die quantitative Auswertung niedriger Infektionsdosen unterliegt methodenbedingt größeren Schwankungen, als dies bei einer Einsaat von 10^4 oder 10^5 Oozysten der Fall ist. Isolatbedingte Unterschiede wurden in Versuch 2 dargestellt und könnten Ursache für die Differenzen sein. Bei den von SLIFKO et al. (1997) verwendeten Oozysten handelte es sich um ein mehrfach im Kalb passagiertes Feldisolat aus Kansas, das nicht weiter charakterisiert wurde. Darüber hinaus wurden die Focizahlen in der Publikation von SLIFKO et al. (1997) durch dreimaliges Durchmustern der Zellkultur ermittelt und damit einem anderen Auswertungsverfahren unterzogen. Und schließlich könnten Unterschiede in der Exzystierungsrate der Oozysten zu abweichenden Ergebnissen geführt haben. Die von SLIFKO et al. (1997) verwendeten Oozysten exzystierten zu mindestens 50 %. In dieser Arbeit wurden nur Oozysten mit mindestens 75 % Exzystierungsrate verwendet.

5.3 Vergleich von Feldisolaten

Die gewonnenen Feldisolate stammten alle aus Betrieben, die nachgewiesenermaßen ein Problem mit kryptosporidienassoziierten Durchfällen bei Kälbern hatten. Im Betrieb I kam es bei 1-2 Wochen alten Kälbern zu lang anhaltenden Durchfällen (über zwei Wochen). Das Allgemeinbefinden der Kälber war dabei jedoch nicht oder nur geringgradig beeinträchtigt. Über eine eventuell durchgeführte Behandlung dieser Kälber liegen keine Informationen vor. Im Betrieb II wurden ebenfalls Durchfälle bei Kälbern und zeitgleich die Ausscheidung von Kryptosporidien beobachtet. Die Durchfälle waren jedoch von kürzerer Dauer als im Betrieb I (etwa eine Woche) und die Kälber blieben unbehandelt. Im Betrieb III kam es im Verlauf der Durchfälle trotz Behandlung (Infusion, Halocur[®]) zu massiven Krankheitsfällen mit Todesfolge bei einzelnen Kälbern. Vergleicht man die Anzahl Foci bzw. die gemessenen Flächen der intrazellulären Entwicklungsstadien der drei Isolate miteinander, so lagen die Werte vom Betrieb III in drei von fünf Infektionsdosen um ein Vielfaches über denen der Isolate aus den Betrieben I und II.

Auch bei einer Gegenüberstellung der Fociwerte aus verschiedenen Versuchen zeigte sich deutlich die höhere Infektionsrate von Isolat III gegenüber dem Isolat I (Anhangstabelle 4).

Die Abweichung der Mittelwerte aus jeweils sieben Zellkulturen lag zwischen 127 % (10^6 Oozyten) und 848 % (10^4 Oozysten) (Anhangstabelle 5). Auf eine Interpretation der Fociwerte des Isolates II wurde bedingt durch die geringe Anzahl infizierter Zellkulturen verzichtet. Eine Versuchswiederholung für dieses Isolat gelang nicht, da die Oozysten nicht mehr ausreichend exzystiert hatten (< 75 %).

Die Oozysten aus dem Betrieb III hatten zu höheren Infektionsraten *in vitro* geführt als Vergleichsisolate und gleichzeitig die schwersten Krankheitsverläufe *in vivo* erzeugt. Die Fragestellung, ob die Oozysten der jeweiligen Isolate über eine unterschiedliche Virulenz verfügten, kann bedingt durch die zu geringe Anzahl an Versuchsdurchläufen nicht sicher beantwortet werden.

In einer genetischen Untersuchung von 180 humanen und bovinen Proben wurden 7 Subtypen des Genotyp 1 und 30 Subtypen des Genotyp 2 (multilocus genotypes) gefunden (MALLON et al. 2003). Ungeklärt bleibt die Bedeutung dieser genetischen Vielfalt für die Virulenz der Erreger. Unterschiede in der Infektiosität verschiedener Isolate von *C. parvum in vivo* (XIAO et al. 1999) und *in vitro* (HIJJAWI et al. 2001) wurden nachgewiesen. Es wäre nun interessant, weitere Feldisolate *in vitro* zu testen und die Ergebnisse in Zusammenhang mit der Klinik betroffener Tiere auszuwerten. Dafür würde sich das hier entwickelte Testsystem anbieten.

Eine geeignete Infektionsdosis pro Zellkultur wären 10^5 Oozysten. Um methodenbedingte Schwankungen erkennen zu können, sollte jedes Isolat im Triplikate getestet werden. Für drei Labtek-chamber Slides® ergeben sich bei der gleichen Infektionsdosis pro Kammer insgesamt 18 Zellkulturen pro Isolat.

5.4 Vergleich verschiedener Antikörper

Sowohl der monoklonale wie auch der polyklonale Antikörper eigneten sich gleichermaßen gut zum Nachweis intrazellulärer Entwicklungsstadien von *C. parvum* in der Zellkultur und lieferten auch in Bezug auf Bildqualität und Fluoreszenz keine Unterschiede. Obwohl die erzielten Messwerte bei Verwendung des mAk höher ausfielen, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den Medianwerten aus drei aufeinander folgenden Versuchen.

Der zeitliche Aufwand, der bei der Verwendung des pAK entstand, war deutlich geringer, da dieser kommerziell erhältliche AK bereits konjugiert geliefert wird und nur einmal inkubiert und abgewaschen werden muss. Eine ausreichend gute Reproduzierbarkeit ist unabhängig vom Antikörper.

5.5 Inaktivierung von Oozysten

Die hygienische Relevanz der zoonotischen Parasiten ist außerordentlich groß. Ausdruck dafür ist die stetig steigende Inzidenzrate von Kryptosporidiose beim Menschen in Deutschland (Robert-Koch-Institut, Epidemiologisches Jahrbuch 2005 und 2006) sowie die biologischen und epidemiologischen Besonderheiten des Erregers [lange Überlebenszeit in der Umwelt (6 - 9 Monate), hohe Ausscheidungsrate von infizierten Wirten (10^6 /g Kot), niedrige Infektionsdosen (1-30 Oozysten), geringe Größe der infektiösen Stadien (4-6 μm), Resistenz gegenüber Desinfektionsmitteln].

Der Einfluss der Temperatur auf die Inaktivierung von Oozysten ist für die Anwendung z.B. bei der Gülleinaktivierung und darüber hinaus ebenfalls für die Sicherung der Unbedenklichkeit von Trinkwasser von Bedeutung.

Eine Reihe von mechanischen, chemischen und biologischen Verfahren werden zur Rohwasseraufbereitung eingesetzt. Die Aufbereitung von Grundwasser ist dabei weniger aufwändig als die von Oberflächen- und Quellwässern. Als Oberflächenwasser wird das Wasser aus stehenden oder fließenden Gewässern bezeichnet. Es ist meist ein Gemisch aus Grund-, Quell-, Regen- und teilweise auch Abwasser. Für die Aufbereitung von Oberflächengewässern werden häufig die Ozonierung, die Flockung mit anschließender Sedimentation oder Filtration und eine Aktivkohlefiltration zur Eliminierung von Schadstoffen eingesetzt. Am Ende steht eine obligatorische Desinfektion zur nachhaltigen Entkeimung des Trinkwassers. In einer Mitteilung des Umweltbundesamtes zur Trinkwasserdesinfektion wird eindeutig darauf hingewiesen, dass weder die herkömmliche Desinfektion noch die UV-Bestrahlung geeignet sind, um Kryptosporidien sicher abzutöten (DVGW Regelwerk 2006, Arbeitsblatt W 293). Die sichere Entfernung von vitalen Oozysten ist nur über spezielle Filtrationsverfahren möglich. Dabei fließt das Rohwasser durch eine oder mehrere Ultrafiltrationsmembranen, ähnlich einem Sieb der Maschenweite 0,02 μm . Die gesetzlichen Bestimmungen (Trinkwasserverordnung) enthalten klare Vorschriften zum Einsatz der Filtrationstechnik.

Gleichzeitig fordern die Wasserversorgungsunternehmen verstärkte Maßnahmen zum Ressourcenschutz (Kläranlagen, Ausweisung von Wasserschutzgebieten) und eine effektivere Überwachung. Eine routinemäßige Untersuchung des Trinkwassers auf Parasiten erscheint aus derzeitiger Sicht wenig hilfreich.

Bei der Trinkwasseraufbereitung spielt die thermische Inaktivierung von Parasiten derzeit keine Rolle. Als Präventivmaßnahme greift die Gülleinaktivierung jedoch in den Wasserkreislauf mit ein, da mit dieser Maßnahme der Eintrag von vitalen Oozysten in Oberflächengewässer vermieden werden kann. In einer aerob-thermophilen Biogasanlage zur Entseuchung von Flüssigmist wurden unterschiedliche Temperaturstufen zur Abtötung von verschiedenen Fäkalkeimen und Parasiten getestet. Kryptosporidien wurden bei einer Einwirkdauer von 55 °C über 24 h zu 97 – 99 % abgetötet (DOLL et al. 1999).

Vor diesem Hintergrund sollte in der zweiten Phase der Arbeit die Eignung des entwickelten Vitalitätsassays für Inaktivierungsversuche getestet werden. Für die Inaktivierung von Oozysten finden verschiedene Methoden ihre Anwendung. Bei der chemischen Behandlung mit dem Desinfektionsmittel Neopredisan[®] konnten nach einer Einwirkdauer von 2 Stunden in einer 4 %-igen Konzentration keine vitalen Oozysten in der Zellkultur mehr nachgewiesen werden (ECKERT 2001, NAJDROWSKI 2006). Dieses Desinfektionsmittel ist für die Stalldesinfektion ausreichend getestet und für die Nutztierhaltung zugelassen.

Zu den physikalischen Inaktivierungsverfahren gehört die thermische Behandlung von Oozysten. Sie wurde von mehreren Autoren *in vivo* getestet (ROBERTSON et al. 1992, FAYER 1994, FAYER 1996b, HARP et al. 1996, JENKINS et al. 2004). In neueren Studien werden überwiegend andere physikalische Verfahren erprobt. Dabei ist die Behandlung von Oozysten im Thermomixer, verglichen mit der UV-Bestrahlung (LINDEN et al. 2001, SIVAGANESAN et al. 2005) oder der Ozonbegasung (DRIEDGER et al. 2001), ein einfaches und praktikables Verfahren. Im Gegensatz zu chemisch behandelten können thermisch behandelte Oozysten auch keinen negativen Einfluss auf die Vitalität der Zellmonolayer ausüben. In einer Studie von DENG und CLIVER (2001) wurden Oozysten bei 70 – 71 °C in pasteurisiertem Apfelsaft über 5 log-Stufen inaktiviert. Der Nachweis dafür wurde mittels IFAT in einem Zellkultursystem erbracht. Eine thermische Behandlung von Oozysten bei einer mesophilen Temperatur (38 °C) brachte keine signifikante Inaktivierung. Demgegenüber war nach einer 4-stündigen thermophilen Behandlung bei 55 °C die Infektiosität für HCT-8-Zellen vollständig aufgehoben (NAJDROWSKI 2006).

Um der Frage nachzugehen, bei welcher Temperatur die Inaktivierung von *C. parvum* beginnt und ab welcher Temperatur annähernd 100 % Inaktivierung erreicht werden, wurde eine stufenweise Inaktivierung mit einer Temperaturspanne von 40 °C – 50 °C gewählt sowie die völlige Abtötung aller Oozysten bei 55 °C über 4 h erneut getestet.

Hierzu wurden in zwei aufeinanderfolgenden Versuchen zwei Oozystenchargen (Isolat III und I) getestet. Die schrittweise Temperaturerhöhung führte in beiden Ansätzen zu kontinuierlich sinkenden Meßwerten. Um den Einfluss der schrittweisen Temperaturerhöhung auf die Infektiosität beurteilen zu können, wurden die Ergebnisse der einzelnen Temperaturstufen miteinander verglichen. Dabei unterschieden sich die gemessenen Flächen je Temperaturstufe nicht in jedem Fall signifikant voneinander. Es kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass bei der Behandlung von Oozysten ein Temperaturunterschied von 2 °C keinen mit dieser Methode nachweisbaren Einfluss auf die Infektionsrate der Oozysten besitzt. Demgegenüber konnten zwischen den Messwerten bei einem Temperaturunterschied von 4 °C hochsignifikante Ergebnisse ($p=0,01$) ermittelt werden.

Unter dem Einfluss einer Temperatur von 50 °C über eine Stunde wurden nicht alle Oozysten inaktiviert. Die Infektionsrate wurde im Vergleich zur Positivkontrolle um 87,2 % in Versuch 1 und um 99,8 % in Versuch 2 reduziert. Demgegenüber bewirkte eine Temperatur von 55 °C über 4 Stunden eine 100 % -ige Abtötung aller Parasiten und es war kein einziges intrazelluläres Entwicklungsstadium bei gezielter Suche auf der gesamten Zellkultur nachweisbar. Eine völlige Abtötung aller Oozysten beginnt bei einer Temperatureinwirkung zwischen 50 °C bis 55 °C über eine bis vier Stunden. Es wäre interessant, die vollständigen Inaktivierungsbedingungen in einem Folgeversuch weiter einzugrenzen. Dabei sollten immer auch mehrere verschiedene Isolate getestet werden.

Um die thermische Inaktivierung genauer zu untersuchen, wurde bei jeder Temperaturstufe die Exzystierungsrate vor der Inokulation bestimmt. Diese sank mit steigender Temperatur kontinuierlich; die bei 50 °C inkubierten Oozysten wiesen nur noch eine Exzystierungsrate von 10 % auf und bei 55 °C inkubierten Oozysten ließen sich keine freien Sporoziten mehr nachweisen. Die Ergebnisse führen zu der Vermutung, dass die Oozysten durch die thermische Behandlung ihre Fähigkeit zu exzystieren verloren haben.

5.6 Digitale Bildanalyse mit Leica QWin

Die digitale Bildanalyse findet in vielen Bereichen, wie der Industrie, der Kriminalistik, der militärischen Aufklärung aber auch in der Medizin zahlreiche Anwendungen. Als ein Beispiel aus der Humanmedizin sei ihre Nutzung als Hilfsmittel in der Melanomfrüherkennung (ELLWANGER 2005) genannt. In der Tiermedizin wird sie bei der histologischen Auswertung von gefärbten Präparaten (STARKE 1997, SCHWICKERT 2002, KORFMANN 2004), zur Analyse von Videoaufzeichnungen (DOERING 1999) oder zur Differenzierung von Kokzidienspezies anhand morphologischer Daten (DAUGSCHIES et al. 1999) angewendet.

Ausgehend von der Zielsetzung, die Infektiosität von *C. parvum* in einem Zellkultursystem möglichst genau bestimmen zu können, wurde die exakte Messung aller Entwicklungsstadien, die sich in einer definierten Zeit in den Monolayern gebildet hatten, angestrebt. In vielen Arbeiten wurden Wirkstoffe gegen *C. parvum in vitro* getestet und verschiedene Vitalitätsassays miteinander verglichen (SLIFKO et al. 1998 u. 1999, ROCHELLE et al. 2002, JOACHIM et al. 2003, SIMMONS u. SOBSEY 2003). Die dabei verwendeten Methoden zur Quantifizierung der intrazellulären Entwicklungsstadien wurden jedoch nur sehr selten diskutiert und oft unzureichend erklärt. Sie umfassen im Wesentlichen verschiedene Zählverfahren, wobei zwischen 25 und 50 mikroskopische Sichtfelder auf die Anwesenheit oder Abwesenheit von Entwicklungsstadien durchmustert wurden (WEIR et al. 2002, PHELPS et al. 2001, SLIFKO 1998, ARMSON et al. 1999) oder die Entwicklungsstadien pro Sichtfeld direkt gezählt wurden (FLANIGAN et al. 1991, SLIFKO et al. 1997, UPTON et al. 1995, JOACHIM et al. 2003, CURRENT und HEYNES 1984).

Im Unterschied zu den beschriebenen Methoden wurden in dieser Arbeit von jeder Zellkultur eine definierte Anzahl Bilder (n=10) fotografiert und einem Bildanalyseprogramm (QWin[®] von LEICA) zugeführt. Eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse dieser Arbeit mit anderen Veröffentlichungen ist, bedingt durch die unterschiedlichen Versuchsanordnungen (Infektionsmaterial, Inkubationszeit, Zelltyp, Zellkulturmedium, Größe der Zellkultur, mikroskopische Vergrößerung), nur sehr eingeschränkt möglich.

5.6.1 Mikroskopische Betrachtung und Aufnahme von Fluoreszenzbildern

Die Verwendung des Graumodus ermöglichte ein effizienteres Arbeiten, da die Datenmenge pro Bild reduziert wurde und die Software dadurch deutlich schneller arbeitete. Darüber hinaus ist die Bildanalyse, speziell die Detektion, bei einem Graubild einfacher, als dies bei einem mehrfarbigen Bild der Fall ist.

Um den subjektiven Einfluss bei der Bilderauswahl weitgehend zu minimieren, wurden die Zellkulturen mäanderförmig durchmustert und dabei 10 zufällig gewählte Blickfelder fotografiert. Damit sollte, obwohl die Verteilung der Foci auf der gesamten Zellkultur unregelmäßig war und der ausgewertete Bildausschnitt im Vergleich zur Gesamtfläche sehr klein war, eine hinreichend genaue Schätzung der Vermehrung der Parasiten erreicht werden.

Die Aufnahme der Bilder (60 pro Labtek) wurde durch die sinkende Leuchtkraft der Fluorochrome zeitlich begrenzt. Dieser Arbeitsschritt könnte mit Hilfe eines automatischen Kreuztisches und eines Autofokus noch optimiert werden. Wegen der schnelleren Aufnahme (manuelle Fokussierung am Feintrieb des Mikroskops entfällt) könnte die Anzahl der Bilder pro Zellkultur erhöht werden und die Auswahl völlig unabhängig vom Betrachter erfolgen. Die Software ist für die entsprechenden Anwendungen eingerichtet, die sehr teure Geräteausstattung war aber nicht verfügbar.

5.6.2 Auswertung der aufgenommenen Bilder

Im Laufe der Versuche wurden 1270 Bilder einzeln analysiert. Die beschriebenen Arbeitsschritte Autokontrast, Detektion und Teilchenmessung (siehe 4.3.5.2 Ergebnisteil) wurden durch empirische Studien aus einer Vielzahl von Funktionen mit dem Ziel ausgewählt, einen möglichst einfachen und dennoch genügend genauen Analyseweg zu erarbeiten. Um die zeitaufwändige Einzelbildanalyse weiter zu optimieren, wurde eine automatische Messroutine erstellt, die, ausgehend von einem gewählten Startbild, die gewünschte Anzahl Bilder, die zuvor abgespeichert wurden, analysiert.

Jedes Graubild setzt sich aus vielen Pixeln unterschiedlicher Helligkeiten zusammen. Bei der Detektion werden alle Objekte ab einer bestimmten vorgegeben Helligkeit, dem Schwellwert, markiert. Dieser kann bei QWin[®] manuell durch Schieben eines digitalen Reglers oder aber durch die Anwendung einer Autodetektion eingestellt werden.

Im Verlauf der Arbeit mit beiden Funktionen stellte sich die manuelle Detektion als genauer und verlässlicher heraus, da die Autofunktion die Bilder oft überdetektierte, d.h. zu große Areale in die Messung einbezog. Darüber hinaus kann die Autodetektion derzeit nicht in eine Messroutine integriert werden. Das manuelle Setzen des Schwellwertes hängt von der Erfahrung des Anwenders und der Bildqualität ab. Die Schwellwerteinstellung und daraus folgend die Messgenauigkeit der Bildanalyse stieß immer dann an ihre Grenzen, wenn bei einem Bild große Grauwertunterschiede innerhalb der Objekte auftraten. Die Entwicklungsstadien stellen sich im Idealfall weiß vor einem schwarzen Hintergrund dar. Es kam jedoch oft innerhalb eines Bildes zu abweichenden Helligkeiten, also hellgrauen neben weißen Foci. Eine Detektion mit einem niedrigeren Schwellwert erfasste auch alle dunkleren Teilchen, aber gleichzeitig kam es zur Überdetektion der hellen Teilchen. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Detektion ein Arbeitsschritt ist, der entscheidend die Messergebnisse beeinflusst, von der Subjektivität des Betrachters abhängt und immer einen Kompromiss zwischen Über- und Unterdetektion der zu messenden Flächen darstellt.

In der Testphase wurden Einzelbilder ausgedruckt, die Entwicklungsstadien manuell gezählt und mit dem Ergebnis der digitalen Bildanalyse verglichen. Darüber hinaus erfolgte die Überprüfung der Teilchengröße durch einfache Division der gemessenen Flächen durch die Anzahl gemessener Teilchen. Die durchschnittliche Fläche eines Teilchens betrug $7,75 \mu\text{m}^2$. Daraus ergibt sich eine Größe (Durchmesser) von durchschnittlich $3,14 \mu\text{m}$ pro Focus, ein Wert, der gut mit den Angaben aus der Literatur (SLIFKO et al. 1997) übereinstimmt.

Im Vergleich zur Flächenmessung ist die Focimessung komplexer, da sie den Zwischenschritt der Teilchensegmentierung (Binärsegmentierung) erfordert. Bei diesem Befehl werden die detektierten Flächen in drei aufeinander folgenden Zyklen überall dort, wo Einschnitte vorhanden sind, geteilt.

Die Genauigkeit der Focimessung wird durch die systembedingten Möglichkeiten der Binärsegmentierung mit Qwin[®] limitiert, welche nur dann eine Segmentierung von Clustern vornehmen kann, wenn zwischen den Teilchen genügend tiefe Einschnitte bestehen. Bilden mehrere Entwicklungsstadien eine ovale Fläche, wird diese als einzelner Focus in der Messung erfasst.

Für weitere Vitalitätsstudien genügt es, die Flächenmessung allein (keine Focizählung) vorzunehmen. Dies kann damit begründet werden, dass die Ergebnisse aus beiden Messarten eine vergleichbar gute Korrelation ($r_s = 0,93 - 0,99$) zeigten und die theoretische Anzahl gebildeter Foci aus den detektierten Flächen errechnet werden kann. Das Setzen von Akzeptanzkriterien (Äquivalenter Durchmesser 2 – 15 μm) war weiterhin erforderlich, um Artefakte ausschließen zu können.

5.6.3 Erstellung einer Messroutine

Die Erstellung einer Messroutine erfolgte mit der Zielsetzung, den zeitlichen Aufwand der Bildanalyse zu reduzieren und gleichzeitig mögliche individuelle Fehlerquellen, die bei der Einzelbildanalyse auftreten können, zu umgehen. Ein Beispiel dafür ist das Gleichsetzen von Bild -und Messrahmen. Dieser erste Arbeitsschritt ist in der Messroutine integriert und muss nicht mehr per Maus in jedem Bild vollzogen werden. Die Messroutine sollte so benutzerfreundlich gestaltet werden, dass sie für jeden Anwender einfach und verständlich ist.

So wird z. B. der Anwender durch einen Text, der in einem separaten Fenster erscheint, aufgefordert: „Wählen Sie bitte ein Startbild aus“ und gleichzeitig öffnet sich der Ordner aus dem zuletzt benutzten Verzeichnis. Wie bei der Auswahl von Dateien üblich, kann nun durch Anklicken ein beliebiges Bild aus dieser oder auch aus anderen Dateien ausgewählt werden. Während die Routine ihre Messungen ausführt, erscheint in Fenstern synchron ein Text, der erklärt, welcher der Befehle gerade abgearbeitet wird. Dadurch kann der Anwender stets überprüfen, wie die Messroutine arbeitet.

Anders als bei der Einzelbildanalyse kann der Schwellwert zur Detektion nicht für jedes Bild manuell eingestellt werden. Hier wurde eine Schleife programmiert, die nach dem Öffnen des ersten Bildes eine manuelle Eingabe abfordert und den gewählten Schwellwert bis zum letzten Bild beibehält.

Diese Arbeitsweise erscheint sinnvoll, da der Schwellwert abhängig von der Bildqualität ist und diese sich innerhalb eines Versuches nicht wesentlich verändert.

Der Test auf signifikante Unterschiede zwischen beiden Messarten lieferte keine klare Aussage bei der Auswertung von 170 Bildern, da 8 von 17 Zellkulturen signifikante Unterschiede in den Einzelwerten (Flächen pro Bild) erreichten. Bezogen auf die Reduktion gemessener Flächen von einer höheren zur nächst niedrigen Infektionsstufe (1 log-Stufe) konnten bei der Auswertung über die Messroutine annähernd die gleichen Werte wie bei der Einzelbildanalyse erzielt werden (48,5 % und 51,9 %). Dabei muß jedoch die Tatsache Berücksichtigung finden, dass diese Zahlen die Mittelwerte aus fünf Versuchen darstellen. Eine genügend hohe Anzahl Versuchswiederholungen sind für die Genauigkeit der Methode unabdingbar.

Obwohl man davon ausgehen kann, dass die manuelle Detektion zu genaueren Ergebnissen im Einzelbild führt, überwiegen die Vorteile der Messroutine vor allem in Hinblick auf die große Zeitersparnis und die Reduzierung von Anwenderfehlern.

Ausblick - digitale Bildanalyse

Die Nutzung der digitalen Bildanalyse für die Immunfluoreszenztechnik bietet gegenüber dem manuellen Bewerten der markierten Areale zahlreiche Vorteile. Der Zeitpunkt der Auswertung der gespeicherten Bilder ist unabhängig von der Dauer der Leuchtintensität der Fluorochrome. Ein Vergleich der Ergebnisse aus unterschiedlichen Versuchen ist jederzeit über die abgespeicherten Bilder möglich. Darüber hinaus bietet die digitale Bildbearbeitung die Option, Bildbereiche oder ganze Bilder für die Analyse zu optimieren. Ein weiterer Vorteil liegt in der Zeitersparnis, die eine automatische Detektion mit sich bringt. Um die methodenbedingten Schwankungen bei der Messung von Entwicklungsstadien in einer Zellkultur zu reduzieren, wäre die Erhöhung der Anzahl aufgenommener Blickfelder pro Zellkultur günstig. Die Auswertung einer großen Anzahl von Bildern pro Zellkultur ist mit Hilfe der vorliegenden automatischen Messroutine möglich.

Gegenüber modernen molekularbiologischen Verfahren wie der realtime-PCR ist der IFAT ein kostengünstiges und einfaches Nachweisverfahren. Auch in Hinblick auf die Störanfälligkeit ist der IFAT im Vergleich zu einer PCR das robustere Verfahren und für eine routinemäßige Anwendung in den hier untersuchten Testsystemen zu empfehlen.

6 Zusammenfassung

Cathleen Wackwitz

Vitalitätsbestimmung von *Cryptosporidium-parvum*-Oozysten in einem Zellkultursystem mittels Immunfluoreszenztechnik und computergestützter Bildanalyse

Institut für Parasitologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig
und

Institut für Parasitologie und Zoologie, Department für Pathobiologie der
Veterinärmedizinischen Universität Wien

Eingereicht im April 2007

87 S., 18 Abb., 10 Tab., 204 Lit., 15 Anhangstabellen

Schlüsselwörter: *Cryptosporidium parvum*, Vitalität, Infektiosität, In-vitro-Kultivierung, IFAT, Digitale Bildanalyse

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode zur Vitalitätsbestimmung von *C. parvum*-Oozysten *in vitro* auf der Basis eines Immunfluoreszenztests mit anschließender digitaler Auswertung entwickelt. Die sehr kleinen Oozysten der Kryptosporidien kommen als infektiöse Dauerstadien in der Umwelt vor und können als Zoonoseerreger besonders für immunsupprimierte Menschen zur Gefahr werden. In der Tiermedizin spielen sie vor allem eine wichtige Rolle als Erreger von Kälberdurchfällen. Der mikroskopische Nachweis liefert keine Aussage über die Vitalität und Infektiosität der Oozysten bzw. der darin enthaltenen Sporozoiten. Infizieren diese jedoch nachweisbar eine Zellkultur, so kann dies als Indiz für ihre Vitalität angesehen werden. Für den Nachweis der intrazellulären Entwicklungsstadien wurden das direkte und indirekte Immunfluoreszenzverfahren gewählt, wobei bereits konjugierte polyklonale Antikörper und nicht-konjugierte monoklonale Antikörper vergleichend getestet wurden. Beide Antikörper waren für die Methode gleichermaßen gut geeignet. Die Zellkulturen wurden in einem für diese Technik erstmals angewendeten Verfahren mittels digitaler Bildanalyse (Qwin[®], LEICA) ausgewertet. Im ersten Teil der Studie wurden unbehandelte Oozysten aus drei unterschiedlichen Feldisolaten untersucht und verschiedene Inokulationsdosen getestet. Die Ergebnisse zeigten hohe Standardabweichungen und teilweise signifikante Unterschiede unter gleichartigen Versuchsbedingungen.

Obwohl eine Vielzahl von Faktoren Einfluss auf die Anzahl der intrazellulären Entwicklungsstadien besitzt, wird hier als Hauptursache die ungleiche Verteilung der Parasiten auf der Zellkultur bzw. die Auswertung eines zu kleinen Ausschnittes der Gesamtfläche angenommen. Die Anwendung der Methode im zweiten Teil der Studien mit thermisch inaktivierten Oozysten zeigte reproduzierbare Ergebnisse über den Zeitpunkt einer annähernd 100 %-igen Abtötung (5 log-Stufen) der Parasiten bei 55 °C und 4 Stunden Inkubation. Die Methode reagierte auf eine schrittweise Temperaturerhöhung um zwei Grad (40 °C – 50 °C) mit kontinuierlich abnehmenden Flächen der intrazellulären Entwicklungsstadien. Die Inkubation bei 50 °C über 1 h reichte nicht aus, um alle Oozysten abzutöten. Zusammenfassend lassen diese Versuche die Schlussfolgerung zu, dass Temperaturen zwischen 50 und 55 °C in Abhängigkeit von der Zeit der Hitzeeinwirkung zu einer völligen Inaktivierung der Parasiten *in vitro* führen. Die Auswertung der Fluoreszenzbilder mit Hilfe einer Bildanalysesoftware ist ausreichend genau und zeitsparend. Eine Automatisierung der Bildaufnahme könnte die Qualität der hier vorgestellten Methode noch verbessern, da so die Bilderauswahl standardisiert werden könnte. Darüber hinaus würde eine größere Anzahl Bilder pro Zellkultur die Sensitivität der Methode erhöhen. Um die Effizienz der Bildanalyse weiter zu erhöhen, wurde eine automatische Messroutine geschrieben und deren Anwendung getestet. Ein Vergleich der damit erzielten Ergebnisse mit denen der Einzelbildanalyse lieferte teils signifikante, teils nichtsignifikante Unterschiede in den Einzelwerten, die Zeitdauer der Analyse verringerte sich jedoch erheblich. Insgesamt stellt die hier entwickelte Methode zur Vitalitätsbestimmung von *C. parvum* eine moderne und leistungsfähige Alternative zu beschriebenen Zellkultursystemen dar.

7 Summary

Cathleen Wackwitz

Viability tests for *Cryptosporidium-parvum*-Oocysts in cell culture with immunofluorescence and computer based image analysis

Institute of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

and

Institute of Parasitology and Zoology, Department of Pathobiology, University of Veterinary Medicine Vienna

Submitted in April 2007

87 pp., 18 fig., 10 tab., 204 ref., 15 appendices

Keywords: *Cryptosporidium parvum*, viability, infectivity, *in vitro* cultivation, IFAT, digital image analysis

In the presented work, a method to determine the *in vitro* viability of *C. parvum* oocysts was developed. The tiny oocysts occur as infectious parasitic stages in the environment and pose a risk as causal agents of zoonosis especially in immunosuppressive humans. In animals they play an important role as a cause of diarrhea in calves. The microscopic detection gives no indication about viability and infectivity of oocysts or enclosed sporozoites. If these detectably infect tissue culture though, this can be used as indication for their viability. Direct and indirect immunofluorescence were chosen for detection of intracellular developmental stages. Conjugated polyclonal antibodies and unconjugated monoclonal antibodies were compared. Both antibodies were equally suitable. Tissue cultures were evaluated by digital image analysis (QWin[®], LEICA), which is a completely new technique for this purpose. In the first part of the study untreated oocysts obtained from three field isolates were used and different inoculation doses were tested. The results showed high standard deviations and sometimes significant differences under identical conditions. Even though a multitude of factors has influence on the number of intracellular developmental stages, the main reason is seen in the uneven distribution of the parasites in the cell culture or the evaluation of a too small part of the cell culture.

The use of this method with thermically inactivated oocysts in the second part of experiments showed reproduceable results of almost 100 % inactivation of the parasites at 55 °C for 4 hours.

The method was sensitive to a stepwise temperature increase of 2 °C (40°C - 50°C) with continuous decrease of the area of intracellular developmental stages. A temperature of 50 °C for 1 hour was not sufficient to kill all oocysts. In summary, these experiments lead to the conclusion that temperatures between 50 °C and 55 °C in dependence of the exposure time result in a complete inactivation of the parasites *in vitro*. The evaluation of images of fluorescence with digital analysis software is sufficiently exact and time-saving. An automation of picture selection and acquisition could improve the quality of the presented method and allows standardization. Additionally, a higher number of pictures per tissue culture could increase the suitability of the method. The digital image analysis was optimised by creating an automated routine which allows us to measure a large number of images in a shorter time, and thus reducing human error.

8 Literaturverzeichnis

Abrahamsen MS, Templeton TJ, Enomoto S, Abrahante JE, Zhu G, Lancto CA, et al. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science*. 2004;304(5669):441-55.

Adams RB, Guerrant RL, Zu SX, Fang GD, Roche JK. *Cryptosporidium parvum* infection of intestinal epithelium: morphologic and functional studies in an *in vitro* model. *J Infect Dis*. 1994;169(1):170-7.

Aji T, Flanigan T, Marshall R, Kaetzel C, Aikawa M. Ultrastructural study of asexual development of *Cryptosporidium parvum* in a human intestinal cell line. *J Protozool*. 1991;38(6):82-4.

Angus KW. Cryptosporidiosis in domestic animals and humans. *In Pract*. 1987;9:47-9.

Anusz K, Mason PH, Riggs MW, Perryman LE. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in bovine feces by monoclonal antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol*. 1990;28(12):2770-4.

Argenzio RA, Liacos JA, Levy ML, Meuten DJ, Lecce JG, Powell DW. Villous atrophy, crypt hyperplasia, cellular infiltration, and impaired glucose-Na⁺ absorption in enteric cryptosporidiosis of pigs. *Gastroenterology*. 1990;98(5 Pt 1):1129-40.

Armson A, Meloni BP, Reynoldson JA, Thompson RCA. Assessment of drugs against *Cryptosporidium parvum* using a simple *in vitro* screening method. *FEMS Microbiol Lett*. 1999a;178(2):227-33.

Armson A, Sargent K, MacDonald LM, Finn MP, Thompson RCA, Reynoldson JA. A comparison of the effects of two dinitroanilines against *Cryptosporidium parvum in vitro* and *in vivo* in neonatal mice and rats. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1999b;26(2):109-13.

Arrowood MJ. *In vitro* cultivation of *Cryptosporidium* species. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(3):390-400.

Atwill ER, Johnson EM, Pereira MC. Association of herd composition, stocking rate, and duration of calving season with fecal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in beef herds. *J Am Vet Med Assoc*. 1999;215(12):1833-8.

Barbee SL, Weber DJ, Sobsey MD, Rutala WA. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity by disinfection and sterilization processes. *Gastrointest Endosc*. 1999;49(5):605-11.

Bennett JW, Gauci MR, Le Moenic St, Schäfer FW, Lindquist HDA. A comparison of enumeration techniques for *cryptosporidium parvum* oozysts. *J Parasitol*. 1999;85(6):1131-65.

Bialek R, Binder N, Dietz K, Joachim A, Konbloch J, Zelck UE. Comparison of fluorescence, antigen and PCR assays to detect *Cryptosporidium parvum* in fecal specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002;43(4):283-8.

Black EK, Finch GR, Taghi-Kilani R, Belosevic M. Comparison of assays for *Cryptosporidium parvum* oocysts viability after chemical disinfection. *FEMS Microbiol Lett*. 1996;135(2-3):187-9.

Bodley-Tickell AT, Kitchen SE, Sturdee AP. Occurrence of *Cryptosporidium* in agricultural surface waters during an annual farming cycle in lowland UK. *Water Res*. 2002;36(7):1880-6.

Böse R. Desinfektion von *Cryptosporidium parvum*-Oozysten mit Neopredisan®. *Schweinewelt*. 1998;23(6):28.

Brasseur P. Waterborne cryptosporidiosis: a major environmental risk. *J Eukaryot Microbiol*. 1997;44(6):67-8.

Brasseur P, Lemeteil D, Ballet J-J. Anti-cryptosporidial drug activity screened with an immunosuppressed rat model. *J Protozool*. 1991;38(6):230-1.

Buraud M, Forget E, Favennec L, Bizet J, Gobert J-G, Deluol AM. Sexual stage development of *cryptosporidia* in the Caco-2 cell line. *Inf Immun*. 1991;59(12):4610-3.

Cacciò S, Spano F, Pozio E. Large sequence variation at two microsatellite loci among zoonotic (genotype C) isolates of *Cryptosporidium parvum*. *Int J Parasitol*. 2001;31(10):1082-6.

Cai X, Woods KM, Upton SJ, et al. Application of quantitative real-time reverse transcription-PCR in assessing drug efficacy against the intracellular pathogen *Cryptosporidium parvum* *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(11):4437-42.

Camero L, Arrowood M, Shulaw W, et al. Characterization of new monoclonal antibodies against *Cryptosporidium parvum* sporozoites. *J Eukaryot Microbiol*. 1999;46(5):58-9.

Campbell AT, Robertson LJ, Smith HV. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts: correlation of *in vitro* excystation with inclusion or exclusion of fluorogenic vital dyes. *Appl Environ Microbiol*. 1992;58(11):3488-93.

Campbell I, Tzipori S, Hutchison G, Angus KW. Effect of disinfectants on survival of *cryptosporidium* oocysts. *The Veterinary Record*. 1982;414-5.

Carey CM, Lee H, Trevors JT. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Res*. 2004;38(4):818-62.

Carraway M, Tzipori S, Widmer G. Identification of genetic heterogeneity in the *Cryptosporidium parvum* ribosomal repeat. *Appl Environ Microbiol*. 1996;62(2):712-6.

Chalmers RM, Elwin K, Reilly WJ, Irvine WJ, Thomas AL, Hunter PR. *Cryptosporidium* in farmed animals: the detection of a novel isolate in sheep. *Int J Parasitol.* 2002;32(1):21-6.

Chauret CP, Radziminski CZ, Lepuil M, Creason R, Andrews RC. Chlorine dioxide inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and bacterial spore indicators. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(7):2993-01.

Clavel A, Doiz O, Morales S, Varea M, Seral C, Castillo FJ, et al. House fly (*Musca domestica*) as a transport vector of *Cryptosporidium parvum*. *Folia Parasitol.* 2002;49(2):163-4.

Crabb JH. Antibody-based immunotherapy of cryptosporidiosis. *Adv Parasitol.* 1998;40:121-49.

Craik SA, Weldon D, Finch GR, Bolton JR, Belosevic M. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts using medium- and low-pressure ultraviolet radiation. *Water Res.* 2001;35(6):1387-98.

Current WL, Blagburn BL. *Cryptosporidium*: infections in man and domestic animals. In: Long PL, editor. *Coccidiosis of Man and Domestic Animals*. Boca Raton: CRC Press; 1990. p. 155-85.

Current WL, Garcia LS. Cryptosporidiosis: clinical features and diagnosis. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1989;27(6):439-60.

Current WL, Garcia LS. Cryptosporidiosis. *Clin Lab Med.* 1991;11(4):873-97.

Current WL, Haynes TB. Complete development of *Cryptosporidium* in cell culture. *Science* 1984;224(4649):603-5.

Current WL, Reese NC. A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. *J Protozool.* 1986;33(1):98-08.

Dauguschies A, Imarom S, Bollwahn W. Differentiation of porcine *Eimeria* spp. by morphologic algorithms. *Vet Parasitol.* 1999;81:201-10.

De Graaf DC, Vanopdenbosch E, Ortega-Mora LM, Abbassi H, Peeters JE. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int J Parasitol.* 1999;29(8):1269-87.

De Roubin M-R, Pharamond J-S, Zanelli F, Poty F, Houdart S, Laurent F, et al. Application of laser scanning cytometry followed by epifluorescent and differential interference contrast microscopy for the detection and enumeration of *Cryptosporidium* and *Giardia* in raw and potable waters. *J Appl Microbiol.* 2002;93(4):599-07.

Deng MQ, Cliver DO. *Cryptosporidium parvum* development in the BS-C-1 cell line. *J Parasitol.* 1998;84(1):8-15.

Deng MQ, Cliver DO. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts in cider by flash pasteurization. J Food Prot. 2001;64(4):523-7.

Di Giovanni GD, Hashemi FH, Shaw NJ, Abrams FA, LeChevallier MW, Abbaszadegan M. Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in surface and filter backwash water samples by immunomagnetic separation and integrated cell culture-PCR. Appl Environ Microbiol. 1999;65(8):3427-32.

Doering D. Käfigraumausnutzung bei Laborratten.[Dissertation med.vet].Berlin:FU Berlin;1999

Doll L, Meyer J, Oechser H, and Philipp W. Verfahrenstechnische und mikrobiologische Untersuchungen zur Abtötung von Kryptosporidien in Flüssigmist mittels der Verfahren der aerob-thermischen Stabilisierung und der thermophilen Anaerobbehandlung Report:Universität Hohenheim;1999.

Driedger AM, Rennecker JL, Marinas BJ. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with ozone and monochloramine at low temperature. Water Res. 2001;35, No.1:41-8.

DuPont HL, Chappell CL, Sterling CR, Okhuysen PC, Rose JB, Jakubowski W. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. N Engl J Med. 1995;332(13):855-9.

Eckert E. Studien zur Vitalitätsabschätzung von *C. parvum*. [Dissertation med.vet]. Hannover:Tierärztl.Hochsch.; 2001.

Ellwanger, U. Digitale Bildanalyse: Screening-Hilfe für die Melanomfrüherkennung. Deutsches Ärzteblatt. Supplement:Praxis 102, (44)p. 14

Enemark HL, Ahrens P, Juel CD, Petersen E, Petersen RF, Andersen JS, et al. Molecular characterization of Danish *Cryptosporidium parvum* isolates. Parasitology. 2002a;125(Pt4):331-41.

Enemark HL, Ahrens P, Lowery CJ, Thamsborg SM, Enemark JMD, Bille-Hansen V, et al. *Cryptosporidium andersoni* from a Danish cattle herd: identification and preliminary characterisation. Vet Parasitol. 2002b;107(1-2):37-49.

Enemark HL, Bille-Hansen V, Lind P, Heegaard PMH, Vigre H, Ahrens P, et al. Pathogenicity of *cryptosporidium parvum*-evaluation of an animal infection model. Veterinary Para. 2003;113:35-57.

Favennec L, Egraz-Bernard M, Comby E, Lemeteil D, Ballet J-J, Brasseur P. Immunofluorescence detection of *Cryptosporidium parvum* in Caco-2 cells: a new screening method for anticryptosporidial agents. J Eukaryot Microbiol. 1994;41(5):39S.

Fayer R. Effect of high temperature on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water. Appl Environ Microbiol. 1994;60(8):2732-5.

Fayer R, Graczyk TK, Cranfield MR, Trout JM. Gaseous disinfection of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol.* 1996a;62(10):3908-9.

Fayer R, Leek RG. The effects of reducing conditions, medium, pH, temperature, and time on *in vitro* excystation of *cryptosporidium*. *J Parasitol.* 1984;31(4):567-9.

Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol.* 2000;30(12-13):1305-22.

Fayer R, Speer CA, Dubey JP. The general biology of *Cryptosporidium*. In: Fayer R, editor. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. Boca Raton: CRC Press; 1997. p. 1-42.

Fayer R, Trout J, Nerad T. Effects of a wide range of temperatures on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J Eukaryot Microbiol.* 1996b;43(5):64S.

Fichtenbaum CJ, Zackin R, Feinberg J, Benson C, Griffiths JK. Rifabutin but not clarithromycin prevents cryptosporidiosis in persons with advanced HIV infection. *AIDS.* 2000;14(18):2889-93.

Finch GR, Black EK, Gyürék L, Belosevic M. Ozone inactivation of *Cryptosporidium parvum* in demand-free phosphate buffer determined by *in vitro* excystation and animal infectivity. *Appl Environ Microbiol.* 1993;59(12):4203-10.

Flanigan T, Aji T, Marshall R, Soave R, Aikawa M, Kaetzel C. Asexual development of *Cryptosporidium parvum* within a differentiated human enterocyte cell line. *Inf Immun.* 1991;59(1):234-9.

Gargala G, Delaunay A, Favennec L, Brasseur P, Ballet J-J. Enzyme immunoassay detection of *Cryptosporidium parvum* inhibition by sinefungin in sporozoite infected HCT-8 enterocytic cells. *Int J Parasitol.* 1999;29(5):703-9.

Giacometti A, Cirioni O, Barchiesi F, Ancarani F, Scalise G. Activity of nitazoxanide alone and in combination with azithromycin and rifabutin against *Cryptosporidium parvum* in cell culture. *J Antimicrob Chemother.* 2000;45(4):453-6.

Giacometti A, Cirioni O, del Prete MS, Barchiesi F, Fineo A, Scalise G. Activity of buforin II alone and in combination with azithromycin and minocycline against *Cryptosporidium parvum* in cell culture. *J Antimicrob Chemother.* 2001;47(1):97-9.

Girouard D, Gallant J, Akiyoshi DE, Nunnari J, Tzipori S. Failure to propagate *Cryptosporidium* spp. in cell-free culture. *J Parasitol.* 2006;92(2):399-400.

Godiwala NT, Vandewalle A, Ward HD, et al. Quantification of *in vitro* and *in vivo* *Cryptosporidium parvum* infection by using real-time PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(6):4484-8.

Göbel E. Die Kryptosporidiose des neugeborenen Kalbes: Erreger, Krankheitsgeschehen und Bekämpfung. *Prakt Tierarzt, Colleg vet.* 1991;XXI (1990):14-6.

- Gold D, Stein B, Tzipori S. The utilization of sodium taurocholate in excystation of *Cryptosporidium parvum* and infection of tissue culture. *J Parasitol.* 2001;87(5):997-1000.
- Graczyk TK, Cranfield MR, Fayer R, Bixler H. House flies (*Musca domestica*) as transport hosts of *Cryptosporidium parvum*. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;61(3):500-4.
- Griffiths JK, Balakrishnan R, Widmer G, Tzipori S. Paromomycin and geneticin inhibit intracellular *Cryptosporidium parvum* without trafficking through the host cell cytoplasm: implications for drug delivery. *Inf Immun.* 1998;66(8):3874-83.
- Griffiths JK, Moore R, Dooley S, Keusch GT, Tzipori S. *Cryptosporidium parvum* infection of Caco-2 cell monolayers induces an apical monolayer defect, selectively increases transmonolayer permeability, and causes epithelial cell death. *Inf Immun.* 1994;62(10):4506-14.
- Grimason AM, Smith HV, Parker JFW, Bukhari Z, Campbell AT, Robertson LJ. Application of DAPI and immunofluorescence for enhanced identification of *Cryptosporidium* spp. oocysts in water samples. *Water Res.* 1994;28(3):733-6.
- Gut J, Petersen C, Nelson R, Leech J. *Cryptosporidium parvum*: *in vitro* cultivation in Madin-Darby canine kidney cells. *J Protozool.* 1991;38(6):72-3.
- Hamer DH, Ward H, Tzipori S, Pereira ME, Alroy JP, Keusch GT. Attachment of *Cryptosporidium parvum* sporozoites to MDCK cells *in vitro*. *Inf Immun.* 1994;62(6):2208-13.
- Hanes DE, Worobo RW, Orlandi PA, Burr DH, Miliotis MD, Robl MG, Bier JW, Arrowood MJ, Churey JJ, Jackson GJ Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts in fresh apple cider by UV irradiation. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(8):4168-72.
- Harp JA, Fayer R, Pesch BA, Jackson GJ. Effect of Pasteurization on Infectivity of *Cryptosporidium parvum* Oocysts in water and milk. *Appl Environ Microbiol.* 1996;2866-68.
- Harp JA, Woodmansee DB, Moon HW. Effects of colostral antibody on susceptibility of calves to *Cryptosporidium parvum* infection. *American journal of veterinary research.* 1989;50(12):2117-9.
- Harp JA. *Cryptosporidium* and host resistance: historical perspective and some novel approaches. *Anim Health Res Rev.* 2003; 4(1):53-62
- Harrington BJ, Kassa H. A comparison of an immunoassay with acid-fast staining to detect cryptosporidium. *Lab Med.* 2002;33(6):451-4.
- Hashim A, Clyne M, Mulcahy G, et al. Host cell tropism underlies species restriction of human and bovine *Cryptosporidium parvum* genotypes. *Infect Immun.* 2004; 72(10):6125-31.
- Heiges M, Wang H, Robinson E, et al. CryptoDB: a *Cryptosporidium* bioinformatics resource update. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34(Database issue):419-22.

Heine J. A simple technic for the demonstration of cryptosporidia in feces. *Zentralbl Veterinarmed B (Germany, West)*. 1982;29(4):324-7.

Heine J, Moon HW, Woodmansee DB, Pohlenz JF. Experimental tracheal and conjunctival infections with *Cryptosporidium* sp. in pigs. *Vet Parasitol*. 1984;17(1):17-25.

Henriksen SA, Pohlenz JF. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Vet Scand (Denmark)*. 1981; 22(3-4):594-6.

Henriksen SA, Krogh HV. Bovine cryptosporidiosis in Denmark. 1. Prevalence, age distribution, and seasonal variation. *Nord Vet Med*. 1985;37(1):34-41.

Higgins JA, Fayer R, Trout JM, et al. Real-time PCR for the detection of *Cryptosporidium parvum*. *J Microbiol Methods*. 2001;47(3):323-37.

Hijjawi NS, Meloni BP, Ng'anzo M, Ryan UM, Olson ME, Cox PT, Monis PT, Thompson RC. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *Int J Parasitol*. 2004;34(7):769-77.

Hijjawi N. *In vitro* cultivation and development of *cryptosporidium* in cell culture. From molecules to disease. 2006. p. 233-53.

Hijjawi NS, Meloni BP, Morgan UM, Thompson RCA. Complete development and long-term maintenance of *Cryptosporidium parvum* human and cattle genotypes in cell culture. *Int J Parasitol*. 2001;31(10):1048-55.

Hunter PR, Hughes S, Woodhouse S, et al. Sporadic cryptosporidiosis case-control study with genotyping. *Emerg Infect Dis*. 2004; 10(7):1241-9.

Jenkins MB, Anguish LJ, Bowman DD, et al. Assessment of a dye permeability assay for determination of inactivation rates of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol*. 1997;63(10):3844-50.

Jenkins MB, Bowman DD, Ghiorse WC. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts by ammonia. *Appl Environ Microbiol*. 1998a;64(2):784-8.

Jenkins MC, Trout J, Fayer R. Development and application of an improved semiquantitative technique for detecting low-level *Cryptosporidium parvum* infections in mouse tissue using polymerase chain reaction. *J Parasitol*. 1998b;84(1):182-6.

Jenkins M, Higgins J, Kniel KE, Trout J, Fayer R. Protection of calves against cryptosporidiosis by oral inoculation with gamma-irradiated *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J Parasitol*. 2004;90(5):1178-80.

Joachim A, Eckert E, Petry F, Bialek R, Dauschies A. Comparison of viability assays for *Cryptosporidium parvum* oocysts after disinfection. *Vet Parasitol*. 2003a;111(1):47-57.

Joachim A, Krull T, Schwarzkopf J, Dauschies A. Prevalence and control of bovine cryptosporidiosis in German dairy herds. *Vet Parasitol.* 2003b;112(4):277-88.

Joachim A. Human cryptosporidiosis: an update with special emphasis on the situation in Europe. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2004;51(6):251-9.

Kniel KE, Sumner SS, Lindsay DS, Hackney CR, Pierson MD, Zajac AM, et al. Effect of organic acids and hydrogen peroxide on *Cryptosporidium parvum* viability in fruit juices. *J Food Prot.* 2003;66(9):1650-7.

Korfmann MA. Zur Skelettentwicklung und Wachstumsdynamik der Beckengliedmaße bei Mastputen.[Dissertation med.vet].Berlin: FU Berlin;2004.

Korich DG, Mead JR, Madore MS, Sinclair NA, Sterling CR. Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Appl Environ Microbiol.* 1990;56(5):1423-8.

Kuhls TL, Mosier DA, Crawford DL. Effects of carbohydrates and lectins on cryptosporidial sporozoite penetration of cultured cell monolayers. *J Protozool.* 1991;38(6):74-6.

Lacharme L, Villar V, Rojo-Vazquez FA, et al. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in rabbit chondrocytes (VELI cells). *Microbes Infect.* 2004;6(6):566-71.

Laurent F, Kagnoff MF, Savidge TC, Naciri M, Eckmann L. Human intestinal epithelial cells respond to *Cryptosporidium parvum* infection with increased prostaglandin H synthase 2 expression and prostaglandin E2 and F2alpha production. *Inf Immun.* 1998;66(4):1787-90.

Laurent F, McCole D, Eckmann L, Kagnoff MF. Pathogenesis of *Cryptosporidium parvum* infection. *Microbes Infect.* 1999;1(2):141-8.

Lawton P, Naciri M, Mancassola R, Petavy A-F. Cultivation of *Cryptosporidium parvum* in a non-adherent human monocytic cell line. *J Microbiol Methods.* 1996;27(2-3):165-73.

Lawton P, Naciri M, Mancassola R, Petavy A-F. *In vitro* cultivation of *Cryptosporidium parvum* in the non-adherent human monocytic THP-1 cell line. *J Eukaryot Microbiol.* 1997;44(6):66S.

LeChevallier MW, Di Giovanni GD, Clancy JL, Bukhari Z, Bukhari S, Rosen JS, et al. Comparison of method 1623 and cell culture-PCR for detection of *Cryptosporidium* spp. in source waters. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(2):971-9.

Levine ND. Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *J Parasitol.* 1980;66(5):830-4.

Levine ND. Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (protozoa, apicomplexa). *J Protozool.* 1984;31(1):94-8.

- Liebler E, Pohlenz JF, Woodmansee DB. Experimental intauterine infection of adult BALB/c mice with *Cryptosporidium* sp. *Inf Immun*. 1986;54(1):255-9.
- Linden KG, Shin G, Sobsey MD. Comparative effectiveness of UV wavelengths for the inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water. *Water Sci Technol*. 2001;43(12):171-4.
- Lindsay DS, Upton SJ, Owens DS, Morgan UM, Mead JR, Blagburn BL. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: *Cryptosporiidae*) from cattle, *Bos taurus*. *J Eukaryot Microbiol*. 2000a;47(1):91-5.
- Lindsay DS, Woods KM, Upton SJ, Blagburn BL. Activity of decoquinate against *Cryptosporidium parvum* in cell cultures and neonatal mice. *Vet Parasitol*. 2000b;89(4):307-11.
- Luginbühl A, Pfister K. Die Kryptosporidiose des Kalbes als schwerwiegendes Bestandsproblem. *Schweiz Arch Tierheilk*. 1996;138(4):195-200.
- Lumb R, Smith K, O'Donoghue PJ, Lanser JA. Ultrastructure of the attachment of *Cryptosporidium* sporozoites to tissue culture cells. *Parasitol Res*. 1988;74(6):531-6.
- MacKenzie WR, Schell WL, Blair KA, Addiss DG, Peterson DE, Hoxie NJ, et al. Massive outbreak of waterborne *Cryptosporidium* infection in Milwaukee, Wisconsin: recurrence of illness and risk of secondary transmission. *Clin Infect Dis*. 1995;21(1):57-62.
- Maillot C, Favennec L, Francois A, Ducrotte P, Brasseur P. Sexual and asexual development of *Cryptosporidium parvum* in five oocyst- or sporozoite-infected human enterocytic cell lines. *J Eukaryot Microbiol*. 1997;44(6):582-5.
- McDonald V, Stables R, Warhurst DC, Barer MR, Blewett DA, Chapman HD, et al. *In vitro* cultivation of *Cryptosporidium parvum* and screening for anticryptosporidial drugs. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990;34(8):1498-1500.
- McLauchlin J, Amar C, Pedraza-Díaz S, Nichols GL. Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. *J Clin Microbiol*. 2000;38(11):3984-90.
- Mallon M, MacLeod A, Wastling J, et al. Population structures and the role of genetic exchange in the zoonotic pathogen *Cryptosporidium parvum*. *J Mol Evol*. 2003; 56(4):407-17.
- Morgan U, Weber R, Xiao L, et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected individuals living in Switzerland, Kenya, and the United States. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(3):1180-3.
- Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, et al. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis*. 1999;5(5):607-25.

Mehlhorn H, Düwel D, Raether W. Diagnose und Therapie der Parasiten von Haus-, Nutz- und Heimtieren, 1993; 2.Auflage Gustav Fischer Verlag. 161-62S

Meulbroek JA, Novilla MN, Current WL. An immunosuppressed rat model of respiratory cryptosporidiosis. J Protozool. 1991;38(6):113-5.

Moore AG, Vesey G, Champion A, Scandizzo P, Deere D, Veal D, et al. Viable *Cryptosporidium parvum* oocysts exposed to chlorine or other oxidising conditions may lack identifying epitopes. Int J Parasitol. 1998;28(8):1205-12.

Morgan UM, Sargent KD, Deplazes P, Forbes DA, Spano F, Hertzberg H, et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* from various hosts. 1998;117(1):31-7.

Morgan UM, Thompson RCA. PCR detection of *Cryptosporidium*: the way forward? Parasitol Today. 1998;14(6):241-5.

Morgan UM, Monis PT, Fayer R, et al. Phylogenetic relationships among isolates of *Cryptosporidium*: evidence for several new species. J Parasitol. 1999; 85(6):1126-33.

Morgan-Ryan UM, Fall A, Ward LA, Hijjawi N, Sulaiman IM, Fayer R, et al. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. J Eukaryot Microbiol. 2002;49(6):433-40.

Mosier DA, Kuhls TL, Simons KR, Oberst RD. Bovine humoral immune response to *Cryptosporidium parvum*. J Clin Microbiol. 1992;30(12):3277-9.

Najrowski M. Etablierung eines In-vitro-Infektionsmodells zur Vitalitätsbeurteilung von *Cryptosporidium-parvum*-Oozysten [Dissertation med.vet]. Leipzig: Vet. Fak.:2006

Neumann NF, Gyürék LL, Finch GR, Belosevic M. Intact *Cryptosporidium parvum* oocysts isolated after *in vitro* excystation are infectious to neonatal mice. FEMS Microbiol Lett. 2000a;183(2):331-6.

Neumann NF, Gyürék LL, Gammie L, Finch GR, Belosevic M. Comparison of animal infectivity and nucleic acid staining for assessment of *Cryptosporidium parvum* viability in water. Appl Environ Microbiol. 2000b;66(1):406-12.

Nichols GL, McLauchlin J, Samuel D. A technique for typing *Cryptosporidium* isolates. J Protozool. 1991;38(6):237-40.

Nydam DV, Lindergard G, Guard CL, Schaaf SL, Wade SE, Mohammed HO. Serological detection of exposure to *Cryptosporidium parvum* in cattle by ELISA and its evaluation in relation to coprological tests. Parasitol Res. 2002;88(9):797-803.

Oechsner H. Wirtschaftsdünger-Verfahren zur Hygienisierung von Flüssigmist zur Ausbringung in Wasserschutzgebieten. Sonderdruck "Landinfo" 2003;(3):1-10

Oelmaier BA. Untersuchungen zum therapeutischen Einsatz eines bovinen Trockenkolostrums bei der neonatalen Diarrhoe des Kalbes.[Dissertation med.vet]. München:TU-München;2002

Okhuysen PC, Chappell CL. *Cryptosporidium* virulence determinants - are we there yet? Int J Parasitol. 2002;32(5):517-5.

Peeters JE, Mazás EA, Masschelein WJ, de Maturana IVM, Debacker E. Effect of disinfection of drinking water with ozone or chlorine dioxide on survival of *cryptosporidium parvum* oocysts. Applied and Environmental Microbiology. 1989;55, (6):1519-22.

Peng MM, Xiao L, Freeman AR, Arrowood MJ, Escalante AA, Weltman AC, et al. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. Emerg Infect Dis. 1997;3(4):567-73.

Petry F, Robinson HA, McDonald V. Murine infection model for maintenance and amplification of *Cryptosporidium parvum* oocysts. J Clin Microbiol. 1995;33(7):1922-4.

Petry F, Shirley MW, Miles MA, McDonald V. Characterisation of a *Cryptosporidium parvum*-specific cDNA clone and detection of parasite DNA in mucosal scrapings of infected mice. Mol Biochem Parasitol. 1998;95(1):21-1.

Petry F. Laboratory diagnosis of *Cryptosporidium parvum* infection. Contrib Microbiol. 2000; 6:33-49

Phelps KK, Lindsay DS, Sumner SS, Fayer R. Immunohistochemistry based assay to determine the effects of treatments on *Cryptosporidium parvum* viability. J Eukaryot Microbiol. 2001;Suppl:40-1.

Pieniazek NJ, Bornay-Llinares FJ, Slemenda SB, Da Silva AJ, Moura INS, Arrowood MJ, et al. New *Cryptosporidium* genotypes in HIV-infected persons. Emerg Infect Dis. 1999;5(3):444-9.

Pohlenz J. Die Kryptosporidiose bei Menschen und Tieren. Dtsch tierärztl Wochenschr. 1987;94(2):67-70.

Pokorny NJ, Weir SC, Carreno RA, et al. Influence of temperature on *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in river water samples as detected by tissue culture assay. J Parasitol. 2002;88(3):641-3.

Puech MC, McAnulty JM, Lesjak M, Shaw N, Heron L, Watson JM. A statewide outbreak of cryptosporidiosis in Nw South Wales associated with swimming at public pools. Epidemiol Infect. 2001;126(3):389-96.

Puiu D, Enomoto S, Buck GA, et al. CryptoDB: the *Cryptosporidium* genome resource. Nucleic Acids Res. 2004; 32(Database issue):329-31.

Quílez J, Sánchez-Acedo C, Clavel A, Del Cacho E, López-Bernad F. Comparison of an acid-fast stain and a monoclonal antibody-based immunofluorescence reagent for the detection of

Cryptosporidium oocysts in faecal specimens from cattle and pigs. *Vet Parasitol.* 1996;67(1-2):75-81.

Quílez J, Vergara-Castilblanco CA, Ares-Mazás ME, Sánchez-Acedo C, Del Cacho E, Freiere-Santos F. Serum antibody response and *Cryptosporidium parvum* oocyst antigens recognized by sera from naturally infected sheep. *Vet Parasitol.* 2002;104(3):187-97.

Rasmussen KR, Larsen NC, Healey MC. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in a human endometrial carcinoma cell line. *Inf Immun.* 1993;61(4):1482-5.

Rehg JE. Anti-cryptosporidial activity of macrolides in immunosuppressed rats. *J Protozool.* 1991;38(6):228-30.

Robertson LJ, Campbell AT, Smith HV. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Appl Environ Microbiol.* 1992;58(11):3494-500.

Rochelle PA, Ferguson DM, Handojo TJ, et al. An assay combining cell culture with reverse transcriptase PCR to detect and determine the infectivity of waterborne *Cryptosporidium parvum*. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63(5):2029-37.

Rochelle PA, Ferguson DM, Johnson AM, De Leon R. Quantitation of *Cryptosporidium parvum* infection in cell culture using a colorimetric in situ hybridization assay. *J Eukaryot Microbiol.* 2001;48(5):565-74.

Rochelle PA, Marshall MM, Mead JR, Johnson AM, Korich DG, Rosen JS, et al. Comparison of *in vitro* cell culture and a mouse assay for measuring infectivity of *Cryptosporidium parvum*. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(8):3809-17.

Rodgers MRFDJW. Identification of algae which interfere with the detection of giardia cysts and *cryptosporidium* oozysts and a method for alleviating the interference. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61:3759-63.

Rommel M. Cryptosporidiose. In: Rommel M, Eckert J, Kutzer E, Körting W, Schnieder T, editors. *Veterinärmedizinische Parasitologie*. Berlin: Parey Buchverlag; 2000. p. 144-9.

Rosales MJ, Cifuentes J, Mascaro C. *Cryptosporidium parvum*: culture in MDCK cells. *Exp Parasitol.* 1993;76(2):209-12.

Rump JA, Arndt R, Arnold A, et al. Treatment of diarrhoea in human immunodeficiency virus-infected patients with immunoglobulins from bovine colostrum. *Clin Investig.* 1992;70(7):588-94.

Ryan UM. Molecular characterization and taxonomy of *Cryptosporidium*. From molecules to disease. 2003:147-60.

Ryan UM, Monis P, Enemark HL, et al. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *J Parasitol.* 2004;90(4) :769-73.

Schwickert S. Histomorphologischer Vergleich des Blutgefäßsystems: Eine computergestützte bildanalytische Studie. [Dissertationmed.vet]. Gießen. Vet.med.Fak. Gießen;2002.

Simmons OD, Sobsey MD. A chemiluminescent immunofocus assay (CIFA) for non-microscopic enumeration of *Cryptosporidium parvum* infectivity in cell culture. Water Sci Technol. 2003;47(3):137-42.

Sivaganesan M, Sivaganesan S. Effect of lot variability on ultraviolet radiation inactivation kinetics of *Cryptosporidium parvum* oocysts. Environ Sci Technol. 2005;39(11):4166-71.

Slifko TR, Friedman D, Rose JB, Jakubowski W. An *in vitro* method for detecting infectious *Cryptosporidium* oocysts with cell culture. Appl Environ Microbiol. 1997;63(9):3669-75.

Slifko TR, Friedman-Huffman DE, Rose JB. Comparison of 4 *Cryptosporidium parvum* viability assays: DAPI/PI, excystation, cell culture, and animal infectivity. Proc Am Water Works Assoc Water Quality Technology Conference (WQTC) Am Water Works Assoc , Denver, Colorado, USA. 1998.

Slifko TR, Huffman DE, Dussert B, Owens JH, Jakubowski W, Haas CN, et al. Comparison of tissue culture and animal models for assessment of *Cryptosporidium parvum* infection. Exp Parasitol. 2002;101(2-3):97-106.

Slifko TR, Huffman DE, Rose JB. A most-probable-number assay for enumeration of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts. Appl Environ Microbiol. 1999;65(9):3936-41.

Slifko TR, Raghubeer E, Rose JB. Effect of high hydrostatic pressure on *Cryptosporidium parvum* infectivity. J Food Prot. 2000a;63(9):1262-7.

Slifko TR, Smith HV, Rose JB. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. Int J Parasitol. 2000b;30(12-13):1379-93.

Smith HV, Campbell BM, Paton CA, Nichols RAB. Significance of enhanced morphological detection of *Cryptosporidium* sp. oocysts in water concentrates determined by using 4',6'-diamidino-2-phenylindole and immunofluorescence microscopy. Appl Environ Microbiol. 2002;68(10):5198-201.

Smith HV, Rose JB. Waterborne cryptosporidiosis: current status. Parasitol Today. 1998;14(1):14-22.

Soave R, Armstrong D. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Rev Infect Dis. 1986;8(6):1012-23.

Starke B. Morphologische Untersuchung an Herz, Niere und Nebenniere von Schafen unter besonderer Berücksichtigung des Blutdruckes. [Dissertationmed.vet]. Berlin:FU Berlin;1997.

Sturdee AP, Bodley-Tickell AT, Archer A, Chalmers RM. Long-term study of *Cryptosporidium* prevalence on a lowland farm in the United Kingdom. *Vet Parasitol.* 2003;116(2):97-113.

Tenter AM. Erreger von Parasitosen: Taxonomie, Systematik und allgemeine Merkmale. In: Schnieder T., editor. *Veterinärmedizinische Parasitologie*:2006;(6) p.33-4

Theodos CM, Griffiths JK, D'Onfro J, Fairfield A, Tzipori S. Efficacy of nitazoxanide against *Cryptosporidium parvum* in cell culture and in animal models. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(8):1959-65.

Tsushima Y, Karanis P, Kamada T, Xuan X, Makala LH, Tohya Y, et al. Viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts detected in river water in Hokkaido, Japan. *J Vet Med Sci.* 2003;65(5):585-9.

Tyzzer EE. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch Protistenkd.* 1912;26:394-412.

Tzipori S. Cryptosporidiosis in animals and humans. *Microbiol Rev.* 1983;47(1):84-96.

Tzipori S. Cryptosporidiosis in perspective. *Adv Parasitol.* 1988;27:63-129.

Tzipori S, Angus KW, Campbell I, Grey EW. *Cryptosporidium*: evidence for a single-species genus. *Inf Immun.* 1980;30(3):884-6.

Tzipori S, Widmer G. The biology of *Cryptosporidium*. *Contrib Microbiol.* 2000;6:1-32

Uguen C, Brasseur P, Moreno-Sabater A, et al. Evaluation of viability and infectivity of waterborne *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J Eukaryot Microbiol.* 1997; 44(6):73S.

Upton SJ. *In vitro* cultivation. In: Fayer R, editor. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. Boca Raton: CRC Press; 1997. p. 181-202.

Upton SJ, Tilley M, Mitschler RR, Oppert BS. Incorporation of exogenous uracil by *Cryptosporidium parvum* *in vitro*. *J Clin Microbiol.* 1991;29(5):1062-65.

Upton SJ, Tilley M, Nesterenko MV, Brillhart DB. A simple and reliable method of producing *in vitro* infections of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa). *FEMS Microbiol Lett.* 1994;118(1-2):45-9.

Verdon R, Keusch GT, Tzipori S, Grubman SA, Jefferson DM, Ward HD. An *in vitro* model of infection of human biliary epithelial cells by *Cryptosporidium parvum*. *J Infect Dis.* 1997;175(5):1268-72.

Webster KA, Pow JDE, Giles M, Catchpole J, Woodward MJ. Detection of *Cryptosporidium parvum* using a specific polymerase chain reaction. *Vet Parasitol.* 1993;50(1-2):35-44.

- Weir SC, Pokorny NJ, Carreno RA, et al. Efficacy of common laboratory disinfectants on the infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in cell culture. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(5):2576-9.
- Willmitzer H. Chlorresistente Parasiten im Trinkwasser. *Naturwissenschaftliche Rundschau.* 1997;50(2):62-3.
- Wilson JA, Margolin AB. The efficacy of three common hospital liquid germicides to inactivate *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J Hosp Infect.* 1999;42(3):231-7.
- Woodmansee DB. Studies of *in vitro* excystation of *Cryptosporidium parvum* from calves. *J Protozool.* 1987;34(4):398-402.
- Woodmansee DB, Pohlenz JFL. Development of *Cryptosporidium* sp. in a human rectal tumor cell line. Proc 4th Int Symp Neonatal Diarrhea Veterinary Infectious Disease Organization, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada. 1983;306-319.
- Woods KM, Nesterenko MV, Upton SJ. Development of a microtitre ELISA to quantify development of *Cryptosporidium parvum in vitro*. *FEMS Microbiol Lett.* 1995;128(1):89-94.
- Xiao L, Morgan UM, Limor J, et al. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(8):3386-91.
- Xu P, Widmer G, Wang Y, et al. The genome of *Cryptosporidium hominis*. *Nature* 2004; 431(7012):1107-12
- Yang S, Healey MC, Du C. Infectivity of preserved *Cryptosporidium parvum* oocysts for immunosuppressed adult mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1996;13(2):141-5.
- You X, Arrowood MJ, Lejkowski M, Xie L, Schinazi RF. A chemiluminescence immunoassay for evaluation of *Cryptosporidium parvum* growth *in vitro*. *FEMS Microbiol Lett.* 1996;136(3):251-6.
- You X, Schinazi RF, Arrowood MJ, Lejkowski M, Juodawlkis AS, Mead JR. In-vitro activities of paromomycin and lasalocid evaluated in combination against *Cryptosporidium parvum*. *J Antimicrob Chemother.* 1998;41(2):293-6.
- Yu JR, Choi SD, Kim YW. *In vitro* infection of *Cryptosporidium parvum* to four different cell lines. *Korean J Parasitol.* 2000;38(2):59-64.
- Yu JR, Seo M. Infection status of pigs with *Cryptosporidium parvum*. *Korean J Parasitol.* 2004;42(10):45-7.

9 Anhänge

Anhangstabelle 1: Überprüfung der Reproduzierbarkeit- Signifikanzen (p-Werte) zwischen 6 Zellkulturen einer Infektionsdosis (Mann-Whitney-Test)

Foci Zellkultur	Dosis-Oozysten			
	10^3	10^4	10^5	10^6
01:02	0,13	0,97	0,41	0,50
01:03	0,62	0,37	0,10	0,04
01:04	0,83	0,82	0,79	0,02
01:05	0,49	0,91	0,2	0,01
01:06	0,08	0,82	0,68	0,33
02:03	0,25	0,34	0,01	0,05
02:04	0,29	0,76	0,19	0,01
02:05	0,37	0,97	0,02	0,01
02:06	0,75	0,68	0,11	0,82
03:04	0,77	0,63	0,02	0,03
03:05	0,82	0,33	0,55	0,02
03:06	0,29	0,28	0,04	0,03
04:05	0,78	0,76	0,11	0,33
04:06	0,38	0,65	0,76	0,01
05:06	0,29	0,85	0,16	0,01

Flächen Zellkultur	Dosis-Oozysten			
	10^3	10^4	10^5	10^6
01:02	0,11	0,52	0,36	0,10
01:03	0,69	0,37	0,15	0,01
01:04	0,83	0,70	0,88	0,01
01:05	0,62	1,00	0,23	0,01
01:06	0,09	0,65	0,23	0,13
02:03	0,19	0,73	0,01	0,04
02:04	0,25	0,82	0,29	0,01
02:05	0,29	0,45	0,02	0,01
02:06	0,97	0,26	0,01	0,71
03:04	0,84	0,69	0,11	0,02
03:05	0,82	0,25	0,82	0,01
03:06	0,25	0,16	0,41	0,04
04:05	0,77	0,65	0,12	0,15
04:06	0,33	0,36	0,29	0,01
05:06	0,25	0,60	0,82	0,01

Grau hinterlegt: signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) und hochsignifikante Unterschiede ($p \leq 0,01$)

Anhangstabelle 2: Überprüfung der Reproduzierbarkeit-Deskriptive Statistik zu den Foci -und Flächenwerten aus 6 Zellkulturen

Focimessung					
Infektionsdosis	n=ZK	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabw.
10 ⁶	6	737	2098	1416	556,0
10 ⁵	6	354	682	509	123,2
10 ⁴	6	71	119	99	15,9
10 ³	6	8	60	36	21,5

Flächenmessung					
Infektionsdosis	n=ZK	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabw.
10 ⁶	6	6462,5	26299,8	14465,1	7304,7
10 ⁵	6	4013,8	7354,4	5427,6	1316,6
10 ⁴	6	585,1	1715,3	1123,1	402,7
10 ³	6	98,5	623,8	355,0	233,3

ZK=Zellkultur

Anhangstabelle 3: Vergleich von Feldisolaten -Korrelation zwischen Infektionsdosis Oozysten und den Foci-u.Flächen

Isolat	Spearman´s Korrelationskoeffizient r _s		
	I	II	III
Foci- Dosis Oozysten	0,93	0,93	0,76
Flächen - Dosis Oozysten	0,94	0,93	0,85
Foci-Flächen	0,99	0,99	0,93

Anhangstabelle 4: Vergleich von Feldisolaten- Foci (Summen aus 10 Bildern) aus mehreren Versuchen

Isolat	Versuch	Oozystendosis			
		10^3	10^4	10^5	10^6
I	Überprüfung der Reproduzierbarkeit *	8-60	71-119	354-682	737-2098
	Mittelwert	36	99	509	1416
	Vergleich von Feldisolaten **	0	92	484	2459
II	Vergleich von Feldisolaten **	0	149	595	1886
III	Vergleich zweier Antikörper*	45-411	495-1445	1111-2970	2201-3135
	Mittelwert	237	1009	2072	2699
	Vergleich von Feldisolaten**	127	611	1784	2225

* n=6 Zellkulturen je Infektionsdosis

** n=1 Zellkultur je Infektionsdosis

Anhangstabelle 5: Vergleich von Isolat I und III anhand von Mittelwerten Foci aus mehreren Versuchen

Isolat	Anzahl Zellkulturen	Infektionsdosis Oozysten			
		10^3	10^4	10^5	10^6
I	n = 7	36	96	497	1938
III	n = 7	182	810	1928	2462
Abweichung der Mittelwerte in (%)		505,5	848,2	387,9	127,0

Anhangstabelle 6: Vergleich zweier Antikörper -Summen der Foci-und Flächen aus 10 Einzelbildern je Zellkultur

V1		Foci		Flächen	
Inf.dosis	pAK	mAK	pAK	mAK	
10 ¹	0	19	0,0	163,7	
10 ²	67	108	660,9	1052,0	
10 ³	149	348	1035,1	3736,1	
10 ⁴	979	967	7757,1	8454,0	
10 ⁵	2190	2329	15413,5	20093,8	
10 ⁶	2702	2665	26946,8	24483,6	

V2		Foci		Flächen	
Inf.dosis	pAK	mAK	pAK	mAK	
10 ¹	16	27	132,1	152,5	
10 ²	19	37	139,1	434,1	
10 ³	340	411	2928,6	3405,8	
10 ⁴	1256	1445	9080,4	9902,4	
10 ⁵	2170	2970	14012,2	19858,0	
10 ⁶	3135	2818	20042,2	20653,6	

V3		Foci		Flächen	
Inf.dosis	pAK	mAK	pAK	mAK	
10 ¹	0	0	0	0	
10 ²	0	100	0	665,4	
10 ³	128	45	1119,0	257,5	
10 ⁴	495	912	4692,5	5995,6	
10 ⁵	1111	1664	9450,6	10941,5	
10 ⁶	2201	2673	14154,2	16658,8	

pAK = polyklonaler Antikörper, mAK = monoklonaler Antikörper, V = Versuch

Anhangstabelle 7: Vergleich zweier Antikörper-Anzahl positiver Bilder aus den Versuche 1-3

Oozysten	mAK	pAK
10 ¹	2	1
10 ²	9	5
10 ³	19	18
10 ⁴	30	27
10 ⁵	30	30
10 ⁶	30	30

Antikörper

pAK = polyklonaler Antikörper, mAK = monoklonaler

Anhangstabelle 8: Vergleich zweier Antikörper -Anteil positiver Bilder (%) aus den Versuchen V 1- V3

Oozysten	mAK			pAK		
	V1 (%)	V2 (%)	V3(%)	V1 (%)	V2 (%)	V3(%)
10 ¹	10	10	0	0	10	0
10 ²	30	30	30	30	20	0
10 ³	70	90	30	70	50	60
10 ⁴	100	100	100	100	100	70
10 ⁵	100	100	100	100	100	100
10 ⁶	100	100	100	100	100	100
Mittelwert (%)	68,3	71,7	60,0	66,7	63,3	55,0

pAK = polyklonaler Antikörper, mAK = monoklonaler Antikörper, V= Versuch

Anhangstabelle 9: Vergleich zweier Antikörper -Korrelation der Infektionsdosis Oozysten und den Foci-und Flächenwerten

		Spearman´s Korrelationskoeffizient r_s	
	Versuch	Foci- Dosis Oozysten	Flächen - Dosis Oozysten
mAK	V1	0,92*	0,91*
	V2	0,92*	0,92*
	V3	0,89*	0,88*
pAK	V1	0,93*	0,93*
	V2	0,90*	0,90*
	V3	0,87*	0,85*

*Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig)

pAK = polyklonaler Antikörper, mAK = monoklonaler Antikörper, V= Versuch

Anhangstabelle 10: Vergleich zweier Antikörper -Vergleich der Versuche auf signifikante Unterschiede (p-Werte) in den Einzelwerten (Mann-Whitney-Test)

Infektionsdosis	Messung	V1:V2		V1:V3		V2:V3	
		mAK	pAK	mAK	pAK	mAK	pAK
10 ¹	Fläche	0,94	0,32	0,32	1,00	0,32	0,32
10 ¹	Focus	0,94	0,32	0,32	1,00	0,32	0,32
10 ²	Fläche	0,67	0,43	0,74	0,07	0,82	0,15
10 ²	Focus	0,19	0,43	0,79	0,07	0,55	0,15
10 ³	Fläche	0,91	0,67	0,01	0,70	0,01	0,48
10 ³	Focus	0,59	0,78	0,01	0,94	0,01	0,55
10 ⁴	Fläche	0,33	0,55	0,15	0,07	0,02	0,06
10 ⁴	Focus	0,02	0,33	0,60	0,03	0,03	0,02
10 ⁵	Fläche	0,82	0,41	0,02	0,01	0,02	0,02
10 ⁵	Focus	0,10	0,88	0,17	0,01	0,03	0,01
10 ⁶	Fläche	0,29	0,02	0,02	0,01	0,15	0,07
10 ⁶	Focus	0,41	0,08	0,82	0,27	0,60	0,10

grau hinterlegt: signifikante Unterschiede (p≤0,05) und hochsignifikante Unterschiede (p≤0,01)
pAK = polyklonaler Antikörper, mAK = monoklonaler Antikörper, V= Versuch

Anhangstabelle 11: Thermische Inaktivierung- Vergleich der Flächen (p-Werte) zwischen zwei Temperaturstufen (Mann-Whitney-Test)

Temperatur	2 °C Unterschied		Temperatur	4 °C Unterschied	
	V 1	V 2		V 1	V 2
PK - 40°C	0,01	0,01	40°C - 44°C	0,01	0,01
40°C - 42°C	0,89	0,32	42°C - 46°C	0,01	0,01
42°C - 44°C	0,19	0,01	44°C - 48°C		0,01
44°C - 46°C	0,01	0,03	46°C - 50°C	0,06	0,01
46°C - 48°C		0,01			
48°C - 50°C		0,28			

grau hinterlegt: signifikante Unterschiede (p≤0,05) und hochsignifikante Unterschiede (p≤0,01)
V= Versuch

Anhangstabelle 12: Exzystierungsrate (%) nach der thermischen Inaktivierung von Oozysten

	Versuch 1	Versuch 2
Kontrolle	82	76
40 °C, 1 h	80	67
42 °C, 1 h	72	55
44 °C, 1 h	58	50
46 °C, 1 h	35	18
48 °C, 1 h	20	12
50 °C, 1 h	18	10
55 °C, 4 h	0	0

Anhang 13: Digitale Bildanalyse mittels automatischer Messroutine-Programmierung

Routine Header:

Number of fields: 1

Standard Frames

Image Windows (Auto Size, Auto Colour, Auto Lut, Fit Image to Window, No Warning Before Image Overwrite)

MPFAD\$ = ROUTINE.PATH\$ + "Messungen\"

Clear Accepts

Repeat

Grey Util (Clear All)

//Messrahmen wird auf die Größe des Bildrahmens gesetzt

Image frame (x IFRAMEX, y IFRAMEY, Width IFRAMEW, Height IFRAMEH)

MFRAMEX = IFRAMEX

MFRAMEY = IFRAMEY

MFRAMEH = IFRAMEH

MFRAMEW = IFRAMEW

Measure frame (x MFRAMEX, y MFRAMEY, Width MFRAMEW, Height MFRAMEH)

// Einladen einer bestimmten Anzahl von alten ungenerierten Bildern,...

//...welche generiert und benutzerdefiniert abgespeichert werden

Pause Text ("Nun können Sie eine neue Bildreihe einlesen oder drücken den Button "BEENDEN" in dem Fenster in der rechten oberen Bildecke . Geben Sie ihren Projektnamen ein ")

Display ("Pfad der eingelesenen Bilder" , tab follows)

Display ("Pfad des Startbildes" , tab follows)

Display line

PauseText ("Wählen Sie ein START-Bild aus, von dem aus eine von Ihnen definierte Anzahl an Bildern eingelesen wird!!!")

//Zählen der aufgenommenen Bilder

ACQOUTPUT = 0

Read image [PAUSE] (from file ACQFILE\$ into ACQOUTPUT)

Disply (ACQFILE4, tab follows)

A\$ = ACQFILE\$

B\$ = "\ "

I = 1

While (I > 0)

 POS1 = I

I = MATCH(B\$,A\$,I + 1)

Endwhile

NAME\$ = MID\$(A\$,POS1 + 1,POS2-POS2-POS1 - 1)

STAMM\$ = LEFT\$(A\$,POS1)

EXT\$ = RIGHT\$(A\$,POS1)

NUMMER = VAL(NAME\$)

PauseText ("Geben Sie nun die Anzahl an Bildern ein, die Sie aus Ihrem Verzeichnis auslesen und messen wollen")

Input (BILDERANZAHL)

//Einladen eines Bildes in Bild0 mit anschließender Detektion zu Binary0

//Abarbeiten der einzelnen Bilder von Image0 nach Binary0

For (I = 1 to Bilderanzahl, Stepp 1)

 NUMMERNEU = NUMMER+I-1

 ACQFILE\$ = STAMM\$ +STR\$(NUMMERNEU) + EXT\$

 Display (ACQFILE\$, tab follows)

 Display Line

 Read image (from file ACQFILE\$ into ACQOUTPUT)

Anhang 14: Digitale Bildanalyse mittels automatischer Messroutine- Ausgabefenster der Messroutine (Beispiel): Angegeben werden die gemessenen Flächen und die Anzahl der Foci pro Bild (Feld) sowie die zugehörige Statistik

Feld	Fläche	Anzahl
1	1262.21	346.00
2	939.84	288.00
3	1197.43	367.00
4	1949.75	461.00
5	1784.81	388.00
6	1981.67	500.00
7	4369.42	767.00
8	2397.89	411.00
9	2396.88	540.00
10	5075.21	785.00
11	2366.11	536.00
12	2474.72	429.00
13	2036.71	445.00
14	1779.20	465.00
15	1635.29	430.00
16	5402.45	680.00
17	1998.23	391.00
18	1208.04	319.00
19	2859.70	598.00
20	1986.47	528.00
21	1219.81	199.00
22	840.37	165.00
23	1706.71	310.00
24	1524.59	228.00
25	313.51	100.00
26	982.85	199.00
27	360.17	66.00
28	632.56	160.00
29	839.49	187.00
30	715.13	192.00
Total	56237.23	11480.00
Mit.wert	1874.57	382.67
Std.Abw.	1217.42	183.73
Fehl.Std.	222.27	33.54
Max	5402.45	785.00
Min	313.51	66.00

**Anhang 15: Test auf signifikante Unterschiede (Test nach Wilcoxon)
 Der Ergebnisse aus der Einzelbildanalyse und der Messroutine**

Versuch	Oozysten	p-Wert	Signifikanzen
1	10^6	0,17	n.s.
	10^5	0,05	s.
	10^4	0,04	s.
2	10^6	0,38	n.s.
	10^5	0,50	n.s.
	10^4	0,17	n.s.
3	10^6	0,13	n.s.
	10^5	0,65	n.s.
4	10^6	0,09	n.s.
	10^5	0,01	s.
	10^4	0,02	s.
5	10^6	0,05	s.
	10^5	0,09	n.s.
	10^4	0,05	s.
6	10^6	0,02	s.
	10^5	0,14	n.s.
	10^4	0,01	s.

grau hinterlegt: signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) und
 hochsignifikante Unterschiede ($p \leq 0,01$)

10 Danksagung

Mein besonderer Dank richtet sich an Frau Prof. A. Joachim für die Bereitstellung des Themas sowie an Herrn Prof. A. Dauschies für die Aufnahme und Betreuung im Institut der Parasitologie sowie für die Bereitstellung der materiellen und finanziellen Mittel zur Durchführung dieser Arbeit. Darüber hinaus danke ich Herrn Dr. M. Najdrowsi für die Einweisung in die Arbeit im Zellkulturlabor und in die Aufreinigung der Oozysten. Während der Durchführung dieser Arbeit konnte ich von seinem Wissen über *C. parvum*, von seiner Laborerfahrung und von seiner stets positiv motivierenden Kollegialität profitieren.

Herrn Richter möchte ich für seine Hilfe bei der Durchführung der statistischen Berechnungen herzlich danken.

Ich danke auch Frau Prof. U. Mackenstedt sowie Frau D. Kliemt für die freundliche Überlassung der monoklonalen Antikörper, die an Ihrem Institut hergestellt wurden.

Außerdem danke ich meiner gesamten Familie für die mentale Unterstützung sowie meinen Freunden, die mir bis zur Fertigstellung der Arbeit hilfreich zur Seite standen.