

6 ZUSAMMENFASSUNG

Für Desinfektionsmittel gibt es in Deutschland derzeit kein gesetzlich vorgeschriebenes Zulassungsverfahren. Für den veterinärmedizinischen Bereich wird von der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) eine Liste mit empfohlenen Desinfektionsmitteln herausgegeben. Desinfektionsmittel müssen den Anforderungen der "Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel" (DEUTSCHE VETERINÄRMEDIZINISCHE GESELLSCHAFT, 1988, 2. Aufl., Gießen) entsprechen, um in die Liste aufgenommen zu werden. Als Testparasiten für die Prüfung an Coccidienoocysten dienen entwickelte (sporulierte) Oocysten des Hühnercoccids *Eimeria tenella*. Der Desinfektionserfolg soll durch Inokulation desinfizierter Oocysten in Hühnerküken ermittelt werden (Infektionstest). Die in den Richtlinien der DVG vorgeschriebene Methodik für die Desinfektion und den Infektionstest ist in vielfacher Hinsicht unzureichend. Insbesondere ist der Desinfektionserfolg im Infektionstest nicht quantifizierbar. Dies führte in der Vergangenheit oft zu nicht reproduzierbaren oder sogar widersprüchlichen Ergebnissen bei der Prüfung von Desinfektionsmitteln. In früheren Untersuchungen wurde als erster Schritt eine Methode zur quantitativen Ermittlung des Desinfektionserfolgs im Infektionstest entwickelt (ULLRICH-TEICH, 1993, Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.).

Ziel meiner Arbeit war es, die Methodik der Prüfung von Desinfektionsmitteln soweit zu verbessern und zu vereinfachen, daß ihre Reproduzierbarkeit und Standardisierbarkeit gewährleistet sind. Da mit dem Keimträgerversuch nach DVG keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden konnten, wurde für die methodischen Untersuchungen der Suspensionsversuch verwendet. Unterschiedliche Methoden zum Stoppen der Desinfektionsreaktion wurden geprüft: verschiedene Verdünnungsfaktoren, Auswaschen des Desinfektionsmittels durch Zentrifugation oder Dialyse gegen Wasser. Die Zahl der zurückgewonnenen Oocysten (Wiederfindungsrate) und der Grad der Residualwirkung im Sporulationshemmtest wurden geprüft. Lediglich mit einer Verdünnung der Desinfektionsmittel-Oocysten-Suspension auf das 1500-fache Volumen und anschließender Sedimentation für 24 Stunden zur Konzentrierung der Oocysten wurden Wiederfindungsraten von rechnerisch 100 % bei geringer Residualwirkung (1,3 %) erzielt. Um Präparate mit lysierender Wirkung auf Oocysten testen zu können, wurde der Lysistest als zusätzlicher *in-vitro*-Test entwickelt. Die Zahl zurückgewonnener Oocysten im Vergleich zu nicht desinfizierten Kontrollen diente dabei als direktes Maß für die Wirksamkeit (Lysisrate).

Zur Feststellung des Infektiositätsverlustes sporulierter, desinfizierter Oocysten wurde der Infektionstest mit Hühnerküken weiter verbessert. Zur Erstellung der Eichkurve wurden Gruppen von je zehn Küken mit 2000, 1000, 500, 250, 125, 62, 31, 15 oder 7 Oocysten

inokuliert. Die Oocysten-Gesamtausscheidung von Tag 6 bis 12 nach der Inokulation wurde mit zwei verschiedenen Methoden ermittelt. Dazu wurde die Zahl täglich ausgeschiedener Oocysten ermittelt und daraus die Oocysten-Gesamtausscheidung berechnet oder die Zahl der Oocysten in einer über die gesamte Sammelperiode gepoolten Probe ermittelt. Der Vergleich der beiden Methoden ergab keine signifikanten Unterschiede. Es bestand eine gute Dosis-Wirkung-Beziehung mit annähernd linearer Abhängigkeit ($r^2 = 0,95$) im Bereich niedriger Inokulationsdosen, wenn man die Zahl inokulierter mit der Zahl insgesamt ausgeschiedener Oocysten verglich. Die Abweichungen von den linearen Verhältnissen konnten durch die Verwendung eines nichtlinearen Berechnungsverfahrens zur Erstellung einer Eichkurve ausgeglichen werden ($r^2 = 0,99$). Die Infektiosität eines Inokulums desinfizierter Oocysten wurde anhand der Zahl produzierter Oocysten mit Hilfe der die Kurve beschreibenden Gleichung quantitativ bestimmt. Daraus ergab sich die Wirkung eines Desinfektionsmittels als prozentualer Anteil der abgetöteten Oocysten.

Zur Etablierung eines Referenzstammes für die Prüfung von Desinfektionsmitteln wurden verschiedene Feldisolate vergleichend mit dem Houghton-Stamm geprüft. Bei allen Isolaten und dem Houghton-Stamm setzte der Intensitätseffekt bei Inokulationsdosen zwischen 500 und 2000 Oocysten ein. Dieser war durch ein abnehmendes Reproduktionspotential bei steigender Inokulationsdosis gekennzeichnet. Feldisolate unterschiedlicher Virulenz unterschieden sich hinsichtlich des einsetzenden Intensitätseffekt nicht wesentlich voneinander. Daher wurde der Houghton-Stamm, ein Stamm von geringer Virulenz, als Referenzstamm für die Prüfung von Desinfektionsmitteln etabliert. Bei den verwendeten Inokulationsdosen (≤ 1000 Oocysten) traten keine klinischen Symptome auf. Der verbesserte Infektionstest mit dem Houghton-Stamm stellt somit einen entscheidenden Beitrag zum Tierschutz dar.

Die erarbeitete Methodik wurde durch vergleichende Prüfungen verschiedener Test- und Handelspräparate validiert. Dabei wurden signifikante Tenazitätsunterschiede zwischen verschiedenen *Eimeria tenella*-Isolaten festgestellt. Die Bestimmung der Lysisrate unsporulierter und sporulierter Oocysten *in vitro* und die Berücksichtigung der Lysis bei der Doseinstellung für den Infektionstest sind die methodischen Voraussetzungen für die Entwicklung hochwirksamer, schwefelkohlenstofffreier Desinfektionsmittel gegen Coccidienoocysten. Die Ergebnisse der Prüfung verschiedener Testpräparate auf der Basis von Kresolen (4-Chlor-3-methylphenol, Preventol[®]CMK, Fa. Bayer) zeigten eine hohe Korrelation zwischen der nach Desinfektion im Suspensionsversuch *in vitro* ermittelten Lysisrate und der im Infektionstest ermittelten Wirksamkeit, so daß der *in-vitro*-Test bereits eine hohe Aussagekraft für die Wirksamkeit des Desinfektionsmittels erlangt. Die erarbeitete Methodik wird im Hinblick auf die Änderung der Richtlinien der DVG diskutiert.

SUMMARY

Institute of Parasitology, School of Veterinary Medicine Hanover, Germany
Jeanette Marx (1995)

Improvement in methods testing disinfectants against chemically resistant stages of parasites

Currently, there are no legal requirements for registration of disinfectants in Germany. For veterinary use, a list of recommended chemical disinfectants is issued by the *Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG)*. Products must be tested and approved according to the "Guidelines for testing chemical disinfectants" in order to be listed. Apart from other drawbacks the current guidelines do not allow quantification of the efficacy against *Coccidia* oocysts. This has led to irreproducible and contradicting results in the past. In previous studies an animal model was developed allowing quantification of the efficacy of chemical disinfectants against sporulated *Eimeria tenella* oocysts. Additionally, the sporulation inhibition test (SIT) was developed for testing disinfectants against non-sporulated oocysts (ULLRICH-TEICH, 1993, Thesis, School of Veterinary Medicine Hannover).

The aim of my thesis was to further improve and simplify the testing of chemical disinfectants against *Coccidia* using the *Eimeria tenella* oocyst model. *In vitro*, different methods for disinfecting of oocysts were tried. Reproducible results could only be obtained by disinfecting oocysts in suspension but not on surfaces (tiles). Thus, for all further studies on the methodology the suspension test was used. Different methods for termination of the disinfection reaction were tried (dilution with different volumes of water with or without removal of the disinfectant by centrifugation or dialysis against a continuous flow of water). Recovery rates and degrees of residual activities of disinfectants were determined using the SIT. Only by dilution of the oocyst suspension with 1500 volumes of water and subsequent sedimentation for 24 h, high recovery rates (100 %) and low residual activity (1,3 %) were obtained. To allow for testing of disinfectants with lytic activity on oocysts a lysis test was developed. The number of recovered oocysts compared to non-disinfected controls was used as a direct parameter for the efficacy of the given disinfectant.

The animal model for testing efficacy against sporulated oocysts was further improved. To establish a nomograph, groups of ten chickens were inoculated with 2000, 1000, 500, 250, 125, 62, 31, 15 or 7 oocysts. The total number of oocysts produced during patency (day 6 - 12 after inoculation) was determined using two

different methods. The number of oocysts produced was determined daily and the total number of oocysts calculated or the number of oocysts determined in a pooled sample from the feces produced during patency. No significant differences were found using these two methods. An almost linear correlation between the number of oocysts inoculated and the number of oocysts produced was found ($r^2 = 0,95$). A better correlation was observed after performing a non-linear regression analysis ($r^2 = 0,99$). Using the nomograph, the number of infective oocysts in inoculation doses of disinfected oocysts could be calculated from the number of oocysts excreted by the chickens.

To establish an *E. tenella* reference strain for testing of chemical disinfectants different field isolates and the Houghton strain were evaluated. For all isolates an intensity effect (crowding effect) was observed with inoculation doses ranging from 500 to 2000 oocysts, although all isolates showed marked differences in virulence. The Houghton strain, exhibiting low virulence, was established as a reference strain. With the inoculation doses used (≤ 1000 oocysts) no clinical signs of disease were observed. Thus the improved animal model using the Houghton strain is an important contribution to animal welfare.

The methods developed were validated by testing different commercially available disinfectants or test formulations. Significant differences in resistance between different *E. tenella* isolates were demonstrated. Development of the lysis test and the improved animal model are the prerequisites for the development of highly efficacious disinfectants devoid of CS₂. A strong correlation between lysis rate and infectivity for chickens was found when different test formulations containing 4-Chlor-3-methylphenol, Preventol®CMK, Bayer, were tested. Therefore the lysis rate *in vitro* can be used to screen disinfectants before testing in the animal model. The developed methods are discussed in view to the introduction of new DVG Guidelines for testing chemical disinfectants.