

Erfahrungen mit der Gefrierkonservierung dritter Larvenstadien von Trichostrongyliden der Wiederkäuer

Autor(en): **Ramp, T. / Eckert, J. / Christen, C.**

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **128 (1986)**

PDF erstellt am: **21.06.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-588857>

Nutzungsbedingungen

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

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

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

Haftungsausschluss

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

Institut für Parasitologie der Universität Zürich
 Direktor: Prof. Dr. J. Eckert

Erfahrungen mit der Gefrierkonservierung dritter Larvenstadien von Trichostrongyliden der Wiederkäuer

Th. Ramp, J. Eckert, C. Christen¹

Einleitung

Im Rahmen eines Forschungsprojektes zur Entwicklung parasitologischer Alternativmethoden zum Tierversuch wurden in Anlehnung an Literaturangaben (*van Wyk et al.*, 1977; weitere Lit. s. *Diskussion*) Untersuchungen zur Gefrierkonservierung (Kryopräservation) von Trichostrongyliden-Larven mit dem Ziel durchgeführt, die Brauchbarkeit des Verfahrens für die Laborpraxis, auch im Hinblick auf die Einsparung von Versuchstieren, zu überprüfen. Über die dabei gesammelten Erfahrungen wird hier berichtet.

Material und Methoden

1. Parasiten-Isolate und Larvengewinnung

Als Testorganismen für unsere Untersuchungen dienten ein Isolat von *Ostertagia leptospicularis* (= O1-N-CH: nicht resistent, aus der Schweiz [*Sulger Büel et al.*, 1984], 7 Passagen durch Kälber oder Schafe in unserem Institut) sowie 2 Isolate von *Haemonchus contortus* (= Hc-N-SA: nicht resistent, aus Südafrika; Hc-R-USA: gegen Camoendazol resistent, aus den USA. Beide Isolate hatten in europäischen Labors eine unbekannte Zahl von Passagen durch Schafe durchlaufen).

Die Züchtung dritter (= infektiöser) Larven der drei Isolate erfolgte aus eihaltigem Kot künstlich infizierter Schafe nach dem Verfahren von Roberts und O'Sullivan (Lit. bei *Eckert*, 1960). Die gewonnene, in dünner Schicht bei +6 °C bis zum Versuchsbeginn (41 bis 103 Tage) gelagerte Larvensuspension wurde am Tag vor dem Einfrierexperiment in einem modifizierten Baermann-Apparat (*Annen et al.*, 1975) mit Nylon-Sieb (Maschenweite 70 µm) gereinigt.

2. Vorbereitung der Larven zum Einfrieren

Die Entfernung der Larvenscheide ist für die Gefrierkonservierung unerlässlich (*Campbell et al.*, 1972; *James*, 1980). Dazu wurden 1 bis 5 ml Larvensuspension mit ca. 25 000–160 000 Larven pro ml (Larvenkonzentration ist nicht kritisch) in Zentrifugenröhrchen (15 ml, Spitzboden) überführt und mit der gleichen Menge 0,4%iger Natriumhypochloritlösung versetzt. (Beachte: die Prozentangabe bezieht sich auf Gehalt an aktivem Chlor; als Verdünnungsmedium wurde phosphatgepufferte physiologische NaCl-Lösung [PBS], pH 7,4, verwendet.) Danach wurde die Suspension durch Einleitung

¹ Adresse: Winterthurerstr. 266a, CH-8057 Zürich

von Luft gut durchmischt. Nach 15 Min. Einwirkungszeit bei Raumtemperatur wurden in Intervallen von 5 Min. kleine Tropfen der Suspension mikroskopisch kontrolliert. Sobald mehr als 90% der Larven aus der Scheide geschlüpft waren, wurde die Reaktion wie folgt abgebrochen: Die Larvensuspension wurde in grosse Zentrifugenröhrchen (50 ml, Spitzboden, Falcon Nr. 2098) mit 40 ml PBS überführt und zentrifugiert ($600 \times g$, 5 Min., Raumtemperatur). Nach Absaugen des Überstandes wurde das Sediment zweimal auf gleiche Weise mit je 50 ml PBS gewaschen.

3. Einfrieren und Auftauen

Nach Zählung der Larven mit Hilfe des üblichen Verdünnungsverfahrens (Stammuspension 1:10 verdünnt; davon in fünf Tropfen von je 100 μ l die Larven ausgezählt) wurden folgende Larvenmengen in Kunststoffröhrchen mit Schraubverschluss (Cryotubes 2 ml; Nunc, DK-Roskilde) übertragen und in einem Gesamtvolumen von 1 ml PBS suspendiert: je 1000, 10000 oder 20000 Larven von Hc-R-USA; 1200, 12000 und 24000 Larven von O1-N-CH bzw. 1500, 15000, 30000 und 60000 Larven von Hc-N-SA. Das Einfrieren der Larvensuspension erfolgte in den verschlossenen Cryotubes, die in einem offenen Styroporbehälter während 2 Stunden in der Gasphase über Flüssigstickstoff gehalten wurden.

Anschliessend wurden die Probengefässe bis zur Verwendung für die Vitalitätsprüfung in Flüssigstickstoff gelagert (Chronos-Behälter; Messer Griesheim AG, D-Griesheim). Bei Versuchsende wurden die Proben durch Überführen der Cryotubes in ein Wasserbad von $+37^\circ\text{C}$ bis auf ein erbsengrosses Stück Resteis aufgetaut, kurz manuell geschüttelt bis zum vollständigen Auftauen und danach mindestens 2 Stunden bis zur Kontrolle bei Raumtemperatur stehen gelassen.

In gesonderten Experimenten wurde die Kühlrate (Temperaturabfall pro Zeiteinheit) während der ersten zwei Stunden, in denen die Larven der Temperatureinwirkung in der Gasphase über flüssigem Stickstoff ausgesetzt waren, gemessen. Dazu wurde eine Platin-Temperatursonde (Pt 100) in das mit 1 ml PBS (ohne Larven) gefüllte Probengefäss eingeführt und mit einem Schreiber verbunden (PM 8222; Philips, NL-Eindhoven). Die erreichten Werte sind in Abständen von 30 Min. in Tabelle 3 aufgeführt. Aus den Daten wurde einerseits die «mittlere» Kühlrate berechnet, d. h. der durchschnittliche Temperaturabfall vom Beginn des Einfriervorganges bis zum Erreichen der Minimaltemperatur. Ausserdem ist die «maximale» Kühlrate angegeben, die dem steilsten, nahezu linearen, während des Einfriervorganges erreichten Temperaturabfall entspricht. Die Temperaturveränderung beim Überführen der Proben aus der gasförmigen in die flüssige Phase des Stickstoffs konnte aus technischen Gründen nicht gemessen werden.

4. Vitalitätsprüfung

Zur Prüfung der Vitalität der Larven wurden ihre Beweglichkeit *in vitro* sowie ihre Infektiosität für Schafe geprüft.

Die *in vitro* durchgeführten Vitalitätstests beruhten auf der Feststellung der Beweglichkeit der entscheideten Larven in PBS bei Zimmertemperatur vor dem Einfrieren (Beurteilung von $2 \times 100 \mu$ l der 1:5 verdünnten Larvensuspension, Zählung von 100–200 Larven pro Probe) bzw. frühestens 2 Stunden nach dem Auftauen (Zählung von 100 bis 200 Larven pro Probe). Dabei wurden die Larven auf einer Zählplatte längere Zeit mikroskopisch beobachtet und die Beweglichkeit festgestellt. Das Auftauen erfolgte nach 1 Tag, 1 Woche, 4 Wochen und 16 Wochen Lagerung in Flüssigstickstoff.

Die Infektiosität der Larven wurde nach 16 Wochen Lagerung in Flüssigstickstoff an helminthenfrei aufgezogenen Schafen im Alter von 8 und 17 Monaten geprüft. Die Schafe wurden mit unterschiedlichen Zahlen von Larven (Tabelle 2), die in 20 ml PBS aufgeschwemmt waren, peroral infiziert. Ab dem 15. Tag post infectionem (p. i.) wurden täglich Kotproben entnommen und mit Hilfe des Floationsverfahrens (Boch und Supperer, 1983) auf Eier von Trichostrongyloiden untersucht. Vom 1.–8. Tag der Patenz wurde bei den Einzeltieren mindestens an 6 und maximal an 8 Tagen die Eiausscheidung quantitativ nach dem McMaster-Verfahren (Wetzel, 1951) erfasst. Vier Wochen nach der Infektion wurden die Schafe geschlachtet und die Bürde an adulten Helminthen nach den üblichen Verfahren quantitativ bestimmt (vgl. Boch und Supperer, 1983, Untersuchung von 10% der Waschflüssigkeit von Labmagen und Dünndarm).

Ergebnisse

1. In-vitro-Vitalitätsprüfung

Die Ergebnisse der In-vitro-Vitalitätsprüfung sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Sie zeigen, dass die dritten Larven aller drei untersuchten Isolate das Einfrieren und die Lagerung in Flüssigstickstoff bis zu 16 Wochen zu einem erheblichen Teil überlebt haben. Dies ergibt sich aus den Prozentsätzen der beweglichen Larven, die vor dem Einfrieren bei den einzelnen Isolaten 88 bis 100% und nach 16wöchigem Tiefgefrieren noch 62 bis 76% betragen. Die Differenzen der Beweglichkeit der Larven vor dem Einfrieren im Vergleich zu jener nach 16 Wochen Tiefkühlung schwankte bei den drei Isolaten zwischen -24 und -37%. Zu vermerken ist, dass die Prozentsätze der beweglichen Larven innerhalb des gleichen Trichostrongyliden-Isolates an den 4 Kontrolldaten nach Lagerung in Flüssigstickstoff zum Teil erheblichen Schwankungen unterlagen (Tabelle 1). Nach unseren Erfahrungen sind diese nicht durch die Larvenkonzentration in der eingefrorenen Suspension verursacht.

Tabelle 1: In-vitro-Vitalitätstest durch Prüfung der Beweglichkeit entscheideter dritter Larven von Trichostrongyliden vor dem Einfrieren sowie nach Einfrieren und Lagerung in Flüssigstickstoff (f1N₂).

Parasitenisolat	% bewegliche Larven vor dem Einfrieren ^a :	% bewegliche Larven ^{a, b} nach Lagerung in f1N ₂ für:			
		1 Tag	1 Woche	4 Wochen	16 Wochen
<i>O. leptospicularis</i> (N-CH)	99	55	52	57	62
<i>H. contortus</i> (N-SA)	88	51	69	66	64
<i>H. contortus</i> (R-USA)	100	57	81	73	76

^aRest unbeweglich. Mittelwerte aus je 2 Proben. ^bAusgezählt nach Auftauen und mindestens 2 Stunden Adaptation an Raumtemperatur. Einzelheiten siehe «Material und Methoden».

2. Infektionsversuche an Schafen

Die perorale Infektion von Schafen mit zuvor 16 Wochen lang tiefgefrorenen dritten Larven der 3 Isolate führte bei allen 6 Versuchstieren zu patentem Befall. Die durch koprologischen Einachweis ermittelten Präpatenzzeiten (Tabelle 2) lagen im Normalbereich (Widmer, 1982; Sulger Büel et al., 1984). Die Eiausscheidung (Tabelle 2) während der ersten acht Tage der Patenz erreichte bei allen Tieren Werte, die eine ausreichende Gewinnung dritter Larven zur weiteren Propagation des Isolates erlaubt hätten. Im Labmagen bzw. im Dünndarm der 4 Wochen p.i. seziierten Schafe wurden in allen Fällen adulte Trichostrongyliden gefunden. Die Infektionserfolge, gemessen an den Auffindungsraten, waren bei den einzelnen Isolaten recht unterschiedlich (Tabelle 2).

Tabelle 2: In-vivo-Vitalitätstest: Infektiosität entschiedener dritter Larven von Trichostrongylden nach dem Einfrieren und 16wöchiger Lagerung in Flüssigstickstoff für Schafe nach peroraler Applikation.

Parasitenisolat	Tier Nr.	Infektionsdosis ^a	Präpatenz (Tage)	EpGb		Wurmbürde ^c Labmagen	Auffindungsrate ^d Labmagen
				Max.	\bar{x}		
<i>O. leptospicularis</i> (N-CH)	1	32000	18	967	333	15400	48,1
	2	31000	21	967	327	12590	40,6
<i>H. contortus</i> (N-SA)	3	6700	18	1933	654	100	1,5
	4	6500	21	433	222	100	1,5
<i>H. contortus</i> (R-USA)	5	6000	19	767	308	410	6,8
	6	7500	20	2967	1438	1140	15,2

^aAnzahl bewegliche dritte Larven; ^bEizahl pro Gramm Kot: Maximum und Mittelwert von 6–8 Untersuchungen ab 1.–8. Tag der Patenz; ^cAdulte Würmer; es wurden bei allen Tieren sowohl Labmagen als auch Dünndarm untersucht; letzterer enthielt jedoch nur bei Tier Nr. 1 1040 Würmer, die in die angegebenen Zahlen eingeschlossen sind; ^dProzentsatz der Wurmbürde im Verhältnis zur Infektionsdosis.

3. Messung der Kühlrate

Die in unseren Experimenten ermittelten Kühlraten (Temperaturabfall pro Zeiteinheit) enthält Tabelle 3. Die mittleren Kühlraten schwankten in vier Versuchen zwischen 9,6 und 10,3 °C/min (Mittelwert: 9,9 °C/min).

Tabelle 3: Kühlraten bei dem angewandten Verfahren zum Tiefgefrieren dritter Trichostrongyldenlarven.

Versuch	Ausgangstemperatur (°C)	Minimaltemperatur (°C)	Messwert erreicht nach (min) ^a	Temperaturdifferenz (°C)	Kühlrate (°C/min)	
					Mittlere ^b	Maximale
1	+14	-137	15,7	151	9,6	33,2
2	+11	-137	15,1	148	9,8	35,5
3	+14	-137	15,7	151	9,6	28,5
4	+17	-137	14,8	154	10,4	43,5
Mittelwert	+14	-137	15,3	151	9,9	35,2
±S.D.	2	0,2	0,5	2,5	0,4	6,3

^aErrechnet aus der graphischen Temperaturlaufzeichnung; ^bMittlere Kühlrate = Temperaturdifferenz: Minuten.

Diskussion

Die dritten (= infektiösen) Larvenstadien der Trichostrongylden von Wiederkäuern sind aufgrund spezieller morphologischer und biochemischer Eigenschaften (Lit. bei Eckert, 1967) in der Lage, in der Aussenwelt auf Weideflächen wochen- bis monatelang zu überleben und zum Teil auch zu überwintern (Lit. bei Michel, 1969; Eckert und Bürger, 1979).

Unter Laborbedingungen in destilliertem Wasser bei +5 °C gelagerte dritte (bescheidete) Larven von *Ostertagia ostertagi*, *O. circumcincta*, *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *T. axei* und *Cooperia oncophora* hatten mediane Überlebenszeiten von mehr als 500 Tagen, wobei die beiden erstgenannten Arten die längsten Zeiten mit 1133 (\pm 102) bzw. von 825 (\pm 73) aufwiesen (Boag und Thomas, 1985). Diese, durch Feststellung der Beweglichkeit ermittelten Überlebenszeiten sind jedoch nicht gleichzusetzen mit der Infektiosität, die in der Regel viel früher verloren geht als die Motilität der Larven (Kutzer, 1967). Auch Temperaturen unter dem Gefrierpunkt vermögen bescheidete Drittlarven der verschiedenen Trichostrongyliden-Arten mehr oder weniger gut zu tolerieren (Anderson et al., 1966), doch büßen sie ziemlich rasch ihre Infektiosität ein. So verlieren in Wasser eingefrorene Drittlarven von *O. ostertagi* bei -10 °C in 43 Tagen zu 99,9% und bei -25 °C in 78 Stunden zu 100% ihre Infektiosität (Kutzer, 1967).

Aus diesem Grund werden Drittlarven von Trichostrongyliden für experimentelle Zwecke gewöhnlich bei +4 bis +6 °C in Wasser gelagert. Dieses Verfahren hat jedoch verschiedene Nachteile. So brauchen die aufbewahrten Larvensuspensionen eine gewisse Pflege (Wasserwechsel, mikroskopische Kontrolle), je nach Trichostrongyliden-Art stirbt ein unterschiedlich grosser Anteil der Larven im Laufe der Zeit ab, und ausserdem sind von Zeit zu Zeit Tierpassagen durch helminthenfrei aufgezogene Schafe oder Rinder notwendig, will man das Isolat ständig in einem optimalen Zustand erhalten. Dadurch ist die Haltung solcher Isolate an den Einsatz von Versuchstieren gebunden und somit auch recht arbeitsaufwendig und teuer. Ferner ist zu berücksichtigen, dass im Isolat biologische Veränderungen während der Kühlung (Induktion von Hypobiose, Lit. bei Borgsteede et al., 1978) oder bei der Entwicklung im Wirt (selektierende Einflüsse durch Resistenzmechanismen des Wirtes) auftreten können.

Aus diesen Gründen wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen Methoden zur Gefrierkonservierung entwickelt, durch die Drittlarven verschiedener Arten von Trichostrongyliden und anderer Nematoden über Monate oder sogar Jahre bei Erhaltung der Infektiosität für die entsprechenden Endwirte konserviert werden können (Parfitt, 1971; Campbell et al., 1972, 1973; Campbell und Thomson, 1973; van Wyk et al., 1977; Coles et al., 1980; James, 1980; van Wyk und Gerber, 1980a, 1980b; Rew und Campbell, 1983).

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen bestätigen Befunde anderer Autoren (Campbell et al., 1973; van Wyk et al., 1977; Rew und Campbell, 1983), dass sich entseidete Drittlarven von *H. contortus* ohne Zusatz eines Gefrierschutzmittels problemlos in flüssigem Stickstoff tiefgefrieren und lagern lassen, ohne dass die Infektiosität für den Endwirt verloren geht. Dies konnte von uns auch für Drittlarven von *O. leptospicularis* gezeigt werden. Bei dieser Art führte die Infektion von Schafen mit zuvor tiefgefrorenen Larven zu einem ähnlichen Erfolg (Auffindungsrate von 41–48%) wie bei Applikation nicht gefrorener Larven (51–90%; nach Sulger Büel et al., 1984). Hingegen war in unseren Versuchen bei *Haemonchus*-Isolaten der Infektionserfolg niedriger als von anderen Autoren für zuvor tiefgefrorene Drittlarven angegeben wurde (van Wyk et al., 1977). Die schlechteren Ergebnisse unserer Versuche könnten eventuell mit der langen Lagerzeit (41–60 Tage) der relativ empfindlichen *Haemonchus*-Larven vor dem

Tiefgefrieren zusammenhängen. Daher sollten für Routinezwecke stets frisch gewonnene Larven zur Kryopräservierung verwendet werden. Das Alter der Wirtstiere hatte in unseren Untersuchungen auf den Infektionserfolg keinen Einfluss.

Wie oben angegeben, führte in unseren Experimenten die perorale Applikation entscheideter Drittlarven in wässriger Suspension bei *O. leptospicularis* zu sehr guten und bei *Haemonchus* zu (für die weitere Propagation der Isolate) ausreichenden Infektionsergebnissen. Bei Nematoden, die den Dünndarm oder Dickdarm besiedeln, hatte man in früheren Untersuchungen, in denen die Larven zum Teil in Gelatinekapseln per os appliziert worden waren, unbefriedigende Infektionsergebnisse. Daher ging man zur Injektion der Larven in den Labmagen oder Dünndarm nach Laparotomie über (Lit. bei *van Wyk et al.*, 1984). Kürzlich konnten *van Wyk et al.* (1984) zeigen, dass die Infektionsergebnisse bei Arten, die den Dünndarm besiedeln (*Trichostrongylus colubriformis*, *T. facultatus* u.a.) bei peroraler Applikation entscheideter Larven in Suspension wesentlich besser waren als bei Gabe der infektiösen Stadien in Gelatinekapseln.

Die Auslösung des Schlundrinnen-Reflexes durch Kupfersulfatlösung hatte keinen Einfluss auf den Infektionserfolg.

Einer der entscheidenden Faktoren für die Kryopräservierung lebender Organismen ist die Kühlrate (*Ashwood-Smith und Farrant*, 1980). Bei Larven von *Nematodirus battus*, *N. filicollis*, *Trichostrongylus* spp. (*Trichostrongylidae*) sowie von *Trichonema* spp. (*Strongylidae*) ergab eine Einfrierrate von 1 °C/min gute Überlebensraten, doch starben Larven von *H. contortus* und *O. circumcincta* ab (Lit. bei *James*, 1980). Für die Larven der beiden letztgenannten und verschiedener anderer *Trichostrongyliden*-Spezies wurde von anderen Autoren (*van Wyk et al.*, 1977 u.a.) rasches Einfrieren mit bisher undefinierten Kühlraten erfolgreich angewandt. Ein ähnliches Verfahren verwendeten wir, wobei die mittlere Kühlrate 9,9 °C/min betrug.

Aufgrund von Literaturangaben (siehe oben) und eigenen Erfahrungen kann die Kryopräservierung der Drittlarven von *Trichostrongyliden* für die Laborpraxis empfohlen werden. Dieses Verfahren ermöglicht nicht nur die langfristige Vorratshaltung definierter Isolate von *Trichostrongyliden* (z. B. Isolate ohne oder mit Anthelminthika-Resistenz), sondern stellt auch einen Beitrag zur Einsparung von Versuchstieren dar.

Zusammenfassung

Entscheidete dritte Larven von *Ostertagia leptospicularis* und von zwei Isolaten von *Haemonchus contortus* wurden, suspendiert in phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS), in der Gasphase über flüssigem Stickstoff bei einer durchschnittlichen Kühlrate von 9,9 °C/min eingefroren und anschliessend für 16 Wochen in flüssigem Stickstoff gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Larven, suspendiert in PBS, auf sechs helminthenfreie Schafe peroral übertragen. Bei allen Tieren entwickelte sich eine patente Infektion. Die Ergebnisse stimmen mit den Feststellungen anderer Autoren überein, dass die Kryopräservierung eine praktikable Technik für die langfristige Aufbewahrung definierter Isolate von *Trichostrongyliden*-Larven ist. Dieses Verfahren kann zur Reduktion der Zahl von Versuchstieren beitragen.

Résumé

Des larves 3 d'*Ostertagia leptospicularis* ayant perdu leur cuticule et de deux isolats d'*Haemonchus contortus*, en suspension dans une solution physiologique saline tamponnée au phosphate (PBS).

ont été congelées dans la phase gazeuse d'azote liquide, avec un quotient de refroidissement moyen de 9,9 °C/min, et ont finalement été stockées durant 16 semaines dans l'azote liquide. Après décongélation, les larves, en suspension dans du PBS, ont été administrées per os à six moutons exempts d'helminthes. Une infection manifeste s'est alors développée chez tous les animaux. Ces résultats rejoignent les constatations d'autres auteurs, à savoir que la cryopréservation est une technique appropriée pour la conservation à long terme d'isolats définis de larves de Trichostrongylides. Ce procédé peut contribuer à une réduction du nombre d'animaux d'expérience.

Riassunto

Larve sgusciate al terzo stadio di *Ostertagia leptospicularis* e da due isolati di *Haemonchus contortus*, messe in sospensione fisiologica di cloruro di sodio tamponata con fosfato (PBS), vennero congelate nella fase gasiforme su azoto liquido in una quota media termica di 9,9 °C/min ed in seguito vennero tenute per 16 settimane in azoto liquido. Dopo lo scongelamento le larve, sospese nel PBS, vennero somministrate per via orale a 6 pecore esenti da vermi gastrointestinali. In tutti gli animali si sviluppò una manifesta infestazione. I risultati corrispondono a quelli di altri autori, nel senso che la criopreservazione costituisce una tecnica pratica per la lunga conservazione di isolati definiti di larve di trichostrongili. Questa procedura può servire a ridurre il numero degli animali da esperimento.

Summary

Exsheathed third stage larvae of *Ostertagia leptospicularis* and of two isolates of *Haemonchus contortus* suspended in phosphate buffered physiological saline (PBS) were frozen in the gas phase over liquid nitrogen at an average cooling rate of 9,9 °C/min and then stored for 16 weeks in liquid nitrogen. After thawing, the larvae (suspended in PBS) were perorally transmitted to 6 helminth-free sheep. All animals developed patent infections. The results are in agreement with findings of other authors that cryopreservation is a feasible technique for long-term storage of defined isolates of trichostrongylid larvae. This procedure can contribute to reduce the numbers of experimental animals.

Danksagung

Die Autoren danken dem Bundesamt für Veterinärwesen für die finanzielle Unterstützung (Tierschutzforschung, Projekt Nr. 014.83.7), Frau M. Roy-Meier für die technische Mithilfe, Frau E. Läderach für die Schreifarbeiten sowie Herrn Dr. D. Düwel, Hoechst AG Frankfurt/Main, für die Überlassung der beiden Isolate von *Haemonchus*.

Literatur-Verzeichnis

Anderson F. L., Wang G. T. and Levine N. D.: Effects of temperature on survival of the free-living stages of *Trichostrongylus colubriformis*. J. Parasitol. 52, 713–721 (1966). – Annen J. M., Eckert J., and Hess U.: Eine einfache Methode zur Gewinnung von *Toxocara canis*-Antigen für die indirekte Immunfluoreszenz-Technik. Acta trop. 32, 37–47 (1975). – Ashwood-Smith M. J. and Farrant J. (eds.): Low Temperature Preservation in Medicine and Biology. Pitman Medical, Tunbridge-Wells/UK (1980). – Boag B. and Thomas R. J.: The effect of temperature on the survival of infective larvae of nematodes. J. Parasitol. 71, 383–384 (1985). – Boch J. und Supperer R.: Veterinärmedizinische Parasitologie, 3. Aufl., Parey Verlag, Berlin (1983). – Borgsteede F. H. M., Armour J. and Jansen J. (eds.): Arrested development of nematodes in sheep and cattle. Facts and Reflections III. Central Vet. Inst., Lelystad. Bronder-Offset, Rotterdam (1978). – Campbell W. C. and Thomson B. M.: Survival of nematode larvae after freezing over liquid nitrogen. Austr. Vet. J. 49, 110–112 (1973). – Campbell W. C., Blair L. S. and Egerton J. R.: Motility and infectivity of *Haemonchus contortus* larvae after freezing. Vet. Rec. 91, 13 (1972). – Campbell W. C., Blair L. S. and Egerton J. R.: Unimpaired infectivity of the nematode *Haemonchus contortus* after freezing for 44 weeks in the presence of liquid nitrogen. J. Parasitol. 59, 425–427 (1973). – Coles G. C., Simpkin K. G. and Briscoe M. G.: Routine cryopreservation of

ruminant nematode larvae. Res. Vet. Sci. 28, 391–392 (1980). – *Eckert J.*: Die Diagnose des Magen-Darmstrongylidenbefalles des Schafes durch Differenzierung der freilebenden dritten Larven. Zbl. Vet. Med. 7, 612–630 (1960). – *Eckert J.*: Zur Physiologie invasionsfähiger Larven der Trichostrongyliden. Z. Parasitenkd. 29, 209–241 (1967). – *Eckert J. und Bürger H.-J.*: Die parasitäre Gastroenteritis des Rindes. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 92, 449–457 (1979). – *James E. R.*: Protozoa and Helminth Parasites of Man and Animals. In: Ashwood-Smith M. J., and Farrant J. (eds.): Low Temperature Preservation in Medicine and Biology. Pitman Medical, Tunbridge-Wells/UK (1980). – *Kutzer E.*: Biologie und Ökologie der präparasitären Entwicklungsstadien von *Ostertagia ostertagi* und *Cooperia oncophora* (Nematoda, Trichostrongylidae) im Hinblick auf die Epidemiologie der Trichostrongylidose der Rinder. Wien. Tierärztl. Monatsschr. 54, 164–181, 315–332 (1967). – *Michel J. F.*: The epidemiology and control of some nematode infections in grazing animals. Adv. Parasitol. 7, 211–282 (1969). – *Parfitt J. W.*: Deep freeze preservation of nematode larvae. Res. Vet. Sci. 12, 488–489 (1971). – *Rew R. S. and Campbell W. C.*: Infectivity of *Haemonchus contortus* in sheep after freezing for ten years over liquid nitrogen. J. Parasitol. 69, 251–252 (1983). – *Sulger Büel E., Eckert J., Häcki W. H., Hauser B. und Lutz H.*: Pathogenität von *Ostertagia leptospicularis* für Rind und Schaf. Zbl. Vet. Med. B. 31, 189–202 (1984). – *Van Wyk J. A. and Gerber H. M.*: Survival and development of larvae of the common nematodes of ruminants after long-term cryopreservation and investigation of different routes of infestation. Onderstepoort J. Vet. Res. 47, 129–136 (1980a). – *Van Wyk J. A. and Gerber H. M.*: Benzimidazole-resistant *Haemonchus contortus* – the effect of cryopreservation on the resistance of successive generations. Onderstepoort J. Vet. Res. 47, 143–146 (1980b). – *Van Wyk J. A., Gerber H. M. and Alves R. M. R.*: Methods of infesting sheep with gastro-intestinal nematodes after cryopreservation: dosing of larvae in gelatin capsules compared to dosing of larvae in water. Onderstepoort J. Vet. Res. 51, 217–221 (1984). – *Van Wyk J. A., Gerber H. M. and Van Aardt W. P.*: Cryopreservation of the infective larvae of the common nematodes of ruminants. Onderstepoort J. Vet. Res. 44, 173–194 (1977). – *Wetzel R.*: Verbesserte McMaster-Kammer zum Auszählen von Wurmeiern. Tierärztl. Umschau 6, 209–210 (1951). – *Widmer C.*: Versuche zur Hypobiose bei *Haemonchus contortus* des Schafes. Vet. Diss. Zürich (1982).

Manuskripteingang: 20. September 1985

BUCHBESPRECHUNG

Innere Krankheiten der landwirtschaftlichen Nutztiere. Herausgeber: N. Rossow. 441 Seiten, 171 Abbildungen und 73 Tabellen, Enke-Verlag, Stuttgart (1985). DM 96.—

Das vom Herausgeber und vier Mitautoren verfasste Buch richtet sich an Studierende der Veterinärmedizin und Tierärzte. Die Autoren setzen sich zum Ziel, das Verständnis für innere Erkrankungen der Nutztiere (Wiederkäuer, Schwein, Pferd) zu wecken, indem sie die ihnen zugrunde liegenden pathophysiologischen Vorgänge in den Vordergrund stellen. Dies geschieht meistens durch Schemen, die allerdings nicht immer leicht verständlich sind. Es wird versucht, die für alle Spezies geltenden Prinzipien voranzustellen und anschliessend die Hauptprobleme der einzelnen Tierarten getrennt zu besprechen. Dabei wird klar, dass diesem Vorgehen relativ enge Grenzen gesetzt sind, weil am praktischen Fall die tierartspezifischen Probleme viel bedeutender sind als die allgemeinen. Dies zeigt sich zum Beispiel beim Kapitel Schlundverstopfung, oder bei der Unterteilung der Hauptkapitel in Erkrankungen der Vormägen und des Labmagens einerseits und in Erkrankung des einhöhligen Magens und des Darmkanals andererseits. Der Absicht der Autoren entsprechend werden Symptomatologie, Diagnostik, Therapie und Prophylaxe stichwortartig und prinzipiell beschrieben, so dass man für die klinisch-praktische Ausbildung nicht auf zusätzliche Lehrmittel verzichten kann. Wer ein Lehrbuch für angewandte Pathophysiologie der Nutztiere sucht, wird in diesem Werk wertvolle Hinweise finden.

J. Martig, Bern