

Prüfung von Desinfektionsmitteln gegen parasitäre Einzeller (*Cryptosporidium parvum*) und Wurmeier (*Ascaris suum*)

1. CRYPTOSPOIRIDIUM PARVUM (Spalte 8a)

EINLEITUNG

Die Testung zur Prüfung von Desinfektionsmitteln an protozoären Dauerstadien erfolgt an Oozysten von *Cryptosporidium parvum*. Diese Stadien sind infektiös für Mensch und Tier und zeichnen sich durch eine hohe chemische Tenazität aus. Geprüft wird obligatorisch die Vermehrungsfähigkeit des Erregers nach 120 Minuten Inkubation mit der Testsubstanz bei 10°C durch Einsäen dem Prüfmuster ausgesetzter Oozysten in eine Zellkultur und Quantifizierung der Erreger-DNA nach 24 h. Fakultativ sind Einwirkungszeiten von 30 und /oder 60 Minuten sowie eine Prüftemperatur von 20°C möglich. Sowohl ein Suspensionstest als auch ein Keimträgertest sind für die Erstellung eines Gutachtens durchzuführen. Der Übergang vom wirksamen in den nicht-wirksamen Bereich ist dabei zu zeigen. Als wirksam gilt ein Prüfmuster in einer Konzentration, die die Vermehrung des Erregers im Suspensions- und im Keimträgertest in jeweils zwei unabhängig voneinander durchgeführten Testdurchgängen im Mittel um mindestens 95 % im Vergleich zu einer nicht desinfizierten Kontrolle reduziert.

Infektionsmaterial

Oozysten von *C. parvum* werden im Institut für Parasitologie der Universität Leipzig regelmäßig passagiert (*Cp Stamm Leipzig*) und können von dort bezogen werden. Andere Isolate sind nur dann akzeptabel, wenn zuvor nachgewiesen wurde, dass sie sich hinsichtlich Exzystierungsrate und Kultivierbarkeit analog zu *Cp Stamm Leipzig* verhalten.

In 1,5ml-Reaktionsgefäße werden jeweils 5×10^6 Oozysten pipettiert und die Röhrchen dann bei 6000 x g für 6 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgesogen und die Pellets in 50 µl PBS unter Zusatz von bovinem Serumalbumin (BSA) in einer Konzentration von 0,03 % aufgenommen. Diese Oozystensuspensionen müssen innerhalb von 2 Tagen (Lagerung bei 4°C) verwendet werden. Die Anzahl der Reaktionsröhrchen richtet sich nach der Anzahl der geplanten Testbedingungen.

Suspensionstest

500 µl der durch Verdünnung mit Wasser standardisierter Härte (WSH) angefertigten Arbeitslösung/-suspension des Prüfmusters werden zu den Oozystenpellets (siehe oben, 5×10^6 Oozysten je Ansatz) gegeben und anschließend für die vorgegebene Zeit (i. d. R. 2h) bei 10°C bzw. 20°C inkubiert. Die Inkubation der Oozysten mit dem Desinfektionsmittel sollte nicht länger als 24h vor der Infektion der HCT-8 Zellen beginnen. Die Arbeitslösung/-suspension sollte zuvor entsprechend temperiert sein. Während der Einwirkzeit werden die Ansätze liegend auf einem Schüttler langsam bewegt. Nach Ablauf der Einwirkzeit werden die Reaktionsgefäße vorsichtig geöffnet und mit 0,04 %TWEEN in WSH aufgefüllt. Die Reaktionsgefäße werden dann bei $9600 \times g$ für 6 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt und verworfen. Dieser Waschschrift wird einmal wiederholt.

Sind in der Arbeitslösung/-suspension des Prüfmusters bzw. nach Abschluss der Inkubation und Waschung der Pellets Präzipitate erkennbar, werden nach erneuter Zentrifugation 500 µl 36% DMSO in WSH zu den Pellets gegeben, intensiv geschüttelt (Vortex), erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wird mit 0,04 % TWEEN in WSH aufgefüllt. Mit dem zusätzlichen DMSO-Waschschrift werden mögliche zytotoxische Einflüsse von unlöslichen Desinfektionsmittelresiduen auf die HCT-8-Zellen ausgeschlossen. Um vergleichbare Bedingungen zu haben, werden in diesem Fall auch alle Kontrollansätze in gleicher Weise behandelt.

Die resultierende von Desinfektionsmittel frei gewaschene Oozystensuspension wird erneut pelletiert ($9000 \times g$, 6 Minuten) und das Pellet in 1000 µl Zellkulturmedium (RPMI 1640 mit L-Glutamin, 100 I.U. Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2,5 µg/ml Amphotericin B, 50 µg/ml Gentamycin) aufgenommen.

Die Oozystendichte wird für die nicht-behandelten Kontrollen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Auf dieser Grundlage werden alle Ansätze auf $1,5 \times 10^6$ Oozysten/ml (entspricht 3×10^5 Oozysten je Ansatz) eingestellt.

Keimträgertest

Die vorbereiteten Oozystensuspensionen (50 µl) werden auf entfettete und trockene Edelstahlkeimträger so pipettiert und verteilt, dass ein unbenetzter Rand von 1-2 mm erhalten bleibt. Nach 30 Minuten Antrocknungszeit bei Raumtemperatur werden die Keimträger mit 100 µl Desinfektionsmittel in der mit WSH eingestellten Konzentration vollständig überschichtet und 120 Minuten bei 10 °C oder 20 °C inkubiert. Das Desinfektionsmittel und die Keimträger sind vor Testbeginn bei der entsprechenden Temperatur zu lagern. Die Keimträger müssen strikt horizontal aufgestellt werden, damit ein Abfließen der Flüssigkeit über den Rand verhindert wird.

Nach Ablauf der Inkubationszeit werden zur Rückgewinnung der Oozysten die Keimträger in 50 ml Zentrifugenröhrchen, in die 10 ml WSH mit 0,04 % TWEEN

vorgelegt wurden, überführt. Nach 2 Minuten werden die Röhrchen für 1 Minute bei 2400 rpm auf einem Schüttler suspendiert, der Keimträger entnommen und die Röhrchen bei 2100 x g für 8 Minuten zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand bis auf 1 ml abgesogen und verworfen. Die verbliebenen 1 ml werden sorgfältig resuspendiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, die dann mit WSH/0,04% TWEEN aufgefüllt werden. Es wird erneut zentrifugiert (9600 x g, 6 Minuten) und das resultierende Pellet mit WSH/0,04% TWEEN aufgenommen. Der Zentrifugierschritt wird wiederholt und das Pellet dann in 1000 µl Zellkulturmedium aufgenommen. Die nun in Medium suspendierten Oozysten müssen innerhalb von 24 h für die Infektion der HCT-8-Kulturen verwendet werden. Die Oozystendichte in den Suspensionen wird auf $1,5 \times 10^6$ /ml eingestellt (Zählung in der Neubauer-Kammer; entspricht einer Infektionsdosis pro Kultur von 3×10^5 Oozysten).

Im Keimträger- und Suspensionstest mitzuführende Kontrollen

Zur chemischen Prozesskontrolle werden Oozysten verwendet, die mit 30 % H₂O₂ (Referenzsubstanz) für 120 Minuten inkubiert wurden. Diese Oozyten müssen in ihrem Reproduktionsvermögen zu mindestens 95% reduziert sein (DELLING ET AL 2017). Ebenso wird eine Negativkontrolle mit nicht desinfizierten Oozysten (Inkubation mit WSH = Wasser standardisierter Härte) geführt (Inaktivierung = 0%).

Zellkulturen

HCT-8-Zellen (ileocecal colorectal adenocarcinoma cell line) können über die American Type Culture Collection (HCT-8 [HRT-18] (ATCC® CCL-244™)) bezogen werden (<http://www.lgcstandards-atcc.org/>). Für die Stammhaltung werden die Zellen in Passagemedium (RPMI 1640 mit L-Glutamin, 10% Fetales Kälberserum, 1 mM Natriumpyruvat; max. 50-60 wöchentliche Passagen) kultiviert. Eine Lagerung der Zellen in Stickstoff ist möglich.

Vor der Testung eines Prüfmusters werden die HCT-8-Zellen in einer Dichte von $3-4 \times 10^5$ Zellen / Well einer 24er Zellkulturplatte ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank zu Monolayern in Wachstumsmedium (RPMI 1640 mit L-Glutamin, 10% Fetales Kälberserum, 1 mM Natriumpyruvat, 100 I.U. Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2,5 µg/ml Amphotericin B, 50µg/ml Gentamycin) vorkultiviert. Zellkulturen sind für das Testverfahren geeignet, wenn sie zum Zeitpunkt der Einsaat der Oozysten 80-90%ige Konfluenz erreicht haben. Dies ist i.d.R. nach 48 Stunden der Kultivierung der Fall.

Das Wachstumsmedium über den Monolayern wird abgesaugt und durch Zellkulturmedium (s.o.) mit darin suspendierten Oozysten (200 µl = 3×10^5 Oozysten pro Well) ersetzt. Natriumtaurocholat wird in einer Endkonzentration von 0,4% zugegeben und die Zellkulturplatte vorsichtig geschwenkt.

Die beimpften Zellkulturen werden bei 37°C und 5% CO₂ für 3 Stunden inkubiert, dann der Überstand verworfen und durch 1 ml frisches Wachstumsmedium ersetzt. Nach insgesamt 24 Stunden Inkubation wird erneut der Überstand verworfen und die Zellkulturen 2x mit PBS gewaschen. Schließlich werden die Zellen mit 200 µl Trypsin abgelöst. Nach Zugabe von 500 µl Passagemedium werden die abgelösten Zellen in 1,5 ml Reaktionsröhrchen überführt. Dieser Schritt wird wiederholt um möglichst alle Zellen zu gewinnen.

Die Zellsuspension wird durch Zentrifugation bei 2400 x g für 5 Minuten pelletiert. Der Überstand wird durch 200 µl PBS oder eine gleiche Menge Puffer (je nach ausgewähltem Kit für die DNA-Gewinnung) ersetzt und resuspendiert.

DNA-Nachweis durch quantitative real time PCR

DNA-Isolierung und –aufreinigung

Die Gesamt-DNA kann beispielsweise über Phenol-Chloroform-Extraktion oder Säulenchromatographie (QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Kat.-Nr. 51306) oder das NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Kat.-Nr. 740952.250) oder mit dem Maxwell 16 LEV Blood DNA Kit (Promega) im Maxwell 16 Roboter nach Herstellerangaben aufgereinigt werden.

Die DNA wird in DEPC-Wasser (50-100 µl) eluiert oder gelöst und kann bis zur Verwendung (max. 2 Wochen) bei 4°C aufbewahrt werden, eine längere Aufbewahrung sollte bei -20°C erfolgen.

Quantifizierung der Parasitenstadien mittels qPCR

Die qPCR dient zur Quantifizierung der intrazellulären Parasitenstadien pro Well. Gemessen wird die Anzahl der hsp70-Genkopien wobei eine Kopie einem Parasiten entspricht. Um die Anzahl der Genkopien genau ermitteln zu können wird eine Plasmid-Standardreihe mit einer genau definierten Menge an Plasmidmolekülen verwendet.

Der verwendete Standard besteht aus dem Plasmid hsp70/ pBSK. 3,35 ng dieses Plasmides entsprechen 10⁹ Molekülen bzw. Cryptosporidien. Die Stammlösung wird mit DEPC-Wasser auf eine Konzentration von 2x10⁷ Molekülen pro µl verdünnt (10⁸ Moleküle/5 µl). Ausgehend davon wird eine 1:10 Verdünnungsreihe mit DEPC-Wasser hergestellt, so dass beim Einsatz von 5 µl in der qPCR 10² – 10⁶ Moleküle pro Well vorliegen.

Ein zu häufiges Auftauen und Einfrieren der Stammlösung ist durch Aliquotieren zu vermeiden.

Die Quantifizierung basiert auf einer hsp70-Gen-spezifischen Taq-Man-Sonde. Das unten angeführte Protokoll ist für einen Stratagene Mx3000P Cyclus unter Verwendung des Fermentas Maxima® Probe Master Mixes optimiert und muss ggf. angepasst werden. Alle Proben werden in drei technischen Triplikaten angesetzt.

Als Kontrollen werden eingesetzt:

- a) Non-template-Kontrolle (NTC_qPCR): Mastermix ohne DNA
- b) Non-template-Kontrolle ZK (NTC_ZK): nicht infizierte Zellkultur
- c) Negativ Kontrolle (negK) als Triplikate: mit nicht desinfizierten Oozysten infizierte Zellkultur
- d) Positiv-Kontrolle (posK) als Triplikate: mit H₂O₂ (30%)-desinfizierten Oozysten infizierte Zellkultur
- e) Zu untersuchende Probe in Triplikaten
- f) Optional weitere Kontrollansätze, wenn z.B. bestimmte Lösungsmittel verwendet werden müssen

Das PCR-Protokoll sieht folgenden Schritte vor: Initial Denaturierung von 15 Minuten bei 95°C gefolgt von 40 Zyklen mit einer Denaturierung von 15 Sekunden bei 95°C und einer 1minütigen kombinierten Annealing- und Extensionphase bei 60°C.

Auswertung und Validierung:

Die Abweichung der mittleren Ct-Werte darf innerhalb der technischen PCR-Duplikate den Wert 0,8 nicht überschreiten. Weist ein Well einen Unterschied von $\geq 0,8$ Ct zum anderen auf, so ist der Ansatz zu verwerfen. Die Standardkurve muss eine Effizienz zwischen 90 und 110 % und ein Bestimmtheitsmaß von 0,9-1,0 aufweisen.

Die Berechnung der Kopienzahl von hsp70 kann über die Cycloer-Software oder mithilfe einer Excel-Tabellenfunktion berechnet werden.

Die Wirksamkeit der Substanz (Effizienz der Desinfektion) wird als prozentuale Reduktion im Vergleich zur Negativkontrolle dargestellt.

Prozentuale Reduktion:
$$\% \text{ Reduktion} = 100 - \left[\frac{\text{Kopienzahl Probe} \times 100}{\text{Mittelwert Kopienzahl negK}} \right]$$

Als wirksam gilt ein Prüfmuster in einer Konzentration, die die Vermehrung des Erregers im Suspensions- und Keimträgertest im Mittelwert um mindestens 95 % im Vergleich zu einer nicht desinfizierten Kontrolle reduziert. Dabei darf keiner der Einzelwerte eine Reduzierung von unter 93 % aufweisen.

2. ASCARIS SUUM (Spalte 8b)

Einleitung

Als Testobjekte (Modell) für die Prüfung von Desinfektionsmitteln an Spulwurmeiern dienen unentwickelte Eier des Schweinespulwurms *Ascaris suum*. Die Desinfektion der *Ascaris suum*-Eier wird in Suspensionstests in offenen Gefäßen bei Raumtemperatur (20 ± 2 °C) und als Keimträgertest durchgeführt. Die

Desinfektionsmittelwirkung wird in beiden Testsystemen anhand der Embryonierung mit dem Desinfektionsmittel behandelte Eier beurteilt.

Gewinnung der Eier

Adulte Spulwurmweibchen werden aus dem Dünndarm von Schlachtschweinen gesammelt und die Eier aus den distalen Abschnitten (ca. 2 cm lang) der beiden Uterusschläuche der Würmer gewonnen. Mit einer gebogenen Deckglaspinzette werden die Eier aus den herausgeschnittenen Uterusschläuchen ausgestreift. Ein Teil der Eier aus jedem Uterusschlauch wird zunächst direkt auf einen Objektträger ausgedrückt und zur Feststellung des Entwicklungsgrades mikroskopisch untersucht. Aus Uteri mit reifen Eiern werden die übrigen Eier in ein mit Leitungswasser gefülltes Gefäß ausgestreift. Die Eisuspension wird über ein Sieb von 200 µm Maschenweite in einen silikonisierten Standzylinder überführt. Spulwurmeier können bis zu 3 Wochen bei täglichem Wechsel der Hälfte der Flüssigkeit im Kühlschrank bei +4 °C aufbewahrt und für Desinfektionstests verwendet werden.

Desinfektion der Eier

Die Konzentration der Eisuspension wird durch acht Zählungen in einer McMaster-Kammer nach Flotation in gesättigter NaCl-Lösung ($\delta = 1,18 \text{ g/cm}^3$) bestimmt und durch entsprechende Verdünnung mit WSH auf 100.000 Eier/ml eingestellt.

Suspensionstest

Das zu prüfende Desinfektionsmittel wird unmittelbar vor jedem Test in doppelter Anwendungskonzentration mit WSH angesetzt. Je Desinfektionsmittel, Konzentration und Einwirkzeit werden 0,5 ml in Glaspetrischalen ($\varnothing = 2 \text{ cm}$) gegeben. Für die Kontrolle wird WSH verwendet. Alle Ansätze werden doppelt angelegt. Zum Start der Desinfektionsreaktion werden zu jedem Ansatz 0,5 ml der Eisuspension hinzugefügt. Die Suspensionen werden auf einem Schüttelapparat (Wipptisch) in schwacher aber steter Bewegung gehalten. Nach Ablauf der Einwirkzeiten von 30, 60, 90, 120 und 180 min wird der gesamte Inhalt der Glaspetrischalen in mit ca. 1400 ml WSH gefüllte Schraubdeckelgläser (1500 ml) oder Bechergläser (2000 ml) (z. B. Schott Nr. 2111663) überführt. Die Schalen werden mit einem scharfen Strahl von WSH nachgespült und die Gläser mit der Spülflüssigkeit auf 1500 ml aufgefüllt. Nach Mischen durch Inversion oder Umrühren mit einem Glasstab und anschließender 24 h Sedimentation bei Raumtemperatur wird der Überstand bis auf ca. 30 ml abgesaugt. Das Sediment wird resuspendiert und in Zellkulturplatten mit sechs Vertiefungen (z. B. Greiner Nr. 657160) überführt. Die Platten werden anschließend 20 Tage lang bei +25 °C im Brutschrank gehalten und jeden 2. Tag durch Einblasen von Luft mit Hilfe einer Pasteurpipette belüftet.

Keimträgertest

Als Keimträger dienen weiße Wandfliesen (z.B. Villeroy & Boch, Artikel-Nr. 1121) von 15 x 15 cm Größe. Die unglasierte Rückseite der Fliesen sollte vor Gebrauch mit WSH mit Hilfe einer harten Bürste abgewaschen werden, um lose anhaftende Materialpartikel zu entfernen. (Diese würden sonst bei der späteren mikroskopischen Auswertung stören.) Die Fliesen werden vollständig getrocknet (Wärmeschrank) und können danach für den Keimträgertest verwendet werden.

Für die Tests werden die zu prüfenden Desinfektionsmittel unmittelbar vor jedem Testansatz in einfacher Anwendungskonzentration mit WSH angesetzt. Für die Kontrollen wird WSH verwendet. Je Desinfektionsmittel, Konzentration und Einwirkzeit werden 2 Fliesen (Doppelansatz) benötigt.

Die Fliesen werden mit der Rückseite nach oben in eine Plastikschiene ($\varnothing = 30 \text{ cm}$) gelegt und mit einer Wasserwaage ausgerichtet. Von der Eisuspension (100.000 Eier/ml) werden 5 ml auf der Rückseite der Fliesen gleichmäßig aufgetragen. Die Eisuspension läßt man für 1 h bei Raumtemperatur antrocknen.

Zum Start der Desinfektionsreaktion wird die Rückseite der Fliesen vorsichtig mit der Desinfektionsmittellösung überschichtet bis ein zusammenhängender Flüssigkeitsfilm die gesamte Fläche bedeckt, ohne daß die Lösung über die Fliesenkanten abläuft. Das poröse Material des Keimträgers nimmt innerhalb der ersten zehn Minuten einen Teil der Desinfektionsmittellösung auf. Es muß daher Präparatelösung nachgegeben werden, um den Flüssigkeitsfilm zu erhalten.

Nach Ablauf der jeweiligen Einwirkzeit (30, 60, 90, 120, 180 min) wird die Desinfektionsmittellösung mit WSH von der Testoberfläche abgespült. Die Eier werden mit einer kleinen Bürste abgebürstet. Für jeden Ansatz muß eine unbenutzte Bürste verwendet werden, da sonst eine Verschleppung der Eier erfolgen kann. Vorteilhafterweise lassen sich für diesen Zweck Einmalzahnbürsten verwenden. Nach dem Abbürsten wird die Testoberfläche nochmals mit einem scharfen Strahl WSH nachgespült. Die Desinfektionsmittellösung und die gesamte Spülflüssigkeit werden in der Plastikschiene aufgefangen. Der Schaleninhalt wird in Schraubdeckelgläser (1500 ml) oder Bechergläser (2000 ml) (z. B. Schott Nr. 2111663) überführt und der Inhalt mit WSH auf 1500 ml aufgefüllt. Nach Mischen durch Inversion oder Umrühren mit einem Glasstab und anschließender Sedimentation für 24 h bei Raumtemperatur wird der Überstand bis auf ca. 30 ml abgesaugt. Das Sediment wird resuspendiert und in Zellkulturplatten mit sechs Vertiefungen (z. B. Greiner Nr. 657160) überführt. Die Platten werden anschließend 20 Tage lang bei +25 °C im Brutschrank gehalten und jeden 2. Tag durch Einblasen von Luft mit Hilfe einer Pasteurpipette belüftet.

Ermittlung des Desinfektionserfolgs an *A. suum*-Eiern

Sowohl im Suspensions- als auch im Keimträgertest wird mit einem

Untertischmikroskop bei ca. 160-facher Vergrößerung der Boden der sechs Tüpfel je

Ansatz durchmustert. Es werden 6 x 50 Eier ausgezählt und der Anteil embryonierter und nicht embryonierter Eier ermittelt. Nur Eier, in denen eine Larve deutlich sichtbar entwickelt ist, werden als embryoniert gewertet. Eier mit toten, plump erscheinenden, larvenähnlichen Gebilden gelten als nicht embryoniert.

Der Prozentsatz der embryonierten Spulwurmeier (absolute Embryonierungsrate (abs. ER)) wird errechnet und der Mittelwert der Doppelansätze gebildet. Die Embryonierungsrate der nicht desinfizierten Kontrollen sollte mindestens 90 % betragen. Die relative Embryonierungsrate (rel. ER) wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{rel. ER [\%]} = \text{abs. ER X [\%]} \times 100 / \text{abs. ER Kontrolle [\%]}$$

Die Wirksamkeit eines Desinfektionsmittels drückt sich aus im Grad der Entwicklungshemmung und ergibt sich aus der Differenz zu 100:

$$\text{Wirksamkeit [\%]} = 100 - \text{rel. ER [\%]}$$

Anforderungen an ein Desinfektionsmittel gegen Spulwurmeier

Zur Eintragung in die "Liste geprüfter Desinfektionsmittel für die Tierhaltung" müssen im Suspensionstest wenigstens 98 %, im Keimträgertest wenigstens 95 % der *Ascaris suum*-Eier nach 120 min langer Einwirkzeit in ihrer Entwicklung gehemmt sein.