

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen  
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Kurt Pfister

Angefertigt am Institute of Veterinary, Animal and Biochemical Sciences,  
Massey University, Palmerston North, Neuseeland

(Prof. William E. Pomroy)

Vergleichender Nachweis von *Dictyocaulus eckerti* L1 und  
Trichostrongylideneiern mittels FLOTAC-, McMaster- und  
Baermann-Verfahren beim Rothirsch (*Cervus elaphus*)

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der  
Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Benjamin Ulrich Bauer

aus Ulm

München 2012

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun  
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Pfister  
Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Förster

Tag der Promotion: 21. Juli 2012

Die vorliegende Arbeit wurde nach § 6 Abs. 2 der Promotionsordnung

für die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München  
als kumulative Dissertation gestaltet.

Meiner Familie

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>VII</b>
<b>GLOSSAR.....</b>	<b>VIII</b>
<b>PRÄSENTATIONEN.....</b>	<b>IX</b>
<b>I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>II. LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1. Bedeutung der Rothirschhaltung in Neuseeland.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Parasitenbefall beim Rothirsch (<i>Cervus elaphus</i>) in kommerzieller         Haltung in Neuseeland .....</b>	<b>4</b>
2.1. Trichostrongyliden .....	5
2.2. <i>Dictyocaulus eckerti</i> .....	5
<b>3. Nachweis von Nematodeneiern mittels Flotation .....</b>	<b>8</b>
<b>4. Nachweismethoden von <i>Dictyocaulus</i>-Larven .....</b>	<b>10</b>
<b>5. FLOTAC – Ein neues Verfahren zum Nachweis von Endoparasiten.....</b>	<b>11</b>
5.1. Das FLOTAC-Verfahren.....	11
5.2. FLOTAC in der Veterinärparasitologie .....	14
5.3. FLOTAC in der Humanparasitologie.....	16
<b>III. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>18</b>
<b>1. Experiment 1 bis 4.....</b>	<b>18</b>
<b>2. Modifizierte Baermann-Technik .....</b>	<b>18</b>
<b>3. Modifizierte McMaster-Methode.....</b>	<b>19</b>
<b>4. FLOTAC-Technik.....</b>	<b>19</b>
<b>5. Experiment 5.....</b>	<b>20</b>
<b>6. Statistik.....</b>	<b>20</b>
<b>IV. ERGEBNISSE .....</b>	<b>21</b>
<b>1. Publikation.....</b>	<b>21</b>

---

<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>28</b>
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>34</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>35</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>36</b>
<b>IX.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>48</b>
<b>X.</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>49</b>
<b>XI.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>50</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

ANOVA	Analysis of Variance
ca.	circa
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EpG	Eier pro Gramm Kot
et al.	und andere (lat.)
g	Mittlere Erdbeschleunigung
h	Stunde
L1	Erstes Larvenstadium von <i>Dictyocaulus</i> spp.
LpG	Larven pro Gramm Kot
MAF	Ministry of Agriculture and Forestry
MAFF	Ministry of Agriculture, Fisheries and Food
ml	Milliliter
NZD	Neuseeland-Dollar (engl.)
RAPD-PCR	Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction
r.p.m.	Umdrehung pro Minute (engl.)
SAF	Sodium-acetate-Acetic-acid-Formalin
SD	Standardabweichung (engl.)
SG	Spezifisches Gewicht
WAAVP	World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology

## GLOSSAR

**Absetzer:** Hirschkälber, die im Alter von 3 bis 4 Monaten von der Mutter getrennt werden.

**Zerviden:** Familie der Paarhufer, dessen Männchen Geweihe tragen. Repräsentiert werden sie insbesondere durch die Gattungen Rentier (*Rangifer*), Elche (*Alces*), Amerikahirsche (*Odocoileus*), Rehe (*Capreolus*) und Edelhirsche (*Cervus*).

***Dictyocaulus eckerti*:** syn. *Dictyocaulus noeneri*; großer Lungenwurm beim Rothirsch (*Cervus elaphus*), Reh (*Capreolus capreolus*), Damhirsch (*Dama dama*) und weiteren verschiedenen Hirscharten.

**Fading Elk Syndrome:** andauernde Kachexie unterschiedlichster Genese insbesondere beim Wapiti und seinen Kreuzungen mit dem Rothirsch in den Herbst- und Wintermonaten.

**Hauswiederkäuer:** Domestizierte Form von Rind, Wasserbüffel, Schaf und Ziege in menschlicher Obhut.

**Kaliumtetraiodomercurat:** Kaliumtetraiodomercurat(II)-Lösung,  $\text{HgI}_4\text{K}_2$ , sehr giftig beim Einatmen, Verschlucken und bei Berührung mit der Haut.

**Parasep® SF Testkit:** Verfahren zum Nachweis von Helmintheneiern und -larven sowie Protozoenzysten und -oozysten.

**Protostrongyliden:** Sammelbegriff für die kleinen Lungenwürmer von Schaf und Ziege.

**Rothirsch:** Schottischer Rothirsch (*Cervus elaphus scoticus*) sowie seine Kreuzungen mit dem nordamerikanischen Wapiti (*Cervus elaphus nelsoni*, *roosevelti* und *manitobensis*).

**Trichostrongyliden:** Sammelbegriff für Nematoden im Magen-Darm-Trakt insbesondere von Wiederkäuern.



## PRÄSENTATIONEN

Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit wurden auf folgenden Veranstaltungen präsentiert:

1. Bauer B. U., Pfister K.: Die Rothirschhaltung (*Cervus elaphus*) in Neuseeland unter besonderer Berücksichtigung von *Dictyocaulus eckerti*. DVG-Tagung Fachgruppe Zootier-, Wildtier- und Exotenmedizin, Stuttgart. 30.11. – 04.12.2011; Vortrag
2. Bauer B. U., Pomroy W. E., Gueydon J., Gannac S., Scott I., Pfister K.: FLOTAC-, McMaster- und Baermann-Verfahren zum Nachweis von *Dictyocaulus eckerti* L1 und Strongylideneiern in Fäzes von Rothirschen (*Cervus elaphus*) im Vergleich. DVG-Tagung Fachgruppe Parasitologie und parasitäre Krankheiten, München. 07. – 09.07.2010; Vortrag
3. Bauer B. U., Pomroy W. E., Gueydon J., Gannac S., Scott I.: Evaluation of different flotation solutions using the FLOTAC technique to detect *Dictyocaulus eckerti* (L1). New Zealand Society for Parasitology Annual Meeting No. 37, Wanaka, Neuseeland. 20. – 22.10.2009; Poster

## I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die kommerzielle Rothirschhaltung in Neuseeland ist die größte weltweit. Infektionen mit *Dictyocaulus eckerti* und Magen-Darm-Strongyloiden sind die parasitären Hauptprobleme der Hirschindustrie (Mackintosh und Wilson, 2003; Mason und Gladden, 1983; Parsons et al., 1994; Watson und Charleston, 1985). Jungtiere und Absetzer sind besonders betroffen und Infektionen führen zu Abmagerung und Todesfällen (Hoskin et al., 2007; Johnson et al., 2001b; Mason, 1981a; McKenzie, 1990; Wilson et al., 1997). In neuseeländischen Labors werden Lungenwurmlarven (L1) und Trichostrongylideneier klassischerweise mit dem Baermann-Auswanderungsverfahren bzw. mit der McMaster-Methode nachgewiesen (Audigé et al., 1998; Hoskin et al., 2005; Stafford et al., 1994).

Mit dem FLOTAC-Apparat wurde ein standardisiertes und einfaches Diagnostikverfahren entwickelt, welches auch den Ansprüchen der WAAVP genügen soll (Cringoli, 2006; Cringoli et al. 2010). Diverse parasitäre Elemente können mit FLOTAC gleichzeitig nachgewiesen werden. Unter Verwendung entsprechender Flotationslösungen werden parasitäre Bestandteile an die Oberfläche flotiert. Der Einsatz des neuen FLOTAC-Verfahrens wurde bereits erfolgreich in verschiedenen Bereichen der Human- und Veterinärparasitologie evaluiert (Duthaler et al., 2010; Knopp et al., 2009a; Rinaldi et al., 2007a; Utzinger et al., 2008). Für Hauswiederkäuer wurden verschiedene Flotationslösungen mit FLOTAC getestet. Zum Nachweis von Trichostrongylideneiern wird entweder Sheather's Zuckerlösung (SG 1,25), gesättigte Kochsalzlösung (SG 1,20) oder Sucrose plus Kaliumtetraiodomercurat (SG 1,25) als Flotationslösung empfohlen (Cringoli et al., 2010). Weiterhin wird Zinksulfat plus Kaliumtetraiodomercurat (SG 1,45) als Goldstandard zum Nachweis von Lungenwürmern (L1) favorisiert (Cringoli et al., 2010). Vergleichbare Empfehlungen fehlen jedoch für den Nachweis von Endoparasiten bei Zerviden.

Ziel dieser Studie war es unter Verwendung von Rothirschfäzes verschiedene Flotationslösungen auf ihre Fähigkeit zum Nachweis von Trichostrongylideneiern und *Dictyocaulus*-Larven (L1) mittels FLOTAC zu überprüfen. Die ermittelten LpG- bzw. EpG-Werte wurden ferner mit Ergebnissen des Baermann-

Auswanderungsverfahrens und der McMaster-Methode verglichen. Dementsprechend wurden vier Experimente durchgeführt um FLOTAC mit den unterschiedlichsten Flotationslösungen und mit den traditionellen Methoden zu vergleichen. Ein 5. Experiment vergleicht die Zuverlässigkeit der Baermann-Methode mit der FLOTAC-Technik zum Nachweis von *Dicytocaulus* (L1) aus frischen und bei 4 °C gelagerten Kotproben.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Bedeutung der Rothirschhaltung in Neuseeland

Der Rothirsch (*Cervus elaphus scoticus*) wurde zwischen 1851 und 1926 aus Großbritannien zu jagdlichen Zwecken nach Neuseeland eingeführt (Dolman und Wäber, 2008; Forsyth et al., 2010). Später versuchte man die Rothirsche wieder auszurotten und die Haltung war strikt verboten. Jedoch war der Export von Hirschfleisch nach Europa sehr lukrativ und deshalb wurde die Haltung 1969 erstmalig erlaubt. Die größer werdende Nachfrage nach Hirschfleisch und die Gründung der New Zealand Deer Farmers' Association im Jahre 1975 machten die Hirschhaltung immer professioneller und sie entwickelte sich zu einem wichtigen landwirtschaftlichen Betriebszweig (Fennessy et al., 1991; Mason, 1994; Wilson, 2002). Rothirsche werden mit nordamerikanischen Wapitis (*Cervus elaphus nelsoni*, *roosevelti* und *manitobensis*) verpaart um schwerere und magere Schlachtkörper sowie größere Geweihe zu produzieren (Fennessy et al., 1991; Pearse, 1988; Pollard und Wilson, 2002). Aufgrund ständiger Selektion und menschlichem Kontakt haben die Tiere weitgehend die Angst vor dem Menschen verloren und lassen sich dadurch leicht handhaben (Pollard und Wilson, 2002).

Momentan werden auf neuseeländischen Hirschbetrieben ca. 1,12 Millionen Rothirsche gehalten (MAF, 2011). Neuseeland ist somit der weltgrößte Produzent von Hirschfleisch (Johnson und Mackintosh, 2003; Johnson et al., 2001b). Hauptabnehmer von Hirschfleisch ist mit 80 % des Exportaufkommens die Europäische Union, wobei Deutschland traditionell den größten Absatzmarkt darstellt (Fennessy et al., 1991; MAF, 2011; Mason, 1994). Insgesamt wurde im Handelsjahr 2011 Hirschfleisch im Wert von 211 Millionen NZD exportiert (Anonymous, 2011a). Bastgeweihe werden vor allem für die traditionellen medizinischen Märkte in Südkorea und China produziert (Anonymous, 2011a; Fennessy et al., 1991; Mason, 1994). Das Exportvolumen betrug im Jahr 2011 ca. 26 Millionen NZD (Anonymous, 2011a). Somit stellt die kommerzielle Hirschhaltung eine bedeutende Einnahmequelle für die neuseeländische Landwirtschaft dar.



**Abb.1.** Typisches Rothirschgatter in Neuseeland

## **2. Parasitenbefall beim Rothirsch (*Cervus elaphus*) in kommerzieller Haltung in Neuseeland**

Rothirsche in der neuseeländischen Landwirtschaft infizieren sich vor allem mit *Dictyocaulus eckerti* und gastrointestinalen Würmern (Mackintosh und Wilson, 2003; Mason und Gladden, 1983; Parsons et al., 1994). Der Befall mit Lungen- und Magen-Darm-Nematoden verursacht schätzungsweise jährliche Verluste von 2,8 Millionen NZD (Mackintosh und Wilson, 2003). Jedoch fehlen detaillierte Erkenntnisse über den direkten Einfluss von Endoparasiten auf die Hirschproduktion sowie die Epidemiologie dieser Parasiten (Castillo-Alcala et al., 2007; Hoskin et al., 2007). Zur Bekämpfung stehen in Neuseeland eine Reihe von zugelassenen Anthelminthika zur Verfügung. Am häufigsten wird ein Pour-on-Präparat mit dem Wirkstoff Moxidectin verwendet (Castillo-Alcala et al., 2007).

Neben *D. eckerti* und gastrointestinalen Nematoden infizieren sich Rothirsche in Neuseeland auch mit anderen Endoparasiten wie *Taenia hydatigena*, *Moniezia expansa*, *Fasciola hepatica*, *Calicophoron calicophorum*, *Elaphostrongylus cervi* und *Varestrongylus sagittatus* (Anonymous, 1979; Mason, 1981a, 1994; Swanson et al., 2007).

### 2.1. Trichostrongyliden

Wie alle Tiere in Weidehaltung infiziert sich auch der Rothirsch mit Magen-Darm-Strongyliden. Im Vergleich zu Lungenwürmern spielen jedoch gastrointestinale Nematoden eine geringe Rolle in der Hirschhaltung (Mason, 1994). Mason (1994) begründet dies damit, dass die Bekämpfung von Lungenwürmern auch zur Reduzierung von Magen-Darm-Nematoden führt. Der Befall von gastrointestinalen Parasiten äußert sich besonders subklinisch und führt zu geringerer Futteraufnahme und geringeren Gewichtszunahmen vor allem bei Absetzern (Hoskin et al., 2000, 2007). Infektionen besonders mit Nematoden des Abomasums können auch zum „Fading Elk Syndrome“ und Tod führen (Mackintosh und Tolentino, 2009; Mason, 1977; Waldrup und Mackintosh, 1992).

Folgende Nematoden wurden bei landwirtschaftlich genutzten Rothirschen in Neuseeland im Labmagen bzw. im Dünn- und Dickdarm nachgewiesen und bestimmt: *Apteragia quadrispiculata*, *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta*, *Ostertagia leptospicularis*, *Rinadia mathevossiani*, *Skrjabinagia kolchida*, *Spiculoptera* *asymmetrica*, *Spiculoptera* *spiculoptera*, *Trichostrongylus axei*, *Capillaria bovis*, *Cooperia mcmasteri*, *Cooperia oncophora*, *Cooperia pectinata*, *Chabertia ovina*, *Oesophagostomum radiatum* (Anonymous, 1979; Mason, 1981b, 1994; Mason und Gladden, 1983; Swanson et al., 2007; Wilson, 1981). *Spiculoptera* spp. kommen am häufigsten bei Rothirschen vor, unabhängig vom Alter der Tiere (Hoskin et al., 1997; Wilson, 1981). Für Hoskin et al. (2007) sind besonders die *Ostertagia*-Arten pathogen.

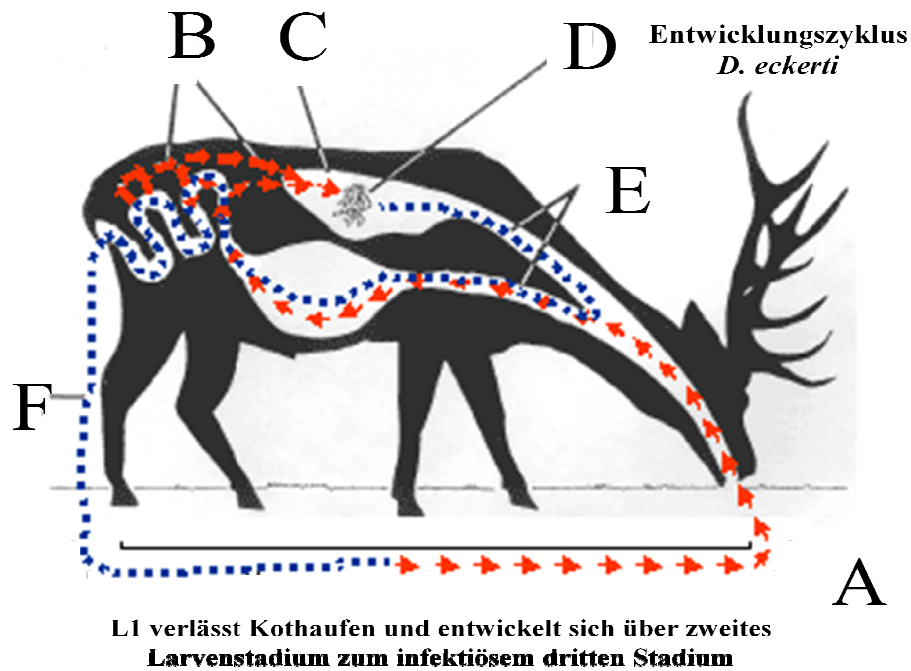
### 2.2. *Dictyocaulus eckerti*

Im Jahre 1931 wurde der Lungenwurm *D. eckerti* erstmalig von Skrjabin in Rentieren (*Rangifer tarandus*) beschrieben. Die Existenz von *D. eckerti* und dessen morphologische Unterscheidung zu *Dictyocaulus viviparus* wurde jedoch in der Vergangenheit immer wieder diskutiert (Epe et al., 1995; Gibbons und Khalil, 1988; Johnson et al., 2001a). Vielmehr war man der Überzeugung, dass es einen Rinder- und einen Hirsch-assoziierten *D. viviparus* gibt (Corrigall et al., 1988). Durch eine ausführliche morphologische Überprüfung des Genus *Dictyocaulus* durch Gibbons und Khalil (1988) konnte *D. eckerti* als Lungenwurm von Zerviden bestätigt werden. Endgültige Gewissheit über die Existenz von *D. eckerti* als eigenständige Lungenwurm Spezies brachte die moderne Molekularbiologie. Mit Hilfe der RAPD-PCR gelang es Epe et al. (1995)

genetische Unterschiede zwischen *D. viviparus* und *D. eckerti* festzustellen. Dies wurde in darauffolgenden Studien bestätigt (Epe et al., 1997; Schnieder et al., 1996). Kreuzkontaminationen von *D. eckerti* und *D. viviparus* bei Rothirschen bzw. Rindern sind dennoch möglich (Bienioschek et al., 1996; Johnson et al., 2003b). Interessanterweise kann sich *D. viviparus* in geringem Umfang in den Bronchien von Hirschen etablieren und vermehren, dies wiederum gelingt *D. eckerti* bei der Infektion von Rindern jedoch kaum (Bienioschek et al., 1996; Johnson et al., 2003b).

Aufgrund der oben genannten Entwicklung wurde auch in der neuseeländischen Literatur lange Zeit beim Lungenwurmbefall des Rothirsches von *D. viviparus* berichtet (Charleston, 1980; Mason, 1981a, 1981b, 1994; McKenzie, 1990; Wilson und Collier, 1981). Johnson et al. (2001a, 2001b) verglichen Lungenwürmer von Rindern und Rothirschen morphologisch sowie genetisch. Bei beiden Verfahren konnten signifikante Unterschiede zwischen den beiden Lungenwurm Spezies nachgewiesen werden. Damit war für Johnson et al. (2001a, 2001b) bewiesen, dass es sich bei den Lungenwürmern von neuseeländischen Rothirschen ebenfalls um *D. eckerti* handelt.

*D. eckerti* hat einen direkten Entwicklungszyklus und ist identisch mit dem Zyklus von *D. viviparus*. Die Präpatenz beträgt 20 bis 24 Tage (Taylor et al., 2007b). Infektionen mit *D. eckerti* verursachen hohe wirtschaftliche Verluste (Orr, 1991) und somit ist *D. eckerti* der bedeutendste Parasit in der kommerziellen Rothirschhaltung (Charleston, 1980; Mason, 1981b, 1994; McKenzie, 1990). Der Lungenwurmbefall führt bei Rothirschen in erster Linie zu Abmagerung sowie geringer Gewichtszunahme der Tiere und seltener zu respiratorischen Symptomen wie Husten (Corrigall et al., 1988; Johnson und Mackintosh, 2003; Mason, 1981a; Orr, 1991; Wilson und Collier, 1981). Vor allem bei Jungtieren und Absetzern kommt es im Herbst zu vermehrten plötzlichen Todesfällen (Johnson et al., 2003b; Mackintosh und Tolentino, 2009; Mason, 1994; McKenzie, 1990). Wie beim Rind entwickelt sich beim Rothirsch eine Immunität mit zunehmenden Alter (McKenzie, 1990). Deshalb haben Johnson et al. (2003a) versucht mit Hilfe eines Impfstoffes Rothirsche vor der Infektion mit *D. eckerti* zu schützen. Jedoch konnte der Impfstoff, welcher für Rinder entwickelt wurde, die Infektion nur verzögern und nicht verhindern.



**Abb. 2.** Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von *D. eckerti* (modifiziert nach Anonymous (2011b))

**A.** Infektiöse Larve wird mit Gras aufgenommen.

**B.** Infektiöse Larve penetriert die Darmschleimhaut und wandert in Lymphknoten ein. Dort findet die Häutung zum 4. Larvenstadium (L4) statt. Über Lymph- und Blutbahn wandert L4 in die Lunge ein.

**C.** Entwicklung zum 5. Larvenstadium und Reifung zum Adulten in den Bronchiolen.

**D.** Adulte Würmer etablieren sich in den Bronchien und legen Eier.

**E.** Eier werden hoch gehustet und abgeschluckt und entwickeln sich zu L1.

**F.** L1 wird mit Fäzes ausgeschieden.



### 3. Nachweis von Nematodeneiern mittels Flotation

Für die Bestimmung der Eizahlen im Kot sind unterschiedliche Ausführungen von Flotationsmethoden beschrieben worden: direkte Flotation (Taylor et al., 2007a), Flotation mit gesättigter Kochsalzlösung nach Fülleborn (Bauer, 2006), Wisconsin Flotationsmethode (Cox und Todd, 1962), McMaster-Methode (Cringoli et al., 2004; Gordon und Whitlock, 1939), modifizierte Salz-Zucker Flotation nach Mes (Mes et al., 2001), modifiziertes Flotationsverfahren nach Markovics und Medinski (Markovics und Medinski, 1996) mit einer Zuckerlösung (SG 1,25). Alle Verfahren basieren darauf, dass eine Flotationslösung mit bekanntem spezifischem Gewicht mit Kot homogenisiert wird. Nach einer bestimmten Zeit und mit Hilfe der Gravidität flotieren die leichteren Eier, Larven oder Oozysten an die Oberfläche und werden somit von den schwereren Kotpartikeln getrennt (Bauer, 2006). Für den Nachweis von Nematodeneiern sind Flotationslösungen mit einem spezifischen Gewicht zwischen 1,10 und 1,20 notwendig (Taylor et al., 2007a). Die wahrscheinlich am häufigsten verwendeten Flotationslösungen sind gesättigte Kochsalzlösung (SG 1,20) und Sheather's Zuckerlösung (SG 1,25) (Dunn, 1978; MAFF, 1986; Zajac und Conboy, 2006).

Von großer Bedeutung ist die McMaster Methode zur Bestimmung der Eizahl pro Gramm Kot (EpG). Sie ist ein wesentlicher Bestandteil des Eizahlreduktionstest, welcher von der WAAVP zum Nachweis von Anthelmintikaresistenzen empfohlen wird (Coles et al., 1992; Coles et al., 2006). Ursprünglich wurde die McMaster-Methode von Gordon und Whitlock (1939) beschrieben und wurde seitdem mehrfach modifiziert (Bowman et al., 2003; MAFF, 1986; Pereckiene et al., 2007; Stafford et al., 1994; Vadlejšch et al., 2011; Wetzel, 1951). Gerade diese Vielzahl an verschiedenen Ausführungen beeinträchtigt die Zuverlässigkeit dieses Verfahrens (Cringoli et al., 2004; Vadlejšch et al., 2011). Neben der Wahl der Flotationslösung spielt auch die Flotationsdauer eine Rolle. Dunn und Keymer (1986) erhielten ein Maximum an EpG-Werten von *Heligmosomoides polygyrus* wenn zwischen Beladung der McMaster-Kammern und Auswertung ca. 30 Minuten lagen. Auch Rehbein et al. (1999) stellten signifikante Unterschiede bei der Ermittlung von *Dicrocoelium dentriticum* mittels McMaster-Methode (Zinksulfat SG 1,45) fest. So wurden nach 3 bis 5 Minuten Flotationsdauer niedrigere EpG-Werte ermittelt als nach 15 bis 20 Minuten. Dunn und Keymer (1986) untersuchten auch den Einfluss der Probenverdünnungen auf die EpG-

Werte und empfehlen eine Verdünnung von 1:15. Dies wurde durch Cringoli et al. (2004) später bestätigt. In einer groß angelegten Studie verglichen Cringoli et al. (2004) neben den Flotationslösungen auch verschiedene Volumina (0,15 ml bis 1,0 ml) von McMaster-Zählkammern. Bei der Verwendung einer McMaster-Zählkammer von 1,0 ml wurden zuverlässige EpG-Werte von gastrointestinalen Nematoden und *D. dentriticum* erzielt. Pereckiene et al. (2007) verglich sieben modifizierte McMaster-Methoden um *Ascaris suum* Eier nachzuweisen. Diese Modifikationen unterschieden sich hinsichtlich: Probenmenge, Verdünnung, Flotationslösung und deren spezifischen Gewicht, Zentrifugationsgeschwindigkeit und -dauer, Flotationsdauer, Zählkammern und Multiplikationsfaktor. Trotz der Vielzahl an Faktoren, lieferten vor allem Verfahren die eine Zentrifugation als Arbeitsschritt beinhalteten die besten Ergebnisse. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Vadlejch et al. (2011). Sie verglichen die modifizierten McMaster-Methoden nach Wetzell, Zajíček sowie Roepstroff und Nansen um Eier von *T. circumcincta* nachzuweisen. Aufgrund der größten Probenmenge und Zentrifugation war die Methode nach Roepstroff und Nansen am sensitivsten und zuverlässigsten.

Die unterschiedlichen Ausführungen und Empfehlungen der traditionellen McMaster-Methode machen deutlich, dass eine Vielzahl von Faktoren die Ergebnisse der EpG-Werte beeinflussen und eine Standardisierung der Nachweismethoden für Endoparasiten in der Tiermedizin notwendig ist (Cringoli et al., 2004; Pereckiene et al., 2007; Vadlejch et al., 2011).

#### 4. Nachweismethoden von *Dictyocaulus*-Larven

Methode der Wahl für den Nachweis von *Dictyocaulus*-Larven aus Kotproben ist das traditionelle Baermann-Auswanderungsverfahren. Zwei verschiedene Modifikationen des Auswanderungsverfahrens sind in der Literatur beschrieben. Zum Einen kann ein Trichter, der sogenannte Baermann-Apparat, verwendet werden (Eysker, 1997; McKenna, 1999; Thienpont et al., 1990) und zum Anderen ein einfaches Trichtergefäß (McKenna, 1999). Beide basieren auf demselben Prinzip: Eine bestimmte Menge Fäzes wird in Gaze eingewickelt und im wassergefüllten Trichter oder Trichtergefäß für 30 - 36 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit wandert das erste Larvenstadium der *Dictyocaulus* spp. aus der Fäzes und sinkt auf den Grund des Trichterhalses bzw. -bodens. Beim Baermann-Apparat kann eine Klemme, die den Gummischlauch über dem Trichterhals verschließt vorsichtig gelöst werden und einige Tropfen der Larvensuspension können auf einen Objektträger getropft und untersucht werden. Bei Verwendung eines Trichtergefäßes wird die Gaze entfernt und die Flüssigkeit bis auf wenige Milliliter aus dem Gefäß abgesaugt. Anschließend wird die zurückbleibende Flüssigkeit untersucht. Das Auswanderungsverfahren ist sehr von der Motilität der *Dictyocaulus*-Larven abhängig. Diese wird durch Kühlen der Proben negativ beeinflusst und somit wird die Verwendung von frischen Kotproben empfohlen (Eysker, 1997; McKenna, 1999; Rode und Jørgensen, 1989).

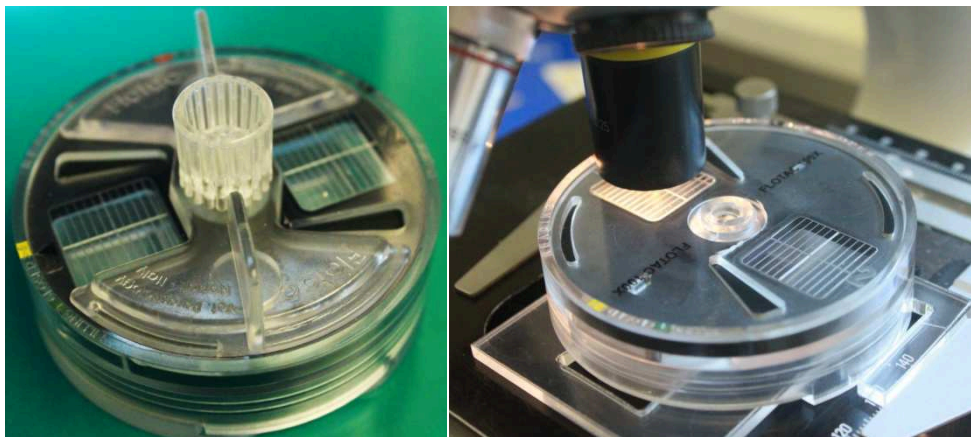
Nur wenige Autoren verwenden andere Techniken um *Dictyocaulus*-Larven nachzuweisen. Lyons et al. (1995, 1972) bevorzugten die Flotationsmethode mit Zinksulfat (SG 1,22) zum Nachweis von *D. viviparus*. Samuel und Trainer (1969) sowie Williams und Broussard (1995) benutzten ein Flotationsverfahren mit Zuckerlösung (SG 1,25 bzw. 1,27) zum Nachweis von *Dictyocaulus*-Larven. Jedoch wiesen Samuel und Trainer (1969) darauf hin, dass sie mit der Flotation nur sehr wenige Larven nachweisen konnten.

Neben dem direkten Nachweis von *D. viviparus* Larven aus Fäzes kann der Befall auch mittels ELISA unter Verwendung von Serum- (von Holtum et al., 2008) oder Milchproben (Fiedor et al., 2009) diagnostiziert werden.

## 5. FLOTAC – Ein neues Verfahren zum Nachweis von Endoparasiten

### 5.1. Das FLOTAC-Verfahren

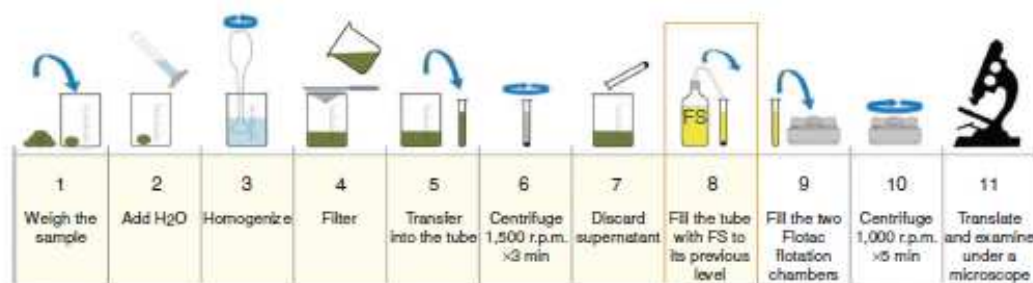
Die FLOTAC-Technik wurde von Cringoli 2006 erstmalig vorgestellt (Cringoli, 2006). Die neue Diagnostikmethode basiert auf dem Prinzip der Flotation. Durch Verwendung verschiedener Flotationslösungen mit unterschiedlichem spezifischem Gewicht ist es möglich sämtliche Formen von Parasiten (Oozysten, Eier, Larven und Zysten) gleichzeitig nachzuweisen. Cringoli und seine Mitarbeiter haben den Aufbau des FLOTAC-Apparates und die Durchführung der koprologischen Diagnostik mit Hilfe der neuen Technik ausführlich in verschiedenen Fachzeitschriften publiziert (Cringoli, 2006; Cringoli et al., 2010).



**Abb. 3.** FLOTAC-Apparat und FLOTAC-Apparat unter dem Mikroskop

Die wesentlichen Arbeitsschritte des FLOTAC-Verfahrens sind folgende:

1. 10 Gramm Kot werden mit 90 ml Leitungswasser vermischt und homogenisiert (Verdünnung 1:10).
2. Anschließend wird die homogenisierte Lösung durch ein Sieb (Maschenweite 250 bis 350  $\mu\text{m}$ ) gegeben.
3. Mit der filtrierten Lösung wird ein verschließbares Zentrifugenröhrchen mit 11 ml befüllt.
4. Das Zentrifugenröhrchen wird mit 170 g für 3 Minuten zentrifugiert.
5. Der Überstand wird abgegossen und das Zentrifugenröhrchen mit 11 ml der gewünschten Flotationslösung befüllt und vermischt.
6. Nun werden beide Kammern des FLOTAC-Apparates mit jeweils 5 ml Lösung befüllt.
7. Der FLOTAC-Apparat wird durch Drehung der Lesescheibe verschlossen und mit 120 g für 5 Minuten zentrifugiert.
8. Anschließend wird die Lesescheibe des FLOTAC-Apparates um 90° gedreht und kann unter einem Mikroskop ausgewertet werden.



**Abb. 4.** Schematische Darstellung des FLOTAC-Verfahrens (Cringoli et al., 2010)

Cringoli et al. (2010) empfehlen für den Nachweis von Endoparasiten von Hauswiederkäuern verschiedene Flotationslösungen:

Parasit	Nachweis	Goldstandard: Flotationslösung mit spezifischen Gewicht (SG)
<i>Eimeria</i> spp.	Oozysten	Sucrose plus Kaliumtetraiodomercurat (SG 1,25)
Magen-Darm-Strongyliden	Eier	Sheather's Zuckerlösung (SG 1,20); gesättigte Kochsalzlösung (SG 1,20); Sucrose plus Kaliumtetraiodomercurat (SG 1,25)
<i>Moniezia</i> spp.	Eier	Zinksulfat (SG 1,20); Magnesiumsulfat (SG 1,28)
<i>Fasciola hepatica</i>	Eier	Zinksulfat (SG 1,35); Zinksulfat plus Kaliumtetraiodomercurat (SG 1,45)
<i>Calicophoron daubneyi</i>	Eier	Zinksulfat (SG 1,35); Zinksulfat plus Kaliumtetraiodomercurat (SG 1,45)
<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	Eier	Kaliumtetraiodomercurat (SG 1,44)
Lungenwürmer	Larven (L1)	Zinksulfat plus Kaliumtetraiodomercurat (SG 1,45)

**Tab 1.1:** Empfohlene Flotationslösungen für das FLOTAC-Verfahren für den Nachweis von Endoparasiten bei Hauswiederkäuern unter Verwendung von frischen Kotproben.

Seit der Einführung von FLOTAC wurde diese neue Methode in zahlreichen Studien der Veterinär- und Humanparasitologie angewendet.

## 5.2. FLOTAC in der Veterinärparasitologie

In einer Vielzahl von veterinärmedizinischen Studien wurde das neue FLOTAC-Verfahren evaluiert und bereits als vollwertiges Diagnostikinstrument verwendet. Unter anderem wurde das FLOTAC-Verfahren mit entsprechender Flotationslösung mit klassischen Nachweismethoden verglichen. Dabei konnten Rinaldi et al. (2007a) und Gaglio et al. (2008) erfolgreich auch die karnivoren Lungenwürmer *Crenosoma vulpis* und *Aelurostrongylus abstrusus* mit FLOTAC und unter der Verwendung von Zinksulfat (SG 1,20) bzw. von Zinksulfat plus Kaliumtetraiodomercurat (SG 1,45) nachweisen. In beiden Studien hat das FLOTAC-Verfahren signifikant ( $p < 0,05$ ) mehr Lungenwurmlarven aus Kotproben nachgewiesen als das übliche Baermann-Auswanderungsverfahren. Beim Nachweis von *Passalurus ambiguus* Eiern in einem italienischen Kaninchenbetrieb war FLOTAC (gesättigte Kochsalzlösung, SG 1,20) genauso sensitiv wie die Tesafilm-Abklatsch-Methode (Rinaldi et al., 2007b). Hier hat FLOTAC den Vorteil, dass eine frische Kotprobe aus dem Kaninchenstall entnommen werden kann und somit das Tier nicht aktiv gehandhabt werden muss, wie beim Abklatschpräparat üblich. Mit FLOTAC (Zinksulfat, SG 1,35) konnten auch mehr *Spirocerca lupi* Eier aus Hundefäzes nachgewiesen werden als mit modifizierten Flotationsverfahren (Traversa et al., 2008). Für Levecke et al. (2009) war FLOTAC auch das sensitivste Diagnostikinstrument zum Nachweis von *Trichuris trichiura* aus Fäzes von Affen. Sie verglichen das FLOTAC-Verfahren (Zuckerlösung, SG 1,27), die McMaster-Methode (gesättigte Kochsalzlösung plus Zuckerlösung, SG 1,22), eine auf Ether basierende Anreicherungsmethode sowie den Parasep® SF Testkit miteinander. Jedoch bemerkten sie, dass das FLOTAC-Verfahren auch die arbeits- und zeitaufwendigste Methode von allen vier Verfahren ist. FLOTAC kann auch erfolgreich zum Nachweis von Trematodeneiern eingesetzt werden. In einer Studie von Duthaler et al. (2010) war FLOTAC (Zinksulfat, SG 1,35) sensitiver und schneller zum Nachweis von *F. hepatica* als die traditionelle Sedimentation.

Ausführliche Untersuchungen mit FLOTAC wurden auch mit verschiedenen Flotationslösungen und unterschiedlich haltbar gemachten Proben gemacht. Rinaldi et al. (2010) verglichen frische, mit 5 % Formalin und mit 10 % Formalin konservierte Proben sowie gefrorene Schaffäzes um große und kleine Lungenwürmer nachzuweisen. Dafür verwendeten sie die FLOTAC-Methode, die

direkte Flotation und die McMaster Methode mit jeweils neun verschiedenen Flotationslösungen. FLOTAC ergab mit den Flotationslösungen Zinksulfat plus Kaliumtetraiodomercurat (SG 1,45) und Zinksulfat (SG 1,20 und 1,35) bei Verwendung von Proben, die mit 5 %igen Formalin konserviert wurden, die zuverlässigsten Ergebnisse. Weiterhin verglichen Rinaldi et al. (2010) FLOTAC mit den Flotationslösungen Zinksulfat plus Kaliumtetraiodomercurat (SG 1,45), Zinksulfat (SG 1,20 und 1,35) und das Baermann-Auswanderungsverfahren unter Verwendung von frischen Kotproben. Alle drei Flotationslösungen wiesen signifikant ( $p < 0,05$ ) höhere LpG-Werte nach als das Baermann-Verfahren. In einer anschließenden Studie evaluierten Rinaldi et al. (2011) wieder FLOTAC, McMaster und die direkte Flotationsmethode mit jeweils neun unterschiedlichen Flotationslösungen und denselben vier verschiedenen Konservierungsmethoden. Jedoch wurde diesmal die Sensitivität für *D. dentriticum*, *M. expansa* und gastrointestinale Nematoden untersucht. Mit der FLOTAC-Technik wurden immer ähnliche und sogar höhere EpG-Werte ermittelt als mit der McMaster-Methode. Mit der direkten Flotation war es nicht möglich zuverlässig parasitäre Bestandteile nachzuweisen. Rinaldi et al. (2011) empfehlen deshalb den Gebrauch von FLOTAC unter Verwendung von gesättigter Kochsalzlösung (SG 1,20) zum Nachweis von Nematoden- und Cestodeneiern sowie gesättigte Zinksulfatlösung (SG 1,35) zum Nachweis von Trematodeneiern aus frischen Schafkotproben. Neben ovinen Endoparasiten wurden auch Studien mit Hundeparasiten durchgeführt. Schnyder et al. (2011) verglichen neun Flotationslösungen um *Angiostrongylus vasorum* mit FLOTAC nachzuweisen. Mit Zinksulfat (SG 1,20) und Zinksulfat plus Kaliumtetraiodomercurat (SG 1,45) erhielten sie die meisten Larven pro Gramm Kot. Jedoch wurde darauf hingewiesen, dass sich bei Zinksulfat plus Kaliumtetraiodomercurat die Larven leicht in ihrer Form verändern. Weiterhin wurde die FLOTAC-Technik (Zinksulfat, SG 1,20) mit der McMaster-Methode, der direkten Flotation und dem Baermann-Auswanderungsverfahren verglichen. Dabei konnten mit FLOTAC höhere LpG-Werte ( $p < 0,05$ ) nachgewiesen werden als bei den anderen drei Methoden. Cringoli et al. (2011) machten eine ausführliche Studie mit FLOTAC zum Nachweis von *Ancylostoma caninum*. Neun Flotationslösungen sowie frische, mit 5 % Formalin, mit 10 % Formalin, mit SAF-Lösung und bei -30 °C konservierte Kotproben wurden verwendet um den Hakenwurm mit direkter Flotation, McMaster-Methode und FLOTAC nachzuweisen. Die höchsten Eizahlen pro



Gramm Kot (EpG) konnten mit der FLOTAC-Technik mit Kochsalzlösung (SG 1,20) bei Verwendung von in 5 % Formalin konservierten Kotproben nachgewiesen werden.

Die obengenannten Untersuchungen hatten alle das Ziel die Nützlichkeit und Zuverlässigkeit von FLOTAC zu evaluieren. Schon bald nach Einführung der FLOTAC-Technik wurde das neue Verfahren in unterschiedlichen Studien als alleiniges Diagnostikinstrument eingesetzt. So verwendete Keiser et al. (2008, 2010) FLOTAC (Zinksulfat plus Kaliumtetraiodomercurat, SG 1,45) zum Nachweis von *F. hepatica* bei Schafen. Für den Nachweis von Nematoden- und Cestodeneiern bei Wasserbüffeln (Rinaldi et al., 2009a) sowie Trematodeneiern bei Schafen (Musella et al., 2011) kam FLOTAC mit den Flotationslösungen Sucrose plus Kaliumtetraiodomercurat (SG 1,25) und Zinksulfat plus Kaliumtetraiodomercurat (SG 1,45) zum Einsatz. Außerdem verwendeten Rinaldi et al. (2009b) in einer weiteren Studie FLOTAC (Zuckerlösung, SG 1,25) für den Nachweis von Magen-Darm-Strongyliden bei Ziegen.

Die aufgeführten veterinärmedizinischen Studien haben bewiesen, dass es mit der neuen FLOTAC-Technik möglich ist, zuverlässig parasitäre Bestandteile nachzuweisen. Dabei waren die Nachweisraten für verschiedene Parasiten (EpG und LpG) mindestens genauso hoch oder sogar höher als mit den herkömmlichen Methoden. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die FLOTAC-Technik im Vergleich zur McMaster-Methode zeit- und arbeitsintensiver ist. Im Gegensatz dazu, konnten mit der FLOTAC-Technik zuverlässiger und schneller spezies-unabhängig Lungenwurmlarven nachgewiesen werden, als mit dem Baermann-Auswanderungsverfahren.

### **5.3. FLOTAC in der Humanparasitologie**

Auch in der Humanparasitologie kommt die FLOTAC-Technik vermehrt zum Einsatz. Vor allem in Entwicklungsländern wird das neue Verfahren zum Nachweis von humanpathogenen Endoparasiten verwendet. Für den Nachweis von Hakenwürmern wie *Ancylostoma duodenale* und *Nector americanus* wird Natriumnitrat (SG 1,20) als Flotationslösung verwendet (Jeandron et al., 2010; Knopp et al., 2009a, 2009b; Utzinger et al., 2008). Um Nematodenlarven wie *Strongyloides stercoralis* und Trematodeneier von *Schistosoma mansoni* und *F. hepatica* nachzuweisen, wird entweder eine Kombination aus Zinksulfat plus

Kaliumtetraiodomercurat (SG 1,45) (Knopp et al., 2009a; Utzinger et al., 2008) oder nur Zinksulfat (SG 1,35) (Jeandron et al., 2010; Knopp et al., 2009a) verwendet. In allen Studien wurde die FLOTAC-Methode mit den obengenannten Flotationslösungen verwendet und mit der herkömmlichen Kato-Katz Methode verglichen. Dabei erwies sich FLOTAC in den aller meisten Fällen als die sensitivere Nachweismethode.

### III. MATERIAL UND METHODEN

#### 1. Experiment 1 bis 4

Für die nachfolgenden Experimente wurden frische Kotproben von drei jungen Rothirschen (*Cervus elaphus*) verwendet. Die Rothirsche wurden in Freilandhaltung auf dem Gelände der Deer Research Unit der Massey University, Palmerston North, Neuseeland gehalten. Auf den Weiden wurden in den letzten Jahrzehnten ausschließlich Rothirsche gezüchtet. Somit kann eine Kontamination mit *D. viviparus* ausgeschlossen werden. Mit Hilfe von Kotauffangbeuteln, die mit einem Körpergeschirr am Rothirsch angebracht wurden, konnte die tägliche Menge an produziertem Kot kontaminationsfrei gesammelt werden. Es fand eine natürliche Infektion von *D. eckerti* und Magen-Darm-Nematoden statt. Die Proben wurden ins Labor der Veterinärparasitologie der Massey University, Palmerston North, Neuseeland gebracht und anschließend untersucht. Für jedes Experiment wurde die Kotprobe eines Rothirsches verwendet. Im ersten Versuch wurden fünf verschiedene Flotationslösungen mit der neuen FLOTAC-Technik verglichen. In den darauffolgenden drei Experimenten wurden verschiedene Flotationslösungen mit FLOTAC und den traditionellen Methoden zum Nachweis von Eiern und Larven gegenüber gestellt. Für jede Evaluierung wurden 10 Wiederholungen durch geführt.

#### 2. Modifizierte Baermann-Technik

Für die modifizierte Baermann-Technik wurden 4 Gramm Kot in eine chirurgische Gaze gewickelt und in einen konischen Messzylinder (Durchmesser: 5 cm, Höhe: 7,5 cm, Volumen: 40 ml) gehängt. Der Messzylinder wurde dann mit Leitungswasser gefüllt und anschließend für 20 Stunden bei 23 °C inkubiert. Anschließend wurde die Gaze mit Kot entfernt und die zurückbleibende Flüssigkeit vorsichtig bis auf ein Volumen von ca. 2,5 ml mittels Pasteurpipette (Raylab, Volumen = 3 ml, Neuseeland) abgesaugt. Diese 2,5 ml wurden mittels Pasteurpipette in eine Zählkammer (Whitlock S.F.E.L.O., Volumen = 2 ml, Australien) übertragen und mit einer 100fach Vergrößerung unter einem Mikroskop (Nikon YS2-H, Japan) untersucht. Die Summe der gezählten *D. eckerti* Larven wurde durch vier dividiert um die Larvenzahl pro Gramm Kot zu erhalten.



**Abb. 5.** Baermann-Verfahren mit konischen Messzylindern

### 3. Modifizierte McMaster-Methode

Zwei Gramm Kot wurden mit 28 ml gesättigter Kochsalzlösung (SG 1,20) vermischt. Das Gemisch wurde durch ein Sieb (Maschenweite 250  $\mu\text{m}$ ) gegeben und der Rückstand verworfen. Unter Rühren wurde das Filtrat durchgemengt und gleichzeitig mit einer Pasteurpipette (Raylab, Volumen = 3 ml, Neuseeland) aufgezogen um eine zwei-kammerige McMaster-Zählkammer (CHALEX Cooperation, Volumen = 0.3 ml, USA) zu befüllen. Die befüllten McMaster-Zählkammern wurden für 10 Minuten stehen gelassen, bevor sie untersucht wurden. Jedes gezählte Wurmei repräsentiert 50 Eier pro Gramm Kot.

### 4. FLOTAC-Technik

Die FLOTAC-Technik wurde ausführlich von Cringoli et al. (2006) beschrieben. Für die vorliegenden Experimente wurde das Verfahren leicht verändert, um elf verschiedene Flotationslösungen, welche detailliert in „Table 1“ aufgelistet sind, zu vergleichen. Fünf Gramm Kot wurden mit 95 ml Leitungswasser zu einer homogenen Flüssigkeit vermischt (Verdünnung 1:20). Die Suspension wurde durch ein Sieb (Maschenweite 250  $\mu\text{m}$ ) gefiltert und Zentrifugenröhrchen (Greiner Bio-One, Volumen = 15 ml, Deutschland) wurden mit 10 ml Suspension befüllt. Anschließend wurden die Zentrifugenröhrchen mit 470 g für 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgossen. Die Zentrifugenröhrchen wurden dann mit 6 ml der jeweiligen Flotationslösung befüllt und der Rückstand mittels Vortex gut vermischt. Eine Kammer des FLOTAC-Apparates wurde mit der homogenisierten Lösung unter Hilfe einer Pasteurpipette (Raylab, Volumen = 3 ml, Neuseeland) befüllt. Der FLOTAC-Apparat wurde dann mit 200 g für 5

Minuten zentrifugiert. Danach wurde die Untersuchungsscheibe des FLOTAC-Apparates um 90° Grad gedreht und die Lungenwurmlarven sowie Nematodeneier mit einer 100fach Vergrößerung unter dem Mikroskop (Nikon YS2-H, Japan) gezählt. Die Verwendung von 6 ml anstatt von den empfohlenen 5 ml war notwendig um die FLOTAC-Kammern vollständig zu befüllen und um Luftbläschen zu vermeiden. Deshalb repräsentiert jede gezählte Larve bzw. jedes gezählte Nematodenei 2,4 Larven bzw. Eier pro Gramm Kot. Der Faktor 2,4 wurde davon abgeleitet, dass nur 5 ml vom Gesamtvolumen 6 ml untersucht wurden. Folglich mussten die Summen der gezählten Larven und Eier um den Faktor 6/5 korrigiert werden. Weiterhin mussten die Ergebnisse mit dem Faktor zwei multipliziert werden, da nur 5 Gramm Kot verwendet wurde, anstatt den empfohlenen 10 Gramm Kot. In Vorversuchen hat sich gezeigt, dass bei Verwendung von 10 Gramm Kot die Flotationslösung in der FLOTAC-Kammer häufig zu dicht war und damit das Erkennen der Parasitenstadien erschwert wurde oder sogar unmöglich machte. Letztendlich wurden mit dem Faktor 2,4 die Eier bzw. die Larven pro Gramm Kot bestimmt.

## 5. Experiment 5

In Experiment 5 wurde das Baermann-Auswanderungsverfahren und der FLOTAC-Apparat verwendet um das erste Larvenstadium von *D. eckerti* nachzuweisen. Nur Magnesiumsulfat (SG 1,28) wurde als Flotationslösung verwendet. Das Baermann-Auswanderungsverfahren und die FLOTAC-Technik wurden genauso wie in den vorherigen Experimenten durchgeführt. Kotproben wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen vom gleichen Rothirsch gesammelt. Die erste Kotprobe wurde in einem Kühlschrank bei 4 °C für 7 Tage gelagert und anschließend untersucht. Die zweite Kotprobe wurde umgehend untersucht. Für jede Evaluierung wurden zehn Wiederholungen durchgeführt.

## 6. Statistik

Die Ergebnisse der gezählten Wurmeier und Larven von jedem Experiment wurden mittels ANOVA in Verbindung mit dem Turkey Test für multiple Vergleiche mit  $\alpha = 0.05$  analysiert. Alle Analysen wurden mit dem Programm Statistix 8 (Analytical Software, Tallahassee, USA) durchgeführt.

## IV. ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich der Validierung des FLOTAC-Verfahrens durchgeführt wurden, sind in einer Veröffentlichung dargestellt, welche in einer wissenschaftlichen Fachzeitschrift mit Gutachtersystem publiziert wurde (Parasitology Research; Parasitol Res).

### 1. Publikation

---

**Comparison of the FLOTAC technique with the McMaster method and the Baermann technique to determine counts of *Dictyocaulus eckerti* L1 and strongylid eggs in faeces of red deer (*Cervus elaphus*).**

---

#### Parasitology Research

Eingereicht am: 30. März 2010

Angenommen am: 20. April 2010

**B. U. Bauer<sup>1</sup>, W. E. Pomroy<sup>1,3</sup>, J. Gueydon<sup>1</sup>, S. Gannac<sup>1</sup>, I. Scott<sup>1</sup>, K. Pfister<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Veterinary, Animal and Biomedical Sciences, Massey University, Private Bag 11-222, Palmerston North, New Zealand.

<sup>2</sup>Comparative Tropical Medicine and Parasitology, Ludwig-Maximilians-University, Leopoldstr. 5, 80802 Munich, Germany.

<sup>3</sup>Corresponding author. Tel.: +64 6 350 7569; Fax: +64 6 350 5616. E-mail address: w.pomroy@massey.ac.nz

## Comparison of the FLOTAC technique with the McMaster method and the Baermann technique to determine counts of *Dictyocaulus eckerti* L1 and strongylid eggs in faeces of red deer (*Cervus elaphus*)

Benjamin U. Bauer · William E. Pomroy ·  
Julien Gueydon · Samuel Gannac · Ian Scott ·  
Kurt Pfister

Received: 30 March 2010 / Accepted: 20 April 2010 / Published online: 26 May 2010  
© Springer-Verlag 2010

**Abstract** The FLOTAC flotation technique has been introduced as a new diagnostic tool to detect parasitic elements from faeces. Samples from naturally infected young deer were used for counting *Dictyocaulus* larvae and strongylid eggs. The FLOTAC technique, using 11 different flotation solutions with specific gravities (sg) between 1.20 and 1.45, was compared with the Baermann technique and the saturated sodium chloride (sg 1.20)-based McMaster method. In addition, a comparison was made between the FLOTAC technique with magnesium sulphate (sg 1.28) and the Baermann technique for larval recovery from faeces that were examined on the day of collection or after 7 days storage at 4°C. On the whole egg counts between the FLOTAC using different flotation solutions and the McMaster were unremarkable. In contrast, variations of larval counts were detected between different flotation solutions as well as with the Baermann technique. Most flotation solutions with a specific gravity of 1.20 floated significantly fewer lungworm larvae ( $p < 0.05$ ) compared to flotation solutions with a higher specific gravity. Magnesium sulphate (sg 1.28) consistently

produced the highest mean larval counts in all conducted experiments. Larval counts using magnesium sulphate (sg 1.28) were higher than with the Baermann technique both on the day of collection and after 7 days. Overall, the use of magnesium sulphate (sg 1.28) with FLOTAC for larval counts resulted in higher counts than the Baermann recovery technique and was the better choice of those flotation solutions examined. Furthermore, magnesium sulphate (sg 1.28) was also reliable for strongylid egg detection with the FLOTAC apparatus.

### Introduction

Lung and gastrointestinal nematodes are the principle internal parasites of farmed red deer (*Cervus elaphus*) in New Zealand (Watson and Charleston 1985). Young animals are particularly susceptible to *Dictyocaulus eckerti* infections (Johnson et al. 2003). Different methods have been used to detect nematode eggs and lungworm larvae and to determine the faecal egg count and faecal larval count, respectively. The traditional Baermann technique is the most used method to detect the first-stage larvae of lungworms, particularly for *Dictyocaulus* spp. (Eysker 1997; Rode and Jørgensen 1989). Use of flotation methods to diagnose lungworm infestation is much less common. Nevertheless, some authors have reported using zinc sulphate (sg 1.22) (Lyons et al. 1972, 1995) or sugar solutions (sg 1.25 and 1.27) (Samuel and Trainer 1969; Williams and Broussard 1995) to float *Dictyocaulus* spp. larvae from faeces. To count strongylid eggs, a variety of flotation techniques are commonly used. These include the McMaster technique originally described by Gordon and Whitlock (1939), which has been modified

B. U. Bauer · W. E. Pomroy (✉) · J. Gueydon · S. Gannac ·  
I. Scott  
Institute of Veterinary, Animal and Biomedical Sciences,  
Massey University,  
Private Bag 11-222,  
Palmerston North, New Zealand  
e-mail: w.pomroy@massey.ac.nz

K. Pfister  
Institute of Comparative Tropical Medicine and Parasitology,  
Ludwig-Maximilians-University,  
Leopoldstr. 5,  
80802 Munich, Germany

many times for use in various laboratories since originally described (Bowman 2009; MAFF 1986; Stafford et al. 1994; Whitlock 1948). Strongylid nematode eggs will generally float in a solution with a specific gravity between 1.10 and 1.20 (Taylor et al. 2007). The most commonly used flotation media are probably saturated sodium chloride (sg 1.20) and Sheather's sugar solution (sg 1.25) (Dunn 1978; Zajac and Conboy 2006).

The FLOTAC apparatus was created to detect all parasitic elements simultaneously (Cringoli 2006). This new diagnostic tool can utilise a variety of flotation solutions with varying specific gravities to float parasitic elements to the surface. The aim of this study was to evaluate a variety of flotation media for their ability to enable counting of both gastrointestinal strongylid parasites and *Dictyocaulus* L1, then to compare this with common standard practices, which are the Baermann procedure and the McMaster faecal egg count technique. A series of four experiments were conducted to compare these classical diagnostic techniques with FLOTAC using a variety of flotation media. In the fifth experiment, a comparison was made on the reliability of the Baermann technique compared to FLOTAC for recovering larvae from both fresh faeces and faeces stored at 4°C.

#### Material and methods

##### Experiment 1 to 4

Fresh faeces from a succession of individual red deer (*C. elaphus*) were used for the following examinations. The deer were naturally infected with *D. eckerti* and gastrointestinal nematodes. In the first trial, five different flotation solutions were evaluated with the FLOTAC technique. In the subsequent three experiments, use of different flotation media and FLOTAC was compared with the traditional egg and larval counts. For each evaluation, 10 replicates were used. The flotation media compared are as described in Table 1. All were prepared with distilled water at ambient temperature. The specific gravity readings were made with a density hydrometer (Boeco, Germany; reference temperature 20°C).

##### Modified Baermann technique

For the modified Baermann technique, 4 g of faeces was enclosed in surgical gauze and suspended over a conical measuring flask (diameter: 5 cm; height: 7.5 cm; volume: 40 ml), which was filled with tap water. The samples were incubated for 20 hours at 23°C. The faeces were then removed and the liquid carefully siphoned to a remaining volume of about 2.5 ml. This volume was examined in a

counting chamber (Whitlock S.F.E.L.O., Australia; volume 2 ml) at  $\times 100$  magnification. The count was divided by four to estimate the larvae per gram.

##### Modified McMaster method

Two grams of faeces was weighed and mixed with 28 ml saturated salt (sg 1.20). The mixture was passed through a wire mesh screen (aperture 250  $\mu$ m) and the retentate discarded. After mixing, a sample of the filtrate was examined in a standard two-chambered McMaster slide (CHALEX Cooperation, USA; volume=0.3 ml) where each egg counted represented 50 eggs per gram.

##### FLOTAC technique

The FLOTAC technique was largely as described by Cringoli (2006). In the present experiments, a slightly modified procedure was used to compare 11 different flotation solutions that are detailed in Table 1. In brief, 5 g of faeces was mixed with 95 ml tap water and homogenized (dilution 1:20). The suspension was filtered through a wire mesh screen (aperture 250  $\mu$ m), and tubes (15 ml) were filled to 10 ml with the filtrate. After centrifugation at 470 g for 3 minutes, the supernatant was discarded and the tubes were refilled with the appropriate flotation solution to 6 ml. After mixing the sample by vortex, one chamber of a FLOTAC was filled with the homogenized solution (5 ml). The FLOTAC was then centrifuged at 200 g for 5 minutes before rotating the observation disc and counting parasite elements at  $\times 100$  magnification. The utilisation of 6-ml instead of the recommended 5-ml volume was necessary to ensure that chambers were completely full and to avoid small air bubbles. Therefore, each egg or larva counted represented 2.4 eggs or larvae/g. This was derived because only 5 ml of the total volume of 6 ml was examined necessitating correction by a factor of 6/5, and because only 5 g of faeces was initially used, the counts also had to be multiplied by 2 to convert the counts to eggs per gram or larvae per gram, respectively.

##### Experiment 5

In Experiment 5, the Baermann technique and FLOTAC apparatus were used to detect larvae (L1) from *D. eckerti*. Only magnesium sulphate (sg 1.28) was used as a flotation solution. The Baermann and FLOTAC procedures were the same as in the previous experiments. Faecal samples were collected on two consecutive days from the same deer. The first sample was stored in the fridge at 4°C and examined 7 days later. The second sample was examined immediately. For each evaluation, 10 replicates were used.



**Table 1** Flotation media with their chemical components and specific gravities

Flotation solution	Composition (added to 1,000ml H <sub>2</sub> O)	sg
Saturated sodium chloride	NaCl 350 g	1.20
Sucrose	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> 700 g	1.20
Zinc sulphate	ZnSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O 414 g	1.20
Sodium nitrate	NaNO <sub>3</sub> 357 g	1.20
Magnesium sulphate	MgSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O 1,100 g	1.28
Sodium nitrate+Sodium thiosulphate	NaNO <sub>3</sub> 347 g+Na <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub> • 5 H <sub>2</sub> O 417 g	1.30
Zinc sulphate	ZnSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O 900 g	1.35
Sodium chloride+Zinc chloride	NaCl 323 g+ZnCl <sub>2</sub> 359 g	1.35
Sucrose+Sodium nitrate	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> 720 g+NaNO <sub>3</sub> 480 g	1.35
Sodium nitrate+Sodium thiosulphate	NaNO <sub>3</sub> 656 g+Na <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub> • 5 H <sub>2</sub> O 1,453 g	1.45
Sucrose+Sodium nitrate+Sodium thiosulphate	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> 606 g+NaNO <sub>3</sub> 648 g+Na <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub> • 5 H <sub>2</sub> O 900 g	1.45

sg specific gravity

#### Statistics

The egg and larval counts of each experiment were analysed using analysis of variance (ANOVA) in conjunction with the Tukey test for multiple comparisons with  $\alpha = .05$ . All analyses were made using Statistix 8 (Analytical Software, Tallahassee, USA).

#### Results

The results of the egg counts are summarised in Table 2, and larval counts in Table 3. Strongylid eggs and lungworm

larvae (L1) were detectable in each sample used. However, both sucrose flotations in experiment 3 resulted in very dark faecal suspensions and were difficult to examine. In experiments 2 and 3, a higher mean egg count could be detected with the McMaster method than with the FLOTAC technique using a variety of media, but the differences were not significant ( $p > 0.05$ ). In contrast in experiment 4, the FLOTAC technique with magnesium sulphate (sg 1.28) had a higher count ( $p < 0.05$ ) than with the McMaster method or the FLOTAC with saturated sodium chloride (sg 1.20) and zinc sulphate (sg 1.20).

In contrast to the results for egg counts, the FLOTAC technique with magnesium sulphate (sg 1.28) consistently had

**Table 2** Comparison of mean faecal egg counts ( $\pm$ SD) using a modified McMaster method or FLOTAC technique with a variety of flotation media of different specific gravities

Experiment	1	2	3	4
McMaster		230.0 <sup>a</sup> $\pm$ 113.5	170.0 <sup>a</sup> $\pm$ 113.6	210.0 <sup>b</sup> $\pm$ 144.9
FLOTAC				
Saturated sodium chloride (sg 1.20)	61.8 <sup>b</sup> $\pm$ 10.8			204.2 <sup>b</sup> $\pm$ 61.8
Sucrose (sg 1.20)	103.9 <sup>a</sup> $\pm$ 36.4			
Zinc sulphate (sg 1.20)	75.6 <sup>ab</sup> $\pm$ 18.5			219.7 <sup>b</sup> $\pm$ 67.8
Sodium nitrate (sg 1.20)	94.2 <sup>a</sup> $\pm$ 24.0			
Magnesium sulphate (sg 1.28)	104.0 <sup>a</sup> $\pm$ 31.0	162.7 <sup>ab</sup> $\pm$ 36.5	106.6 <sup>a</sup> $\pm$ 37.7	330.2 <sup>a</sup> $\pm$ 45.6
Sodium nitrate+Sodium thiosulphate (sg 1.30)		141.2 <sup>ab</sup> $\pm$ 21.8		
Zinc sulphate (sg 1.35)		140.2 <sup>ab</sup> $\pm$ 25.6		
Sodium chloride+Zinc chloride (sg 1.35)		104.6 <sup>b</sup> $\pm$ 35.4		
Sucrose+Sodium nitrate (sg 1.35)			99.0 <sup>a</sup> $\pm$ 17.9*	
Sodium nitrate+Sodium thiosulphate (sg 1.45)			110.9 <sup>a</sup> $\pm$ 23.4	
Sucrose+Sodium nitrate+Sodium thiosulphate (sg 1.45)			75.0 <sup>a</sup> $\pm$ 23.8*	

For each experiment, faeces were obtained from different animals

Within columns means with different letter superscripts (a, b) are different ( $p < 0.05$ )

\*Difficult to examine/sample too dark

sg specific gravity

**Table 3** Comparison of mean larval counts ( $\pm$ SD) using a Baermann procedure or the FLOTAC technique with a variety of flotation media of different specific gravities

Experiment	1	2	3	4	5 (fresh)	5 (7days)
Baermann		1099.3 <sup>ab</sup> $\pm$ 234.1	2163.9 <sup>a</sup> $\pm$ 180.0	205.8 <sup>b</sup> $\pm$ 65.3	96.9 <sup>z</sup> $\pm$ 53.6	13.5 <sup>x</sup> $\pm$ 2.8
FLOTAC						
Saturated sodium chloride (sg 1.20)	27.8 <sup>d</sup> $\pm$ 19.7			58.7 <sup>c</sup> $\pm$ 35.0		
Sucrose (sg 1.20)	103.1 <sup>bc</sup> $\pm$ 18.4					
Zinc sulphate (sg 1.20)	124.8 <sup>b</sup> $\pm$ 25.0			341.4 <sup>a</sup> $\pm$ 81.1		
Sodium nitrate (sg 1.20)	84.5 <sup>c</sup> $\pm$ 27.3					
Magnesium sulphate (sg 1.28)	207.6 <sup>a</sup> $\pm$ 40.9	1430.4 <sup>a</sup> $\pm$ 321.8	2317.0 <sup>a</sup> $\pm$ 462.9	432.4 <sup>a</sup> $\pm$ 123.5	183.4 <sup>x</sup> $\pm$ 68.4	133.9 <sup>yz</sup> $\pm$ 32.5
Sodium nitrate+Sodium thiosulphate (sg 1.30)		1351.2 <sup>ab</sup> $\pm$ 354.6				
Zinc sulphate (sg 1.35)		1255.7 <sup>ab</sup> $\pm$ 245.7				
Sodium chloride+Zinc chloride (sg 1.35)		1050.7 <sup>b</sup> $\pm$ 258.0				
Sucrose+Sodium nitrate (sg 1.35)			2185.2 <sup>a</sup> $\pm$ 215.8*			
Sodium nitrate+Sodium thiosulphate (sg 1.45)			1956.8 <sup>a</sup> $\pm$ 645.9			
Sucrose+Sodium nitrate+Sodium thiosulphate (sg 1.45)			1763.0 <sup>a</sup> $\pm$ 603.0*			

For each experiment, faeces were obtained from different animals

Within-columns means with different letter superscripts (a, b, c, d) are different ( $p < 0.05$ ). For experiment 5, "fresh" vs. "7 days" means with different superscripts (x, y, z) are different ( $p < 0.05$ ).

\*Difficult to examine / sample too dark

higher larval counts than the other flotation solutions, although whether this was significant varied. In experiments 2 and 3, there was no significant difference ( $p > 0.05$ ) with the Baermann procedure, whereas in experiments 4 and 5, the counts were significantly higher ( $p < 0.05$ ) with the FLOTAC technique. In the last experiment, the FLOTAC technique with magnesium sulphate (sg 1.28) again recovered significantly ( $p < 0.05$ ) more LI from faeces than the Baermann procedure both on day 1 and after storage at 4°C for 7 days.

## Discussion

The results of the present study demonstrated the reliability of the FLOTAC technique for concurrent recovery of lungworm larvae (LI) and strongylid eggs. This ability is influenced by the choice of flotation solutions. Choice of flotation solution is not simply one of using as high a specific gravity as possible, rather it is using a solution that is sufficient to float the parasite elements but not unnecessary detritus. It is also helpful if the osmotic pressure is not too great as that will quickly result in eggs collapsing and potentially sinking. Overall, using the FLOTAC technique with magnesium sulphate (sg 1.28) achieved at least similar

outcomes to the McMaster method and Baermann technique, and in some experiments, the counts achieved with the FLOTAC technique were significantly higher ( $p < 0.05$ ) than the more traditional methods. The use of the FLOTAC technique also means that both parasitic elements can be detected with the one procedure and do not require the overnight incubation of the Baermann procedure.

The FLOTAC technique is a modification of a simple flotation assay where a faecal suspension in a tube has a coverslip placed over a shallow positive meniscus for a period. In the simple technique, the coverslip is then removed and placed onto a microscope slide for examination. The problem with this approach is the usual loss of some parasite elements that are not transferred. It can also be difficult to reliably centrifuge the tube with the coverslip in place. In the FLOTAC technique, the apparatus effectively cuts the top layer of flotation fluid by rotating the upper parts of the apparatus 90° before examination, thus ensuring that visualisation of parasite elements is only through a thin layer of fluid.

For counting strongylid eggs, a variety of different techniques have been described, but all generally rely on flotation in some form of counting chamber. In this study, a comparison was made with a modified McMaster method. The most commonly used flotation media with this method

would be saturated sodium chloride (sg 1.20) (Dunn 1978; MAFF 1986; Stafford et al. 1994), although a variety of others have been used (Cringoli et al. 2004). Within New Zealand, saturated sodium chloride would be used for the McMaster method in most of both diagnostic and research laboratories and was used here as a point of comparison with the FLOTAC technique for counting strongylid eggs. The various flotation media used with the FLOTAC in this study are largely those described by Cringoli et al. (2004), but those containing formalin or mercury salts were excluded as these pose issues with disposal of waste material. Interestingly, Cringoli et al. (2004) described flotation fluids containing sucrose as his most desirable media for counting eggs in a McMaster slide. Although sucrose (sg 1.20) in the FLOTAC was not directly compared to the McMaster method using saturated sodium chloride (sg 1.20) in this study, by inference across experiments, there would not appear to be great differences. Comparison of sucrose with saturated sodium chloride in the FLOTAC in experiment 1 showed that sucrose (sg 1.20) recovered more eggs, which is consistent with the observations of Cringoli et al. (2004). Using sucrose at higher specific gravity in combination with other salts in the present experiment generally resulted in too much detritus also being floated, and the resulting fluid was too dark to easily recognise eggs or larvae.

In experiments 2 and 3, the McMaster gave a higher egg count than the use of magnesium sulphate, but this difference was not significant, although in experiment 4 the reverse was true and FLOTAC with magnesium sulphate did recover significantly more eggs than the McMaster. In addition, use of saturated sodium chloride (sg 1.20) in the FLOTAC recovered fewer eggs ( $p < 0.05$ ) than magnesium sulphate in experiment 1. The high multiplication factor of 50 with the McMaster method used here is obviously higher than the factor of 2.4 with the FLOTAC apparatus; therefore, a small difference in counting eggs will result in greater differences of the outcomes. This is a possible reason for the similar egg counts seen in experiments 2 and 3. No significant differences were observed by comparing McMaster with the FLOTAC using magnesium sulphate (sg 1.28), sucrose+sodium nitrate (sg 1.35), sodium nitrate+sodium thiosulphate (sg 1.45), as well as sucrose+sodium nitrate+sodium thiosulphate (sg 1.45), although those solutions with a higher specific gravity did also float more detritus. Furthermore, with the lower multiplication factor, the FLOTAC technique will be the more accurate detection method.

The FLOTAC technique using flotation media with a specific gravity higher than 1.20 was generally more successful in recovering lungworm larvae than the Baermann procedure. Overall, use of FLOTAC with the flotation solution of magnesium sulphate (sg 1.28) gener-

ally had the highest larval counts in most comparisons. Several flotation solutions with the same specific gravity produced significantly ( $p < 0.05$ ) different counts of larvae per gram. This verifies the findings of Cringoli et al. (2004) that not only does the specific gravity play a role in the choice of flotation media, but also the type of solution can impair the number of detected parasitic elements. The sugar solution (sg 1.20) in experiment 1 was only able to recover approximately half the larvae recovered using magnesium sulphate (sg 1.28). A similar result was reported by Samuel and Trainer (1969), who detected only small numbers of larvae with sugar solution (sg 1.27). In experiment 3, sugar solutions with a density of 1.35 or higher resulted in high larval counts. However, these solutions also floated lots of debris and made the sample very difficult to count accurately.

Lyons et al. (1972, 1995) preferred the flotation procedure using zinc sulphate (sg 1.22) in both of their studies. They could detect more lungworm larvae with the flotation method than with the Baermann technique. Furthermore, it was even possible to recover unhatched lungworm eggs from faecal samples. In the current study, FLOTAC with zinc sulphate (sg 1.20) was also more sensitive than the Baermann technique, and although it recovered fewer larvae than with magnesium sulphate (sg 1.28), this difference was not significant.

In experiment 5, there was no significant difference between larval counts from fresh faeces and faeces stored for 7 days when using the FLOTAC technique with magnesium sulphate (sg 1.28). In contrast to the Baermann procedure, detection with the FLOTAC technique does not rely on the motility of the larvae. Reduced larval motility is presumably responsible for the low counts with the Baermann technique with stored faeces. It has been observed that the larvae of *Dictyocaulus* spp. are generally detrimentally affected by storage at cool temperatures, and this affects the detection rate (Eysker 1997; Rode and Jørgensen 1989). The results obtained here suggest that use of the FLOTAC with magnesium sulphate (sg 1.28) is still effective for faeces stored for 7 days at 4°C, and even when examined without storage, it is more successful than the Baermann procedure. Use of the FLOTAC technique will remove the requirement to ensure very fresh faeces are available for the Baermann procedure, something that can be difficult to achieve when samples are submitted from the field. These results are consistent with those for recovering *Aelurostrongylus abstrusus* L1 from cat faeces when the FLOTAC technique was compared to the Baermann procedure (Gaglio et al. 2008).

Overall, the FLOTAC apparatus is a reliable tool to detect parasitic elements. Use of the FLOTAC technique with magnesium sulphate (sg 1.28) as the flotation solution produced at least the same egg count as the McMaster

method and generally had a higher sensitivity for detecting *D. eckerti* L1 counts than the traditional Baermann technique. For common deer parasites, the FLOTAC is a useful tool for examining faecal samples, especially those submitted from the field. For other species, further investigations may be needed to determine the appropriate flotation solution depending on the parasites involved.

**Acknowledgement** The authors are grateful to Giuseppe Cringoli (University of Naples, Italy), who provided the FLOTAC apparatuses.

**Ethical standards** Use of animals was approved by the Massey University Animal Ethics Committee.

**Conflict of interest** This research was supported financially by the McGeorge Research Fund, Massey University.

## References

- Bowman DD (2009) *Georgis' parasitology for veterinarians*, 9th edn. Saunders, St. Louis
- Cringoli G (2006) FLOTAC, a novel apparatus for a multivalent faecal egg count technique. *Parassitologia* 48:381–384
- Cringoli G, Rinaldi L, Veneziano V, Capelli G, Scala A (2004) The influence of flotation solution, sample dilution and the choice of McMaster slide area (volume) on the reliability of the McMaster technique in estimating the faecal egg counts of gastrointestinal strongyles and *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Vet Parasitol* 123:121–131
- Dunn AM (1978) *Veterinary helminthology*, 2nd edn. William Heinemann Medical Books Ltd, London
- Eysker M (1997) The sensitivity of the Baermann method for the diagnosis of primary *Dictyoacaulus viviparus* infections in calves. *Vet Parasitol* 69:89–93
- Gaglio G, Cringoli G, Rinaldi L, Brianti E, Giannetto S (2008) Use of the FLOTAC technique for the diagnosis of *Aelurostrongylus abstrusus* in the cat. *Parasitol Res* 103:1055–1057
- Gordon HM, Whitlock HV (1939) A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J Counc Sci Ind Res* 12:50–52
- Johnson M, Mackintosh CG, Labes RE, Taylor MJ, Wharton DA (2003) *Dictyoacaulus* species: cross infection between cattle and red deer. *N Z Vet J* 51:93–98
- Lyons ET, Drudge JH, Labore DE, Tolliver SC (1972) Field and controlled test evaluations of levamisole against natural infections of gastrointestinal nematodes and lungworms in calves. *Am J Vet Res* 33:65–71
- Lyons ET, Patterson DJ, Johns JT, Giles RC, Tolliver SC, Collins SS, Stamper S (1995) Survey for internal parasites in cattle in Kentucky (1993). *Vet Parasitol* 58:163–168
- MAFF (1986) *Manual of veterinary parasitological laboratory techniques*. HMSO Publications Centre, London
- Rode B, Jørgensen RJ (1989) Baermannization of *Dictyoacaulus* spp. from faeces of cattle, sheep and donkeys. *Vet Parasitol* 30:205–211
- Samuel WM, Trainer DO (1969) A technique for survey of some helminth and protozoan infections of white-tailed deer. *J Wildl Manag* 33:888–894
- Stafford KJ, West DM, Pomroy WE (1994) Nematode worm egg output by ewes. *N Z Vet J* 42:30–32
- Taylor MA, Coop RL, Wall RL (2007) *Veterinary parasitology*, 3rd edn. Blackwell, Oxford
- Watson PG, Charleston WAG (1985) The significance of parasites in farmed deer. In: Fennessy PF, Drew KR (eds) *Biology of Deer Production*, Bulletin 22. Royal Society of New Zealand, Wellington, pp 105–117
- Whitlock HV (1948) Some modifications of the McMaster helminth egg-counting technique and apparatus. *J Counc Sci Ind Res* 21:177–180
- Williams JC, Broussard SD (1995) Comparative efficacy of levamisole, thiabendazole and fenbendazole against cattle gastrointestinal nematodes. *Vet Parasitol* 58:83–90
- Zajac AM, Conboy GA (2006) *Veterinary clinical parasitology*, 7th edn. Blackwell, Ames

## V. DISKUSSION

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie demonstrieren die Zuverlässigkeit der neuen FLOTAC-Technik für den gleichzeitigen Nachweis von Lungenwurmlarven (L1) und Trichostrongylideneiern. Diese Fähigkeit wird durch die Wahl der Flotationslösung beeinflusst. Bei der Wahl der Flotationslösung geht es nicht darum ein Medium mit möglichst hohem spezifischem Gewicht zu verwenden, sondern eine Lösung zu verwenden welche zuverlässig Parasitenbestandteile flotiert aber nicht unnötigen Schmutz. Es ist außerdem von Vorteil, wenn der osmotische Druck nicht zu groß ist, da sonst schnell Eier kollabieren und möglicherweise zu Boden sinken. Im Großen und Ganzen, können bei Verwendung der FLOTAC-Technik mit Magnesiumsulfat (SG 1,28) mindestens die gleichen Resultate erzielt werden, wie mit der McMaster-Methode und dem Baermann-Auswanderungsverfahren. In einzelnen Versuchen waren die Resultate mit FLOTAC signifikant höher ( $p < 0,05$ ) als mit den traditionellen Methoden. Die Verwendung der FLOTAC-Technik bedeutet auch, dass beide parasitären Bestandteile gleichzeitig mit einem Verfahren nachgewiesen werden können und eine lange Inkubationszeit von 30 bis 36 Stunden wie beim Baermann-Verfahren nicht notwendig ist. Somit sind Ergebnisse mit FLOTAC in kürzerer Zeit verfügbar als mit der Baermann-Technik (Gaglio et al., 2008). Jedoch muss berücksichtigt werden, dass die Verarbeitung von Proben mit FLOTAC mit einem gewissen Arbeits- und Kostenaufwand verbunden ist. Speich et al. (2010) benötigten 28 Minuten und 14 Sekunden für die Verarbeitung und Auswertung einer Probe mit dem FLOTAC-Apparat. Gerade der anfängliche Umgang mit dem FLOTAC-Apparat verlangt eine gewisse Übung und deswegen muss sogar mit einer längeren Arbeitszeit gerechnet werden. Zusätzlich ist eine entsprechende Laborausstattung, wie eine passende Zentrifuge und unterschiedliche Flotationslösungen, für das FLOTAC-Verfahren notwendig (Cringoli et al., 2010; Knopp et al., 2009a). Dies kann besonders in Ländern mit mangelnder Infrastruktur nicht immer gewährleistet werden (Cringoli et al., 2010). Aufgrund der Verwendung von einfachen Utensilien (Trichter mit Gummischlauch und Klemme, Gaze, Wasser, Objektträger) beim Baermann-Verfahren und der sehr simplen Durchführung, ist der Arbeits- und Kostenaufwand beim Baermann-Auswanderungsverfahren niedriger als bei der

### FLOTAC-Technik.

Rothirsche und Schafe infizieren sich zum Großteil mit ähnlichen Helminthen (Swanson et al., 2007). Interessanterweise wird Magnesiumsulfat (SG 1,28) weder zum Nachweis von Lungenwürmern noch von Magen-Darm-Strongylyden von Hauswiederkäuern empfohlen (Cringoli et al., 2010). Rinaldi et al. (2010) konnten mit Magnesiumsulfat (SG 1,28) nur sehr mäßig ovine Lungenwürmer nachweisen. Da eine Unterscheidung zwischen *Dictyocaulus filaria* und Protostrongylyden nicht durchgeführt wurde, lässt sich über den Einfluss der kleinen Lungenwürmer auf den niedrigen LpG-Wert mit Magnesiumsulfat nur spekulieren. Aufgrund unterschiedlicher Radien von Zentrifugenrotoren ist es ratsam, nicht die Zentrifugationsgeschwindigkeit (r.p.m.) anzugeben sondern den Rotoren unabhängigen Wert g (Mittlere Erdbeschleunigung) zu verwenden. Damit kann eine einheitliche Zentrifugation der Proben garantiert und mögliche Fehlerquellen minimiert werden (Vadlejch et al., 2011). Rinaldi et al. (2010) sowie Cringoli et al. (2010) zentrifugieren die Zentrifugenröhrchen mit 170 g und den FLOTAC-Apparat mit 120 g. Die vorliegende Studie basiert auf der Grundlage der Erstveröffentlichung von Cringoli (2006). Die dort empfohlenen Zentrifugationsgeschwindigkeiten sind in r.p.m. angegeben und wurden für diese Studie in g umgerechnet unter Berücksichtigung der verwendeten Zentrifuge (IEC Centra 8 Benchtop Centrifuge, Thermo Scientific, USA). Somit ergaben sich Werte für g von 470 bzw. 200. Die Zentrifugation von Proben nimmt einen maßgeblichen Einfluss auf das spätere Ergebnis. So konnten höhere EpG-Werte erreicht werden, wenn bei der McMaster-Methode noch eine Zentrifugation als zusätzlicher Arbeitsschritt verwendet wurde (Pereckiene et al., 2007; Vadlejch et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit wurden höhere Werte für g verwendet als von Cringoli et al. (2010) beschrieben. Dieser Unterschied könnte einen Einfluss auf die EpG- bzw. LpG-Werte haben und letztendlich auch für die fehlende Empfehlung von Magnesiumsulfat (SG 1,28) verantwortlich sein.

Weiterhin konnten Rinaldi et al. (2010) mit Zinksulfat (SG 1,35) zuverlässig Lungenwurmlarven nachweisen, jedoch erzeugte dieselbe Flotationslösung nur niedrige EpG-Werte (Rinaldi et al., 2011). Somit ist die Verwendung einer Flotationslösung für den gleichzeitigen Nachweis, wie es beim Rothirsch möglich ist, für ovine Nematoden nicht empfehlenswert. Darüber hinaus muss schon vor der Untersuchung der Kotproben klar sein, welche Parasitenspezies nachgewiesen

werden soll um die optimalste Flotationslösung zu verwenden. Dies bedeutet für Hauswiederkäuer genau genommen die Verwendung von zwei unterschiedlichen Flotationslösungen für den Nachweis von Trematoden. So empfehlen Cringoli et al. (2010) Zinksulfat (SG 1,35) für den Nachweis von *F. hepatica* und Kaliumtetraiodomercurat (SG 1,44) für den Nachweis von *D. dentriticum*.

Die FLOTAC-Technik ist eine Modifikation des direkten Flotationsverfahrens bei der ein Reagenzglas mit fäkaler Lösung bis zu einer konvexen Oberfläche befüllt und für eine bestimmte Zeitspanne mit einem Deckglas abgedeckt wird. Anschließend wird das Deckglas auf einen Objektträger übertragen und unter einem Mikroskop ausgewertet. Das Problem bei der konventionellen Flotation besteht darin, dass für gewöhnlich nicht alle parasitären Bestandteile übertragen werden. Außerdem lässt sich ein Reagenzglas mit Deckglas schwierig zentrifugieren. Bei der FLOTAC-Technik wird die oberste Schicht der Flotationslösung erfolgreich abgetrennt, indem der obere Teil des FLOTAC-Apparates vor Untersuchung um 90° Grad gedreht wird. Dies macht es möglich, parasitäre Bestandteile nur durch eine dünne Flüssigkeitsschicht zu untersuchen.

Für den Nachweis von Trichostrongylideneiern wurden eine Reihe von verschiedenen Methoden beschrieben. Alle basieren im Großen und Ganzen auf der Flotation in einer Zählkammer. In der vorliegenden Studie wurde ein Vergleich mit der modifizierten McMaster-Methode gemacht. Als häufigstes wird gesättigte Kochsalzlösung (SG 1,20) als Flotationsmedium für diese Methode verwendet (Dunn, 1978; MAFF, 1986; Pereckiene et al., 2007; Stafford et al., 1994). Jedoch können auch andere Flotationslösungen dafür verwendet werden (Cringoli et al., 2004). In Neuseeland wird die gesättigte Kochsalzlösung für die McMaster-Methode sowohl in Diagnostik- sowie Forschungslabors verwendet und deshalb wurde diese Flotationslösung für den Vergleich mit FLOTAC für den Nachweis von Trichostrongyliden eingesetzt. Die verschiedenen Flotationslösungen für das FLOTAC-Verfahren wurden bereits von Cringoli et al. (2004) hinreichend beschrieben. Allerdings wurden Flotationslösungen, die Formalin oder Quecksilber beinhalten, aus entsorgungstechnischen Gründen nicht verwendet. Cringoli et al. (2004) bevorzugten Flotationslösungen mit Sucrose für den Nachweis von Eiern mit der McMaster-Methode. Obwohl Sucrose (SG 1,20) mit FLOTAC nicht direkt mit McMaster (gesättigte Kochsalzlösung, SG 1,20) in dieser Studie verglichen wurde, scheint es keine großen Unterschiede zwischen

beiden zu geben. Im direkten Vergleich von Sucrose und gesättigter Kochsalzlösung mit dem FLOTAC-Apparat konnten im Experiment 1 mit Sucrose (SG 1,20) mehr Eier nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Beobachtungen von Cringoli et al. (2004). Die Verwendung von Sucrose mit höherer spezifischer Dichte in Kombination mit anderen Salzen führte in der vorliegenden Studie dazu, dass zu viel Schmutz flotiert wurde und deshalb die Flüssigkeit zu dunkel war um Eier und Larven einfach zu erkennen.

In Experiment 2 und 3 ergab die McMaster-Methode höhere Eizahlen als FLOTAC unter Verwendung von Magnesiumsulfat (SG 1,28). Jedoch waren diese Unterschiede nicht signifikant. Im Experiment 4 zeigte sich genau das Gegenteil. FLOTAC mit Magnesiumsulfat konnte signifikant ( $p < 0,05$ ) mehr Eier ermitteln als McMaster. Weiterhin konnte in Experiment 1 mit der gesättigten Kochsalzlösung (SG 1,20) und FLOTAC weniger Eier ( $p < 0,05$ ) nachgewiesen werden als mit Magnesiumsulfat. Der verwendete Multiplikationsfaktor von 50 bei der McMaster-Methode ist offensichtlich größer als der verwendete Faktor 2,4 mit dem FLOTAC-Apparat. Logischerweise ergibt ein kleiner Unterschied bei der Zählung der Eier einen großen Unterschied bei den Ergebnissen. Dies ist möglicherweise auch die Ursache für die ähnlichen Resultate der Eizahlen in Experiment 2 und 3. Keine signifikanten Unterschiede wurden beim Vergleich von McMaster und FLOTAC mit Magnesiumsulfat (SG 1,28), Sucrose plus Natriumnitrat (SG 1,35), Natriumnitrat plus Natriumschwefelsulfat (SG 1,45) sowie Sucrose plus Natriumnitrat plus Natriumschwefelsulfat (SG 1,45) festgestellt. Jedoch flotierten diejenigen Flotationslösungen mit höherem spezifischem Gewicht auch mehr Schmutz. Zusätzlich ist das FLOTAC-Verfahren aufgrund seines kleinen Multiplikationsfaktor auch die genauere Nachweismethode.

Die FLOTAC-Technik unter Verwendung von Flotationslösungen mit spezifischem Gewicht von höher als 1,20 waren im Allgemeinen erfolgreicher im Nachweis von Lungenwurmlarven als das Baermann-Verfahren. Letztendlich hat FLOTAC mit Magnesiumsulfat (SG 1,28) die höchste Anzahl an Larven nachgewiesen, verglichen zu den anderen verwendeten Flotationslösungen. Einige Flotationslösungen mit dem gleichen spezifischen Gewicht ergaben signifikant ( $p < 0,05$ ) unterschiedliche Ergebnisse an Larven pro Gramm Kot. Dies stimmt mit der Feststellung von Cringoli et al. (2004) überein, dass nicht nur das spezifische



Gewicht sondern auch die Art bei der Wahl der Flotationslösung eine Rolle spielt und damit auch für die Zuverlässigkeit beim Nachweis von Parasiten. Die Zuckerlösung (SG 1,20) in Experiment 1 konnte ca. nur die Hälfte der Larven nachweisen im Vergleich zu Magnesiumsulfat (SG 1,28). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Samuel und Trainer (1969). Diese konnten mit einer Zuckerlösung (SG 1,27) auch nur eine kleine Anzahl von Larven diagnostizieren. In Experiment 3 war es möglich mit Zuckerlösungen mit einem spezifischem Gewicht von 1,35 oder höher eine große Anzahl von Larven zu flotieren. Jedoch flotierten diese Lösungen auch viel Schmutz, was einen maßgeblichen Einfluss auf die Zählgenauigkeit hatte.

Lyons et al. (1995, 1972) bevorzugten in beiden Studien das Flotationsverfahren mit Zinksulfat (SG 1,22). Sie konnten damit mehr Lungenwurmlarven nachweisen als mit dem Baermann-Verfahren. Außerdem gelang es ihnen sogar ungeschlüpfte Lungenwurmeier aus der Kotprobe zu entdecken. In der vorliegenden Studie war FLOTAC mit Zinksulfat (SG 1,20) sensitiver als die Baermann-Technik. Zinksulfat (SG 1,20) wies weniger Lungenwurmlarven nach als Magnesiumsulfat (SG 1,28). Der Unterschied war jedoch nicht signifikant.

In Experiment 5 gab es keinen signifikanten Unterschied von FLOTAC mit Magnesiumsulfat (SG 1,28) zwischen der Larvenanzahl aus einer frischen Kotprobe und der aus einer sieben Tage bei 4 °C gelagerten Kotprobe. Im Gegensatz zum Baermann-Verfahren ist die FLOTAC-Technik von der Motilität der Larven unabhängig. Es wird vermutet, dass die reduzierte Larvenmotilität verantwortlich ist für den niedrigen Larvennachweis beim Baermann-Verfahren mit gelagerten Proben. Larven von *Dictyocaulus* spp. werden durch niedrige Lagertemperaturen negativ beeinflusst und somit wird die Nachweisrate reduziert (Eysker, 1997; Rode and Jørgensen, 1989). Die Ergebnisse in der vorliegenden Studie zeigen, dass FLOTAC mit Magnesiumsulfat (SG 1,28) immer noch zuverlässig Lungenwurmlarven nachweist, unabhängig davon ob diese frisch oder für sieben Tage bei 4 °C gelagert wurden. Für das Baermann-Auswanderungsverfahren sind frische Kotproben unbedingt notwendig. FLOTAC kann unabhängig davon zuverlässig Lungenwurmlarven nachweisen. Dies ist vor allem von Vorteil, wenn Proben aus dem Feld eingereicht werden. Zum selben Ergebnis kamen auch Gaglio et al. (2008) als sie FLOTAC und Baermann miteinander verglichen um *A. abstrusus* (L1) aus Katzenkotproben nachzuweisen.

Diese Studie hat auch gezeigt, dass eine Kühlung von 4 °C für die Konservierung ausreichend ist und somit auf den Einsatz von gesundheitsschädlichem Formalin, wie es von Rinaldi et al. (2010) eingesetzt wird, verzichtet werden kann.

Mit FECPAK wird eine modifizierte McMaster-Methode kommerziell angeboten, damit Kotproben an Ort und Stelle selbst untersucht werden können (Mackintosh und Tolentino, 2009). Im Gegensatz zur McMaster-Methode wird für die FLOTAC-Technik ein gut ausgestattetes Labor mit Zentrifuge benötigt. Zusätzlich zum technischen Aufwand ist der Zeitaufwand mit FLOTAC höher als mit der McMaster-Methode. Levecke et al. (2009) führten einen direkten Vergleich zwischen beiden Untersuchungsmethoden durch. Dafür wurde die Zeit für die Aufarbeitung und Untersuchung für acht Kotproben gemessen. Für die McMaster-Methode wurden durchschnittlich 4 Minuten pro Probe und für die FLOTAC-Technik beinahe 10 Minuten je Probe benötigt. Somit ist das FLOTAC-Verfahren mit einem höherem Zeit- und Kostenaufwand als die McMaster-Methode verbunden (Levecke et al., 2009).

Insgesamt ist der FLOTAC-Apparat ein zuverlässiges Diagnostikinstrument zum Nachweis von parasitären Bestandteilen aus Fäzes. Die Verwendung von FLOTAC mit Magnesiumsulfat (SG 1,28) ergab mindestens die gleiche Eizahl wie die McMaster-Methode und konnte im Allgemeinen mehr *D. eckerti* (L1) nachweisen als die traditionelle Baermann-Technik. Für übliche Hirschparasiten ist FLOTAC ein nützliches Diagnostikinstrument zur Kotuntersuchung besonders für Proben aus dem Feld. Mit FLOTAC und Magnesiumsulfat (SG 1,28) ist es gelungen *D. eckerti* (L1) und Trichostrongylideneier gleichzeitig zuverlässig nachzuweisen. Für weitere Spezies sind zusätzliche Untersuchungen notwendig, um eine geeignete Flotationslösung für die beteiligten Parasiten zu finden. Ausführliche Erfahrungsberichte über den Nachweis von Protozoen mit FLOTAC fehlen noch.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die kommerzielle Rothirschhaltung in Neuseeland ist die größte weltweit. *Dictyocaulus eckerti* und Magen-Darm-Strongylyden sind die parasitären Hauptursachen für Verluste bei Jungtieren und Absetzern. Das FLOTAC-Verfahren wurde als neues Diagnostikinstrument zum Nachweis von Parasiten im Kot entwickelt. Kotproben von jungen Rothirschen wurden verwendet um die Anzahl von *Dictyocaulus*-Larven und Trichostrongylideneiern zu bestimmen. Für FLOTAC wurden 11 verschiedene Flotationslösungen mit einem spezifischem Gewicht (SG) zwischen 1,20 und 1,45 verwendet und mit dem Baermann-Auswanderungsverfahren sowie der McMaster-Methode (gesättigte Kochsalzlösung, SG 1,20) verglichen. Zusätzlich wurden *Dictyocaulus*-Larven aus frischem sowie aus 7 Tage bei 4°C gelagertem Kot mittels FLOTAC (Magnesiumsulfat, SG 1,28) und Baermann-Apparat ermittelt. Die Anzahl an Wurmeiern in einem Gramm Kot mit verschiedenen Flotationslösungen bei FLOTAC und der McMaster-Methode unterschieden sich kaum. Die Zahlen nachgewiesener Lungenwurmlarven mit verschiedenen Flotationslösungen bei FLOTAC sowie dem Baermann-Verfahren wichen jedoch voneinander ab. Die meisten Flotationslösungen mit einem spezifischen Gewicht von 1,20 flotierten weniger Lungenwurmlarven ( $p < 0.05$ ) als Lösungen mit höherem spezifischem Gewicht. Magnesiumsulfat (SG 1,28) ergab konstant hohe Durchschnittswerte an *Dictyocaulus*-Larven. Der Nachweis von Lungenwurmlarven mittels Magnesiumsulfat (SG 1,28) war sensitiver als das Baermann-Verfahren bei frischer sowie gelagerter Fäzes. Insgesamt lieferte FLOTAC mit Magnesiumsulfat (SG 1,28) höhere Larvenzahlen als das Baermann-Verfahren und war eine ebenso zuverlässige Methode zum Nachweis von Trichostrongylideneiern wie die McMaster-Methode.

## VII. SUMMARY

New Zealand's deer industry is the biggest worldwide. *Dictyocaulus eckerti* and gastrointestinal nematodes are the main parasitic cause for losses of calves and weaners. The FLOTAC flotation technique has been introduced as a new diagnostic tool to detect parasitic elements from faeces. Samples from naturally infected young deer were used for counting *Dictyocaulus* larvae and strongylid eggs. The FLOTAC technique, using eleven different flotation solutions with specific gravities (sg) between 1.20 and 1.45, was compared with the Baermann technique and the saturated sodium chloride (sg 1.20) based McMaster method. In addition, a comparison was made between the FLOTAC technique with magnesium sulphate (sg 1.28) and the Baermann technique for larval recovery from faeces that were examined on the day of collection or after 7 days storage at 4 °C. On the whole egg counts between the FLOTAC using different flotation solutions and the McMaster were unremarkable. In contrast, variations of larval counts were detected between different flotation solutions as well as with the Baermann technique. Most flotation solutions with a specific gravity of 1.20 floated significantly fewer lungworm larvae ( $p < 0.05$ ) compared to flotation solutions with a higher specific gravity. Magnesium sulphate (sg 1.28) consistently produced the highest mean larval counts in all conducted experiments. Larval counts using magnesium sulphate (sg 1.28) were higher than with the Baermann technique both on the day of collection and after 7 days. Overall, the use of magnesium sulphate (sg 1.28) with FLOTAC for larval counts resulted in higher counts than the Baermann recovery technique and was the better choice of those flotation solutions examined. Furthermore, magnesium sulphate (sg 1.28) was also reliable for strongylid egg detection with the FLOTAC apparatus.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Anonymous, 1979, Parasites of red deer. *Surveillance* 6, 3.

Anonymous, 2011a, Annual export returns. *Deer Industry News* 51, 4.

Anonymous, 2011b, Deer Disease Info. Merial Ancare  
[http://nz.merial.com/disease\\_information/deer/index.asp](http://nz.merial.com/disease_information/deer/index.asp), abgerufen am  
30.12.2011.

Audigé, L.J.M., Wilson, P.R., Morris, R.S., 1998, A survey of internal parasites and parasite control on North Island deer farms. *New Zeal Vet J* 46, 203-215.

Bauer, C., 2006, Untersuchungsmethoden, In: Schnieder, T. (Ed.)  
*Veterinärmedizinische Parasitologie*, 6. Auflage. Parey, Stuttgart, pp. 84-104.

Bienioschek, S., Rehbein, S., Ribbeck, R., 1996, Cross-infections between fallow deer and domestic ruminants with large lungworms (*Dictyocaulus* spp.). *Appl Parasitol* 37, 229-238.

Bowman, D.D., Lynn, R.C., Eberhard, M.L., Alcaraz, A., 2003, *Georgis' Parasitology for Veterinarians*, 8. Auflage. Saunders, St. Louis, 287 p.

Castillo-Alcala, F., Wilson, P.R., Pomroy, W.E., Hoskin, S.O., 2007, A survey of anthelmintic use and internal parasite control in farmed deer in New Zealand. *New Zeal Vet J* 55, 87-93.

Charleston, W.A., 1980, Lungworm and lice of the red deer (*Cervus elaphus*) and the fallow deer (*Dama dama*) - a review. *New Zeal Vet J* 28, 150-152.

Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H., Geerts, S., Klei, T.R., Taylor, M.A., Waller, P.J., 1992, World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 44, 35-44.

Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., von Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., Taylor, M.A., Vercruyse, J., 2006, The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 136, 167-185.

Corrigall, W., Coutts, A.G., Watt, C.F., Hunter, A.R., Munro, R., 1988, Comparison by experimental infections in cattle of a *Dictyocaulus* species occurring naturally in red deer and a dictyocaulus of bovine origin. *Vet Rec* 122, 302-304.

Cox, D.D., Todd, A.C., 1962, Survey of gastrointestinal parasitism in Wisconsin dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 141, 706-709.

Cringoli, G., Rinaldi, L., Veneziano, V., Capelli, G., Scala, A., 2004, The influence of flotation solution, sample dilution and the choice of McMaster slide area (volume) on the reliability of the McMaster technique in estimating the faecal egg counts of gastrointestinal strongyles and *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Vet Parasitol* 123, 121-131.

Cringoli, G., 2006, FLOTAC, a novel apparatus for a multivalent faecal egg count technique. *Parassitologia* 48, 381-384.

Cringoli, G., Rinaldi, L., Maurelli, M.P., Utzinger, J., 2010, FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. *Nat Protoc* 5, 503-515.

Cringoli, G., Rinaldi, L., Maurelli, M.P., Morgoglione, M.E., Musella, V., Utzinger, J., 2011, *Ancylostoma caninum*: Calibration and comparison of diagnostic accuracy of flotation in tube, McMaster and FLOTAC in faecal samples of dogs. *Exp Parasitol* 128, 32-37.

Dolman, P.M., Wäber, K., 2008, Ecosystem and competition impacts of introduced deer. *Wildlife Res* 35, 202-214.

Dunn, A., Keymer, A., 1986, Factors affecting the reliability of the McMaster technique. *J Helminthol* 60, 260-262.

Dunn, M.D., 1978, *Veterinary Helminthology*. William Heinemann Medical Books Ltd, London, 295 p.

Duthaler, U., Rinaldi, L., Maurelli, M.P., Vargas, M., Utzinger, J., Cringoli, G., Keiser, J., 2010, *Fasciola hepatica*: Comparison of the sedimentation and FLOTAC techniques for the detection and quantification of faecal egg counts in rats. *Exp Parasitol* 126, 161-166.

Epe, C., Bienioschek, S., Rehbein, S., Schnieder, T., 1995, Comparative RAPD-PCR Analysis of Lungworms (*Dictyocaulidae*) from Fallow Deer, Cattle, Sheep, and Horses. *J Vet Med B* 42, 187-191.

Epe, C., von Samson-Himmelstjerna, G., Schnieder, T., 1997, Differences in a ribosomal DNA sequence of lungworm species (*Nematoda: Dictyocaulidae*) from fallow deer, cattle, sheep and donkeys. *Res Vet Sci* 62, 17-21.

Eysker, M., 1997, The sensitivity of the Baermann method for the diagnosis of primary *Dictyocaulus viviparus* infections in calves. *Vet Parasitol* 69, 89-93.

Fennessy, P.F., Drew, K.R., Mackintosh, C.G., Pearse, A.J., 1991, Prospects and issues in deer farming in New Zealand. *Proceedings of the Deer Branch of the New Zealand Veterinary Association* 8, 8-13.

Fiedor, C., Strube, C., Forbes, A., Buschbaum, S., Klewer, A.M., von Samson-Himmelstjerna, G., Schnieder, T., 2009, Evaluation of a milk ELISA for the serodiagnosis of *Dictyocaulus viviparus* in dairy cows. *Vet Parasitol* 166, 255-261.

Forsyth, D.M., Wilmshurst, J.M., Allen, R.B., Coomes, D.A., 2010, Impacts of introduced deer and extinct moa on New Zealand ecosystems. *New Zeal J Ecol* 34, 48-65.

Gaglio, G., Cringoli, G., Rinaldi, L., Brianti, E., Giannetto, S., 2008, Use of the FLOTAC technique for the diagnosis of *Aelurostrongylus abstrusus* in the cat. *Parasitol Res* 103, 1055-1057.

Gibbons, L.M., Khalil, L.F., 1988, A revision of the genus *Dictyocaulus* Railliet & Henry, 1907 (Nematoda: Trichostrongyloidea) with the description of *D. africanus* n.sp. from African artiodactylids. *J Afr Zool* 102, 151-175.

Gordon, H.M., Whitlock, H.V., 1939, A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J Counc Sci Ind Res* 12, 50-52.

Hoskin, S.O., Barry, T.N., Wilson, P.R., Charleston, W.A.G., 1997, A model for study of internal parasites of red deer and effects of forages containing condensed tannins. *Proceedings of the Deer Branch of the New Zealand Veterinary Association* 14, 155-168.

Hoskin, S.O., Wilson, P.R., Charleston, W.A.G., Barry, T.N., 2000, A model for study of lungworm (*Dictyocaulus* sp.) and gastrointestinal nematode infection in young red deer (*Cervus elaphus*). *Vet Parasitol* 88, 199-217.

Hoskin, S.O., Pomroy, W.E., Wilson, P.R., Ondris, M., Mason, P., 2005, The efficacy of oral ivermectin, pour-on ivermectin and pour-on moxidectin against naturally acquired infections of lungworm and gastrointestinal parasites in young farmed deer. *Proceedings of the Deer Branch of the New Zealand Veterinary Association* 22, 21-25.



Hoskin, S.O., Johnson, M., Swanson, J., 2007, Internal parasites and productivity in farmed deer. *P New Zeal Soc An* 67, 102-106.

Jeandron, A., Abdylidaeva, G., Usubalieva, J., Ensink, J.H.J., Cox, J., Matthys, B., Rinaldi, L., Cringoli, G., Utzinger, J., 2010, Accuracy of the kato-katz, adhesive tape and FLOTAC techniques for helminth diagnosis among children in Kyrgyzstan. *Acta Trop* 116, 185-192.

Johnson, M., Labes, R.E., Taylor, M.J., Mackintosh, C.G., 2001a, Lungworm in red deer (*Cervus elaphus*) in New Zealand - *Dictyocaulus viviparus* or *D. eckerti*? *Proceedings of the Deer Branch of the New Zealand Veterinary Association* 18, 153-159.

Johnson, M., Mackintosh, C.G., Labes, R.E., Taylor, M.J., 2001b, *Dictyocaulus eckerti*, lungworm infecting farmed red deer in New Zealand. *New Zeal Vet J* 49, 34-35.

Johnson, M., Mackintosh, C.G., 2003, Vaccination for lungworm in red deer. *Proceedings of the Deer Branch of the New Zealand Veterinary Association* 20, 117-124.

Johnson, M., Labes, R.E., Taylor, M.J., Mackintosh, C.G., 2003a, Efficacy trial of an irradiated cattle lungworm vaccine in red deer (*Cervus elaphus*). *Vet Parasitol* 117, 131-137.

Johnson, M., Mackintosh, C.G., Labes, R.E., Taylor, M.J., Wharton, D.A., 2003b, *Dictyocaulus* species: cross infection between cattle and red deer. *New Zeal Vet J* 51, 93-98.

Keiser, J., Rinaldi, L., Veneziano, V., Mezzino, L., Tanner, M., Utzinger, J., Cringoli, G., 2008, Efficacy and safety of artemether against a natural *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Parasitol Res* 103, 517-522.

Keiser, J., Veneziano, V., Rinaldi, L., Mezzino, L., Duthaler, U., Cringoli, G., 2010, Anthelmintic activity of artesunate against *Fasciola hepatica* in naturally infected sheep. Res Vet Sci 88, 107-110.

Knopp, S., Glinz, D., Rinaldi, L., Mohammed, K.A., N'Goran, E.K., Stothard, J.R., Marti, H., Cringoli, G., Rollinson, D., Utzinger, J., 2009a, FLOTAC: a promising technique for detecting helminth eggs in human faeces. Trans R Soc Trop Med Hyg 103, 1190-1194.

Knopp, S., Rinaldi, L., Khamis, I.S., Stothard, J.R., Rollinson, D., Maurelli, M.P., Steinmann, P., Marti, H., Cringoli, G., Utzinger, J., 2009b, A single FLOTAC is more sensitive than triplicate Kato-Katz for the diagnosis of low-intensity soil-transmitted helminth infections. Trans R Soc Trop Med Hyg 103, 347-354.

Levecke, B., De Wilde, N., Vandenhoute, E., Vercruyse, J., 2009, Field validity and feasibility of four techniques for the detection of *Trichuris* in simians: a model for monitoring drug efficacy in public health? Plos Negl Trop Dis 3, e366.

Lyons, E.T., Patterson, D.J., Johns, J.T., Giles, R.C., Tolliver, S.C., Collins, S.S., Stamper, S., 1995, Survey for internal parasites in cattle in Kentucky (1993). Vet Parasitol 58, 163-168.

Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Labore, D.E., Drudge, J.H., 1972, Field and controlled test evaluations of levamisole against natural infections of gastrointestinal nematodes and lungworms in calves. Am J Vet Res 33, 65-71.

Mackintosh, C.G., Wilson, P.R., 2003, Impact of diseases on the NZ deer industry. P New Zeal Soc An 63, 262-268.

Mackintosh, C.G., Tolentino, B., 2009, Parasite diagnosis. Proceedings of the Deer Branch of the New Zealand Veterinary Association 69, 111-113.

MAF, 2011, Deer, In: MAF (Ed.) Situation and Outlook for New Zealand Agriculture and Forestry. Ministry of Agriculture and Forestry Pastoral House, Wellington, pp. 44 - 45.

MAFF, 1986, Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques, 3. Auflage. HMSO Publications Centre, London, 11 p.

Markovics, A., Medinski, B., 1996, Improved diagnosis of low intensity *Spirocerca lupi* infection by the sugar flotation method. J Vet Diagn Invest 8, 400-401.

Mason, P.C., 1977, Gastrointestinal parasitism in red deer. New Zeal J Agr Sci 11, 182-183.

Mason, P.C., 1981a, Deer parasite trials. Proceedings of the Deer Branch of the New Zealand Veterinary Association, 78-84.

Mason, P.C., 1981b, Parasites of deer in New Zealand. Proceedings of the Deer Branch of the New Zealand Veterinary Association, 63-70.

Mason, P.C., Gladden, N.R., 1983, Survey of internal parasitism and anthelmintic use in farmed deer. New Zeal Vet J 31, 217-220.

Mason, P.C., 1994, Parasites of deer in New Zealand. New Zeal J Zool 21, 39-47.

McKenna, P.B., 1999, Comparative evaluation of two emigration/sedimentation techniques for the recovery of dictyocaulid and protostrongylid larvae from faeces. Vet Parasitol 80, 345-351.

McKenzie, J.S., 1990, Disease status of farmed deer in New Zealand. Surveillance 17, 17-18.

Mes, T.H.M., Ploeger, H.W., Terlouw, M., Kooyman, F.N.J., van der Ploeg, M.P.J., Eysker, M., 2001, A novel method for the isolation of gastro-intestinal nematode eggs that allows automated analysis of digital images of egg preparations and high throughput screening. *Parasitol* 123, 309-314.

Musella, V., Catelan, D., Rinaldi, L., Lagazio, C., Cringoli, G., Biggeri, A., 2011, Covariate selection in multivariate spatial analysis of ovine parasitic infection. *Prev Vet Med* 99, 69-77.

Orr, M.B., 1991, A review of respiratory disease in New Zealand deer. *Surveillance* 18, 17-18.

Parsons, S., Mackintosh, C.G., Wharton, D.A., 1994, A comparison of lungworm faecal larval counts and trichostrongyloid faecal egg counts between red deer (*Cervus elaphus*) and red deer x wapiti F1 hybrids. *New Zeal Vet J* 42, 110-113.

Pearse, A.J., 1988, Wapiti and Hybrids - Special management needs. *Proceedings of the Deer Branch of the New Zealand Veterinary Association* 5, 164-177.

Pereckiene, A., Kaziūnaite, V., Vyšniauskas, A., Petkevičius, S., Malakauskas, A., Šarkūnas, M., Taylor, M.A., 2007, A comparison of modifications of the McMaster method for the enumeration of *Ascaris suum* eggs in pig faecal samples. *Vet Parasitol* 149, 111-116.

Pollard, J.C., Wilson, P.R., 2002, Welfare of farmed deer in New Zealand. 1. Management practices. *New Zeal Vet J* 50, 214-220.

Rehbein, S., Kokott, S., Lindner, T., 1999, Evaluation of Techniques for the Enumeration of *Dicrocoelium* Eggs in Sheep Faeces. *J Vet Med A* 46, 133-139.

Rinaldi, L., Calabria, G., Carbone, S., Carrella, A., Cringoli, G., 2007a, *Crenosoma vulpis* in dog: first case report in Italy and use of the FLOTAC technique for copromicroscopic diagnosis. *Parasitol Res* 101, 1681-1684.

Rinaldi, L., Russo, T., Schioppi, M., Pennacchio, S., Cringoli, G., 2007b, *Passalurus ambiguus*: new insights into copromicroscopic diagnosis and circadian rhythm of egg excretion. *Parasitol Res* 101, 557-561.

Rinaldi, L., Musella, V., Veneziano, V., Condoleo, R.U., Cringoli, G., 2009a, Helminthic infections in water buffaloes on Italian farms: a spatial analysis. *Geospat Health* 3, 233-239.

Rinaldi, L., Veneziano, V., Morgoglione, M.E., Pennacchio, S., Santaniello, M., Schioppi, M., Musella, V., Fedele, V., Cringoli, G., 2009b, Is gastrointestinal strongyle faecal egg count influenced by hour of sample collection and worm burden in goats? *Vet Parasitol* 163, 81-86.

Rinaldi, L., Maurelli, M.P., Musella, V., Santaniello, A., Coles, G.C., Cringoli, G., 2010, FLOTAC: an improved method for diagnosis of lungworm infections in sheep. *Vet Parasitol* 169, 395-398.

Rinaldi, L., Coles, G.C., Maurelli, M.P., Musella, V., Cringoli, G., 2011, Calibration and diagnostic accuracy of simple flotation, McMaster and FLOTAC for parasite egg counts in sheep. *Vet Parasitol* 177, 345-352.

Rode, B., Jørgensen, R.J., 1989, Baermannization of *Dictyocaulus* spp. from faeces of cattle, sheep and donkeys. *Vet Parasitol* 30, 205-211.

Samuel, W.M., Trainer, D.O., 1969, A technique for survey of some helminth and protozoan infections of white-tailed deer. *J Wildl Manag* 33, 888-894.

Schnieder, T., Epe, C., von Samson-Himmelstjerna, G., 1996, Species differentiation of lungworms (*Dictyocaulidae*) by polymerase chain reaction/restriction-fragment-length polymorphism of second internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Parasitol Res* 82, 392-394.

Schnyder, M., Maurelli, M.P., Morgoglione, M.E., Kohler, L., Deplazes, P., Torgerson, P., Cringoli, G., Rinaldi, L., 2011, Comparison of faecal techniques including FLOTAC for copromicroscopic detection of first stage larvae of *Angiostrongylus vasorum*. *Parasitol Res* 109, 63-69.

Speich, B., Knopp, S., Mohammed, K.A., Khamis, I.S., Rinaldi, L., Cringoli, G., Rollinson, D., Utzinger, J., 2010, Comparative cost assessment of the Kato-Katz and FLOTAC techniques for soil-transmitted helminth diagnosis in epidemiological surveys. *Parasites and Vectors* 3, 71.

Stafford, K.J., West, D.M., Pomroy, W.E., 1994, Nematode worm egg output by ewes. *New Zeal Vet J* 42, 30-32.

Swanson, J., Hoskin, S.O., Wilson, P.R., Pomroy, W.E., 2007, Shared parasites of deer, sheep and cattle. *Proceedings of the Deer Branch of the New Zealand Veterinary Association* 24, 26-28.

Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L., 2007a, *Veterinary Parasitology*, 3. Auflage. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, 874 p.

Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L., 2007b, *Veterinary Parasitology*, 3. Auflage. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, 561 p.

Thienpont, D., Rochette, F., Vanparijs, O.F.J., 1990, *Diagnose von Helminthosen durch koproskopische Untersuchung*, 2. Auflage. Janssen Research Foundation, Beerse, 36 p.

Traversa, D., Avolio, S., Modrý, D., Otranto, D., Iorio, R., Aroch, I., Cringoli, G., Milillo, P., Albrechtová, K., Mihalca, A.D., Lavy, E., 2008, Copromicroscopic and molecular assays for the detection of cancer-causing parasitic nematode *Spirocerca lupi*. *Vet Parasitol* 157, 108-116.

Utzinger, J., Rinaldi, L., Lohourignon, L.K., Rohner, F., Zimmermann, M.B., Tschannen, A.B., N'Goran, E.K., Cringoli, G., 2008, FLOTAC: a new sensitive technique for the diagnosis of hookworm infections in humans. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102, 84-90.

Vadlejch, J., Petrtýl, M., Zaichenko, I., Čadková, Z., Jankovská, I., Langrová, I., Moravec, M., 2011, Which McMaster egg counting technique is the most reliable? *Parasitol Res* 109, 1387-1394.

von Holtum, C., Strube, C., Schnieder, T., von Samson-Himmelstjerna, G., 2008, Development and evaluation of a recombinant antigen-based ELISA for serodiagnosis of cattle lungworm. *Vet Parasitol* 151, 218-226.

Waldrup, K.A., Mackintosh, C.G., 1992, Fading elk syndrome research. *Proceedings of the Deer Branch of the New Zealand Veterinary Association* 9, 170-174.

Watson, P.G., Charleston, W.A.G., 1985, The significance of parasites in farmed deer, In: Fennessy, P.F., Drew, K.R. (Eds.) *Biology of Deer Production*. Royal Society of New Zealand, Wellington, pp. 105-117.

Wetzel, R., 1951, Verbesserte McMaster-Kammer zum Auszählen von Wurmeiern. *Tieraerztl Umschau* 6, 209-210.

Williams, J.C., Broussard, S.D., 1995, Comparative efficacy of levamisole, thiabendazole and fenbendazole against cattle gastrointestinal nematodes. *Vet Parasitol* 58, 83-90.

Wilson, P.R., 1981, Studies of parasitism in red deer. *Proceedings of the Deer Branch of the New Zealand Veterinary Association*, 71-77.

Wilson, P.R., Collier, A.J., 1981, Lungworm in deer - a survey of veterinary practices. Proceedings of the Deer Branch of the New Zealand Veterinary Association, 85-93.

Wilson, P.R., Audigé, L.J.M., Morris, R.S., 1997, On-farm internal parasite control - luck or design? Proceedings of the Deer Branch of the New Zealand Veterinary Association 14, 115-142.

Wilson, P.R., 2002, Advances in health and welfare of farmed deer in New Zealand. New Zeal Vet J 50, 105-109.

Zajac, A.M., Conboy, G.A., 2006, Veterinary Clinical Parasitology, 7. Auflage. Blackwell Publishing Professional, Ames, 3 p.



## IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abb. 1.</b> Typisches Rothirschgatter in Neuseeland.....	4
<b>Abb. 2.</b> Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von <i>D. eckerti</i> .....	7
<b>Abb. 3.</b> FLOTAC-Apparat und FLOTAC-Apparat unter dem Mikroskop.....	11
<b>Abb. 4.</b> Schematische Darstellung des FLOTAC- Verfahrens.....	12
<b>Abb. 5.</b> Baermann-Verfahren mit konischen Mess- zylindern.....	19

## X. TABELLENVERZEICHNIS

**Tab. 1.1:** Empfohlene Flotationslösungen für das FLOTAC-Verfahren für den Nachweis von Endoparasiten bei Hauswiederkäuern unter Verwendung von frischen Kotproben.....13

**Table 1:** Used flotation media with their chemical components and specific gravities (sg) at room temperature measured with density hydrometers (Boeco, Germany, reference temperature 20°C). All solutions were prepared with distilled water.....25

**Table 2:** Comparison of mean faecal egg counts ( $\pm$  SD) using a modified McMaster method or FLOTAC technique with a variety of flotation media of different specific gravities (sg). For each experiment faeces were obtained from different animals.....25

**Table 3:** Comparison of mean larval counts ( $\pm$  SD) using a Baermann procedure or the FLOTAC technique with a variety of flotation media of different specific gravities (sg). For each experiment faeces were obtained from different animals.....26

## **XI. DANKSAGUNG**

Als erstes möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Kurt Pfister bedanken. Er war nicht nur maßgeblich an der Fertigstellung der vorliegenden Dissertation beteiligt sondern hat sich auch für ein zustandekommen meines Auslandsaufenthaltes in Neuseeland unermüdlich eingesetzt.

Mein besonderer Dank gilt auch meinem neuseeländischen Mentor Prof. Bill Pomroy, der mir die Gelegenheit gegeben hat, in seinem Labor zu arbeiten und das universitäre Ausbildungssystem im angelsächsischen Raum kennen zu lernen. Seine Geduld und Hartnäckigkeit mir komplexe Sachverhalte zu erklären sowie seine „open-door“ Politik bleiben unvergesslich.

Bei Julien Gueydon und Samuel Gannac möchte ich mich für die technische Unterstützung zu Beginn der Studie bedanken.

Ich danke Dr. Ian Scott für die hilfreichen Kommentare und Korrekturen an den früheren Versionen der Publikation.

Für die finanzielle Unterstützung möchte ich mich beim McGeorge Research Fund, Massey University bedanken.

Bei Prof. Giuseppe Cringoli (University of Naples Federico II, Italien) bedanke ich mich für die kostenlose Überlassung der FLOTAC-Apparate.

Außerdem möchte ich mich bei Barbara Adlington und Anne Tunnicliffe für den warmen Empfang und nicht enden wollende Unterstützung im und besonders außerhalb des Labors bedanken.

Ausdrücklich gedankt sei an dieser Stelle auch meinen Eltern, Otto und Maria Bauer sowie meinem Bruder Markus Bauer. Ohne ihre unaufhörliche Unterstützung wäre mir nicht nur Neuseeland verwehrt geblieben, sondern auch das Tiermedizinstudium. Danke für eure Großzügigkeit und Geduld mich all die Jahre zu unterstützen.