



Alternativen zu Tierversuchen in der Parasitologie

Johannes Eckert

Institut für Parasitologie der Universität Zürich, Winterthurerstr. 266a, 8057 Zürich

Zusammenfassung

Im vorliegenden Artikel werden Beispiele für Möglichkeiten zur Reduktion der Anzahl von Tierexperimenten und von Versuchstieren in der Parasitologie dargestellt. Sie umfassen u.a. gesetzgeberische Massnahmen zum Tierschutz, internationale Richtlinien zur Prüfung der Wirksamkeit und Verträglichkeit von Antiparasitika, die Anwendung der elektronischen Datenverarbeitung in verschiedenen Gebieten sowie die Entwicklung und Anwendung neuer bzw. verbesserter Labormethoden, wie die Kältekonservierung von Parasiten, die in vitro-Kultivierung von Protozoen (Einzeller, z.B. Amöben, Malaria-Plasmodien) und Helminthen (parasitische Würmer), die Kultivierung von Zellen metazoischer Parasiten und den Einsatz der Gentechnologie für die Massenproduktion von Parasitenantigenen. Die Entwicklung von Alternativmethoden erfordert langfristige, neue Forschungsprogramme.



Einleitung

Eine wichtige Aufgabe eines jeden Spezialgebietes der medizinischen und biologischen Forschung ist, heute nach realisierbaren Alternativen zu suchen, die zur Einschränkung oder sogar zum Ersatz von Tierversuchen beitragen könnten. Für die Parasitologie soll dazu der vorliegende Artikel, der an anderer Stelle in ausführlicher Form publiziert worden ist (1), einige Anregungen und Diskussionsbeiträge liefern. Dabei muss betont werden, dass es sich hierbei nicht um eine umfassende Zusammenstellung aller Möglichkeiten handelt, sondern nur um eine Auswahl von Beispielen.

2. Wege zur Einschränkung von Tierversuchen in der Parasitologie

2.1. Tierschutzgesetzgebung

Eine wichtige Rolle bei der Einschränkung von Tierversuchen spielt die gesetzliche Regelung des Tierschutzes. Wenn klare und strenge Tierschutzgesetze vorliegen, die darauf basierenden Verordnungen übersichtlich und den Bedürfnissen der Praxis angepasst sind und die Aufsichtsorgane gut funktionieren, ist mit einem Rückgang der Tierversuche zu rechnen. Dies zeigte sich z.B. nach Inkrafttreten der neuen Tierschutzverordnung in der Schweiz am 27.5.1981: In der Periode 1982-85 gingen die Versuchstierzahlen jährlich um 11,3 %, 12,8 %, 12,1 bzw. 10,0 zurück (2, 3, 4).

2.2. Internationale Richtlinien zur Prüfung von Antiparasitika

In der Parasitologie, speziell im Bereich der Veterinärparasitologie, war in den letzten 25 Jahren eine stürmische Entwicklung der Arzneimittelforschung zu verzeichnen, die zahlreiche hochwirksame und gut verträgliche Antiparasitika hervorgebracht und damit einen entscheidenden Beitrag zur Verbesserung der Bekämpfung verlustreicher und wirtschaftlich bedeutsamer Parasitosen von Haustieren geleistet hat (Lit. bei 5, 6).



Für die Prüfung solcher Antiparasitika auf Wirksamkeit und Verträglichkeit liegen weltweit keine einheitlichen Richtlinien vor. Wegen der Unterschiede in der angewandten Methodik und der damit verbundenen Unsicherheit von Prüfungsergebnissen verlangen die für die Registrierung von Arzneimitteln zuständigen Behörden vieler Länder eine erneute Prüfung der Antiparasitika, auch wenn diese bereits in einem anderen Land erfolgt ist. Die daraus resultierenden vielfachen Wiederholungen von Arzneimittelprüfungen an Tieren könnten durch Anwendung international aufeinander abgestimmter, d.h. "harmonisierter", Prüfmethode reduziert werden. Voraussetzungen dafür wären internationale Richtlinien zur Arzneimittelprüfung sowie die Anerkennung der Resultate durch alle Länder, wenn die Prüfung von Antiparasitika nach diesen internationalen Richtlinien erfolgt ist.

Angeichts der Dringlichkeit solcher Massnahmen hat die "World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology" bereits 1977 damit begonnen, internationale Richtlinien für die Wirksamkeitsprüfung von Anthelminthika (Wurmmittel) vorzuschlagen. Die Entwürfe der von Expertenkommissionen ausgearbeiteten Richtlinien werden Fachvertretern in zahlreichen Ländern zur Stellungnahme zugestellt und nach Berücksichtigung aller Kommentare publiziert. Bisher liegen Richtlinien zur Wirksamkeitsprüfung von Anthelminthika bei Wiederkäuern (7) und beim Schwein (8) vor. Entsprechende Richtlinien für Pferd und Fleischfresser werden zur Zeit vorbereitet (9).

2.3. Einsatz der elektronischen Datenverarbeitung (EDV)

Ein verstärkter Einsatz der EDV bietet sich in mehrfacher Hinsicht als Hilfsmittel zur Einschränkung von Tierversuchen an.

Eine wichtige Aufgabe in diesem Zusammenhang ist der Aufbau zentraler Datenbanken und der Kommunikationswege zu parasitologischen Forschungsstätten, damit diese jederzeit in der Lage sind, sich rasch und umfassend über den neuesten Stand der Forschung orientieren zu können. Dadurch wäre es möglich, Wiederholungsuntersuchungen zu vermeiden oder einzuschränken und die



Planungen von Tierversuchen besser abzusichern. Nach Ruh (10) gelten Tierversuche, die nur erfolgen, weil zuvor durchgeführte Experimente dem betreffenden Forscher unbekannt sind, als unethisch. Zentrale Datenbanken könnten auch den Kontrollorganen, die über die Bewilligung von Tierversuchen zu entscheiden haben und dazu Zielsetzung und Wichtigkeit der geplanten Projekte beurteilen müssen, wertvolle Dienste leisten.

Diese neuen Aufgaben erfordern den Einsatz von Spezialisten, die in Parasitologie und EDV ausgebildet sind und in Forschungsinstituten längerfristig angestellt werden können.

2.4. Alternativmethoden

Eine wichtige Aufgabe im Rahmen des Tierschutzes ist die Entwicklung und Verbesserung sowie der vermehrte Einsatz von Alternativmethoden, die Tierversuche einschränken oder sogar ersetzen können. Dazu seien hier einige Beispiele aufgeführt.

2.4.1. Kältekonservierung von Parasiten

In der parasitologischen Forschung werden zahlreiche Isolate (Arten bzw. Stämme) von Parasiten eingesetzt und unter Laborbedingungen über längere Zeit gehalten. Die Haltung eines Teiles dieser Parasiten erfolgt in Wirbeltieren, und zwar durch Serienpassagen von Tier zu Tier, oder unter Einschaltung wirbelloser Zwischenwirte. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass zur Haltung des Parasiten-Isolates in lebensfähigem Zustand während langer Zeiträume, oft über viele Jahre, Versuchstiere eingesetzt werden müssen, auch dann, wenn vorübergehend keine Forschungsarbeiten mit dem betreffenden Parasiten durchgeführt werden.

Wegen dieser Nachteile der Parasitenhaltung in Tieren wird in der Protozoologie schon seit vielen Jahren die Kältekonservierung (Kryopräservierung) verschiedener Arten in umfangreicher Masse eingesetzt. So können zahlreiche Arten von Protozoen tiefgefroren und über viele Jahre in flüssigem Stickstoff gelagert werden (Lit. bei 11, 12, 13). Die Parasiten-Isolate



werden dann bei Bedarf aufgetaut und für Forschungszwecke eingesetzt. Die Kältekonserverung kann somit wesentlich dazu beitragen, die Zahl der für die Haltung von Parasiten-Isolaten benötigten Tiere zu reduzieren.

Aufgrund des höheren Organisationsgrades ist die Kryopräservierung metazoischer Parasiten schwieriger als bei Protozoen. Daher wird in der Helminthologie die Kältekonserverung zur Haltung von Parasiten-Isolaten bisher nur wenig eingesetzt (Lit. bei 11, 14, 15). Verschiedene Untersuchungen zeigen jedoch, dass eine Kryopräservierung verschiedener Stadien von Helminthen möglich ist. So konnten u.a. folgende Helminthen durch Tiefgefrieren konserviert werden: Die infektiösen Larven verschiedener Arten von Trichostrongyliden und Strongyliden, die Mikrofilarien und/oder infektiösen Larven von Filarien (Brugia, Dirofilaria, Dipetalonema, Litomosoides, Wuchereria und Onchocerca) sowie die Sporozysten und Schistosomula von Schistosoma mansoni, (Lit. bei 14, 15, 16). Dritte Larven von Trichostrongyliden (Haemonchus contortus) bewahrten in tiefgefrorenem Zustand 10 Jahre lang ihre Infektiosität für Schafe (17). Bei den Nematoden sind als neueste Daten die erfolgreiche Kältekonserverung der infektiösen Larven von Dictyocaulus viviparus (18, 19) und der 2. Larven von Toxocara canis (20) hinzuzufügen.

Ueber die Kryopräservierung von Zestoden (Bandwürmer) liegen nur sehr wenige Daten vor. Uns gelang erstmalig die Kältekonserverierung der Metazestoden von Echinococcus multilocularis (14), die bei Lagerung in flüssigem Stickstoff nach dem bisherigen Erfahrungsstand mindestens ein Jahr lang lebens- und infektiösfähig bleiben (unveröffentlicht).

Bei den Metazestoden von E. multilocularis handelt es sich um in Nagetieren (Meriones unguiculatus) relativ rasch wachsende und pathogene Stadien, für deren Haltung in Serienpassagen pro Isolat und Jahr mindestens 20 - 30 Versuchstiere erforderlich sind. Bei Haltung mehrerer Isolate in einem Labor ist daher der Tieraufwand allein zur ständigen Passage der Parasiten hoch.



Durch den Einsatz der Kältekonservierung können viele Versuchstiere eingespart werden. Ausserdem kann dank dieser Technik Referenzmaterial eines jeden Isolates in einer "Parasitenbank" für spätere Untersuchungen gelagert werden.

Diese Beispiele zeigen, dass eine Weiterentwicklung und breitere Anwendung der Verfahren zur Kältekonservierung von Parasiten zur Reduktion der Zahl von Versuchstieren beitragen können.

2.4.2. In vitro-Kultivierung

Eine weitere Möglichkeit ist die Haltung von Parasiten in vitro und der Einsatz dieser Technik für verschiedene Zwecke der Forschung, Lehre und Diagnostik. Ein klassisches Beispiel dafür ist die nach langjährigen Untersuchungen gelungene, kontinuierliche in vitro-Kultivierung von Plasmodium falciparum durch Trager und Mitarbeiter (21). Dieser Durchbruch in der Malariaforschung hat dazu geführt, dass der Einsatz von Affen als Versuchstiere bei einer Reihe von Problemstellungen überflüssig geworden ist, z.B. bei der Gewinnung von P. falciparum-Antigenen aus erythrozytären Stadien des Parasiten für diagnostische Zwecke und für die Entwicklung einer Vakzine gegen Malaria sowie bei der Testung der Arzneimittelresistenz der Erreger.

Während in vitro-Techniken in der Protozoologie bereits seit vielen Jahren in grossem Umfang für verschiedene Zwecke erfolgreich eingesetzt werden (Lit. bei 13, 22), besteht diesbezüglich in der Helminthologie noch ein erheblicher Nachholbedarf, obwohl auch hier beachtliche Fortschritte erzielt worden sind, z.B. in der Kultivierung von Echinococcus-Arten (23) oder in der langfristigen in vitro-Haltung der Metazestoden von Mesocystoides corti und Taenia crassiceps (24).

Ein völlig unerschlossenes Feld der Parasitologie ist die in vitro-Züchtung verschiedener Zellarten von Helminthen, die in ähnlicher Weise wie Zellen von Säugetieren für verschiedene "versuchstierfreie" Forschungszwecke eingesetzt werden könnten.

2.4.3. Gentechnologie

Die Molekularbiologie hat auch für die Parasitologie neue Wege eröffnet, besonders hinsichtlich der versuchstierfreien gentechnologischen Produktion von Antigenen für diagnostische Zwecke und zur Herstellung von Vakzinen.

Diese neuen Möglichkeiten, die bereits bei Arbeiten zur Entwicklung von Vakzinen gegen Malaria des Menschen, das Ostküstenfieber von Rindern, Kokzidiosen des Geflügels und verschiedene Helminthosen eingesetzt werden (25), sollten intensiv gefördert werden, da sie einerseits Alternativmethoden zum Tierversuch darstellen und andererseits die mit dieser Methodik hergestellten, gegen parasitäre Erkrankungen gerichteten Vakzinen wesentlich zur Verminderung von Leiden bei Menschen und Tieren beitragen könnten.

2.4.4. Andere Methoden

Ausser den oben erwähnten Möglichkeiten zur Einschränkung von Tierversuchen in der parasitologischen Forschung stehen noch weitere Wege offen. So wird daran gearbeitet, gewisse Arthropoden-Arten (Gliederfüssler, u.a. Insekten) mit Blut zu ernähren, das in vitro durch Membranen ("Membranfütterung") und nicht am lebenden Versuchstier aufgenommen wird (26). Durch die "Membranfütterung" lassen sich Stress und die Belästigung der Wirtstiere durch den Arthropoden-Stich sowie andere Nebenwirkungen vermeiden.

Ein weiteres Beispiel für tierschutzgerechtere Arbeitsmethoden ist die Gewinnung von Antikörpern gegen Parasiten aus dem Dotter von Hühnereiern. Eine solche Methode ist z.B. von Gottstein und Hemmeler (27) in unserem Institut zur Gewinnung von Antikörpern gegen Echinococcus-Antigen eingesetzt worden. Bei dem bisher üblichen Verfahren wurden Kaninchen mit Echinococcus-Antigen immunisiert und später die Antikörper aus dem Serum der Tiere nach mehrmaligen Blutentnahmen am lebenden Tier oder durch Entbluten des Tieres nach Euthanasie gewonnen. Bei der neuen Methode werden Legehennen ebenfalls mit Antigenen immunisiert, die Gewinnung der Antikörper erfolgt jedoch unblutig durch Isolation aus dem Eidotter.



Schlussfolgerungen

Der vorliegende, z.T. auf Untersuchungsergebnissen unserer Arbeitsgruppe beruhende Artikel, soll der Förderung der Diskussion um die Problematik der Tierversuche dienen. Die wenigen aufgeführten Beispiele zeigen, dass in der Parasitologie verschiedene realistische Möglichkeiten bestehen, um die Zahl der Tierversuche und die Anzahl der Versuchstiere zu reduzieren. Zur Realisierung dieser Möglichkeiten sind jedoch in Zukunft intensive und langfristige Forschungen nötig, die einen entsprechenden Einsatz finanzieller Mittel erfordern. Wenn die öffentliche Hand bereit wäre, diese Mittel aufzubringen, liesse sich mit hoher Wahrscheinlichkeit eine weitere Einschränkung der Tierversuche ohne Verlust der Forschungsqualität erreichen.

Die im Artikel erwähnten eigenen Arbeiten über Alternativmethoden zum Tierversuch wurden finanziell gefördert durch: Das Bundesamt für Veterinärwesen, Bern (Projekt-Nr. 014.83.7. Sponsoren: Migros-Genossenschaftsbund, Kant. Zürcher Tierschutzverein, Stiftung Fonds für versuchstierfreie Forschung), den Schweiz. Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Projekt Nr. 4.780.84.17) und den Kanton Zürich. Dafür sei auch an dieser Stelle gedankt.

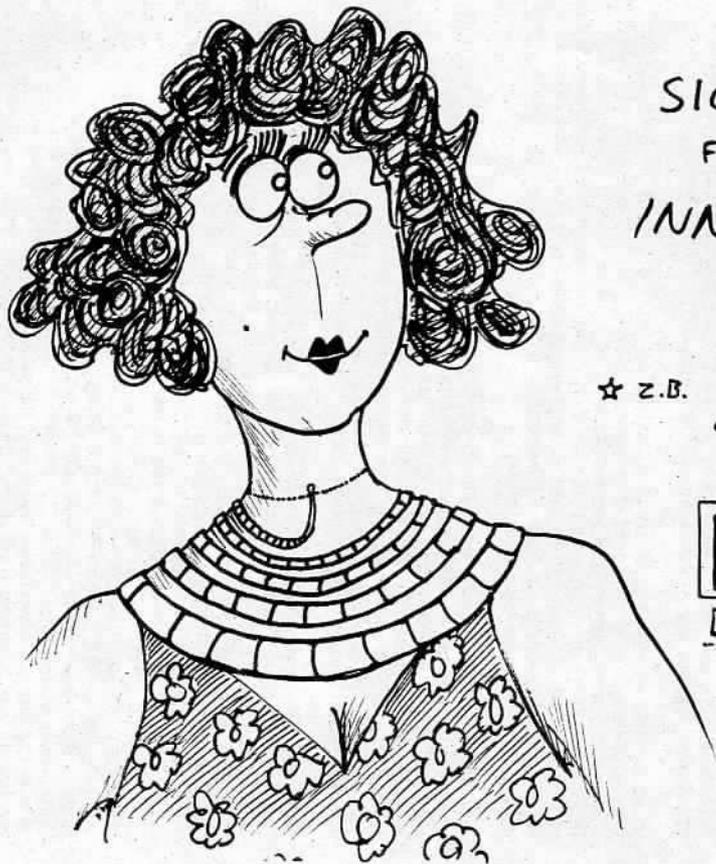


Literatur

- 1 ECKERT, J.: (1986): Alternativen zu Tierversuchen in der Parasitologie. Dtsch. tierärztl. Wschr. 93: 380-382.
- 2 FREUDIGER, U. (1985): Die Volksinitiative "für die Abschaffung der Vivisektion", genannt "Weber-Initiative". Schweiz. Arch. Tierheilk. 127: 635-649.
- 3 MITT. BVET. (1985): Statistik über die im Jahre 1984 bewilligten Tierversuche nach Angaben der Kantone. Mitt. Bundesamt Veterinärwesen 86: 176-177.
- 4 MITT. BVET. (1986): Statistik über die im Jahre 1985 bewilligten Tierversuche nach Angaben der Kantone. Mitt. Bundesamt Veterinärwesen 87: 178-179.
- 5 HIEPE, Th. (1981): Lehrbuch der Parasitologie. Band 1: Allgemeine Parasitologie. Fischer Verlag, Jena.
- 6 BOCH, J.; SUPPERER, R. (1983): Veterinärmedizinische Parasitologie. 3. Aufl., P. Parey, Berlin.
- 7 POWERS, K.G.; WOOD, I.B.; ECKERT, J.; GIBSON, T.; SMITH H.J. (1982): Guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine and ovine). Vet. Parasitol. 10: 265-284.
- 8 DÜWEL, D.; BARTH, D.W.; BATTE, E.G.; BERGER, H.; STEWART, T.B.; THEODORIDES, V.J. (1986): Guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in swine. Vet. Parasitol. (21: 69-82).
- 9 WAAVP (1986): World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, Newsletter No. 1, 1986.
- 10 RUH, H. (1985): Ethik und Tierversuch. Alternativ. Tierexper. Nr. 3, 5-20.
- 11 ASHWOOD-SMITH, M.J., FARRANT, J. (1980): Low Temperature Preservation in Medicine and Biology. Pitman Medical, Tunbridge-Wells, U.K.
- 12 LEEF, J.L.; HOOLINGDALE, M.R.; BEAUDOIN, R.L. (1981): Principles of cryopreservation of protozoan parasites and erythrocytes. Wrl. Hlth. Org. Document WHO Mal 81.940, Geneva.
- 13 JENSEN, J.B. (Hrsg.) (1983): In Vitro Cultivation of Protozoan Parasites. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- 14 ECKERT, J.; RAMP, Th. (1985): Cryopreservation of Echinococcus multilocularis metacystodes and subsequent proliferation in rodents (Meriones). Z. Parasitenkd. 71: 777-787.



- 15 JAMES, E.R. (1985): Cryopreservation of helminths. *Parasitol. Today* 1: 134-139.
- 16 RAMP, Th.; ECKERT, J.; CHRISTEN, C. (1986): Erfahrungen mit der Gefrierkonservierung dritter Larvenstadien von Trichostrongylien der Wiederkäuer. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 128: 79-86.
- 17 REW, R.S.; CAMPBELL, W.C. (1983): Infectivity of *Haemonchus contortus* in sheep after freezing for ten years over liquid nitrogen. *J. Parasitol.* 69: 251-252.
- 18 JAMES, E.R.; PEACOCK, R. (1986): Studies on the cryopreservation of *Dictyocaulus viviparus* (Nematoda) third-stage larvae. *J. Helminthol.* 60: 65-73.
- 19 ECKERT, J.; RAMP, Th.; METTLER, I. (1986): Cryopreservation of larval cestodes and nematodes. *Abstr. Internat. Congr. Parasitol.*, August 24-29, 1986, Brisbane.
- 20 RAMP, Th.; ECKERT, J.; Gottstein, B. (1986): Cryopreservation and long-term in vitro maintenance of second-stage larvae of *Toxocara canis*. (zur Publ. eingereicht).
- 21 TRAGER, W.; JENSEN, J.B. (1976): Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 1983: 673.
- 22 ROWE, D.S.; HIRUMI, H. (Hrsg.) (1980): The in vitro cultivation of the pathogens of tropical diseases. *Trop. Res. Ser.*: 3. Schwabe & Co., Basel.
- 23 HOWELL, M.J. (1986): Cultivation of *Echinococcus* species in vitro. In: Thompson, R.C.A. (Hrsg.): *The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease*, S. 143-163. G. Allen & Unwin, London.
- 24 RAMP, Th.; ECKERT, J. (1984): In vitro cultivation of *Mesocostoides corti* and *Taenia crassiceps*. *Zbl. Bakt. Hyg. A*, 258: 399.
- 25 COBON, G.; WILLETTS, N.S. (1984): The application of recombinant DNA techniques to the production of anthelmintic vaccines. S. 55-65. In: Dineen, J.K., Cutteridge, P.M. (Hrsg.): *Immunogenic Approaches to the Control of Endoparasites*. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization Australia.
- 26 WETZEL, H., LUGER, D. (1978): In vitro feeding in the rearing of tsetse flies (*Glossina m. morsitans* and *G.p.palpalis*, Diptera: Glossinidae). *Tropenmed. Parasit.* 29: 239-251.
- 27 GOTTSSTEIN, B.; HEMMELER, E. (1985): Egg yolk immunoglobulin Y as an alternative antibody in the serology of echinococcosis. *Z. Parasitenkd.* 71: 273-276.



SICHERHEIT
FÜR IHRE
INNEREN WERTE*!

☆ z.B. EIN WERTVOLLES
CESTODEN-COLLIER

P

DIE PARASITENBANK

