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

Herausgeber: Gesellschaft Schweizer Tierärztinnen und Tierärzte

Band: 131 (1989)

Heft: 8

Artikel: Indirekter Erregernachweis bei ausgewählten Parasitosen von Tieren mit Hilfe immunologischer und molekularbiologischer Methoden

Autor: Gottstein, B. / Deplazes, P.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-592478

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 15.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

SCHWEIZ. ARCH. TIERHEILK. 131, 465–477, 1989

Aus dem Institut für Parasitologie (Direktor: Prof. Dr. J. Eckert) der Universität Zürich

INDIREKTER ERREGERNACHWEIS BEI AUSGEWÄHLTEN PARASITOSEN VON TIEREN MIT HILFE IMMUNOLOGISCHER UND MOLEKULARBIOLOGISCHER METHODEN

B. GOTTSTEIN UND P. DEPLAZES

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Übersichtsarbeit werden folgende Möglichkeiten des indirekten Erregernachweises bei ausgewählten Parasitosen von Tieren besprochen: Nachweis von Serumantikörpern mit ELISA, IFAT und anderen Testsystemen bei Leishmaniose des Hundes, Babesiose bei Pferd, Rind und Hund und Toxoplasmose der Katze und verschiedener Arten von Zwischenwirten. Bei der Leishmaniose des Hundes kann die Spezifität des Nachweises durch Zusatzuntersuchungen mit dem Western-Blot verbessert werden. Neue Möglichkeiten bieten Verfahren zum Nachweis von Antigenen, die im Serum zirkulieren (z. B. bei Dirofilariose des Hundes) oder im Kot ausgeschieden werden (Koproantigene) (bei intestinalen Parasitosen). Die letztgenannten Verfahren sind zum Teil noch in Erprobung. Ein neuer Trend in der Diagnostik von Parasitosen ist der Einsatz von DNA-Technologien zur spezifischen Identifikation von Erregern. Die Anwendung solcher Methoden wird an einigen Beispielen erläutert.

SCHLÜSSELWÖRTER: indirekter Parasitennachweis – immundiagnostische Methoden – Antikörpernachweis – Antigennachweis – molekularbiologische Methoden

INDIRECT DETECTION OF CAUSAL AGENTS IN ANIMAL PARASITOSES BY MEANS OF IMMUNOLOGICAL AND MOLECULAR-BIOLOGICAL TECHNIQUES

In this review the following possibilities of indirect detection of causal agents in selected animal parasitoses are discussed: Detection of serum antibodies by ELISA, IFAT and other test systems in leishmaniosis of dogs, babesiosis of horse, cattle and dog, and in toxoplasmosis of cat and various intermediate host species. In leishmaniosis of dogs the specificity of serodiagnosis can be improved by additional Western-Blot analysis. New approaches are provided by the detection of antigens circulating in serum (i. e. in dirofilariosis of dogs) or excreted in faeces (copro-antigens) (i. e. in intestinal parasitoses). Some of the last mentioned techniques are still under evaluation. A new trend in the diagnosis of parasitoses is the application of DNA technologies for the specific identification of causal agents. Some examples are discussed.

KEY WORDS: indirect detection of parasites – immunodiagnostic techniques – antibody detection – antigen detection – molecularbiological techniques

EINLEITUNG

Die parasitologischen Methoden der Laboratoriumsdiagnostik ermöglichen bei vielen Parasitosen von Tieren den direkten Erregernachweis. Gelingt dieser nicht, so ist ein Befall nicht in jedem Falle ausgeschlossen. Andernseits ist bei verschiedenen Parasitosen der direkte Parasitennachweis nicht möglich oder technisch zu aufwendig. Aus diesen Gründen haben Methoden zum indirekten Parasitennachweis mit immunologischen und neuerdings auch mit molekularbiologischen Methoden erheblich an Bedeutung gewonnen. Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, an einigen ausgewählten Beispielen die heutigen oder zukünftigen Möglichkeiten des indirekten Erregernachweises bei Parasitosen von Tieren darzustellen. Eine vollständige Übersicht kann in diesem Rahmen nicht gegeben werden. Im ersten Abschnitt der Arbeit erläutern wir Beispiele des Antikörpernachweises bei Parasitosen, im zweiten Teil wird der diagnostische Antigennachweis diskutiert und im dritten Teil auf zukünftige Möglichkeiten zum Ein-

satz molekularbiologischer Techniken hingewiesen. Im weiteren sollen 2 Übersichtstabellen den praktizierenden Tierärztinnen und Tierärzten Hinweise über Methodik und dazu benötigtes Untersuchungsmaterial für die Diagnose der ausgewählten Parasitosen geben.

DIAGNOSTISCHER NACHWEIS VON ANTIKÖRPERN

Während im Bereich der medizinischen Parasitologie der serologische Antikörpernachweis heute zum festen und routinemässigen Diagnostikrepertoire vieler Parasitosen gehört, werden in der Veterinärparasitologie diese Möglichkeiten bisher wenig genutzt. Bei einigen Parasitosen ist jedoch die Anwendung von Verfahren zum Antikörpernachweis sinnvoll, wie folgende Beispiele zeigen sollen.

Leishmaniose

Im Mittelmeerraum gehört der Hund zu den wichtigsten Reservoirwirten von *Leishmania (L.) infantum*, einem der Erreger der viszeralen Leishmaniose des Menschen (*Bettini* und *Gradoni*, 1986). Amastigote Stadien von *Leishmania* spp. können in Zellen des retikuloendothelialen Systems aus Punktionsmaterial von Lymphknoten oder Knochenmark durch Färbung nach Giemsa direkt dargestellt werden. Bei Hunden mit chronischer Leishmaniose sowie auch bei anbehandelten Patienten gelingt der parasitologische Nachweis nicht immer (*Pospischil* et al., 1987; *Slappendel*, 1988). Diagnostisch sehr sensitiv ist die in vitro-Anzüchtung von promastigoten Stadien (*Berens* et al., 1976) aus Punktionsmaterial. Nach Erfahrungen in Tunesien liessen sich in 92% der Leishmaniose-Fälle von Hunden die Erreger für diagnostische Zwecke anzüchten (*Dedet* und *Belazzoug*, 1985). Diese relativ leicht durchzuführende Technik hat sich in jüngster Zeit am Institut für Parasitologie der Universität Zürich (IPZ) gut bewährt.

Da zwischen Infektion und erstem Auftreten von klinischen Symptomen Monate bis Jahre vergehen können, nach künstlicher Infektion aber bereits nach 15—30 Tagen Antikörper nachgewiesen wurden (*Reiter* et al., 1985), kommt den immundiagnostischen Methoden eine wichtige Rolle zu. Besonders bewährt haben sich der IFAT (indirekter Immunofluoreszenz-Antikörper Test), unter Verwendung von Kryoschnitten oder Tupfpräparaten von Leber und Milz künstlich infizierter Hamster als Antigen, sowie der ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) mit Antigen aus in vitro gezüchteten, promastigoten Leishmanien. Gegenwärtig werden im IPZ ein sensitiver ELISA und ein spezifischer Mini-Western-Blot als Routineverfahren zur Diagnose der Leishmaniose beim Hund eingesetzt. Mit beiden Testsystemen wird eine diagnostische Sensitivität von 100% bzw. 96% erreicht (*Gottstein* et al., 1988). Über eine ebenfalls ausgezeichnete Sensitivität des IFAT und des ELISA berichten *Hommel* et al. (1978), *Reiter* et al. (1985) und *Reusch* und *Reiter* (1987). Demgegenüber erhielt *Slappendel* (1988) mit einem IFAT bei 20% der parasitologisch bewiesenen Leishmaniose-Fällen von Hunden falsch negative Resultate. Die Gründe dafür sind nicht bekannt. Kreuzreaktionen im Bereich geringer Antikörperkonzentrationen traten bisher im ELISA bei Seren von Hund mit Babesiose oder Trypanosomose auf. Daher wird bei ELISA-Resultaten, die erhöhte Antikörperkonzentrationen anzeigen, die Spezifität der Reaktion weiter mit dem Mini-Western-Blot abgeklärt. Mit diesem Vorgehen konnten bisher alle durch Babesiose entstandenen Kreuzreaktionen aufgezeigt werden (*Gottstein* et al., 1988).

Obwohl einige Publikationen auf das autochthone Vorkommen von *L. (L.) infantum* in der Schweiz hinweisen (*Schawalder*, 1977; *Arnold* et al., 1986), muss die Leishmaniose in unseren Breitengraden als eine typisch importierte Erkrankung angesehen werden. Von 146 Hunde-Seren, die zwischen Anfang 1985 und Ende 1988 von der Medizinischen Kleintierklinik der Universität Zürich oder von praktizierenden Tierärzten/innen zur serologischen Untersuchung auf Leishmaniose an das IPZ eingeschickt wurden, waren 36 im ELISA und im Mini-Western-Blot positiv. Von den seropositiven Hunden hatten 27 (75%) einen Aufenthalt im Mittelmeerraum (Portugal inbegriffen), 2 stammten aus Afrika und nur ein Hund soll die Schweiz nie verlassen haben (Tab. 1).

Nach Therapie mit Glucantime® oder Pentostam® (Lit. bei *Kammermann-Lüscher*, 1980; *Reusch* und *Reiter*, 1987) kommt es erst im Verlauf einer längeren Zeitspanne von einigen Monaten zu einem allmählichen Abfall der Antikörperkonzentrationen im Serum (*Mancianti* et al., 1988). Über Monate gleichbleibende hohe Antikörperkonzentrationen oder ansteigende Werte sind Hinweise für einen progressiven Verlauf oder für die Entstehung von Rezidiven (*Bourdeau*, 1983; *Reusch* und *Reiter*, 1987; eigene Beobachtungen). Aus diesem Grunde ist die serologische Überwachung der Leishmaniose-Patienten in Abständen von 6 Monaten zu empfehlen.

Babesiose

Die *Babesiose der Pferde* kommt in der Schweiz nicht endemisch vor. Ein kürzlich von *Hermann* et al. (1987) im Kanton Zürich beschriebener Ausbruch einer *Babesia equi*-In-

Tab. 1: Serologische Untersuchung von Hunden auf Leishmaniose mit dem ELISA und Mini-Western-Blot

Jahr:	1986	1987	1988
	Anzahl Hunde:		
ohne spezifische Antikörper (negativ)	31	53	62
mit spezifischen Antikörpern (positiv)	9	14	13
Herkunft oder Ferienaufenthalt der serologisch positiven Hunde:	Anzahl Hunde:		
Spanien	3	7	6
Portugal	1	1	1
Italien	1	0	2
Frankreich	0	1	2
Griechenland	0	1	1
Afrika	0	1	1
ohne Auslandsaufenthalt	1	0	0
keine Unterlagen	3	3	0

fektion in einem Rennpferdebestand ist mit hoher Wahrscheinlichkeit primär auf Einschleppung des Erregers durch ein latent infiziertes Tier zurückzuführen. Während der akuten Phase der *B. equi* – oder *B. caballi* – Infektion sind Babesien in nach Giemsa gefärbten Blutausstrichen nachweisbar. Meistens liegen bereits 2–3 Wochen nach der Infektion nur noch sehr geringe Parasitämien vor, oder die Erreger sind in Blutausstrichen überhaupt nicht mehr feststellbar (*Boch*, 1985; *Hermann* et al., 1987). In dieser Phase gelingt jedoch der Nachweis von Antikörpern im Serum. Zum Nachweis der latenten oder chronischen Babesiose eignen sich besonders der IFAT und die KBR (Komplementbindungsreaktion). Mit diesen beiden Verfahren liessen sich nach *Weiland* et al. (1984) 3–10 Tage nach experimenteller Erstinfektion mit *B. equi* (intravenöse oder durch Zecken übertragene Infektionen) spezifische Antikörper nachweisen. *Heidrich-Joswig* (1982) stellte 14–18 Tage nach *B. equi*-Übertragung durch Zecken mit der KBR Antikörper fest. *Weiland* (1986) wies mit der KBR 2–10 Tage, mit dem IFAT 3–20 Tage nach experimenteller Infektion mit *B. equi* oder *B. caballi* spezifische Antikörper nach. Bei der *B. caballi*-Infektion blieb die KBR nur bis zum 67. Tage p. i. positiv, hingegen persistierten die im IFAT festgestellten Antikörper bis zum Ende des Versuches (über 200 Tage). Nach Untersuchungen an 2 Pferden waren nach Infektion mit Sporozoiten von *B. equi* in der KBR Antikörper nur bis zum 42. bzw. 84. Tag nachweisbar, obwohl Babesien im Tierkörper persistierten (*Friedhoff*, 1982). Diesem Befund kommt im Hinblick auf Export/Import-Untersuchungen von Pferden besondere Bedeutung zu. Eine Prognose, wann Pferde nach einer Infektion oder Therapie in der KBR negativ werden, ist nicht möglich (*Friedhoff*, 1982). Pferde können über Jahre intermittierend negativ und dann wieder positiv reagieren, ohne dass eine Reinfektion stattfand. Um mit Sicherheit eine latente Babesien-Infektion serologisch erfassen zu können, empfehlen *Weiland* et al. (1984) den gleichzeitigen Einsatz von KBR und IFAT. Kreuzreaktionen zwischen *B. equi* und *B. caballi* wurden von *Weiland* (1986) im IFAT, nicht aber in der KBR, beobachtet.

Der KBR kommt im internationalen Pferdeverkehr eine besondere Bedeutung zu, da die USA, Kanada, Australien und Japan nur die Einfuhr von Pferden mit negativem KBR-Resultat gestatten, obwohl mit dem IFAT latente Infektionen besser erfasst werden könnten.

Beim *Rind* ist in der Schweiz das Vorkommen von 3 *Babesia*-Arten gesichert: In der Südschweiz *B. major* und *B. divergens*, im Jura *B. divergens* und im Wallis *B. bovis (Aeschlimann* et al., 1975; *Gern* et al., 1988). Die Problematik der Diagnose der Babesiose des Rindes ist der des Pferdes ähnlich. Der Erregernachweis ist nur während der akuten Phase möglich. Während der latenten Phase müssen indirekte serologische Methoden herangezogen werden. *Weiland* et al. (1980) wiesen bei Rindern 6–9 Tage nach intravenöser Injektion von *B. divergens*-haltigem Blut gegen Babesien gerichtete Antikörper sowohl mit dem ELISA wie auch mit dem IFAT und dem IHAT (indirekter Hämagglutinations-Test) nach. Nach *Weiland* (1982) sind die 3 genannten Methoden gleichermassen zum Erfassen von Antikörpern gegen Babesien auch während der latenten Infektion geeignet, während die KBR offenbar nur bei frischen Infektionen positiv wird.

Die Anwendung serologischer Untersuchungsverfahren zur Diagnose der *Babesiose des Hundes*, verursacht durch *B. canis* oder *B. gibsoni*, ist bei klinischem Verdacht oder nach Rückkehr aus Endemiegebieten indiziert. Insbesondere bei der Diagnose der chronischen Form, bei der der Parasitennachweis in nach Giemsa gefärbten Blutausstrichen oft nicht gelingt, sind indirekte Methoden von Bedeutung. Das bisher wohl am häufigsten angewandte Verfahren ist der IFAT (*Dennig* et al., 1980; *Gothe* et al., 1987). *Weiland* und *Kratzer* (1979) haben Hunde mit *B. canis* und *B. gibsoni* intravenös infiziert. Im ELISA und IFAT, unter Verwendung verschiedener *B. canis*- und *B. rhodhaini*-An-

tigene, wurden zwischen dem 5. Tag und dem Ende der Untersuchungen (130.–214. Tag) spezifische Antikörper nachgewiesen. In dem am IPZ zur Diagnose der Babesiose eingesetzten IFAT (*Weiland*, 1982) traten bei einem Teil der Seren von Hunden mit Leishmaniose oder Trypanosomose Kreuzreaktionen mit *B. canis*-Antigen auf.
Eine zusätzliche Schwierigkeit in der Interpretation serologischer Resultate entstand in jüngster Zeit durch den Einsatz des Impfstoffes Pirodog® (Rhône-Mérieux, Lyon) (*Moreau* und *Laurent*, 1984), der die Bildung von anti-*Babesia*-Antikörpern induziert. Eigene Untersuchungen an 2 vakzinierten Hunden haben gezeigt, dass 10 Tage nach der vorgeschriebenen Booster-Injektion im IFAT nachweisbare Antikörper auftraten, deren Konzentrationen jenen bei natürlichen Infektionen entsprachen. Diese Antikörper persistierten während einiger Monate (Abb. 1). Anamnestische Angaben über die Impfung sind daher für die Interpretation serologischer Befunde in der Routinediagnostik unerlässlich.

Toxoplasmose

Die parasitologische Diagnose der patenten enteralen *Toxoplasma*-Infektion der Katze ist durch den koprologischen Nachweis von Oozysten möglich. Die Oozystenausscheidung dauert nach Erstinfektion 3–20 Tage (Abb. 2). Gelegentlich werden Oozysten aber auch nach Reinfektionen oder bei Schwächung der Tiere ausgeschieden. Gründe dafür sind andere Erkrankungen oder wiederholte Verabfolgung von Glucocorticoiden.
Bei Zwischenwirten können Toxoplasmen (z. B. aus Punktat- oder Biopsiematerial) intraperitoneal in Mäusen (Mäuseinokulationstest) vermehrt und 3–6 Wochen nach

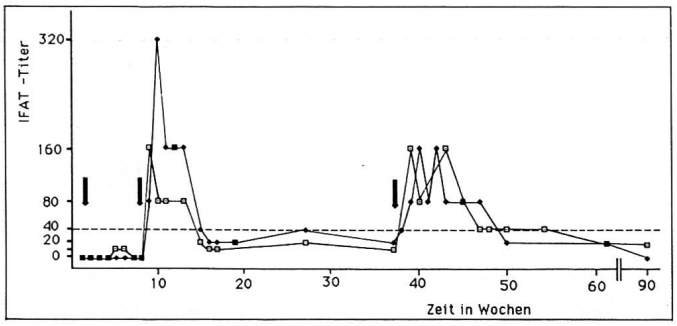

Abb. 1: Antikörpernachweis im IFAT nach Immunisierung von zwei Hunden (Nr. 1 ✦–✦, Nr. 2 ⊡–⊡) mit der Pirodog®-Vakzine. Die Linie (----) bei Titerstufe 1/40 stellt die Nachweisgrenze von spezifischen Antikörpern gegen *Babesia canis* dar. Die Pfeile bezeichnen die Zeitpunkte der Vakzination.

der Infektion mit diesem Nachweisverfahren erfasst werden. Die in jüngster Zeit entwickelte in vitro-Kultivierungsmethode hat eine vergleichbare diagnostische Sensitivität wie der Mäuseinokulationstest, kann aber schon nach 5 Tagen abgelesen werden. Mit beiden Verfahren konnten *Derouin* et al. (1987) in 73% bis 100% der Fälle zwischen 30 und 100 *Toxoplasma*-Organismen aus experimentell infizierten Mäusen erfassen.
Für den Nachweis spezifischer Antikörper (zumeist IgG) wurden sehr viele Testsysteme zur Untersuchung von Katze, Hund, Schaf, Ziege, Schwein, Rind, Pferd und andern Säugetier-Arten eingesetzt (Lit. bei *Dubey*, 1985; 1985a; 1986; 1986a; 1986b; 1987). Wir möchten in diesem Rahmen nur einige wichtige Verfahren erwähnen: Der Sabin-Feldman-Test (SFT) (*Sabin* und *Feldman*, 1948) hat eine sehr gute diagnostische Sensitivität und Spezifität und gilt noch heute in der Humanmedizin als Referenztest. Diese aufwendige Methode, bei der lebende Toxoplasmen verwendet werden, kann bei allen Haus- und Nutztieren ausser dem Rind (*Dubey* et al., 1985) eingesetzt werden. Zusätzlich zum SFT sind heute der IFAT, der direkte Agglutinations-Test (DAT) sowie der ELISA die Testverfahren der Wahl für die Routineserologie. Eine serologische Untersuchung von Tieren auf Antikörper ist dann indiziert, wenn abgeklärt werden soll, ob klinische Erscheinungen – z. B. Neuropathie, Pneumonie oder Abort – ätiologisch mit Toxoplasmose im Zusammenhang stehen. Da ein hoher Prozentsatz unserer «gesunden» Haustiere im Serum spezifische Antikörper gegen *Toxoplasma* aufweist, können serologische Resultate bei Einzeluntersuchung in der Regel nicht interpretiert werden. Aus diesem Grunde ist eine zweite Untersuchung nach 2–3 Wochen zum Nachweis eines Anstieges der Antikörperkonzentration notwendig. Ein Anstieg ist ein Indikator für eine akute Infektion (ein diagnostischer Nachweis von parasiten-spezifischem JgM bei Tieren hat bisher die Praxisreife noch nicht erlangt).
Bei Katzen traten im ELISA feststellbare, gegen *Toxoplasma*-Antigen gerichtete Antikörper frühestens 8–28 Tage nach Erstinfektion auf, je nachdem, ob die Infektion mit Zysten aus Fleisch oder mit sporulierten Oozysten aus Katzenkot erfolgt ist (*Linek*, 1985) (Abb. 2). Danach können die Antikörperkonzentrationen flach abfallen, über Jahre persistieren und bei Reinfektion oder Reaktivierung wiederum ansteigen. Da die Ausscheidung von Oozysten und der Nachweis signifikanter Antikörperkonzentrationen zeitlich nicht immer übereinstimmen, wie das Beispiel in Abb. 2 zeigt, ist die Serologie bei der Katze nicht zur Erfassung von Oozystenausscheidern geeignet. Um das von der

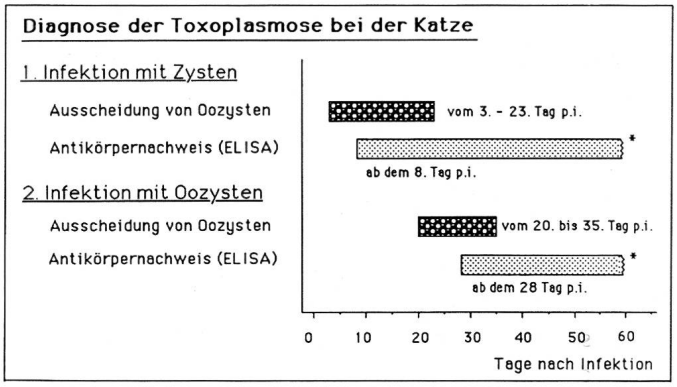

Abb. 2: Daten nach *Linek* (1985)
* Antikörper persistieren über Jahre nach Infektion (p. i.)

Katze ausgehende Infektionsrisiko für den Menschen – insbesondere für schwangere Frauen, Kinder und immunologisch beeinträchtigten Menschen – abschätzen zu können, empfehlen wir im allgemeinen folgendes Vorgehen:

a) *Oozystenausscheider:* Katze stellt ein Infektionsrisiko dar und muss für 3–4 Wochen isoliert und überwacht werden.
b) *Antikörpernachweis ist positiv:* Wenn in 4 koprologischen Untersuchungen im Abstand von einer Woche im Kot keine Oozysten nachgewiesen werden, stellt die Katze mit hoher Wahrscheinlichkeit keine Infektionsquelle dar. Besondere Massnahmen erübrigen sich.
c) *Antikörpernachweis ist negativ:* Katze kann bereits mit *Toxoplasmen* infiziert sein oder sie hatte noch keinen Erregerkontakt und ist daher empfänglich (Abb. 2). Wenn wiederum bei 4 Kotuntersuchungen keine Oozysten gefunden werden und in dieser Zeit eine Infektion auszuschliessen ist, wird die Katze als *Toxoplasma*-frei beurteilt. Folgende vorbeugende Massnahmen schützen die Katze vor einer Infektion: Haltung in der Wohnung, Unterbindung der Jagd auf Nager, Verfüttern von gekochtem Fleisch oder von Dosen- und Trockenfutter. Die prophylaktische Verabreichung von Toltrazuril (Baycox®) in einer Tagesdosis von 5–10 mg pro kg Körpergewicht verhinderte bei 18 von 20 mit Oozysten infizierten Katzen die Oozystenausscheidung (*Rommel* et al., 1987). Dieses Verfahren ist zurzeit aber noch nicht praxisreif.

Taeniose/Zystizerkose

In Mitteleuropa ist die Zystizerkose des Rindes, verursacht durch Finnen von *Taenia saginata*, von praktischer Bedeutung, in vielen Ländern zusätzlich oder überwiegend auch die durch *T. ovis* verursachte Zystizerkose des Schafes. Als Grundlage für Bekämpfungsmassnahmen wäre hier die Erfassung befallener Bestände mit Hilfe serologischer Methoden sinnvoll und notwendig.

In experimentellen Arbeiten konnte *Harrison* und *Sewell* (1981) 2–3 Wochen nach künstlicher Infektion von Rindern mit *T. saginata*-Eiern Antikörper während einer Zeit von 30 Wochen nachweisen. Leider haben aber die bisher entwickelten Methoden zum Antikörpernachweis keine genügende diagnostische Sensitivität und Spezifität. Bei Rindern mit insgesamt weniger als 100 Zystizerken pro Tier war es zu keinem Zeitpunkt der Infektion möglich, den Befall serologisch zu bestätigen (*Geerts* et al., 1981). Bei der Prüfung der Spezifität mit verschiedenen Methoden gelang es *Craig* und *Rickard* (1980) und *Geerts* et al. (1981a) nicht, andere Zestoden-Arten, *Fasciola hepatica* oder Magen-Darm-Nematoden von einem Befall mit Finnen von *T. saginata* zu unterscheiden. Bei der Zystizerkose des Schafes bestehen ähnliche Schwierigkeiten. Massive Spezifitätsprobleme traten beim Nachweis von Antikörpern gegen Finnen von *T. hydatigena (Cysticercus tenuicollis)* bei infizierten Lämmern auf, bei denen keine Diskriminierung zwischen infizierten und nicht infizierten Tieren möglich war (*Hackett* et al., 1981). In derselben Studie betrug die diagnostische Sensitivität nur 32%. Bei Zystizerkose des Menschen, die durch Finnen von *Taenia solium* verursacht wird, sind in 75% der Fälle im ELISA Antikörper im Serum nachweisbar. Mit Hilfe neuer Methoden (Western-Blot) gelingt in solchen Fällen die Spezifitätsabklärung mit einem hohen Grad diagnostischer Sicherheit (*Gottstein* et al., 1987; *Tsang* et al., 1989).

Im Gegensatz zur unbefriedigenden Situation bei der serologischen Untersuchung von Zwischenwirten, hat der Antikörpernachweis bei infizierten Endwirten bisher zu erstaunlich guten Ergebnissen geführt. Spezifische Antikörper gegen adulte *Taenia* spp. konnten mittels ELISA bereits 4 Wochen nach der Infektion von Hunden nachgewiesen werden und verschwanden wieder 4 Wochen nach Therapie (*Jenkins* et al., 1985; 1986). Hohe Antikörperkonzentrationen korrelierten mit einer über lange Zeit persistierenden Infektion, jedoch nicht mit der Befallsstärke (*Heath* et al., 1985). Die Spezifität war in dem Sinne gut, dass zum Teil verschiedene *Taenia*-Arten unterschieden werden konnten. Bei dieser aussichtsreichen Methode muss noch geprüft werden, ob auch schwache *Taenia*-Infektionen mit ausreichender Sicherheit erfasst und vom Befall mit anderen Zestoden differenziert werden können. Dies wäre insbesondere für die Differentialdiagnose des *Taenia*- und

Echinococcus-Befalles von Interesse. Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Diagnose des Zestoden-Befalles von Kleintieren bietet der Nachweis von Koproantigenen.

Diagnostischer Nachweis von Parasitenantigenen

Im Gegensatz zur Feststellung von Antikörpern, die noch lange nach Elimination des Parasiten persistieren können, ist der Nachweis von Parasitenantigen meistens direkt von der Präsenz des Erregers abhängig. Antigene können deshalb bereits während der akuten Phase der Infektion, wenn Antikörper noch nicht gebildet worden sind, festgestellt werden. Von Bedeutung ist in der Humanserologie der Nachweis von zirkulierendem *Toxoplasma*-Antigen, um frische Infektionen zu erkennen (*van Knapen*, 1977; *Hassl* et al., 1985). Insbesondere intestinale Parasitosen, bei denen der Nachweis von Serumantikörpern oft versagt, könnten durch Erfassen von Parasitenantigenen im Kot diagnostiziert werden. Solche Tests haben bei der Amöbiose und der Giardiose (*Grundy*, 1982; *Ungar* et al., 1984; *Ungar* et al., 1985; *Baumann* und *Gottstein*, 1987) bereits praktische Bedeutung erlangt. Erste Untersuchungen an Hunden mit experimentellen *T. hydatigena*-Infektionen ergaben, dass Koproantigene bereits innerhalb der Präpatenz und auch während der Patenz bei allen 6 infizierten Hunden nachzuweisen waren. Nach Elimination der Parasiten durch Chemotherapie verschwand das Antigen innerhalb von 5 Tagen (*Deplazes* et al., in Vorbereitung). Dieses Verfahren wird zurzeit in weiteren Versuchen auf seine Brauchbarkeit in der Praxis geprüft.

Für den Antigennachweis sind verschiedene Methoden erprobt worden wie Gegenstromelektrophorese und vor allem ELISA. Das letztgenannte Verfahren beruht im wesentlichen darauf, dass an einer festen Phase gebundene mono- oder polyklonale Antikörper die Parasitenantigene aus dem aufgearbeiteten Serum, Harn, Kot oder Punktionsmaterial binden. In einem weiteren Schritt wird die primäre Immunreaktion mittels eines enzymmarkierten mono- oder polyklonalen Antikörpers (Konjugat) und dem entsprechenden chromogenen Substrat sichtbar gemacht. Mit der Produktion monoklonaler Antikörper konnten die methodische Sensitivität und die Spezifität solcher Verfahren stark verbessert werden. Die diagnostische Sensitivität ist vom konstanten Vorhandensein einer nachweisbaren Antigenkonzentration abhängig. Diese wiederum ist abhängig von der Art der Antigenfreisetzung, der Parasitenmasse, der Stoffwechselaktivität und dem Entwicklungsgrad sowie auch vom biologischen Verhalten des Parasiten (z. B. intra- oder extrazellulärer Aufenthalt oder Vermehrung).

Ein einfach konzipierter ELISA zum Antigennachweis hat den grossen Vorteil, dass er unabhängig von teuren Apparaturen auch dezentralisiert in der Praxis mit kurzem Zeitaufwand durchgeführt werden kann. Käufliche Schnelltests werden in den USA zur Diagnose der dort sehr verbreiteten Dirofilariose des Hundes angeboten. In Zukunft dürften solche käufliche Tests die Diagnose von weiteren Infektionskrankheiten in der Praxis wesentlich erleichtern.

Dirofilariose

Dirofilaria immitis, der Herzwurm des Hundes, ist vorwiegend in tropischen und subtropischen Gebieten verbreitet. Autochthone Fälle aus der Schweiz wurden bisher nicht beschrieben, wohl aber wurde am IPZ in den letzten Jahren bei einigen aus Italien (Poebene, Toscana) importierten Hunden *D. immitis* nachgewiesen.

Die adulten Dirofilarien leben in der rechten Herzkammer und in den Lungenarterien, wo die Weibchen ab 190–270 Tagen nach Infektion während 4–5 Jahren Mikrofilarien gebären können, die im Blutkreislauf zirkulieren. Zwischenwirte und Vektoren sind Stechmücken (Culex-, Aedes-, Anophelesarten), in denen sich die aufgenommenen Mikrofilarien zu Infektionslarven (3. Larven) entwikkeln, die beim Saugakt wiederum in den Hund gelangen können.

Eine patente Infektion mit *D. immitis* ist durch das Anreichern der Mikrofilarien aus dem Blut diagnostizierbar. Dabei ist oft eine genaue Differenzierung der Mikrofilarien von *D. immitis* von der harmlosen Hautfilarienart *Dipetalonema reconditum* nötig (*Whiteley*, 1988; *Rawlings*, 1986). Ein Problem ist, dass bei 10–67% der mit adulten *D. immitis* befallenen Hunde keine Mikrofilarien nachweisbar sind (okkulte Infektion), was die Diagnose erschwert (*Otto*, 1977; *Wong* et al., 1973).

Mit dem Ziel, Dirofilarien während der Präpatenz und auch okkulte Infektionen zu erfassen, wurden immundiagnostische Methoden entwickelt. Der Nachweis spezifischer Antikörper gegen Mikrofilarien gelang *Wong* und *Suter* (1979) im IFAT. Weitere Verfahren, wie zum Beispiel der ELISA (*Weil* und *Ottesen, 1981; Grieve* et al., 1981), konnten mit Erfolg zur Serodiagnose auch der okkulten Dirofilariose eingesetzt werden. Nach *Rawlings* (1986) reicht aber die Spezifität der bisher entwickelten ELISA für den routinemässigen Einsatz nicht aus.

Weil et al. (1984) wiesen mit der Gegenstromelektrophorese zirkulierende Antigene von adulten Dirofilarien im Serum von Hunden, 6½–8½ Monate nach künstlicher Infektion, nach. Ein grosser Fortschritt beim Antigennachweis war der Einsatz eines ELISA unter Verwendung spezifischer monoklonaler Antikörper. Mit einem solchen Verfahren konnten *Weil* et al. (1985) Infektionen mit *D. reconditum* mit Sicherheit ausschliessen. Die mit diesem ELISA gemessenen Antigenkonzentrationen korrelierten signifikant positiv mit der nach Autopsie der befallenen Hunde nachgewiesenen Anzahl der weiblichen Dirofilarien.

In den USA sind verschiedene käufliche Schnelltests zur *D. immitis*-Diagnose im Handel (Übersicht der Präparate siehe bei *Whiteley*, 1988). Am IPZ wird die Routinediagnostik der Dirofilariose mit dem Difil-Test (Evsco Pharmaceuticals, Buena/USA), einem Anreicherungsverfahren zum Nachweis von Mikrofilarien, und mit dem Antigennachweistest «Dirochek®» (Symbiotics Corp., USA) durchgeführt. Untersuchungen von *Atwell* et al. (1988) zeigten, dass der letztgenannte Test, angewandt bei natürlich infizierten Hunden in Australien, eine Spezifität von 95,9% und eine Sensitivität von 73,1% hat. Gründe für die

Tab. 2: Praktische Hinweise zur Labor-Diagnose ausgewählter Parasitosen des Hundes

Parasitose	Indikation	Diagnoseverfahren	Untersuchungsmaterial
Leishmaniose (Leishmania (L.) infantum und andere spp)	klinische Erkrankung, nach Aufenthalt im Endemiegebiet	*Serologie:* ELISA und weitere Abklärungen mit Western-Blot	Serum (1 ml), antikoaguliertes Blut oder Vollblut (2–4 ml)
		Erregernachweis:*	
		a) Giemsafärbung (intrazelluläre Stadien)	Lymphknoten- und Knochenmarkpunktat ausgestrichen auf Objektträger
		b) in vitro-Anzüchtung von promastigoten Stadien	Lymphknoten- und Knochenmarkpunktat, unmittelbar nach Entnahme in Kulturmedium* geben
Babesiose (Babesia canis B. gibsoni)	akute Infektion, nach Aufenthalt im Endemiegebiet	*Erregernachweis:* Giemsafärbung	mindestens 3 Kapillarblut-Ausstriche oder antikoaguliertes Blut
	subakut-chonische oder latente Infektion	*Serologie:* IFAT	Serum (1 ml), antikoaguliertes Blut oder Vollblut (2–4 ml)
Toxoplasmose (Toxoplasma gondii)	akute oder aktive Infektion	*Serologie:* ELISA oder DAT	2 Serumproben (1 ml) oder Vollblut (2–4 ml) im Abstand von 2–3 Wochen
Dirofilariose (Dirofilaria immitis)	klinische Erkrankung, nach Aufenthalt im Endemiegebiet	Sowohl Methode a) wie auch b) gleichzeitig anwenden	
	Nachweis von adulten Filarien	a) *Serologie:* Nachweis von zirkulierendem Antigen adulter Dirofilarien (Dirochek®)	Serum (1 ml), antikoaguliertes Blut oder Vollblut (2–4 ml)
	Nachweis von Mikrofilarien	b) Nachweis von Mikrofilarien mit Anreicherungsverfahren (Difil-Test®)	antikoaguliertes Blut (3–6 ml)

* mit Speziallabor Vorgehen vereinbaren, Kulturmedium kann beim Institut für Parasitologie der Universität Zürich angefordert werden.

Tab. 3: Praktische Hinweise zur Labor-Diagnose ausgewählter Parasitosen des Pferdes und der Wiederkäuer

Parasitose	Indikation	Diagnoseverfahren	Untersuchungsmaterial
Babesiose: Pferd (B. equi, B. caballi)	akute, klinische Infektion	*Erregernachweis:* Giemsafärbung	3–5 Kapillarblut-Ausstriche oder antikoaguliertes Blut (2–4 ml)
	subakute-chronische oder latente Infektion	*Serologie:* KBR, IFAT	Serum (3–6 ml)
	Export nach USA, Kanada, Australien und Japan	*Serologie:* KBR* (2–3 Wochen vor Export)	Serum (3–6 ml)
Trypanosomose: Pferd Beschälseuche, Dourine *(Trypanosoma equiperdum)*	Export nach Italien und Japan	*Serologie:* KBR (2–3 Wochen vor Export)	Serum (3–6 ml)
Babesiose: Rind (Babesia divergens B. major, B. bovis	akute, klinische Infektion	*Erregernachweis:* Giemsafärbung	3–5 Kapillarblut-Ausstriche oder antikoaguliertes Blut (2–4 ml)
	subakute-chronische oder latente Infektion	*Serologie:* IFAT, ELISA	Serum (3–6 ml)
Toxoplasmose: Wiederkäuer (Toxoplasma gondii)	klinische Erkrankung Aborte, subklinischer Befall	*Serologie:* ELISA, IFAT, DAT (weitere Spezialuntersuchungen)	Serum (3–6 ml) (mit Speziallabor Vorgehen vereinbaren)

* Zur sicheren Erfassung eines latenten Befalles mit Babesien wird die kombinierte Anwendung von KBR und IFAT empfohlen, obwohl von den Importländern nur die KBR vorgeschrieben wird.

falsch negativen Resultate waren geringe Befallstärke oder okkulte Infektionen, bei denen nur in 53,3% der Fälle zirkulierende Antigene nachgewiesen werden konnten.

DNA-TECHNOLOGIEN ZUM NACHWEIS VON PARASITEN

Die im Verlaufe der letzten Jahre für parasitologische Fragestellungen adaptierten molekularbiologischen Technologien finden langsam ihren Weg in die Praxis. Der Diagnostiker kann zukünftig immer mehr damit rechnen, dass herkömmliche Diagnostiktests durch den Nachweis von Parasiten-DNA oder einzelner spezifischer DNA-Sequenzen ergänzt werden. Das Klonieren von Parasitengenen oder Genfragmenten kann auch dazu eingesetzt werden, neue diagnostische «Werkzeuge» zu synthetisieren, z. B. rekombinante und immunodiagnostisch verwendbare Antigene. Eine Einführung in die Grundlagen und Methoden der Molekularbiologie sowie deren Bedeutung in der Veterinärmedizin ist in einer früheren Serie dieser Zeitschrift publiziert worden (*Gassmann* et al., 1987; *Hübscher*, 1987; 1987a). Wir möchten daher in diesem Abschnitt nur spezielle Aspekte parasitologischer Fragestellungen erörtern.

Klonierte DNA als diagnostische Hybridisierungsprobe

Die Entwicklungen, vor allem auf dem Gebiet der diagnostischen Virologie, haben gezeigt, dass sogenannte DNA-Proben als diagnostische Werkzeuge zum Nachweis von

Erregern geeignet sind. Damit ähnliche Proben für die Parasitologie zur Verfügung gestellt werden können, sind geeignete DNA-Sequenzen verschiedener Parasitenarten zuerst zu identifizieren und zu klonieren. Diese DNA-Sequenzen müssen bestimmten Anforderungen gerecht werden, d. h. sie müssen spezies-spezifisch sein, falls eine Artdiagnose angestrebt wird, oder sie sollten in einer grossen Anzahl von Kopien pro Parasitengenom vorliegen, falls ein sehr empfindlicher Nachweis das Ziel ist. Ein solches identifiziertes DNA-Stück wird in den meisten Fällen mittels Plasmiden in Bakterien vermehrt, anschliessend gereinigt und markiert, damit das DNA-Fragment als diagnostische Probe eingesetzt werden kann. Das Standardverfahren war bis vor kurzem die radioaktive Markierung durch den Einbau von [P32]-Nukleotiden («nick-translation»] (siehe auch *Hübscher*, 1987). In neuerer Zeit entwickelte alternative Markierungsmethoden basieren meistens auf der Verwendung von Enzymen als Markierungsmoleküle. Der Nachweis von Parasiten-DNA geschieht dann mittels einer DNA-Probe, an die vorgängig Biotin gekoppelt worden ist. Dies wird durch eine sogenannte Photobiotinylierung oder durch den Einbau eines Biotin-dUTP-Komplexes durchgeführt. Ein an Streptavidin gebundenes Enzym vermag nun mittels einer chromogenen Substratlösung die mit dem Parasitengenom hybridisierte DNA-Proben sichtbar zu machen. Gegenwärtig wird ein weiteres Verfahren angeboten, bei dem ein kleinmolekulares Hapten an die DNA-Probe gebunden wird; die Visualisierung der Hybridisierung geschieht durch Zugabe eines enzymmarkierten Antikörpers und der entsprechenden chromogenen Substratlösung. Biotin- und haptenmarkierte DNA-Proben weisen den grossen Vorteil auf, in grossen Mengen über sehr lange Zeit (Jahre) gefroren gelagert werden zu können; sie eignen sich dementsprechend gut für diagnostische Routineverfahren. Wie bereits oben erwähnt, wird eine gute diagnostische Sensitivität bei Verwendung einer DNA-Probe dann erhalten, wenn die gefragte DNA-Sequenz im Untersuchungsmaterial in möglichst vielen Kopien vorhanden ist. Aus diesem Grunde hat sich die Suche nach diagnostischen DNA-Proben auf hochrepetitive Sequenzen im Parasitengenom konzentriert. Dabei sind in letzter Zeit diagnostische DNA-Proben für verschiedene Parasiten, vor allem für Protozoen, beschrieben worden. Bei der Leishmaniose wurden diverse spezifische DNA-Sequenzen aus genomischer DNA (*Kennedy*, 1984) und aus Kinetoplast-DNA der Erreger (*Lawrie* et al., 1985; *Jackson* et al., 1986) kloniert und in Feldversuchen evaluiert. Leishmanien-DNA konnte sowohl in Geweben von infizierten Tieren als auch in Vektoren (Schmetterlingsmücken) nachgewiesen werden. Hochspezifische und sensitive, repetitive DNA-Sequenzen können zum Nachweis von Malariaerregern (*Barker* et al., 1986; *Zolg* et al., 1987; *Holmberg* et al., 1987), Filarien (*Sim* et al., 1986; *Erttmann* et al., 1987) und Schistosomen (*Rollinson* et al., 1986) Verwendung finden.

Ein wesentlicher technologischer Durchbruch ist durch die Entwicklung eines Verfahrens gelungen, mit dem einzelne Genfragmente im Untersuchungsmaterial bis zum 100 000fachen amplifiziert wurden (sogenannte «polymerase chain reaction») (*Saiki* et al., 1985; *Scharf* et al., 1986; *de Bruijn*, 1988). Diese Technik ermöglicht es, auch nichtrepetitive DNA-Sequenzen als diagnostische Genombereiche der Parasiten zu verwenden. Es befinden sich bereits Apparaturen im Handel, mit denen in kurzer Zeit Genamplifikationen mit grossen Probenzahlen möglich sind. Offen bleibt jedoch immer noch die wichtigste Aufgabe, nämlich geeignete Genabschnitte in Parasitengenomen zu identifizieren.

Rekombinante Parasitenantigene

Spezifische Antigene für die Immundiagnostik von Parasitosen werden herkömmlicherweise mittels immunchemischer Techniken aus Gewebe oder aus metabolischen Produkten der Parasiten gewonnen und gereinigt. Eine vielversprechende Alternative besteht in der Möglichkeit, die für solche Antigene kodierenden Gene zu klonieren und die entsprechenden Antigene als «rekombinante Antigene» in Bakterien zu synthetisieren. Zur Verfügung steht heute eine Vielzahl von Expressions-Vektoren, mit denen die Genprodukte in Form verschiedener Fusionsproteine gewonnen werden können. Ein bekanntes System ist die Verwendung des Expressionsphagen λgt 11, bei dem die synthetisierten Parasitenantigene an bakterielle β-Galaktosidase gebunden sind. Solche Fusionsproteine eignen sich gut für Grundlagenarbeiten, sind jedoch für immundiagnostische Zwecke nur beschränkt brauchbar. Gründe dafür sind anti-β-Galaktosidase-Antikörper, die natürlicherweise in den Seren von etwa 20% der schweizerischen Blutspender/innen sowie auch in Haus- und Wildtierseren vorkommen, und so Anlass zu falsch-positiven serologischen Reaktionen geben.

Für immundiagnostische Zwecke werden heute vor allem Plasmide verwendet, um rekombinante Antigene zu synthetisieren. Zwei Beispiele seien hier aufgeführt: erstes ist das pVB2-Plasmid. Dieses Plasmid beherbergt ein Gen, das für das Galaktosid-Bindungsprotein (GBP) von *Escherichia coli* kodiert. GBP wird in den periplasmatischen

Raum der Bakterienzellen transportiert. Dieser pVB2-Vektor wurde zur Expression eines Genfragmentes von *Echinococcus multilocularis* verwendet (*Müller* et al., 1989). Das resultierende rekombinante, hyperexprimierte Fusionsprotein hatte einen Anteil von 50% am gesamten Zellprotein und konnte leicht aus dem Periplasma mittels osmotischem Schockverfahren in einer reinen Form gewonnen werden. Auf diese Art isolierte rekombinante Antigene sind direkt in immundiagnostischen Testverfahren (z. B. im ELISA) einsetzbar. Eine weitere Möglichkeit zur Synthese von rekombinanten Antigenen, die sich für die Immundiagnostik sehr gut eignen, wird durch die Verwendung des pAR3038-Plasmids gegeben (*Studier* und *Moffat*, 1986). Dabei gebildete rekombinante Antigene sind nur an 11 Aminosäuren vom N-Terminus eines T7-Phagen-Kapsidproteins gebunden. Diese 11 Aminosäuren sind immunologisch inert, rekombinante Antigene lassen sich ebenfalls direkt in immunologische Testverfahren einschleusen, wie dies z. B. an einem Antigen von *E. multilocularis* gezeigt werden konnte (*Müller* et al., im Druck). Die hier beschriebenen Beispiele beziehen sich auf humanmedizinische Problemstellungen; sie können aber genausogut veterinärparasitologischen Fragestellungen angepasst werden. Zu erwähnen sei, dass die bisher in der Literatur beschriebenen rekombinanten Antigene sowohl in der Human- als auch in der Veterinärparasitologie noch keinen Eingang in die Routine-Immundiagnostik gefunden haben. In unmittelbarer Zukunft ist aber mit einem Aufkommen solcher Produkte zu rechnen, sowohl im Bereiche von Protozoonosen als auch von Helminthosen von Tieren. Molekular-Parasitologen/innen hoffen, dass mittels rekombinanter DNA-Technologien einerseits DNA-Proben und rekombinante Antigene für die Diagnostik produziert und andernseits auch neue Wege zur Entwicklung und Applikation von Vakzinen gegen Parasiten beschritten werden können (*Gottstein*, 1989, im Druck).

LITERATUR

Aeschlimann A., Brossard M., Quenet G. (1975): Contribution à la connaissance des piroplasmes de Suisse. Acta Tropica *32*, 281–289. – *Arnold P., Meng E., Hagen A., Suter P. F.* (1986): Was diagnostizieren Sie? Welche Massnahmen schlagen Sie vor? Schweiz. Arch. Tierheilk. *128*, 487–488. – *Atwell R. B., Sheridan A. B., Baldock F. C.* (1988): An evaluation of the Dirochek® test for detection of *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. Aust. Vet. J. *65*, 161–162. – *Barker R. H., Suebsaeng L., Rooney W., Alecrim G. C., Dourado H. V., Wirth D. F.* (1986): Specific DNA probe for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria. Science *231*, 1434–1436. – *Baumann D., Gottstein B.* (1987): A double-antibody sandwich ELISA for the detection of *Entamoeba histolytica* antigen in stool samples of humans. Trop. Med. Parasit. *38*, 81–85. – *Berens R. L., Brun R., Krassner S. M.* (1976): A simple monophasic medium for axenic culture of hemoflagellates, J. Parasitol. *62*, 360–365. – *Bettini S., Gradoni L.* (1986): Canine leishmaniasis in the Mediterranean area and its implications for human leishmaniasis. Insect Sci. Applic. *7*, 241–245. – *Boch J.* (1985): Babesieninfektionen bei Pferd, Rind und Hund in Süddeutschland. Tierärztl. Prax. *Suppl. 1*, 3–7. – *Bourdeau P.* (1983): Eléments pratiques du diagnostic de la leishmaniose canine. Le Point Vét. *15*, 125–132. – *de Bruijn M. H. L.* (1988): Diagnostic DNA Amplification. No respite for the elusive parasite. Parasitology Today *4*, 293–295. – *Craig P. S., Rickard M. D.* (1980): Evaluation of crude antigen prepared from *Taenia saginata* for the serological diagnosis of *T. saginata* cysticercosis in cattle using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Parsitol. Res. *61*, 287–297. – *Dedet J. P., Belazzoug S.* (1985): Leishmaniasis in North Africa. In: Leishmaniasis. K. P. Chang & R. S. Bray (eds): 353–375, Elsevier/Amsterdam. – *Dennig H. K., Centurier C., Göbel E., Weiland G.* (1980): Ein Beitrag zur Babesiose des Hundes und ihrer Bedeutung in der Bundesrepublik Deutschland und Berlin-West. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. *93*, 373–379. – *Deplazes P., Gottstein B., Stingelin Y., Eckert J.* (1989): An ELISA for the detection of *Taenia hydatigena* antigens in fecal samples of dogs (in Vorbereitung). – *Derouin F., Mazeron M. C., Garin Y. J. F.* (1987): Comparative study of tissue culture and mouse inoculation methods for demonstration of *Toxoplasma gondii*. J. Cl. Microbiol. *25*, 1597–1600. – *Dubey J. P.* (1985): Serologic prevalence of toxoplasmosis in cattle, sheep, goats, pigs, bison, and elk in Montana. J. Am. Vet. Med. Assoc. *186*, 969–970. – *Dubey J. P.* (1985a): Toxoplasmosis in dogs. Can. Pract. *12*, 7–28. – *Dubey J. P.* (1986): A review of Toxoplasmosis in cattle. Vet. Parasitol. *22*, 177–202. – *Dubey J. P.* (1986a): A review of Toxoplasmosis in pigs. Vet. Parasitol. *19*, 181–223. – *Dubey J. P.* (1986b): Toxoplasmosis in cats. Fel. Pract. *16*, 12–45. – *Dubey J. P.* (1987): Toxoplasmosis in goats. Agri-Practice *3*, 43–51. – *Dubey J. P., Desmonts G. L., McDonald C., Walls K. W.* (1985): Serologic evaluation of cattle inoculated with *Toxoplasma gondii*: Comparison of Sabin-Feldman dye test and other agglutination tests. Am. J. Vet. Res. *46*, 1085–1088. – *Erttmann K. D., Unnasch T. R., Greene B. M., Albiez E. J., Boateng J., Denke A. M., Ferraroni J. J., Karam M., Schulz-Key H., Williams P. N.* (1987): A DNA sequence spe-

cific for forest form *Onchocerca volvulus*. Nature *327*, 415–417. – *Friedhoff K. T.* (1982): Die Piroplasmen der Equiden – Bedeutung für den internationalen Pferdeverkehr. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. *95*, 388–374. – *Gassmann M., Hübscher U., Kuenzle C. C.* (1987): Gentechnologie und Veterinärmedizin III. Transgene Tiere: Fakten und Perspektiven. Schweiz. Arch. Tierheilk. *129*, 629–642. – *Geerts S., Kumar V., Ceulemans F., Mortelmans J.* (1981): Serodiagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis in experimentally and naturally infected cattle by enzyme linked immunosorbent assay. Res. Vet. Sci. *30*, 288–293. – *Geerts S., Kumar V., Aerts N., Ceulemans F.* (1981a): Comparative evaluation of immunoelectrophoresis, counterimmunoelectrophoresis and enzyme- linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis. Vet. Parasitol. *8*, 299–307. – *Gern L., Kindler A., Brossard M.* (1988): Annual evolution of cattle immunity against *Babesia divergens* in northern Switzerland. Prevent. Vet. Med., *6*, 9–16. – *Gothe R., Kraiss A., Kraft W.* (1987): Eine importierte Krankheit: Die *Babesia canis* und *Babesia gibsoni*-Infektion des Hundes. Kleintierpraxis *32*, 93–140. – *Gottstein B.* (1989): New technology and immunospecific ractions in helminthic diseases. Curr. Top. Inf. Dis. Clin. Microbiol. *2*, 247–254. – *Gottstein B., Deplazes P., Arnold P., Mehlitz D., Reiter I., Eckert J.* (1988): Immundiagnose der Leishmaniose des Hundes mit ELISA und Mini-Western-Blot. Schweiz. Arch. Tierheilk. *130*, 249–262. – *Gottstein B., Zini D., Schantz P. M.* (1987): Species-specific immunodiagnosis of *Taenia solium* cysticercosis by ELISA and immunoblotting. Trop. Med. Parasit. *38*, 299–303. – *Grieve R. B., Mika-Johnson M., Jacobson R. H., Cypess R. H.* (1981): Enzyme-linked immunosorbent assay for measurment of antibody responses to *Dirofilaria immitis* in experimentally infected dogs. Am. J. Vet. Res. *42*, 66–69. – *Grundy M. S.* (1982): Preliminary observations using a multi-layer ELISA method for the detection of *Entamoeba histolytica* trophozoite antigen in stool samples. Trans. Roy. Soc. Trop. *76*, 396–400. – *Hackett F., Willis J. M., Herbert I. V., Edwards G. T.* (1981): Micro ELISA and indirect haemagglutination tests in the diagnosis of *Taenia hydatigena* metacestode infections in lambs. Vet. Parasitol. *8*, 137–142. – *Harrison L. J. S., Sewell M. M. H.* (1981): Antibody levels in cattle naturally infected with *Taenia saginata* metacestodes in Britain. Res. Vet. Sci. *31*, 62–64. – *Hassl A., Auer H., Picher O., Aspöck H.* (1985): Experimentelle Untersuchungen über das Auftreten von zirkulierendem Antigen nach Infektion mit *Toxoplasma gondii*. Tropenmed. Parasitol., *7*, 157–160. – *Heath D. D., Lawrence S. B., Glennie A., Twaalhoven H.* (1985): The use of excretory and secretory antigens of the scolex of *Taenia ovis* for the serodiagnosis of infection in dogs. J. Parasitol. *71*, 192–199. – *Heidrich-Joswig S.* (1982): Vergleichende Untersuchung von Antikörper-Titern sowie der Immunglobuline IgM und IgG während einer *Babesia equi* Infektion. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. *95*, 439–442. – *Hermann M., Baumann D., Weiland G., von Salis B.* (1987): Erstmalige Feststellung von equiner Babesiose als Bestandsproblem in der Schweiz. Pferdeheilkunde *3*, 17–24. – *Holmberg M., Shenton F. C., Franzen L., Janneh K., Snow R. W., Petterson U., Wigzell H., Greenwood B. M.* (1987): Use of a DNA hybridization assay for the detection of *Plasmodium falciparum* in field trials. Am. J. Trop. Med. Hyg. *37*, 230–234. – *Hommel M., Peters W., Ranque J., Quilici M., Lanotte G.* (1978): The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. Ann. Trop. Med. Parasitol. *72*, 213–218. – *Hübscher U.* (1987): Gentechnologie und Veterinärmedizin I. Generelles Prinzip und praktische Anwendungsbeispiele. Schweiz. Arch. Tierheilk. *129*, 513–528. – *Hübscher U.* (1987a): Gentechnologie und Veterinärmedizin II. Gentechnisch hergestellte Vakzinen und Analyse hochvariabler DNA-Abschnitte. Schweiz. Arch. Tierheilk. *129*, 553–564. – *Jackson P. R., Lawrie J. M., Stiteler J. M., Hawkins D. W., Wohlhieter J. A., Rowton E. D.* (1986): Detection and characterization of *Leishmania* species and strains from mammals and vectors by hybridisation and restriction endonuclease digestion of kinetoplast DNA. Vet. Parasitol. *20*, 195–215. – *Jenkins D. J., Rickard M. D.* (1985): Specific antibody response to *Taenia hydatigena, Taenia pisiformis* and *Echinococcus granulosus* infection in dogs. Aust. Vet. J. *62*, 72–78. – *Jenkins D. J., Rickard M. D.* (1986): Specificity of scolex and oncosphere antigens for the serological diagnosis of taeniid cestode infections in dogs. Aust. Vet. J. *63*, 40–42. – *Kammermann-Lüscher B.* (1980): Leishmaniose beim Hund. Schweiz. Arch. Tierheilk. *122*, 585–603. – *Kennedy W. P. K.* (1984): Novel identification of differences in the kinetoplast DNA of *Leishmania* isolates by recombinant DNA techniques and in situ hybridisation. Mol. Biochem. Parasitol. *12*, 313–325. – *van Knapen F., Panggabean S. O.* (1977): Detection of circulating antigen during acute infections with *Toxoplasma gondii* by enzyme-linked immunosorbent assay. J. Cl. Microbiol. *6* (6), 545–547. – *Lawrie J. M., Jackson P. R., Stiteler J. M., Hockmeyer W. T.* (1985): Identification of pathogenic *Leishmania* promastigotes by DNA: DNA hybridization with kinetoplast DNA cloned into *E. coli* plasmids. Am. J. Trop. Med. Hyg. *34*, 257–265. – *Leary J. J., Brigati D. J., Ward D. C.* (1983): Rapid and sen-

sitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *80*, 4045–4049. – *Linek M.* (1985): Verlauf der Antikörper im Serum von Katzen nach experimentellen Infektionen mit *Toxoplasma gondii* und *Hammondia hammondii*. Vet. med. Diss., Hannover. – *Mancianti F., Gramiccia M., Gradoni L., Pieri S.* (1988): Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. *82*, 566–567. – *Martinod S., Laurent N., Moreau Y.* (1986): Resistance and immunity of dogs against *Babesia canis* in an endemic area. Vet. Parasitol., *19*, 245–254. – *Moreau Y., Laurent N.* (1984): Antibabesial vaccination using antigens from cell culture fluids: industrial requirements, in Malaria and babesiosis (eds. Ristic M. et al.), Dordrecht, Boston, Lancaster, Martinus Nijhoff Publishers 129–140. – *Müller N., Gottstein B., Vogel M., Flury K., Seebeck T.* (1989): Application of a recombinant Echinococcus multilocularis antigen in an ELISA for immunodiagnosis of human alveolar echinococcosis. Mol. Biochem. Parasitol. (im Druck). – *Müller N., Vogel M., Gottstein B., Scholle A., Seebeck T.* (1989): Plasmid vector for overproduction and export of recombinant protein in *Escherichia coli*: efficient one-step purification of a recombinant antigen from *Echinococcus multilocularis* (Cestoda). Gene, *75*, 329–334. – *Otto G. F.* (1977): The significance of microfilaria in the diagnosis of heartworm infection. (Veterinary Medicine Publishing Bonner Springs. Kan), Proc Heartworm Symp. *77*, 23–30. – *Pospischil A., Fiebiger I., Krampitz H. E., Weiland G.* (1987): Experimentelle Infektion mit Leishmanien beim Hund: Klinische, pathologische, parasitologische und serologische Befunde. J. Vet. Med. B. *34*, 288–304. – *Rawlings C. A.* (1986): Hartworm disease in dogs and cats. (ed: D. Pederson), Philadelphia, W. B. Saunders Company. – *Reiter I., Kretzschmar A., Boch J., Krampitz H.* (1985): Zur Leishmaniose des Hundes. Infektionsverlauf, Diagnose und Therapieversuche nach exp. Infektion von Beagles mit *Leishmania donovani* (St. Kalkutta). Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. *98*, 40–44. – *Reusch C., Reiter I.* (1987): Die importierte Hundeleishmaniose: Erfahrungen zu Klinik, Diagnostik und Therapie mit Na-Stibogluconat (Pentostam®). Tierärztl. Prax. *15*, 305–310. – *Rollinson D., Walker T. K., Simpson A. J. G.* (1986): The application of recombinant DNA technology to problems of helminth identification. Parasitol. *91*, S53–S71. – *Rommel M., Schnieder T., Krause H. D., Westerhoff J.* (1987): Versuche zur Unterdrückung der Bildung von Oozysten und Zysten von *Toxoplasma gondii* in Katzen durch Medikation des Futters mit Toltrazuril. Vet. med. Nachr. *2*, 141–153. – *Sabin A. B., Feldman H. A.* (1948): Dye tests as microchemical indicatores of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite *(Toxoplasma)*. Science, *108*, 660–663. – *Saiki R. K., Scharf S. J., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Arnheim N.* (1985): Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science *230*, 1350–1354. – *Scharf S. J., Horn G. T., Erlich H. A.* (1986): Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. Science *233*, 1076–1078. – *Schawalder P.* (1977): Leishmaniose bei Hund und Katze. Autochthone Fälle in der Schweiz. Kleintierpraxis *22*, 237–246. – *Sim B. K. L., Piessens W. F., Wirth D. F.* (1986): A DNA probe cloned in *Escherichia coli* for the identification of *Brugia malayi*. Mol. Biochem. Parasitol. *19*, 117–123. – *Slappendel R. J.* (1988): Canine leishmaniasis – A review based on 95 cases in the Netherlands. The Vet. Quar. *10*, 1–17. – *Studier F. W., Moffat B. A.* (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high level expression of cloned genes. J. Mol. Biol. *189*, 113–130. – *Tsang V. C. W., Brand J., Boyer A. E.* (1989): An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticerosis (*Taenia solium*). J. Inf. Dis. *159*, 50–59. – *Ungar B. L. P., Yolken R. H., Quinn T. C.* (1985): Use of a monoclonal antibody in an enzyme immunoassay for the detection of *Entamoeba histolytica* in fecal specimens. Am. J. Trop. Med. Hyg. *34*, 465–472. – *Ungar B. L. P., Yolken R. H., Nash T. E., Quinn T. C.* (1984): Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Giardia lamblia* in fecal specimens. J. Inf. Dis. *149*, 90–97. – *Weil G. J., Malane M. S., Powers K. G., Slayton Blair L.* (1985): Monoclonal antibodies to parasite antigens found in the serum of *Dirofilaria immitis*-infected dogs. J. Immunol. *134*, 1185–1191. – *Weil G. J., Malane M. S., Powers K. G.* (1984): Detection of circulating parasite antigens in canine dirofilariasis by counterimmunoelectrophoresis. Am. J. Trop. Med. Hyg. *33*, 425–430. – *Weil G. J., Ottesen E. A.* (1981): *Dirofilaria immitis*: Parasite-specific humoral and cellular immune responses in experimentally infected dogs. Exp. Parasitol. *51*, 80–86. – *Weiland G.* (1982): Möglichkeiten des serologischen Nachweises von Babesieninfektionen bei Hund und Rind. Fortschritte Vet. Med. *35*, 286–289. – *Weiland G.* (1986): Species-specific serodiagnosis of equine piroplasma infections by means of complement fixation test (CFT), immunofluorescence (IIF), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Vet. Parasitol. *20*, 43–48. – *Weiland G.,*

Kratzer I. (1979): Fluoreszenz- und enzymserologische Untersuchungen zum Nachweis der latenten Hundebabesiose. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. *92*, 398–400. – *Weiland G., Reif L., Schmidt M., Boch J.* (1980): Serologische Untersuchungen zum Nachweis der *Babesia divergens*-Infektion des Rindes. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. *93*, 261–264. – *Weiland G., Aicher B. M., Boch J.* (1984): Serodiagnostik und Therapiekontrolle der Pferdepiroplasmose mit KBR und IFAT. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. *97*, 341–349. – *Whiteley H. E.* (1988): Your diagnostic protocol for *Dirofilaria immitis* infection in dogs. Vet. Med. *83*, 328–345. – *Wong M. M., Suter P. F.* (1979): Indirect fluorescent antibody test in occult dirofilariasis. Am. J. Vet. Res. *40*, 414–420. – *Wong M. M., Suter P. F., Rhode E. A., Guest M. F.* (1973): Dirofilariasis without circulating microfilariae: A problem in diagnosis. J. A. V. M. A. *163*, 133–139. – *Zolg J. W., Andrade L. E., Scott E. D.* (1987): Detection of *Plasmodium falciparum* DNA using repetitive DNA clones as species specific probes. Mol. Biochem. Parasitol. *22*, 145–151.

Mise en évidence indirecte de certains agents responsables de parasitoses animales à l'aide de méthodes immunologiques et de biologie moléculaire

Dans ce travail de synthèse on aborde les méthodes suivantes servant à mettre indirectement en évidence les agents pathogènes de certaines parasitoses animales:
Mise en évidence d'anticorps sériques au moyen d'ELISA, d'IFAT et d'autres systèmes de test lors de leishmaniose chez le chien, de babésiose chez le cheval, le bovin et le chien, et de toxoplasmose chez le chat et chez divers hôtes intermédiaires.
La spécificité de la mise en évidence d'anticorps lors de leishmaniose chez le chien peut être améliorée en ayant recours à l'examen complémentaire Western-Blot.
Des possibilités nouvelles sont offertes par les procédés de mise en évidence d'antigènes circulants dans le sérum (par ex. lors de dirofilariose chez le chien) ou étant éliminés dans les fèces (coproantigènes lors de parasitoses intestinales). Certains de ces procédés sont actuellement encore en expérimentation.
Une tendence nouvelle dans le diagnostic des parasitoses est d'avoir recours aux technologies dites de l'ADN pour une identification spécifique des agents pathogènes. L'utilisation de telles méthodes est présentée sur la base de quelques exemples.

Rilevamento indiretto di agenti patogeni in parasitosi animali scelte, tramite metodologie immunologiche e biomolecolari

In questo lavoro riassuntivo vengono presentati diversi metodi per rilevare indirettamente agenti patogeni in parasitosi animali scelte. Tramite ELISA, IFAT e altri sistemi diagnostici vengono individuati anticorpi serologici contro la leishmaniosi del cane, la babesiosi del cavallo, del bovino e del cane e la toxoplasmosi del gatto e di diversi tipi di ospiti intermedi. Nella leishmaniosi del cane è possibile migliorare la specificità del rilevamento tramite l'applicazione del Western Blot.
Ulteriori possibilità sono date da sistemi nuovi per rilevare antigeni che circolano nel siero (p. es. nella dirofilariosi del cane) o che vengono espulsi tramite le feci nel caso di parasitosi intestinali (coproantigeni). Queste ultime possibilità si trovano in parte ancora nella fase sperimentale. La novità nella diagnostica delle parasitosi è l'utilizzazione di tecnologie con il DNA per l'identificazione specifica di agenti patogeni. L'applicazione di questi metodi viene spiegata tramite alcuni esempi.

Adresse: Dr. B. Gottstein und Dr. P. Deplazes
Institut für Parasitologie der Universität Zürich
Winterthurerstrasse 266a
8057 Zürich

Manuskripteingang: 13. Februar 1989