

Diagnostische PCR in der Veterinärparasitologie : Tritrichomonose, Neosporose/Toxoplasmose, Echinokokkose/Zystizerkose

Autor(en): **Felleisen, R. / Müller, N. / Yamage, M.**

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **138 (1996)**

Heft 3

PDF erstellt am: **05.08.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-590532>

Nutzungsbedingungen

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

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

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

Haftungsausschluss

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

Diagnostische PCR in der Veterinärparasitologie: Tritrichomonose, Neosporose/Toxoplasmose, Echinokokkose/Zystizerkose

R. Felleisen, N. Müller, M. Yamage, B. Gottstein

Zusammenfassung

Die PCR findet als diagnostisches und epidemiologisches Werkzeug in der Veterinär- und Human-Parasitologie immer weitere Verbreitung. Für bestimmte parasitäre Infektionen erlaubt dieses Verfahren eine weitaus sensitivere Diagnose als konventionelle Methoden. Infektiologische Fragestellungen lassen sich unter neuen, molekular-epidemiologischen Gesichtspunkten analysieren. So kann bereits ein breites Spektrum veterinär- und humanparasitologisch relevanter Infektionen durch PCR diagnostiziert werden. In diesem Übersichtsartikel werden am Institut für Parasitologie in Bern entwickelte bzw. angewendete PCR-Verfahren zur Diagnose der Tritrichomonose, Neosporose und Toxoplasmose als Beispiele für Infektionen mit Protozoen, sowie Verfahren zur Detektion der Echinokokkose und Taeniose als Beispiele für Infektionen mit Helminthen dargestellt.

Schlüsselwörter: PCR – Diagnose – Parasit – Protozoen – Zestoden

Diagnostic PCR in veterinary parasitology: Tritrichomonosis, Neosporosis/Toxoplasmosis, Echinococcosis/Cysticercosis

The PCR is now widely introduced as a diagnostic and epidemiological tool in veterinary and human parasitology. Certain parasitic infections are detected using PCR with much higher sensitivity compared to conventional methods, and novel molecular approaches are considered for the analysis of infectiological questions. A broad spectrum of parasites relevant for veterinary and human parasitology already can be diagnosed by PCR. In the present review article, PCR-based methods developed or applied at the Institute of Parasitology in Berne for the detection of protozoan infections (Tritrichomonosis, Neosporosis, Toxoplasmosis) and helminthic infections (Echinococcosis, Taeniosis) are summarized.

Key words: PCR – diagnosis – parasite – protozoa – cestodes

Einleitung

Sowohl epidemiologische Untersuchungen als auch die Routine-Diagnostik parasitärer Infektionen hängen sehr stark von der Effizienz und Verlässlichkeit der für die Detektion und Identifikation der Parasiten eingesetzten Methoden ab. Die Etablierung der PCR als diagnostisches Werkzeug in der Veterinär- und Human-Parasitologie hat teilweise bereits zu einem Durchbruch bezüglich der diagnostischen Sensitivität geführt; bestimmte infektiologische Fragestellungen lassen sich nun unter völlig neuen Gesichtspunkten analysieren.

Im folgenden wollen wir einige ausgewählte Beispiele diagnostischer PCR-Methoden, die an unserem Institut in der veterinär- und humanparasitologischen Diagnostik und Forschung etabliert sind, darstellen. Weitere Anwendungen der PCR für den Nachweis von Parasiten sind nach entsprechender Absprache im Artikel von Mathis et al. in dieser Ausgabe beschrieben.

Tritrichomonose (R. Felleisen)

Tritrichomonas foetus verursacht die weltweit vorkommende, als Deckseuche des Rindes bekannte Tritrichomonose. Die etwa $12-17 \times 6-11 \mu\text{m}$ grossen Flagellaten aus der Familie der Trichomonadidae sind von birnenförmiger Gestalt und sind durch drei an Basalkörpern entspringende apikale Geisseln sowie eine Schleppgeissel, welche eine undulierende Membran bindet, sehr beweglich (Abbildung 1).

Beim männlichen Rind besiedeln die Tritrichomonaden die Präputialhöhle, den Penisgraben und die Harnröhre, beim weiblichen Rind Vagina und Uterus. Die Übertragung erfolgt beim Deckakt bzw. bei künstlicher Besamung durch kontaminierte Samenflüssigkeit. Die Infektion verläuft beim Bullen in der Regel ohne klinische Symptome, beim weiblichen Rind führt sie zu Vaginitis, Endometritis und häufig zur Sterilität. Nach Konzeption kommt es häufig zu Frühaborten nach 6–16 Wochen,

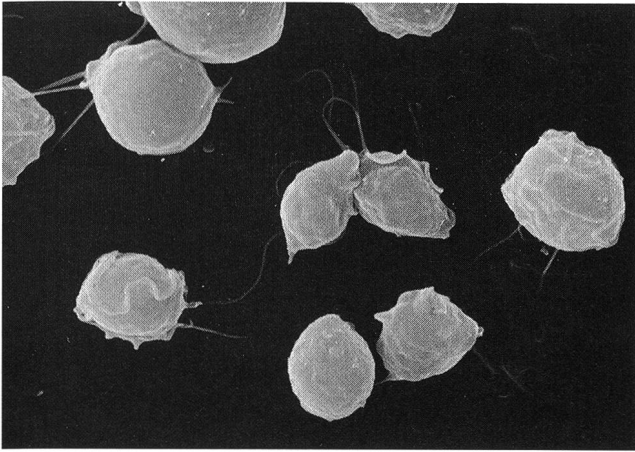


Abbildung 1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Trichomonas foetus* (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Andrew Hemphill, Institut für Parasitologie, Bern). Vergrößerung: 200fach.

seltener werden eine intrauterine Mazeration und Pyometra beobachtet. Im letzteren Fall kann normale Trächtigkeit vorgetäuscht werden. Als Komplikation treten bei weiblichen Tieren häufig bakterielle Begleitinfektionen auf.

Durch mikroskopischen Nachweis von *T. foetus* im Vitalpräparat (Dunkelfeld) bzw. im nach Giemsa gefärbten Tupfpräparat der entsprechenden Proben (abortierter Fetus, Eihaut, Fruchtwasser, Pyometra-Inhalt, Uterus oder Vagina) wird die Diagnose gesichert. Beim Bullen gelingt der direkte Nachweis der Erreger in Präputialspülproben eher selten. Hier empfiehlt sich die Kultivierung des Parasiten. In den USA hat sich hierfür der sogenannte InPouch[®] TF-Test von Biomed Diagnostics (San Jose, California) sehr gut bewährt: Kulturmedium in kleinen Plastik-Säckchen wird direkt bei der Entnahme mit den diagnostischen Proben inokuliert. Nach 24–48 h Kultivierung müssen dann die Isolate in einem modifizierten TYM oder Diamond's Medium in Glasröhrchen weiterkultiviert werden, wobei in der Regel eine Behandlung der Kulturen mit Antibiotika und Fungiziden zur Elimination von Kontaminationen notwendig ist. Als Alternative bzw. zur Bestätigung der auf der Kultivierung und morphologischen Kriterien beruhenden Diagnose wurden weiterhin immunologische (direkte Immun-Fluoreszenz, sandwich-ELISA) und molekularbiologische (PCR, s.u.) Nachweismethoden etabliert.

Im Hinblick auf die Differentialdiagnose ist von Bedeutung, dass beim Bullen und auch beim weiblichen Rind gelegentlich klinisch inapparente Infektionen mit *T. suis* beobachtet werden. Andere beim Rind vorkommende Trichomonaden sind die apathogenen Arten *Tetratrichomonas bovis* und *Pentatrichomonas bovis* (Blinddarm und Pansen) sowie *Trichomonas pavlovi* und *Trichomonas enteris* (Dickdarm).

Seit der Einführung der künstlichen Besamung ist die Trichomonose in Mitteleuropa selten geworden. Der

bis vor kurzem letzte dokumentierte Fall in der Schweiz datiert bereits über 20 Jahre zurück. 1994 wurde jedoch bei einem Stier in der Quarantänestation Ins des Schweizerischen Verbandes für künstliche Besamung (SVKB) im Verlauf der Routineuntersuchung ein Befall mit *T. foetus* festgestellt. Bei weiteren Untersuchungen wurden Trichomonaden ausserdem bei einem zweiten Stier in Ins sowie einem Jungstier in der Aufzuchtstation Langnau (LU) nachgewiesen (Schmidt, 1994). Hierdurch wurde dieser vielleicht in der Schweiz bereits etwas in Vergessenheit geratene Parasit wieder in das Bewusstsein gerückt.

Die Kultivierung von *T. foetus* ist mit hohem Aufwand an Zeit und Arbeit verbunden, und der Nachweis des Parasiten gelingt nicht in jedem Fall. Von Michael Ho und Mitarbeitern in Davis (California, USA) wurde deshalb 1994 ein PCR-Nachweistest entwickelt, welcher eine deutliche Erhöhung der Sensitivität im Vergleich zur traditionellen Kultivierungsmethode darstellt (Ho et al., 1994). Für die Amplifikation werden die beiden primers TF1 und TF2 verwendet, welche von einer 0,85 kbp *T. foetus* DNA-Sonde abgeleitet wurden. Die Nachweisgrenze bei Verwendung dieser Methode beträgt zehn Parasiten in klinischem Material (Direktnachweis, z. B. Präputialspülung) bzw. ein Parasit aus zuvor kultivierten Proben (indirekter Konfirmationstest).

Mit Hilfe dieser Methode gelang uns der Nachweis von *T. foetus* sowohl aus *in vitro*-kultiviertem als auch aus klinischem Material (Präputialspülung) bei den oben erwähnten Stieren: Die genomische DNA wurde mit Hilfe von Standardmethoden (Proteinase K-Verdauungsmethode, Brindley et al., 1993) präpariert und verschiedene

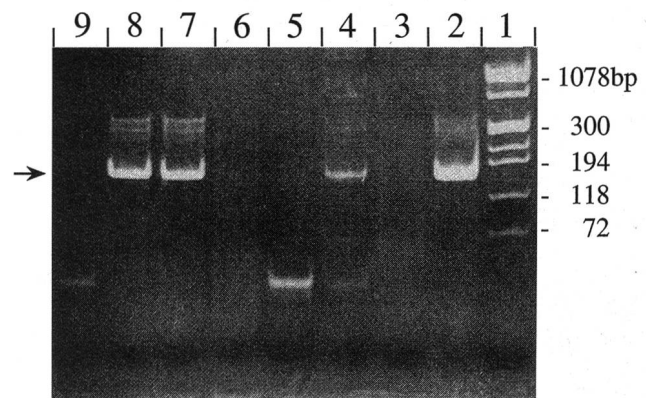


Abbildung 2: PCR-Nachweis von *Trichomonas foetus*-DNA mit Hilfe der primers TF1 und TF2. Die Amplifikate wurden auf einem 10% Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. (1) = Molekulargewichtsmarker; (2) = DNA eines Referenzstammes; (3–5) = DNA isoliert aus diagnostischem Material (Präputialspülung) in verschiedenen Verdünnungen (unverdünn, 1:10, 1:100); (6–8) die gleichen diagnostischen Proben mit Zusatz von DNA des Referenzstammes zur Inhibitionskontrolle; (9) = negative Kontrolle ohne Zusatz von DNA.

Verdünnungen der DNA in der PCR eingesetzt. Präparation der DNA, Vorbereitung der PCR-Proben, Durchführung der Amplifikation und Analyse der Amplifikationsprodukte wurden hierbei räumlich getrennt (verschiedene Laborräume), um falsch positive Resultate, z. B. infolge von Kontaminationen mit Amplifikationsprodukten aus vorangegangenen PCR-Reaktionen, zu verhindern.

Weniger in kultivierten Proben, aber sehr häufig in klinischem Material, kommt es aufgrund verschiedener in den Proben enthaltener Komponenten zur Inhibition der PCR. So können z. B. bei hohen DNA-Konzentrationen im PCR-Ansatz Wirts-DNA und genomische DNA von anderen in der Probe enthaltenen Mikroorganismen unspezifisch *primer*-Moleküle binden. Wir führen deshalb routinemässig für jede Probe eine Inhibitionskontrolle durch, d. h. jede diagnostische Probe wird parallel in Anwesenheit gereinigter genomischer DNA von *T. foetus* getestet. Ein typisches Resultat einer derartigen PCR mit klinischem Material (Präputialspülung von einem der Stiere aus Ins) ist in Abbildung 2 dargestellt. Aufgrund der geringen Grösse des Amplifikationsproduktes von 162 bp wurden die Reaktionsprodukte auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt, um eine sensitivere Detektion und Diskriminierung zu nicht eingebauten *primers* zu ermöglichen. Dieses hier gezeigte Beispiel zeigt klar die Wichtigkeit der Durchführung einer internen Positivkontrolle, da eine Amplifikation bei der unverdünnten diagnostischen Probe ausblieb, was offensichtlich auf eine Inhibition der PCR-Reaktion zurückzuführen ist. Durch Verdünnung der Probe wird diese Inhibition überwunden, und spezifische Amplifikationsprodukte sind eindeutig detektierbar. Weitere Verdünnung führt allerdings zu einem negativen Resultat.

Als Folge des erneuten Nachweises von *T. foetus* in der Schweiz wurde an unserem Institut ein durch das Bundesamt für Veterinärwesen (BVET) sowie den Schweizerischen Verband für künstliche Besamung (SVKB) finanziertes Projekt initiiert, um moderne Methoden zur art-spezifischen Identifizierung des Parasiten, v. a. durch PCR, praxisnah zu etablieren bzw. weiter zu optimieren.

Neosporose / Toxoplasmose

(N. Müller, M. Yamage)

Neospora caninum und *Toxoplasma gondii* sind Protozoen der Klasse Apicomplexa, die schwere klinische Infektionen bei Warmblütern verursachen können. Diese beiden Vertreter der zystenbildenden Kokzidien gelten als Verursacher von Aborten, Muskelschäden und Enzephalitiden bei Nutztieren. Im Fall von *T. gondii* ist zusätzlich ein beträchtliches Infektionspotential für den Menschen von Bedeutung. Nach neuen Erkenntnissen ist weltweit etwa ein Drittel der Bevölkerung mit *T. gondii* infiziert. Die Infektion verläuft bei immunkompetenten Personen in der Regel asymptomatisch. Immungeschwächte und Immunsupprimierte hingegen sind häufig von einer generalisierten, zerebralen Form der Infek-

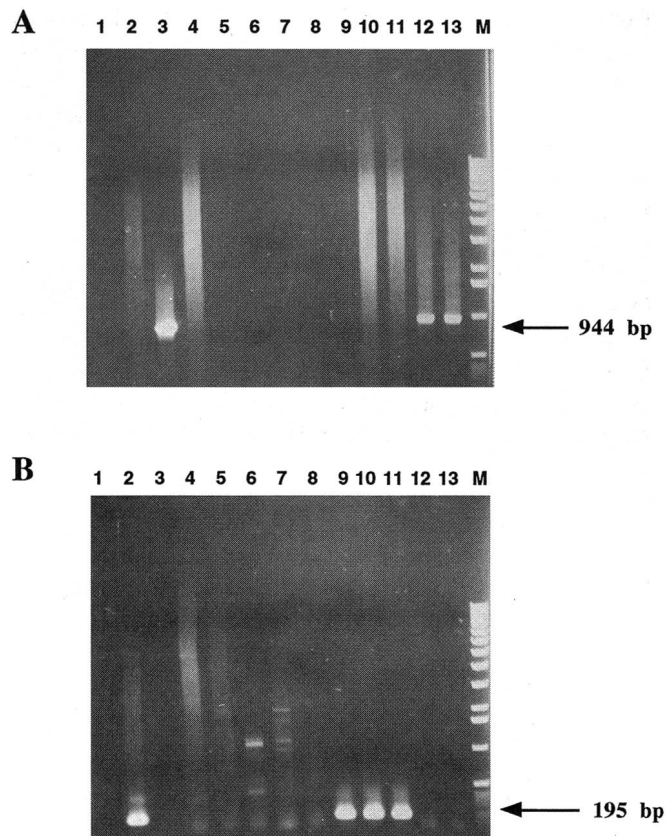


Abbildung 3: PCR-Analyse mit den *N. caninum*-spezifischen primers *Np1* und *Np2* (A) sowie mit *T. gondii*-spezifischen primers des *B1*-Gens (nach Burg et al., 1989) (B). Auf ein 0,8% Agarosegel wurden die Amplifikationsprodukte von PCRs aufgetragen, die mit folgenden DNAs durchgeführt wurden: (1) = negative Kontrolle ohne DNA; (2) = DNA des Plasmids pTXgB1 mit der *T. gondii* B1-Gensequenz; (3) = DNA des Plasmids pNc5 mit der *N. caninum*-spezifischen Gensequenz; (4-8) = DNA verschiedener *Sarcocystis*-Arten; (9-11) = DNA verschiedener *T. gondii*-Stämme; (12-13) = DNA von zwei *N. caninum*-Stämmen; (M) = Molekulargewichtsmarker.

tion mit lebensbedrohenden Auswirkungen betroffen. Eine weitere Risikogruppe sind Schwangere, bei denen im Fall einer Erstinfektion die Möglichkeit einer Übertragung des Parasiten auf den Fetus besteht. Eine solche transplazentäre Infektion ist teilweise mit schwerwiegenden zerebralen Schädigungen beim Fetus verbunden. Der Lebenszyklus konnte bei *T. gondii* vollständig beschrieben werden. Endwirt dieses Parasiten ist ausschliesslich die Katze, die gleichzeitig auch als Zwischenwirt fungieren kann. Durch Ausscheiden von Oozysten über den Kot gelangt der Parasit in die Aussenwelt und wird dort direkt oder über kontaminierte Nahrung von unterschiedlichen Zwischenwirten aufgenommen. Als Zwischenwirte sind neben den wichtigsten Heimtieren (Hund, Katze) vor allem Nutztiere (Rind, Schwein, Schaf) aber auch der Mensch selbst zu nennen. Hier bildet der

Parasit im Verlauf der Infektion intrazelluläre Zysten in unterschiedlichen Geweben und im Gehirn aus. Mit dem Verzehr von zystenhaltigem Fleisch durch den Endwirt (Katze) wird der Lebenszyklus von *T. gondii* geschlossen. Da sich der Mensch und andere Zwischenwirte ebenfalls durch Zysten in kontaminiertem Fleisch infizieren können, besteht bei der Toxoplasmose ein weiterer, vom Endwirt unabhängiger Übertragungszyklus, der infektiologisch von grosser Bedeutung ist.

Im Gegensatz zu *T. gondii* ist der Infektionskreislauf von *N. caninum* nur sehr unzureichend geklärt. Dieser Parasit ist morphologisch *T. gondii* sehr ähnlich und wurde bisher ausschliesslich bei Hunden, Rindern, Schafen, Ziegen und Pferden nachgewiesen. Es ist lediglich bekannt, dass der Parasit im Zwischenwirt transplazentär übertragen werden kann, und es wird vermutet, dass im Zyklus von *N. caninum* ein oder mehrere Karnivore als Endwirt(e) involviert ist.

N. caninum wird seit 1988 als eigene Spezies anerkannt. Der Parasit verursacht ähnliche klinische Erscheinungen wie *T. gondii* und wurde bis 1988 fälschlicherweise auch

als *T. gondii* diagnostiziert. Neben Aborten bei verschiedenen landwirtschaftlichen Nutztieren verursacht *N. caninum* auch Paralysen beim Hund. Erst seit kurzer Zeit ist bekannt, dass *N. caninum* in den USA der wichtigste protozoäre Erreger von Aborten beim Rind ist, die Bedeutung des Parasiten in diesem Zusammenhang wurde aber auch schon in Neuseeland, England und den Niederlanden erkannt.

In der Schweiz wurde die Neosporose bereits in einigen Fällen beim Hund nachgewiesen. Die Relevanz dieser Parasitose im Zusammenhang mit Aborten beim Rind scheint aber nicht sehr gross zu sein (Institut für Parasitologie, Bern, unpublizierte Daten). Die Durchführung einer entsprechenden breiteren epidemiologischen Studie ist dringend erforderlich; hierzu bedarf es jedoch einer routinemässig anwendbaren Diagnosemethode, die nicht nur einen direkten Nachweis von *N. caninum* in den abortierten Feten erlaubt, sondern auch eine klare Abgrenzung zu dem morphologisch und infektiologisch sehr ähnlichen Erreger *T. gondii* zulässt. Diesbezüglich steht derzeit zwar eine immunhistochemische Färbetechnik zur Verfügung, die mit Hilfe von mono- oder polyklonalen Antikörpern eine Unterscheidung zwischen beiden Parasiten ermöglichen könnte. Da diese Technik diagnostisch aber nur dann einsetzbar ist, wenn das zu untersuchende Material mit einer verhältnismässig grossen Zahl an Parasiten befallen ist, wurde in unserem Labor auf der Basis der PCR ein hochempfindlicher und spezifischer Test entwickelt, der potentiell zum Nachweis einer einzigen *N. caninum*-Zyste geeignet sein sollte.

Zur Etablierung dieses PCR-Tests wurde zunächst DNA aus *N. caninum* und *T. gondii* präpariert, die anschliessend als Hybridisierungssonden für ein differentielles screening einer genomischen DNA-Bank von *N. caninum* dienten (Kaufmann et al., 1995). Beim screening konnte ein Klon (pNc5) mit einer DNA-Sequenz identifiziert werden, die sich nicht nur durch eine starke Hybridisierung mit *N. caninum*-DNA auszeichnete, sondern auch keine Kreuzhybridisierung mit *T. gondii*-DNA aufwies. Aus den Sequenzdaten dieses *N. caninum*-spezifischen DNA-Fragments wurde dann ein primer-Paar, Np1 und Np2, für eine diagnostische PCR abgeleitet (Yamaga et al., 1995). Die primers wurden so gewählt, dass ein Amplifikationsprodukt mit einer Grösse von 944 bp zu erwarten war. In einer ersten Anwendung dieser PCR und einer anschliessenden Analyse der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese (Abbildung. 3A) konnte gezeigt werden, dass in Anwesenheit von *N. caninum*-DNA tatsächlich das erwartete DNA-Fragment als deutlich erkennbares Amplifikationsprodukt synthetisiert wird. In einem PCR-Ansatz mit *T. gondii*-DNA hingegen war das Fragment erwartungsgemäss nicht vorhanden. Gleichermassen zeigte der PCR-Test auch negative Resultate mit DNA aus verschiedenen Spezies von Sarcocystis, einer phylogenetisch und infektiologisch mit *N. caninum* nah verwandten Gattung. Aus diesen Ergebnissen liess sich erkennen, dass der entwickelte PCR-Test grundsätzlich zum Einsatz für einen spezifischen Nachweis von *N. caninum*-Infektionen geeignet ist.

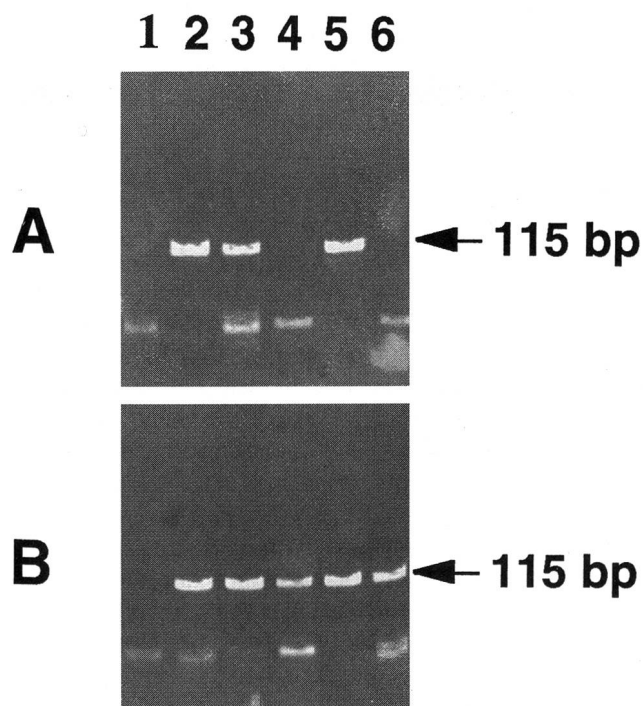


Abbildung 4: PCR-Analyse mit *T. gondii*-spezifischen primers des B1-Gens. Auf ein 10% Polyacrylamidgel wurden die Amplifikationsprodukte von PCRs aufgetragen, die mit folgenden Proben durchgeführt wurden: (1) = negative Kontrolle ohne DNA; (2) = Positivkontrolle (DNA Äquivalent von ca. 4 *T. gondii* Trophozoiten); (3 und 5) = «Positive» Fruchtwasserproben (Mensch); (4 und 6) = «Negative» Fruchtwasserproben (Mensch). (A) zeigt die Analyse der eigentlichen diagnostischen PCRs, (B) die Analyse der PCRs mit Zusatz von 3–5 Molekülen *T. gondii*-DNA als Inhibitionskontrolle (ausser bei (1) = negative Kontrolle ohne DNA). Die schwachen Banden im unteren Bereich der Gele sind diagnostisch irrelevant.

Um eine weitere Voraussetzung für eine Differentialdiagnostik im Bereich Neosporose/Toxoplasmose zu schaffen, wurde in unserem Labor zusätzlich zur *N. caninum*-spezifischen PCR ein entsprechender Test zur Diagnose von Infektionen mit *T. gondii* etabliert. Hierzu bedienten wir uns zunächst einer von Burg et al. (1989) beschriebenen PCR, die auf der Amplifikation einer 195 bp langen Teilsequenz des hochrepetierten B1-Gens von *T. gondii* beruht. Dieser Test hat sich bereits vielfach als diagnostisches Hilfsmittel auf dem Gebiet der Toxoplasmose bewährt. Wir konnten die Tauglichkeit dieser PCR im Hinblick auf ihre Spezifität bestätigen, weil sie einen eindeutigen, molekularen Nachweis von *T. gondii*-DNA erbrachte und zu einem negativen Resultat bei der Analyse von DNA aus *N. caninum* und *Sarcocystis* spp. führte (Abbildung 3B). Bei der Überprüfung von klinischem Material aus dem humandiagnostischen Bereich stellten wir jedoch fest, dass eine durch Bretagne et al. (1993) erarbeitete PCR insgesamt weit zuverlässigere und besser interpretierbare Ergebnisse lieferte als die von uns ursprünglich verwendete PCR. Dieser Test basiert auf der Amplifikation eines 115 bp Fragments des B1-Gens und beinhaltet eine anschließende Auswertung der PCR mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

Wir haben uns die hervorragenden diagnostischen Eigenschaften dieses Tests zunutze gemacht, um *T. gondii* in klinischen Proben vom Mensch nachzuweisen (Abbildung 4). Die wichtigsten Testsubstrate sind Fruchtwasser und Blut (Jacquier et al., 1995). Die Aufarbeitung der entsprechenden Proben besteht aus der Eliminierung der Erythrozyten mit Hilfe eines selektiven Lysis-Puffers (0,32 M Sucrose; 10 mM Tris-HCl, pH 7, 5; 5 mM MgCl₂ und 1% Triton X100) sowie der anschließenden Freisetzung und Denaturierung der Wirts- und Parasiten-spezifischen DNA durch Behandlung des verbleibenden Zellsediments mit Extraktionspuffer (10 mM NaOH; 0,5% Tween 20 und 0,5% Nonidet P-40), gefolgt von 10 minütigem Kochen der Proben. Um die Zuverlässigkeit der Diagnose zu garantieren, werden alle Tests mit zwei verschiedenen Probenmengen und parallel mit einer internen Kontrolle durchgeführt, die aus einer gerade noch nachweisbaren Menge genomischer *T. gondii*-DNA besteht (DNA-Äquivalent zu ca. 4 *T. gondii*-Trophozoiten). Durch die Kontrolle sind wir in der Lage, falsch negative Resultate zu erkennen, die durch inhibitorische Komponenten im PCR-Ansatz verursacht werden. Falsch positive Ergebnisse, die durch *carry-over* Kontaminationen vorangegangener PCRs entstehen können, werden verhindert, indem das Prinzip der räumlichen Trennung von Probenaufarbeitung und Analyse der PCR-Produkte strikt eingehalten wird. «Falsche» Reaktionsbefunde dieses Ursprungs werden ausserdem durch zwei weitere methodische Schritte praktisch ausgeschlossen, die von Longo et al. (1990) beschrieben wurden: (i) Zur PCR wird nicht der authentische Nukleotidsatz natürlich vorkommender DNA zugegeben, sondern eines dieser Nukleotide, dTTP (2'-Deoxythymidin 5'-triphosphat), wird durch das artifizielle Nukleotid dUTP (2'-Deoxyuridin 5'-triphosphat) ersetzt. Dadurch sind PCR-Produkte bio-

chemisch von natürlicher DNA verschieden. (ii) Jeder PCR-Ansatz wird vor der zyklischen Reaktion mit dem Enzym Uracil-DNA-Glycosylase (UDG) inkubiert, wodurch eine eventuell auftretende *carry-over* PCR-Kontamination aufgrund ihres Gehalts an Uracil (basische Komponente von dUTP) selektiv zerstört wird. Da natürlich vorkommende DNA von der Wirkung der UDG verschont bleibt, und das Enzym bei den hohen Temperaturen des Thermozyklus inaktiv ist, kann die PCR trotz der enzymatischen Vorbehandlung ungestört ablaufen. Die hier erwähnten Massnahmen zur Vermeidung falsch negativer und falsch positiver Befunde bei der diagnostischen PCR haben sich in unserer Routineanwendung sehr bewährt. Entsprechende Modifikationen wollen wir nun auch in die bei uns entwickelte PCR zum Nachweis von *N. caninum*-Infektionen einbauen, damit ein routinemässiger Einsatz dieses Tests in der veterinärmedizinischen Diagnostik ins Auge gefasst werden kann. Weitere Studien mit klinischem Material sollen dann zeigen, ob die entsprechend veränderte PCR eine zuverlässige Erfassung von Fällen einer kongenitalen Neosporose beim Rind erlaubt, oder ob weitere Anpassungen des Tests für eine praktische Anwendung erfolgen müssen.

Echinokokkose, Zystizerkose/Taeniose

(B. Gottstein)

Echinokokkose. Unter der alveolären Echinokokkose verstehen wir die Erkrankung, die nach einer Infektion mit Eiern des sogenannten kleinen Fuchsbandwurmes *Echinococcus multilocularis* auftreten kann. *E. multilocularis* kommt als adulter Bandwurm im Dünndarm seiner Endwirte vor. In Mitteleuropa ist hauptsächlich der Rotfuchs betroffen, wobei auch Hund und Katze als Endwirt in Frage kommen. Neuere Untersuchungen bezüglich der Befallsextenzität sowie der Befallsintensität bei Füchsen in der Schweiz weisen auf die starke Präsenz des Parasiten hin (Ewald et al., 1992). Über den Befall bei Hund und Katze liegen aus der Schweiz keine genaueren Daten vor. Sexuelle Maturität erlangen die adulten Würmer bereits 4 bis 5 Wochen nach Infektion, gefolgt von einer Abstossung gravider Proglottiden, die je ungefähr 200 Echinokokkeneier enthalten. Mit dem Kot in die Aussenwelt gelangte Eier sind für Zwischenwirte bereits voll infektiös. Im Gegensatz zu *E. multilocularis* benutzt sein enger Verwandter *Echinococcus granulosus* vorwiegend Hunde als Endwirt sowie verschiedene Nutz- und Wildtiere als Zwischenwirt, wobei dieser Parasit beim Hund in Mitteleuropa sehr selten vorkommt. *E. multilocularis* und *E. granulosus*-Eier sehen morphologisch identisch aus, so dass hier neue Techniken zur Artdifferenzierung notwendig sind (siehe Artikel von Mathis et al. in dieser Ausgabe). Als Zwischenwirte für *E. multilocularis* fungieren kleine Säugetiere, hauptsächlich *Arvicola terrestris* sowie *Microtus arvalis*. Diese infizieren sich durch perorale Aufnahme von *E. multilocularis*-Eiern über kontaminierte Nahrung, möglicherweise auch Wasser. Aktivierte Onkosphären gelangen anschliessend

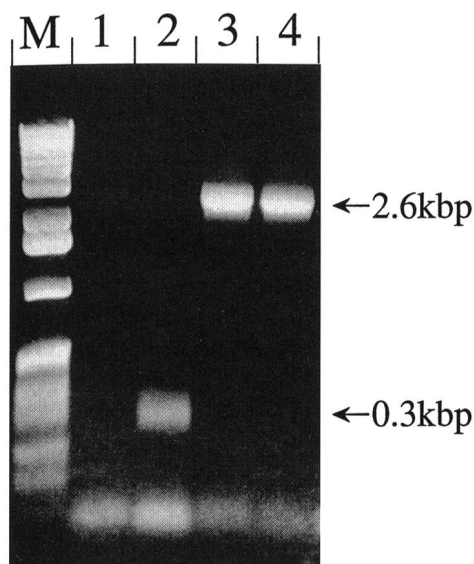


Abbildung 5: PCR-Nachweis von *Echinococcus multilocularis*-DNA unter Verwendung der primers BG1 und BG2 (2,6 kbp Amplifikat, artspezifisch) oder BG1 und BG3 (0,3 kbp Amplifikat, gattungsspezifisch). Darstellung der Amplifikate in einem 0,8% Agarosegel: (1) = «Kontaminationskontrolle» (Reaktion ohne DNA); (2) = DNA aus dem Dünndarmabstrich eines natürlich infizierten Fuchses, amplifiziert mit BG1/BG3; (3) = die selbe DNA amplifiziert mit BG1/BG2; (4) = «Positiv-Kontrolle BG1/BG2» mit hinzugefügter, genomischer *E. multilocularis*-DNA. (M) = Molekulargewichtsmarker.

über Mesenterialvenen und möglicherweise Lymphgefäße in die Leber, wo sie sich zu einem bläschenförmigen Vesikel weiterentwickeln. Mit der Zeit erfolgt die Ausbildung eines riesenwüchsigen Bläschenkonglomerates und, von der Keimschicht ausgehend, eine Differenzierung zu sogenannten Protoskolizes (Kopfanlagen), die, wenn ein Endwirt einen infizierten Zwischenwirt frisst und so Protoskolizes peroral aufnimmt, sich schliesslich wieder zu adulten Bandwürmern weiterentwickeln. Entwickeln sich die Metazestoden von *E. multilocularis* oder *E. granulosus* atypisch (z. B. nekrotisierend), kann die morphologische Artbestimmung schwierig sein, so dass auch hier neue, molekular-diagnostische Techniken zum Zuge kommen können.

Zystizerkose/Taeniose. Bei den Bandwurmart *Taenia solium* (Tso) und *Taenia saginata* (Tsa) fungiert ausschliesslich der Mensch als Endwirt. Abgetrennte Proglottiden (Bandwurmglieder) sowie freigesetzte Eier gelangen mit dem Stuhl in die Aussenwelt. Nach Aufnahme der Eier durch Zwischenwirte (Tso: Schwein, sowie ebenfalls der Mensch, der somit zugleich Endwirt und Zwischenwirt [Fehlwirt] sein kann; Tsa: Rind) werden im Dünndarm Larvalstadien (Onkosphären) frei, die auf dem Blutweg in die Zielorgane gelangen, wo sie innerhalb von 3–4 Monaten zu infektionstüchtigen Zystizerken heranwachsen. Diese können so das Krankheitsbild

der Zystizerkose hervorrufen. In Europa kommt *T. solium* selten in einigen Ländern Ost- und Südeuropas (v.a. Portugal, Polen und Ex-Jugoslawien) vor, in anderen Regionen der Erde dagegen wie Süd- und Mittelamerika, Südafrika sowie Südostasien ist die Prävalenz recht hoch (vor allem in Gebieten mit Schweinezucht und geringem Hygienestandard). In Mitteleuropa gewinnt aber *T. solium* durch Immigration und Tourismus an Bedeutung. Beim Vorliegen eines Befalles mit adulten Taenien kann die Artbestimmung nur dann leicht durchgeführt werden, wenn im Stuhl abgegangene Proglottiden sich morphologisch unterscheiden lassen. Wenn dies nicht der Fall ist, können neue Verfahren wie die PCR ergänzend eingreifen. Zur Zeit sind weltweit ca. 39 Mio. Personen (= Endwirte) mit *T. saginata* infiziert. Beim Zwischenwirt Rind wird in der Schweiz mit einer Prävalenz von ca. 1% gerechnet. Prädilektionsstellen für die Zystizerken sind Kau- und Zungenmuskulatur, Diaphragma sowie Herz. Nach einer gewissen Zeit sterben die Zystizerken zuerst im Herz ab (Verkalkung), später dann auch in der Skelettmuskulatur. Eine morphologische Artidentifizierung bei solchen abgestorbenen Zystizerken ist äusserst schwierig, geeignete molekulare Techniken sind deshalb unter bestimmten epidemiologischen Voraussetzungen unentbehrlich.

Diagnostische PCR. Die Anwendung der PCR und ganz allgemein molekularbiologischer Methoden im parasitologisch-diagnostischen Sektor hat ebenfalls vor den genomisch im Vergleich zu Viren oder Bakterien viel komplexer organisierten Metazoen, insbesondere den Helminthen, keinen Halt gemacht. So sind in letzter Zeit eine

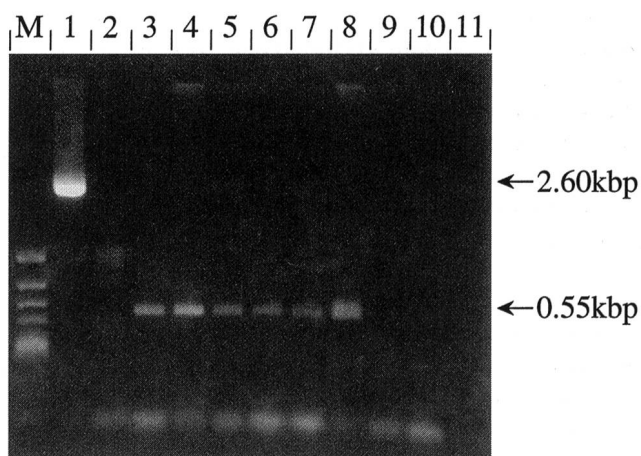


Abbildung 6: PCR-Nachweis von *Taenia saginata*-DNA unter Verwendung der primers BG1 und BG2 (0,55 kbp Amplifikat). Darstellung der Amplifikate in einem 0,8% Agarosegel mit folgender DNA: (1) = genomische *E. multilocularis*-DNA als Kontrolle; (2) = genomische *E. granulosus*-DNA als Kontrolle; (3–8) = *Taenia saginata*-Proglottiden von verschiedenen Patienten; (9, 10) = *Taenia solium*-DNA aus Finnen von verschiedenen Patienten; (11) = «Negativkontrolle» mit *Hymenolepis diminuta*-DNA; (M) = Molekulargewichtsmarker.

Vielzahl verschiedener DNA-Sonden zur Bestimmung und Gruppierung von *E. granulosus*- (Rishi und McManus, 1987; Yap et al., 1988; Lymbery und Thompson, 1989; Bowles und McManus, 1993) und *E. multilocularis*-Isolaten (Vogel et al., 1991) entwickelt worden. Der diagnostische Wert solcher Sonden bestand darin, dass geeignete DNA-Sequenzen zur Entwicklung einer diagnostischen PCR verwendet werden konnten. Die erste *E. multilocularis* DNA-Sonde (pAL1) wurde von Vogel und Mitarbeitern (1991) entwickelt. Mittels pAL1 wurden vorerst verschiedene *E. multilocularis*-Isolate durch *Southern-blot*-Hybridisierungen charakterisiert (Vogel et al., 1991). Später wurde pAL1 sequenziert und so für die Entwicklung einer PCR verwendbar gemacht (Gottstein und Mowatt, 1991). Zwei Oligonukleotid-primers (BG1 und BG2) definierten dabei ein *E. multilocularis*-spezifisches PCR-Fragment mit einer Länge von 2,6 kbp. Aus dem Genom von 14 verschiedenen *E. multilocularis*-Isolaten aus der Schweiz, Alaska, Kanada, Frankreich, Deutschland und Japan konnte das 2,6 kbp PCR-Produkt amplifiziert werden, nicht jedoch bei *E. granulosus* oder anderen Zestodenarten. Ein anderes von pAL1 abgeleitetes primer-Paar (BG1 und BG3) mit einem 0,3 kbp PCR-Fragment erwies sich als Gattungsspezifisch, indem sowohl *E. multilocularis*, *E. granulosus* als auch *E. vogeli* in der PCR identisch reagierten. In der Veterinärparasitologie hat sich die oben erwähnte PCR-Methode (BG1/BG2/BG3-PCR) bereits in Feldversuchen bewährt. Im Rahmen einer Untersuchung von Schermäusen (*Arvicola terrestris*) zum Nachweis von *E. multilocularis*-Metazestoden im Kanton Fribourg wurden die Tiere nicht nur patho-anatomisch und histopathologisch untersucht (Schmidt et al., in press), sondern zusätzlich auch mit der *E. multilocularis*-spezifischen PCR. Insgesamt erwiesen sich 11 von 28 Tieren (39%) als *E. multilocularis* infiziert. Dies stellt unseres Wissens die höchste in Europa je festgestellte Befallsrate dar. Bei diesen Untersuchungen wies die PCR eine diagnostische Sensitivität von 72% auf, wobei sich der Test vor allem dazu geeignet zeigte, vitales Metazestodengewebe nachzuweisen. Die BG1/BG2/BG3-PCR eignete sich ebenfalls zur Identifizierung von Bandwurm-Proglottiden: Bei der Untersuchung von Dünndarmabstrichen von potentiell mit Bandwürmern infizierten Füchsen gelang die direkte molekulare Identifizierung von *E. multilocularis* (Abbildung 5). Weiterführende Untersuchungen an Bandwurmproglottiden zeigten, dass mittels der BG1/BG2-PCR auch *Taenia saginata* von *T. solium* unterschieden werden kann (Gottstein et al., 1991), indem sich ausschliesslich bei *T. saginata* ein 0,55 kbp PCR-Produkt amplifizieren liess (Abbildung 6). Gegenwärtig wird diese Methode zum differentialdiagnostischen Nachweis der intestinalen Taeniose routinemässig eingesetzt, wobei spezifisch *T. saginata* und *T. taeniaeformis* (bei dieser Bandwurmart kommt es zur Amplifikation eines artspezifischen 0,6 kbp-Fragmentes) identifiziert werden können. Das Verfahren eignet sich auch zum Nachweis der entsprechenden Zystizerken. Als Beispiel sei hier ein Projekt zur

Identifizierung bisher nicht bestimmbarer zystizerkoider Gebilde beim Rind in Neuseeland aufgeführt. In Neuseeland gilt das Rind prinzipiell als frei von *T. saginata*-Zystizerken. In der Fleischschau werden jedoch regelmässig abgestorbene, verkalkte Gebilde nachgewiesen, bei denen es sich um Zystizerken handelt, wobei die verursachende *Taenia*-Art morphologisch nicht identifiziert werden konnte. Die verantwortlichen Behörden (Central Animal Health Laboratory, Ministry of Agriculture and Fisheries) gelangten mit der Anfrage zur molekularen Identifizierung des Parasitengewebes an uns. Die in der PCR nachgewiesenen Reaktionen liessen nicht nur *T. saginata* als den für die zystizerkoide Läsion verantwortlichen Organismus ausschliessen, sondern sie lieferten erste Anhaltspunkte für die Existenz einer bisher noch nicht identifizierten *Taenia*-Art beim Rind in Neuseeland.

PCR-Methoden, wie sie hier beschrieben wurden, eignen sich nicht nur zur Identifizierung und Charakterisierung von Parasiten-Isolaten, sie bilden auch eine Grundlage, um neue, für den Kliniker nützliche Werkzeuge zu entwickeln. Die Weiterführung der PCR zu einer sogenannten RT-PCR (*reverse transcription* PCR) sollte es bald ermöglichen, neben der Präsenz des Parasiten auch seine Vitalität zu bestimmen, indem seine mRNA im diagnostischen Untersuchungsmaterial z. B. in Biopsie-Punktionsmaterial nachgewiesen werden kann.

Literatur

- Bowles J., McManus D.P. (1993): Rapid discrimination of *Echinococcus* species and strains using a polymerase chain reaction-based RFLP method. *Mol. Biochem. Parasitol.* 57, 231-240.
- Bretagne S., Costa J. M., Vidaud M., Tran Van Nbieu J., Fleury-Feith J. (1993): Detection of *Toxoplasma gondii* by competitive DNA amplification of bronchoalveolar lavage samples. *J. Infect. Dis.* 168, 1585-1588.
- Brindley P. J., Gazzinelli R. T., Denkers E. Y., Davis S. W., Dubey J. P., Belfort R., Martins M.-C., Silveira C., Jamra L., Waters A. P., Sber A. (1993): Differentiation of *Toxoplasma gondii* from closely related coccidia by riboprint analysis and surface antigen gene polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48, 447-456.
- Burg J. L., Grover, C. M., Pouletty P., Boothroyd J. C. (1989): Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 27, 1787-1792.
- Ewald D., Eckert J., Gottstein B., Straub M., Nigg H. (1992): Parasitological and serological studies on the prevalence of *Echinococcus multilocularis* Leuckart, 1863 in red foxes (*Vulpes vulpes* Linnaeus, 1758) in Switzerland. *O.I.E. Rev. Sci. Tech.* 11, 1057-1061.
- Gottstein B., Deplazes P., Tanner I., Skaggs J.S. (1991): Diagnostic identification of *Taenia saginata* by PCR. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85, 248-249.
- Gottstein B., Mowatt M.R. (1991): Sequencing and characterization of an *Echinococcus multilocularis* DNA probe and its use in the polymerase chain reaction (PCR). *Mol. Biochem. Parasitol.* 44, 183-194.
- Ho M. S. Y., Conrad P. A., Conrad P.J., LeFebvre, R. B., Perez E., BonDurant R.H. (1994): Detection of bovine Trichomoniasis with a specific DNA probe and PCR amplification system. *J. Clin. Microbiol.* 32, 98-104.

Jacquier P., Müller N., Gottstein B. (1995): Techniques actuelles du diagnostic biologique de l'infection à *Toxoplasma gondii*. Schweiz. Med. Wochenschr. 125, 924.

Kaufmann H., Yamage M., Flechner, O., Gottstein B. (1995): Klonierung einer *Neospora*-spezifischen DNA-Sonde. Schweiz. Med. Wochenschr. 125, 930.

Longo M. C., Beringer M. S., Hartley J. L. (1990): Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contaminations in polymerase chain reaction. Gene 93, 125-128.

Lymbery A.J., Thompson R.C.A. (1989): Genetic differences between cysts of *Echinococcus granulosus* from the same host. Int. J. Parasitol. 19, 961-964.

Risbi A.K., McManus D.P. (1987): Genomic cloning of human *Echinococcus granulosus* DNA: isolation of recombinant plasmids and their use as genetic markers in strain characterization. Parasitol. 94, 369-383.

Schmidt J. (1994): Trichomoniasis - eine alte Krankheit taucht wieder auf. Mitteil. BVET 22, 221-222.

Schmitt M., Saucy F., Wyborn S., Gottstein B. (1995): Befall von Schermäusen *Arvicola terrestris* mit Metazestoden von *Echinococcus multilocularis* im Kanton Freiburg (Schweiz). Schweiz. Arch. Tierheilkd. (in press).

Vogel M., Müller N., Gottstein B., Flury K., Eckert J., Seebeck T. (1991): *Echinococcus multilocularis*: Characterization of a DNA probe. Acta Tropica 48, 109-116.

Yamage M., Kaufmann H., Gottstein B. (1995): Simultaneous identification of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* by dual amplification of species-specific genes in polymerase chain reaction (PCR). Experientia 51, A85.

Yap K.W., Thompson R.C.A., Pawlowski I.D. (1988): The development of nonradioactive total genomic probes for strain and egg differentiation in taeniid cestodes. Am. J. Trop. Med. Hyg. 39, 472-477.

Korrespondenzadresse: Prof. Dr. Bruno Gottstein, Institut für Parasitologie, Universität Bern, Länggass-Str. 122, CH-3012 Bern



A propos Praxiseinrichtung

Operationstische und Narkosegeräte mit Zubehör, Operationslampen,
Instrumentenschränke, Sessel,
Zureiche- und Instrumententische, Autoklaven,
Sterilisierdosen ...

... von uns erhalten Sie
das komplette Programm

EISENHUT-VET AG
Veterinärmedizinische Instrumente

Eisenhut-Vet AG
Postfach, Sandweg 52, CH - 4123 Allschwil 1
Tel. 061/302 82 82, Fax 061/302 82 81

Belegbild Werbung ASG