

# Immundiagnose der Leishmaniose des Hundes mit ELISA und Mini-Western-Blot

Autor(en): **Gottstein, B. / Deplazes, P. / Arnold, P.**

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): **130 (1988)**

PDF erstellt am: **25.06.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-590924>

## **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.

Schweiz. Arch. Tierheilk. 130, 249–262, 1988

Aus dem Institut für Parasitologie<sup>1</sup> (Direktor: Prof. J. Eckert) und der Veterinär-Medizinischen Klinik<sup>2</sup> (Direktor: Prof. P. Suter) der Universität Zürich, dem Bernhard-Nocht-Institut für Schiffs- und Tropenkrankheiten (Direktor: Prof. H. J. Müller-Eberhard), Hamburg<sup>3</sup>, sowie dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie der Universität München<sup>4</sup> (Direktor: Prof. R. Gothe)

## Immundiagnose der Leishmaniose des Hundes mit ELISA und Mini-Western-Blot

B. Gottstein<sup>1</sup>, P. Deplazes<sup>1</sup>, P. Arnold<sup>2</sup>, D. Mehlitz<sup>3</sup>, I. Reiter<sup>4</sup> und J. Eckert<sup>1</sup>

### 1. Einleitung

Leishmaniosen werden durch verschiedene Arten (Unterarten) der Gattung *Leishmania* (Trypanosomatidae) verursacht und durch Schmetterlingsmücken der Familie Phlebotomidae von Mensch zu Mensch, häufiger aber von Tieren (Nagern, Karnivoren u. a.) auf Menschen übertragen (Chang und Bray, 1985). In verschiedenen Endemiegebieten sind neben anderen Tierarten Hunde Reservoirwirte für Erreger der viszeralen Leishmaniose des Menschen, so im Mittelmeergebiet, im Mittleren Osten und in Gebieten Asiens für *L. donovani infantum*, in Kenya und Somalia für *L. donovani sp.* sowie in Zentral- und Südamerika für *L. donovani chagasi* (Chang und Bray, 1985). Darüber hinaus können Hunde auch Erreger der kutanen Leishmaniose beherbergen, z. B. *L. tropica* im Mittleren Osten und Indien, *L. braziliensis peruviana* in Südamerika und *L. braziliensis panamensis* in Zentralamerika (Chang und Bray, 1985).

In Endemiegebieten des europäischen und afrikanischen Mittelmeerraumes verursacht *L. donovani infantum* bei Kindern und seltener bei Erwachsenen viszerale Leishmaniose, bei der innere Organe (Leber, Milz usw.) betroffen sind. Wie in Italien beobachtet worden ist, kann dieser Erreger aber auch auf die Haut und den Pharynx lokalisierte Formen der Erkrankung hervorrufen (Lit. bei Bray, 1985). Als Reservoirwirte für *L. donovani infantum* sind im europäischen Mittelmeergebiet Hund, Fuchs (*Vulpes vulpes*) sowie Ratten der Gattung *Rattus* bekannt (Bray, 1985). In nordafrikanischen Mittelmeerländern ist bisher der Hund der einzige erwiesene Reservoirwirt (Dedet und Belazzoug, 1985).

Leishmaniosen sind in warmen Regionen aller Kontinente endemisch (Ausnahme: Australien). In Europa ist autochthone Leishmaniose in Mittelmeerländern (bis etwa zum 45. nördl. Breitengrad) und in einigen weiter nördlich gelegenen Regionen bekannt (z. B. Frankreich). In der Schweiz, in Österreich und in der Bundesrepublik

---

<sup>1</sup>Adresse: Dr. Bruno Gottstein, Institut für Parasitologie, Universität Zürich, Winterthurerstrasse 266a, CH-8057 Zürich

Deutschland diagnostizierte Fälle von Leishmaniose des Hundes sind meist aus dem Mittelmeerraum, seltener aus anderen Endemiegebieten importiert worden (Lit. bei Kammermann-Lüscher, 1980; eigene Beob.). Aus der Schweiz liegen aber auch Berichte über vermutete Fälle von autochthoner Leishmaniose des Hundes vor (Schawalder, 1977; Arnold et al., 1986).

Nach Inkubationszeiten von einigen Wochen bis mehreren Monaten kann die *L. donovani infantum* – Infektion des Hundes zu einer akuten Erkrankung (meist bei Junghunden) oder einer chronischen Verlaufsform (bei älteren Tieren) führen. Bei aus Endemiegebieten nach Mitteleuropa importierten Hunden ist bisher nur die chronische Form beobachtet worden (Lit. bei Kammermann-Lüscher, 1980), die durch Erkrankungen der inneren Organe und durch Hautveränderungen charakterisiert ist. Dabei werden nach Kammermann-Lüscher (1980) folgende Symptome beobachtet (Häufigkeit in absteigender Reihenfolge): schuppender Hautausschlag, Anämie (blasse Schleimhäute), Milzvergrößerung, generalisierte Lymphknotenschwellung, auffallende Müdigkeit, Fieber zur Zeit der Erstuntersuchung, Gewichtsabnahme, Nachhand Schwäche, Nasenbluten. Daneben können Rhinitis, Augenveränderungen, Enteritiden und andere Symptome auftreten. Aufgrund der klinischen Symptome und der Anamnese lässt sich eine Verdachtsdiagnose stellen, die jedoch ätiologisch abgesichert werden muss. Dies ist einerseits durch *direkten Erregernachweis* in Ausstrichen von Knochenmark- oder Lymphknotenpunktaten nach Giemsa – Färbung möglich (Nachweis amastigoter Formen). Nach Kammermann-Lüscher (1980) gelang auf diese Weise der Erregernachweis in 6 von 9 Fällen. Eine weitere Möglichkeit ist die kulturelle Anzüchtung des Erregers (in der begeißelten, promastigoten Form) in den altbewährten mono- oder biphasischen NNN-Medien (**N**ovy-**M**ac**N**eal-**N**icolle) oder in vereinfachten Medien, wie dem Hebes-gepuffertem Gewebekulturmedium 199 mit einem Zusatz von 10% Kälberserum (Lit. bei Chang und Hendricks, 1985). Als Ausgangsmaterial für solche Kulturen sind Punktate von Leber, Milz, Knochenmark und Lymphknoten geeignet. Am einfachsten und ohne Risiko ist die Punktentnahme an den Popliteallymphknoten. Nach Erfahrungen in Tunesien liessen sich daraus in 92% der Fälle im NNN-Medium Erreger anzüchten (Dedet und Belazzoug, 1985). Aus der Haut und dem Blut gelingt der kulturelle Erregernachweis seltener, so dass er zu diagnostischen Zwecken nicht empfohlen werden kann. Voraussetzung für den kulturellen Erregernachweis ist, dass das Punktat möglichst unter aseptischen Bedingungen entnommen und sofort in das Kulturmedium überführt wird (kann bei spezialisierten Untersuchungslabors angefordert werden).

Da der direkte Erregernachweis in einem Teil der Fälle, vor allem bei anbehandelten, nicht gelingt, werden heute vermehrt immundiagnostische Methoden zur spezifischen Diagnose herangezogen, wobei sich zum Antikörpernachweis vor allem ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) und indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT) bewährt haben (Reiter et al., 1985; Reusch und Reiter, 1987).

Diese Tests haben eine hohe diagnostische Sensitivität. Kammermann-Lüscher (1980) berichtete, dass bei allen von 6 an Leishmaniose erkrankten Hunden mittels IIFT Antikörper nachgewiesen werden konnten. Bei dem bisherigen Einsatz dieser

Tests in der Laborpraxis ist allerdings dem Problem der Spezifität der Reaktionen zu wenig Beachtung geschenkt worden. So ist bei der Interpretation serologischer Befunde zu berücksichtigen, dass in Endemiegebieten bei Hunden neben der Leishmaniose auch andere, durch Protozoen verursachte Infektionen vorkommen können, z. B. Infektionen mit *Trypanosoma congolense* und *T. evansi* oder *Babesia canis*. Der Kontakt von Hunden mit Antigenen dieser Erreger könnte bei serologischen Untersuchungen auf Leishmaniose Anlass zu Kreuzreaktionen sein. Diese wären vor allem bei epidemiologischen Untersuchungen von praktischer Bedeutung.

Unter Berücksichtigung dieser Problematik beschreibt die vorliegende Arbeit die immundiagnostischen Eigenschaften (diagnostische Sensitivität/Spezifität) eines ELISA zum Antikörpernachweis bei Leishmaniose des Hundes im Vergleich zum indirekten Immunfluoreszenztest und stellt im «Mini-Western-Blot» ein hochspezifisches Testverfahren vor, das dem diagnostischen Ausschluss von Kreuzreaktionen dient.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Untersuchungsmaterial

#### *Seren von Hunden mit Leishmaniose:*

In der vorliegenden Arbeit wurden Seren von 26 Hunden mit parasitologisch gesicherter Leishmaniose verwendet. Bei 16 dieser Hunde wurden die Erreger im Giemsa-gefärbten Ausstrich von Lymphknotenpunktaten nachgewiesen, bei 9 weiteren Hunden basierte die Diagnose auf den kulturellen Nachweis der Erreger (Ausgangsmaterial: Lymphknotenpunktat; Medium und Kulturbedingungen: siehe Abschnitt «Isolierung und Kultivierung von *L. donovani*»). Alle Blutproben waren vor Beginn einer Chemotherapie entnommen worden. Die meisten Patienten zeigten Adenopathie sowie Hepato- und Splenomegalie. In 14 Fällen bestanden mehr oder weniger stark ausgeprägte Hautveränderungen (siehe Einleitung). Von 21 Hunden war ein Aufenthalt in Endemiegebieten bekannt, und zwar kamen 10 Hunde aus Spanien, 4 aus Portugal, je 3 aus Italien oder Griechenland und 1 Hund aus Sudan. Bei 4 weiteren Hunden konnte nicht geklärt werden, ob die Tiere in einem Endemiegebiet gewesen waren. Ein Hund war zu Forschungszwecken experimentell infiziert worden (mit Stamm «Calcutta»). Bei einem zusätzlich untersuchten Hund wurde berichtet, dass er die Zentralschweiz nie verlassen haben soll (Arnold et al., 1986).

#### *Seren von Hunden mit Trypanosoma spp. -Infektion:*

In die Untersuchungen wurden Seren von 12 Hunden mit gesicherter Trypanosomose einbezogen: Bei sieben Hunden wurde *Trypanosoma congolense* im direkten Erregernachweis diagnostiziert, bei einem davon zusätzlich *T. gambiense* (Charakterisierung durch DNA-Analyse, Zymodeme und Humanserum-Resistenztest). Fünf dieser Hunde stammten aus Liberia, einer ist aus Zentralafrika nach Mitteleuropa importiert worden und ein weiterer stammte aus einem nicht mehr eruierbaren afrikanischen Gebiet. Alle Hunde, mit Ausnahme der Tiere mit *T. congolense*-Infektionen, wiesen bei Diagnosestellung Fieber, Inappetenz und Splenomegalie auf. Bei allen Hunden erfolgte die Entnahme der Blutproben vor Beginn einer spezifischen Therapie. Antikörper gegen *Trypanosoma*-Antigen wurden in 6 der 7 Fälle mittels IIFT und/oder ELISA nachgewiesen.

Fünf weitere Hunde waren experimentell mit *T. brucei* infiziert worden. Die Blutentnahme erfolgte zwischen Tag 28 und 74 nach der Infektion. Alle Hunde hatten im IIFT nachweisbare Antikörper gegen *Trypanosoma*.



### *Seren von Hunden mit Babesiose:*

Ferner standen für die Arbeit Seren von 12 Hunden mit parasitologisch nachgewiesener Infektion durch *Babesia canis* und von 2 Hunden mit gesicherter *B. gibsoni*-Infektion zur Verfügung. Die Diagnose beruhte auf dem mikroskopischen Nachweis von Babesien im Giemsa-gefärbten Blut- oder Kapillarblutausstrichen und der morphologischen Identifikation der Erregerarten. Alle Hunde wiesen für Babesiose typische Symptome auf. Für die meisten Hunde lag eine Anamnese eines Aufenthaltes in enzootischen Gebieten des Mittelmeerraumes vor. Alle Blutproben waren vor oder unmittelbar nach Beginn einer spezifischen Therapie entnommen worden. In allen Seren waren Antikörper gegen *Babesia canis*-Antigen im IIFT nachweisbar.

### *Seren von Kontrollhunden:*

Im IIFT und im ELISA wurden als «negative Kontrollen» Seren von Hunden eingesetzt, bei denen Infektionen mit *Leishmania*, *Trypanosoma* und *Babesia* mit grosser Sicherheit ausgeschlossen werden konnten. Diese Seren stammten von:

- 15 gesunden SPF-Hunden (Beagles) aus einem Hundezuchtbetrieb. Das Durchschnittsalter der Tiere betrug 9 Monate.
- 25 Hunden aus der Nordostschweiz (über das Vorkommen von *Leishmania* und Blutprotozoen ist in diesem Gebiet nie berichtet worden), die mit einer infektiologischen Fragestellung beim Tierarzt untersucht worden sind.

## 2.2. Methoden

### *Isolierung und Kultivierung von Leishmania donovani*

Zum kulturellen Nachweis von Leishmanien wurden unter antiseptischen Bedingungen aspirierte Lymphknotenpunktate (ca. 50  $\mu$ l Material, 20 ml Wegwerfspritze und 0,9  $\times$  40 mm Nadel) in 8 ml Kulturmedium (nach Berens et al., 1976: Eagle's Minimal Essential Medium mit Spinner's Salzen und 10% fötalem Kälberserum) überführt und anschliessend bei +25 °C inkubiert. Innerhalb von 1 bis 2 Tagen fand eine Umwandlung der amastigoten Erreger in promastigote Formen statt, die sich daraufhin durch Zweiteilung massiv vermehrten. Diese Vorkultur diente zum Beimpfen einer 20 ml Kulturmedium (siehe oben) enthaltenden Kulturflasche (Corning 75 cm<sup>2</sup>, Nr. 25110). Nach 7tägiger Inkubation bei +25 °C und Zentrifugation (10 min., 2000 g) des Mediums wurden die Parasiten als Sediment gewonnen.

### *Antigenherstellung*

Zur Antigenherstellung diente folgendes Isolat: *Leishmania donovani infantum*, WHO Code No. MCAN/ES/85/STI 15. Das aus Kulturen gewonnene Sediment mit promastigoten Stadien wurde 3  $\times$  mit PBS-Puffer (0.01 M PO<sub>4</sub> pH 7.2, 0.14 M NaCl, 0,01% NaN<sub>3</sub>) gewaschen, für 10 Min. in flüssigem Stickstoff gefroren und anschliessend im Wasserbad bei +37 °C aufgetaut. Die Parasitensuspension wurde darauf mit einem Ultraschallgerät behandelt (60 Sec., 50 Watt, 80% Puls) und bei 30 000 g für 45 min. bei +4 °C zentrifugiert. Der Überstand diente als Antigenlösung.

### *ELISA*

Für den Test wurden «Nunc Immunoplates I» (A/S Nunc, Roskilde, Dänemark) verwendet und wie folgt mit Antigen beschichtet: Pro Vertiefung Einfüllen von 150  $\mu$ l Carbonat-Bicarbonat-Puffer (0.1 M, pH 9.6) mit 5  $\mu$ g Leishmania-Antigen pro ml Lösung und 0,01% NaN<sub>3</sub>. Zu testende Hundeseren wurden 1:200 mit PBS-Tween 20 (PBS mit 0,3% Tween 20 und 0,01% NaN<sub>3</sub>) verdünnt. Als Konjugat verwendeten wir eigenes, affinitätschromatographisch gereinigtes IgG vom Kaninchen (anti-Hund IgG), gekoppelt an alkalische Phosphate. Alle zusätzlichen, hier nicht beschriebenen Arbeitsschritte erfolgten gemäss Gottstein et al. (1986). Zur Resultatangabe wurden die Antikörperkonzentrationen prozentual auf einen Referenzserumwert bezogen. Ein Wert von 0%

entsprach somit einem «negativen» Resultat (keine spezifischen Antikörper nachweisbar) und ein Wert von 100% der Antikörperkonzentration im Referenzserum; dazwischen oder höher liegende %-Werte zeigten einen Antikörpernachweis mit der entsprechenden quantitativen Beziehung zum Referenzserum an.

### IIFT

Als Antigen dienten amastigote Stadien von *Leishmania donovani* in Kryoschnitten von Leber oder Milz infizierter Goldhamster. Der IIFT wurde nach der von Ambroise-Thomas (1969) beschriebenen Technik durchgeführt. Als Konjugat verwendeten wir ein FITC-markiertes Kaninchen anti-Hund IgG (Nordic Immunology No. 23–185). Das Ablesen der Reaktion erfolgte im Auflicht mit Hilfe einer konventionellen Blaulichtfluoreszenzeinrichtung mit Quecksilberdampflampe und Hellfeldkondensator (Fa. Wild, Heerbrugg, Schweiz). Titer mit dem Wert  $\leq 1:20$  wurden als «positiv» betrachtet (das heisst spezifische Antikörper nachweisbar).

### Mini-Western-Blot

Mit Hilfe der Western-Blot-Technik wurden die löslichen Antigenbestandteile von *Leishmania* durch Mini-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die so aufgetrennten Proteine wurden auf Nitrozellulose übertragen und mit Antikörpern im Hundeserum zur Reaktion gebracht. Diese Reaktion kann anschliessend mittels enzymmarkierter Zweitantikörper und Substratlösung sichtbar gemacht werden. Die Technik bietet den Vorteil, spezifische Antigene isoliert betrachten und charakteristische Bandenmuster identifizieren zu können. Das technische Vorgehen wurde von Gottstein et al. (1986) detailliert beschrieben und für unsere Untersuchungen folgendermassen modifiziert:

- Verwendung eines Mini-SDS-PAGE Systems (Bio-Rad Modell 360) mit 10%-Gelen. Die Auftrennzeit betrug 30 Min. bei 15 mA.
- Verwendung von 0,5  $\mu\text{g}$  Leishmania-Antigen pro mm «slot»-Vertiefung.
- Verwendung von folgendem Konjugat: Goat anti-dog IgG (H+L)-Peroxidase von Southern Biotechnology Assoc. (No. S070-05).

## 3. Resultate

### 3.1. ELISA

Die im ELISA bei Hunden verschiedener Untersuchungsgruppen festgestellten Ergebnisse sind in Abb. 1 dargestellt. Um einen Grenzwert zu ermitteln, der zwischen Antikörpernachweis («positive Reaktion») und «negativem» Normalbereich unterscheiden lässt, wurde der Mittelwert + 3 SD der Absorption ( $A_{404\text{ nm}}$ ) von 25 Seren der Kontrollhunde aus der Nordostschweiz errechnet (Abb. 1a). Anhand dieses Grenzwertes liess sich erkennen, dass bei allen 26 Hunden mit parasitologisch gesicherter Leishmaniose Antikörper nachgewiesen werden konnten. Die Antikörperkonzentrationen schwankten von 12–112%. Die diagnostische Sensitivität des ELISA betrug 100%.

Vier von 14 Hunden mit Babesiose zeigten im ELISA schwache Kreuzreaktionen mit *Leishmania*-Antigen (Abb. 1b). Des weiteren konnten bei 4 von 7 Hunden mit natürlicher *T. congolense*-Infektion und bei 1 von 5 Hunden mit künstlicher *T. brucei*-Infektion Antikörper gegen *Leishmania*-Antigen nachgewiesen werden. Somit wurden bei 9 von 26 Hunden mit Babesiose bzw. Trypanosomose Antikörper gegen *Leishmania*-Antigen nachgewiesen, was einer Rate von 35% Kreuzreaktionen entspricht. Alle 15 jungen SPF-Hunde (Beagles) erwiesen sich im ELISA als negativ.

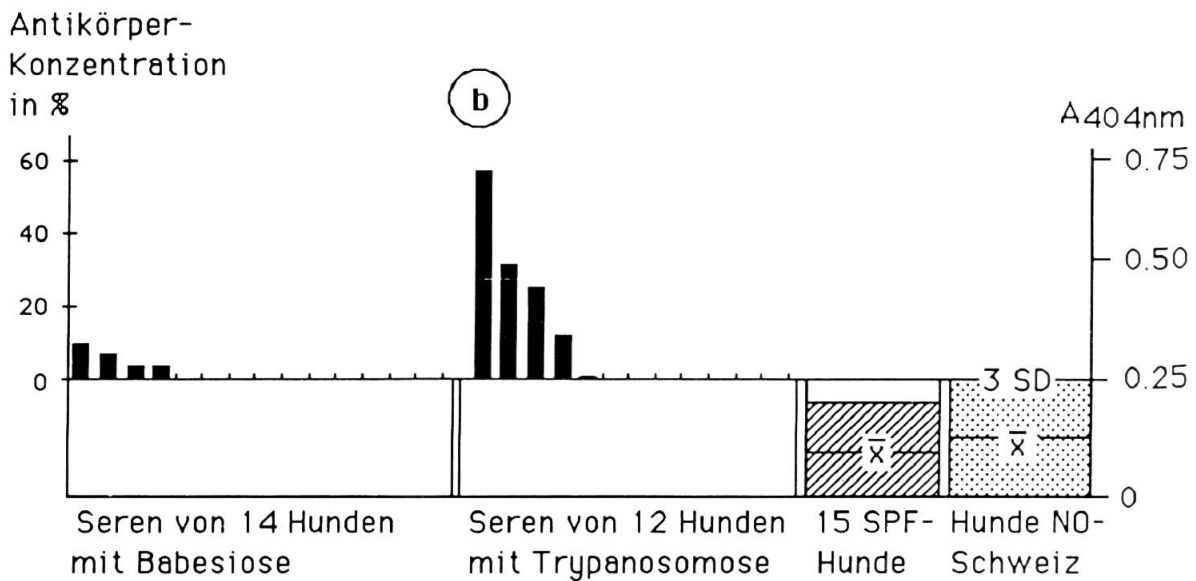
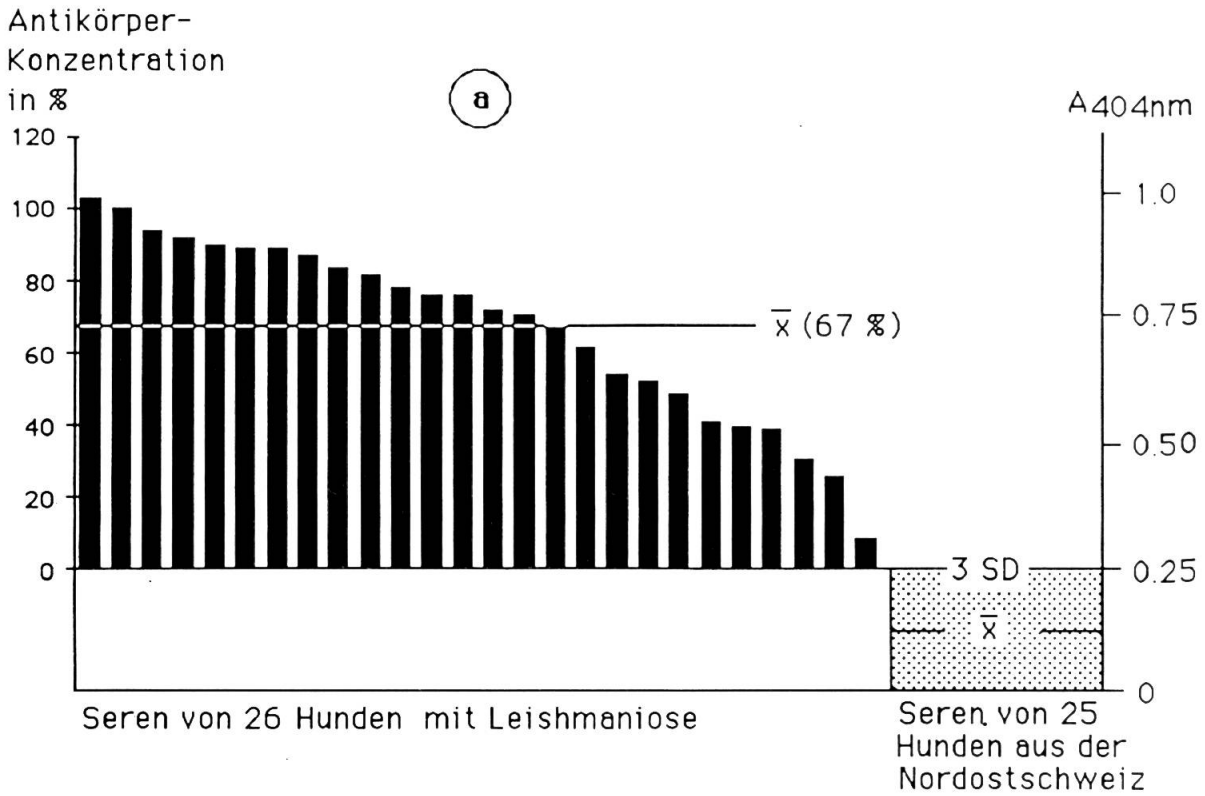


Abbildung 1 Antikörpernachweis bei Hunden mit Leishmaniose (a) und Babesiose und Trypanosomose (b) mittels ELISA und Antigen hergestellt aus *Leishmania donovani infantum* (promastigot). %-Werte zeigen einen Antikörpernachweis in quantitativer Beziehung zu einem positiven Referenzserum an.

### 3.2. IIFT

Die Ergebnisse des IIFT sind in Tabelle 1 im Rahmen einer Zusammenfassung aller ELISA-, IIFT- und Mini-Western-Blot-Resultate dargestellt. Auch im IIFT waren bei den 25 Kontrollhunden aus der Nordostschweiz und bei den 15 SPF-Hunden keine Antikörper gegen *Leishmania*-Antigen nachweisbar. Dagegen erwiesen sich alle 26 Hunde mit Leishmaniose als serologisch positiv mit einem Titerbereich zwischen 1:40 und 1:10 240. Die diagnostische Sensitivität des Tests betrug somit 100%. Im gleichen Test reagierten einer von 14 Hunden mit Babesiose und 6 von 12 Hunden mit Trypanosomose serologisch positiv. Bei insgesamt 7 von 26 Hunden entspricht dies einer Rate von 23% Kreuzreaktionen. Abbildung 2 zeigt die Korrelation zwischen den ELISA- und den IIFT-Ergebnissen bei 26 Hunden mit gesicherter Leishmaniose. Unter Verwendung einer logarithmischen Kurvenanpassung wurde ein Korrelationskoeffizient von  $r = 0,6$  errechnet. Dies lässt in quantitativer Hinsicht auf eine nicht allzu strenge Korrelation schliessen; bezüglich der qualitativen «positiv/negativ»-Diskriminierung vermögen beide Tests mit einer sehr guten diagnostischen Sensitivität richtig zu entscheiden.

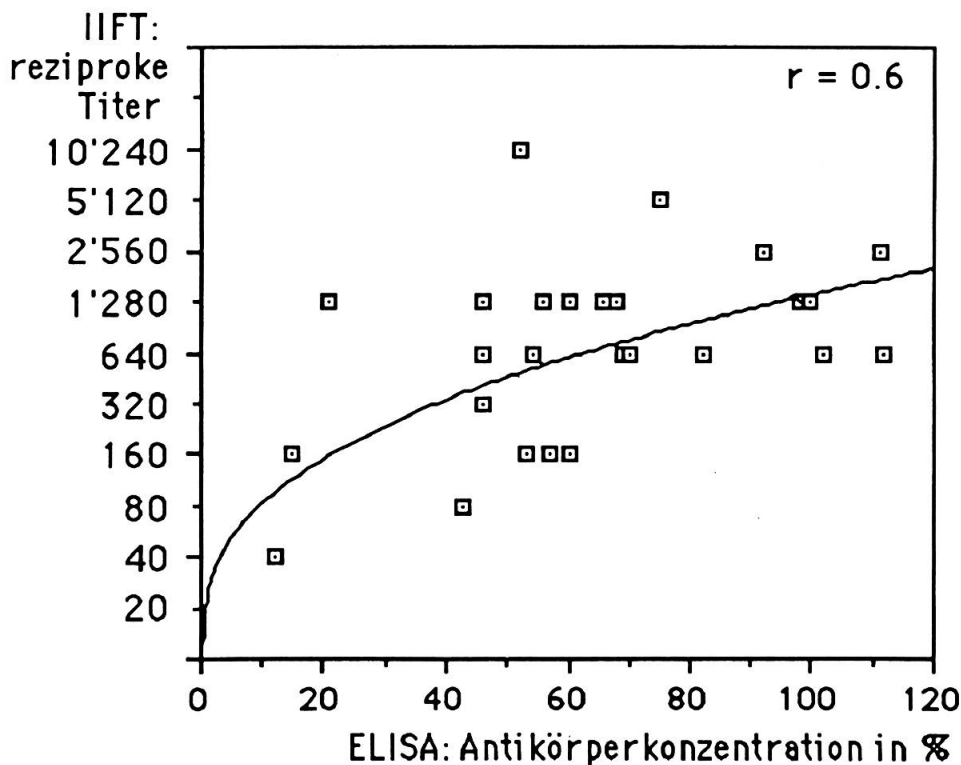
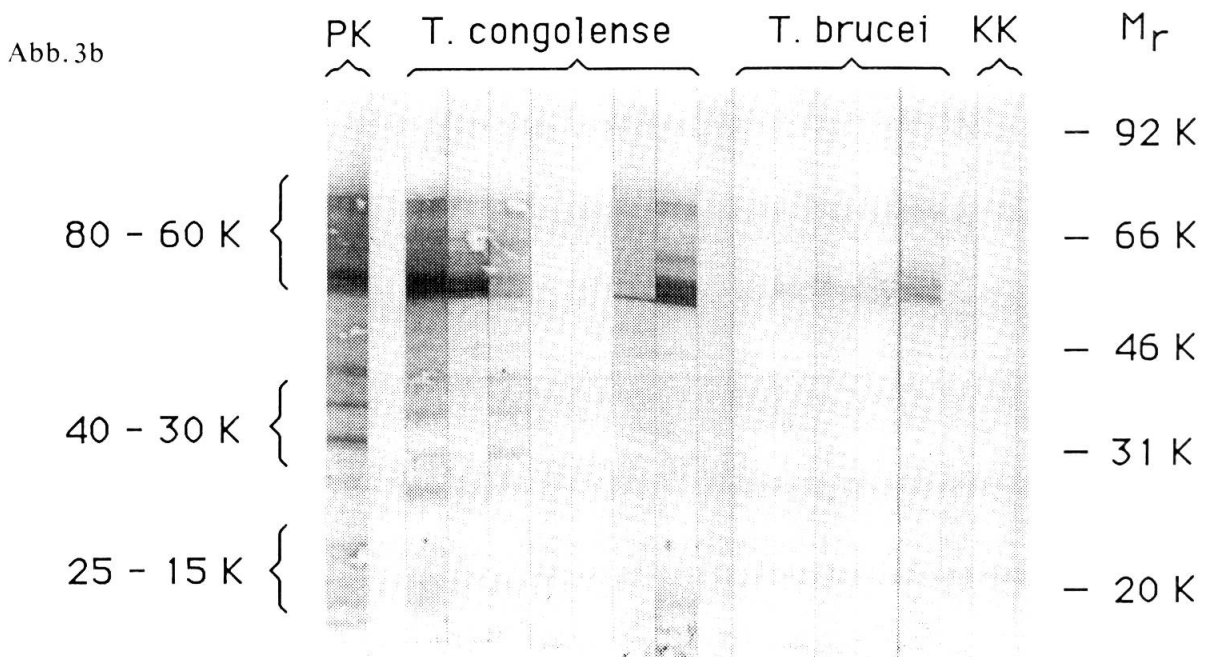
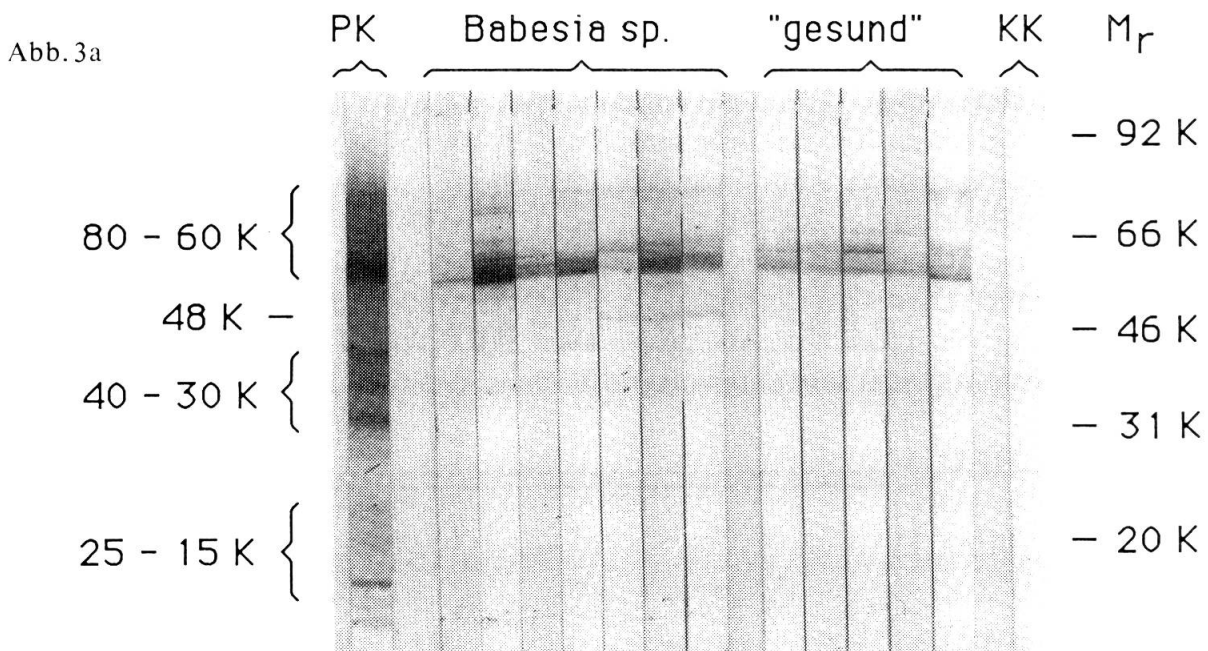


Abbildung 2 Korrelation der Ergebnisse serologischer Untersuchungen mittels ELISA und IIFT bei Hunden mit Leishmaniose.

### 3.3. Mini-Western-Blot

Wie unter «Material und Methoden» bereits beschrieben, wurde das komplexe Proteinantigengemisch von *L. donovani infantum* mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die fixierten, als Banden vorliegenden An-

tigenkomponenten wurden mit Antikörpern im Patientenserum zur Reaktion gebracht und anschliessend mittels Konjugat/Enzym-Substratfarbreaktion visualisiert. Abb. 3(a–c) zeigt das Resultat einer solchen Untersuchung an einigen repräsentativen Seren:





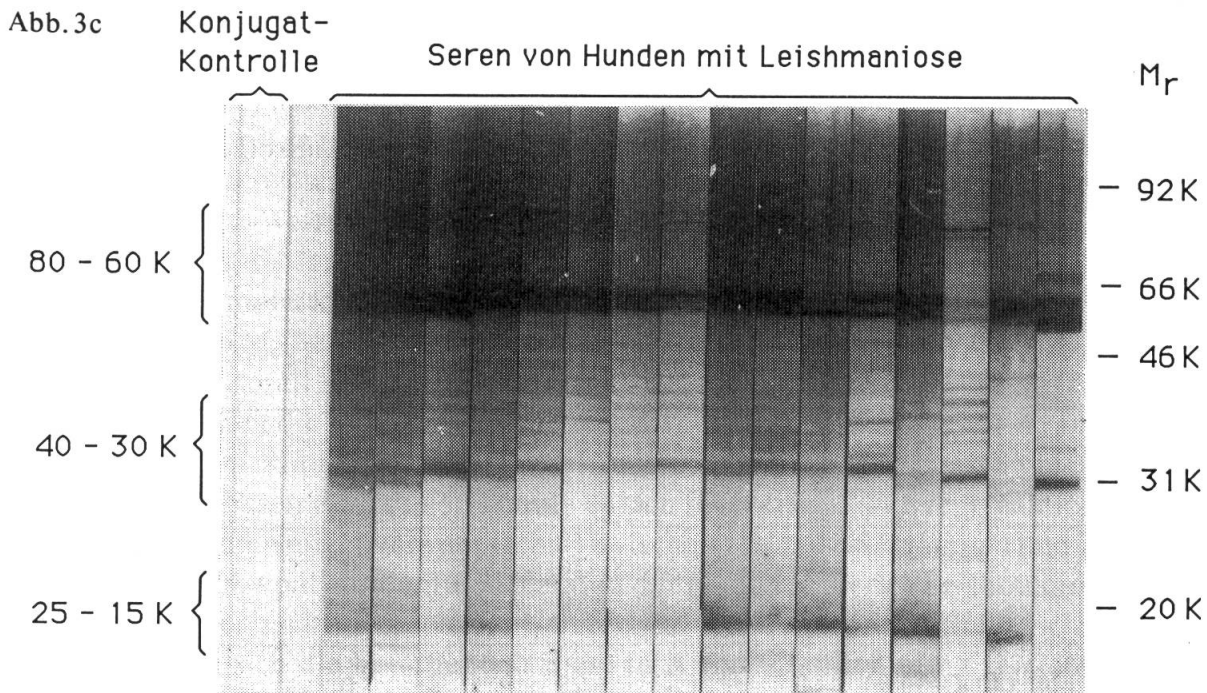


Abbildung 3 Antikörpernachweis im Mini-Western-Blot bei gesunden Hunden und Hunden mit Babesiose (3a); Hunden mit Trypanosomose (3b) und Hunden mit Leishmaniose (3c).  $M_r$  = relative Molekularmasse der Standardproteine. KK: Konjugatkontrolle. PK: mitgeführte «Positivkontrolle» (= Serum eines Hundes mit Leishmaniose).

a) Seren von 7 ausgewählten Hunden mit Babesiose (wovon 3 im ELISA Kreuzreaktionen gezeigt hatten) erkannten im Mini-Western-Blot einige Banden der *Leishmania*-Antigenkomponenten im  $M_r$ -Bereich von 80 K–60 K sowie zum Teil auch eine 48 K-Bande. Die Banden dieses  $M_r$ -Bereiches dürften somit für Kreuzreaktionen verantwortlich sein. Die zusätzliche Untersuchung von 5 ELISA-«negativen» Kontrollhunden zeigte, dass im gleichen  $M_r$ -Bereich auch schwache unspezifische Reaktionen nachgewiesen werden konnten.

b) Seren von 5 Hunden mit *T. brucei*-Infektion (wovon eines im ELISA kreuzreagierte) verhielten sich im Mini-Western-Blot ähnlich wie die unter a) beschriebenen Seren, das heißt schwache Reaktion mit Banden im  $M_r$ -Bereich 80 K–60 K sowie mit einer 48 K-Bande. Die Reaktionsmuster der Seren von Hunden mit *T. congolense*-Infektion konnten in zwei Gruppen eingeteilt werden: eine Gruppe von 2 Seren (negativ im ELISA) ohne nachweisbare Reaktion im Mini-Western-Blot und eine Gruppe von 5 Seren (4 positiv im ELISA) mit einem Bandenmuster, das dem weiter unten beschriebenen Muster der Leishmaniose entsprach.

c) 17 ausgewählte Seren von Hunden mit nachgewiesener Leishmaniose und verschiedenen Konzentrationen von anti-*Leishmania* Antikörpern (im ELISA gemessen) zeigten im Mini-Western-Blot homogene Muster der erkannten Proteinantigene, die vorwiegend in folgenden  $M_r$ -Bereichen lagen: 80 K–60 K (Bereich von Kreuzreaktio-



nen oder unspezifischen Reaktionen), 40 K–30 K (*Leishmania*-spezifischer Bereich) und 25 K–15 K (niedermolekularer Bereich).

Tabelle 1 Resultate des ELISA, IIFT und Mini-Western-Blot beim Antikörpernachweis gegen *Leishmania*-Antigenen

Test:	Hunde:			
	Nordostschweiz (ohne Inf.) n = 25	Leishmaniose n = 26	Babesiose n = 14	Trypanosomose n = 12
ELISA pos.	0	26	4	5
ELISA neg.	25	0	10	7
IIFT pos.	0	26	1	6
IIFT neg.	25	0	13	6
Mini-WB pos. (40 K–30 K)	0	25	0	5
Mini-WB neg. (40 K–30 K)	25	1	14	7

#### 4. Diskussion

Auf die Nützlichkeit der Immundiagnostik bei der Hundeleishmaniose und insbesondere auf die Verwendung des einfachen und rasch durchführbaren ELISA ist bereits in früheren Arbeiten hingewiesen worden (Reiter et al., 1985; Reusch und Reiter, 1987). Unsere Untersuchungen wurden vor allem an Hunden durchgeführt, die zur klinischen Untersuchung in die Vet.-Med. Klinik der Universität Zürich eingewiesen worden sind. Dabei hat sich die gute diagnostische Sensitivität des ELISA bestätigt. Bei allen 26 Hunden mit parasitologisch nachgewiesener Leishmaniose waren im ELISA Antikörper gegen *Leishmania*-Antigen nachweisbar, bei den meisten Fällen in relativ hohen Konzentrationen. Ein Vergleich mit dem IIFT zeigte, dass die diagnostische Sensitivität beider Testverfahren gleich ist. Die Empfindlichkeit der Testverfahren führte auch dazu, dass bei Vorliegen anderer Protozoeninfektionen, wie Trypanosomose und Babesiose, Kreuzreaktionen auftraten. Obwohl diese Kreuzreaktionen in niedrigen Bereichen der Antikörperkonzentrationen lagen, konnten solche Seren von Hunden mit Babesiose oder Trypanosomose nicht von jenen Seren unterschieden werden, die von Hunden mit Leishmaniose stammten und geringe Antikörperkonzentrationen aufwiesen. Aus diesem Grunde entwickelten wir einen zusätzlichen Test (Mini-Western-Blot) zur Abklärung der Spezifität der Antikörperreaktion. Mit diesem Test sind bei einer ähnlichen Problemstellung auf dem Gebiet der Infektionen mit Zestoden (*Taenia solium*-Zystizerkose) gute Ergebnisse erzielt worden (Gottstein et al., 1987). Bezüglich der Leishmaniose zeigten sich zwei Fakten: Erstens wiesen alle im Mini-Western-

Blot getesteten «positiven» Seren von Hunden mit Leishmaniose ein homogenes Reaktionsmuster von Banden auf, das als typisch für die *L. donovani*-Infektion angesehen werden kann. Bei einem Serum (Hund mit gesicherter Leishmaniose) mit geringer Antikörperkonzentration (9% im ELISA) konnte mittels Mini-Western-Blot keine spezifische Reaktion nachgewiesen werden, was möglicherweise auf eine etwas geringere Sensitivität des Mini-Western-Blots im Vergleich zum ELISA schliessen lässt. Zweitens zeigte sich, dass die im ELISA kreuzreagierenden Seren von Hunden mit Babesiose oder Trypanosomose im Mini-Western-Blot nicht oder nur sehr begrenzt reagierten und dann nur im  $M_r$ -Bereich zwischen 80 K–60 K und 48 K. Die Banden im  $M_r$ -Bereich 40 K–30 K sind somit alle als *Leishmania*-spezifisch anzusehen. Als offener Diskussionspunkt bleiben die Befunde von 5 Hunden mit natürlich erworbener *T. congolense*-Infektion, die im Mini-Western-Blot ein für Leishmaniose typisches Bandenmuster aufwiesen. Bei diesen Reaktionen könnte es sich theoretisch um Kreuzreaktionen aufgrund einer engen Antigenverwandtschaft zwischen *L. donovani infantum* und *T. congolense* handeln. Obwohl aus dem Lebensraum der Hunde (Liberia) Leishmaniose beim Menschen bisher nicht diagnostiziert wurde, ist jedoch mit Sicherheit nicht auszuschliessen, dass sich die betreffenden Tiere in Afrika simultan mit *T. congolense* und *Leishmania* infiziert haben könnten. Dafür sprechen die hohen Antikörperkonzentrationen gegen *Leishmania*-Antigen, die in Seren dieser Hunde nachgewiesen werden konnten (57%, 39%, 37%, 1%, 0%) und mit zwei Ausnahmen alle im vergleichbaren Bereich gesicherter Leishmaniose-Fälle lagen. Da bei der Leishmaniose asymptomatische Parasitenträger eine potentielle Infektionsquelle darstellen und später klinisch erkranken können, ist die serologische Erfassung solcher latenten Leishmaniosen von Bedeutung und zu berücksichtigen. Allerdings wird es noch weiterer Studien zur Klärung dieser Problematik bedürfen. Als «echte» Kreuzreaktion konnten im Mini-Western-Blot bei Hunden mit Babesiose Reaktionen identifiziert werden, die sich klar von typischen *Leishmania*-Reaktionsmustern abgrenzen liessen.

Nach dem heutigen Stand der Entwicklung ermöglicht die kombinierte Anwendung von ELISA/IIFT mit dem Mini-Western-Blot eine hochempfindliche und sehr spezifische Diagnose der Leishmaniose des Hundes. Der Einsatz von Tests mit grosser Spezifität ist vor allem bei epidemiologischen Untersuchungen, zum Teil aber auch bei klinischen Fällen, vorteilhaft. Mit dem Mini-Western-Blot lassen sich in Zweifelsfällen durch *Babesia* verursachte Kreuzreaktionen ausschliessen, gleiches gilt für Kreuzreaktionen, die durch *T. brucei* verursacht werden. In unseren Untersuchungen blieb die Frage offen, ob auch zwischen einer *T. congolense*-Infektion und einer Leishmaniose unterschieden werden kann. Diese Frage müsste noch abgeklärt werden.

### Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit stellt eine Testkombination vor, bestehend aus einem ELISA und einem Mini-Western-Blot, die eine spezifische Immundiagnose der Leishmaniose des Hundes ermöglicht. Mit dem ELISA konnten bei 26 Hunden mit parasitologisch gesicherter Leishmaniose Antikörper gegen ein Rohantigen aus *in vitro* kultivierten promastigoten Stadien von *Leishmania*

*donovani infantum* nachgewiesen werden. Die diagnostische Sensitivität dieses Tests betrug somit 100% und war mit der des indirekten Immunfluoreszenztests (IIFT) identisch. Die Seren von 26 Kontrollhunden aus der Nordostschweiz und von 15 SPF-Hunden waren im ELISA und IIFT negativ. Serologische Kreuzreaktionen traten in beiden Testsystemen auf. Im ELISA mit *Leishmania*-Antigen wurden bei 4 von 14 Hunden mit Babesiose (*Babesia canis*) und bei 5 von 12 Hunden mit Trypanosomose (Infektion mit *Trypanosoma congolense* oder *T. brucei*) Antikörper nachgewiesen. Diese serologischen Kreuzreaktionen wurden in einem Mini-Western-Blot unter Verwendung von *Leishmania*-Antigen näher untersucht. Es zeigte sich, dass die Seren von 17 ausgewählten Hunden mit Leishmaniose ein homogenes Bandenmuster im Bereich von M, 40 K–30 K erkannten, das sich als spezifisch für *Leishmania* erwies. Daneben kam es zu Reaktionen im Bandenbereich von 80 K–60 K, in dem unspezifische Reaktionen und Kreuzreaktionen auftraten. Serumantikörper von Hunden mit Babesiose erkannten nur Banden im 80 K–60 K-Bereich und zum Teil auch eine 48 K-Bande. Die Seren von Hunden mit Babesiose liessen sich daher eindeutig von den Seren von Tieren mit Leishmaniose unterscheiden. Dies gelang auch bei den Seren von Hunden mit *T. brucei*-Infektion und bei einigen Seren von Hunden mit *T. congolense*-Infektion. Seren von einigen anderen Hunden mit einer *T. congolense*-Infektion zeigten ein für Leishmaniose typisches Bandenmuster. Die Frage, ob bei diesen Fällen möglicherweise eine Doppelinfektion (*T. congolense* und *L. donovani*) vorlag, blieb offen.

Zurzeit stehen uns somit für Routineuntersuchungen auf Leishmaniose ein sensitiver Suchtest (ELISA oder IIFT) und für weitere Abklärungen ein spezifischer Mini-Western-Blot zur Verfügung, die beide bei epidemiologischen Untersuchungen und unklaren klinischen Fällen nützlich sein können.

### Résumé

Ce travail présente une combinaison de 2 tests, composée d'un ELISA et d'un Mini-Western-Blot, qui permet un diagnostic immunologique spécifique de la leishmaniose canine. Avec le test ELISA, 26 chiens atteints de leishmaniose confirmée par analyse parasitologique présentaient des anticorps contre un antigène brut provenant de stades promastigotes de *Leishmania donovani infantum* cultivés *in vitro*. La sensibilité diagnostique de ce test se montait donc à 100% et était identique à celle du test de l'immunofluorescence indirecte (IFI). Les sérums de 26 chiens de contrôle du nord-est de la Suisse et de 15 chiens SPF présentaient un résultat négatif au test ELISA et au test de l'IFI. Des réactions sérologiques croisées se sont présentées dans les 2 systèmes testés. Dans la méthode ELISA utilisant un antigène de *Leishmania*, 4 chiens sur 14 atteints de babésiose (*Babesia canis*) et 5 chiens sur 12 atteints de trypanosomiase (infection à *Trypanosoma congolense* ou *T. brucei*) ont présenté des anticorps. Ces réactions croisées ont été étudiées plus en détail au moyen d'un Mini-Western-Blot utilisant un antigène de *Leishmania*. Il a été démontré que les sérums de 17 chiens choisis atteints de leishmaniose reconnaissaient un modèle homogène de bandes dans la zone M, 40 K–30 K, qui s'est montré spécifique pour les *Leishmania*. En outre, des réactions se sont passées dans la zone de bande 80 K–60 K, dans laquelle des réactions atypiques et croisées se présentaient. Les anticorps sériques de chiens atteints de babésiose ne reconnaissaient que les bandes situées dans la zone 80 K–60 K et partiellement aussi une bande 48 K. Les sérums de chiens souffrant d'une babésiose se laissaient très nettement différencier de ceux des animaux atteints de leishmaniose. Ce résultat a également été obtenu pour des sérums de chiens infectés avec *T. brucei* et pour quelques sérums de chiens infectés avec *T. congolense*. Des sérums de quelques autres chiens infectés avec *T. congolense* ont démontré un modèle de bandes typique de la leishmaniose. La question de savoir s'il s'agissait peut-être dans ces cas d'une infection mixte (*T. congolense* et *L. donovani*) est restée ouverte.

Nous disposons donc actuellement d'un test sensible de détection (ELISA ou IFI) pour des examens de routine de leishmaniose et un Mini-Western-Blot spécifique pour d'autres clarifications. Ces 2 tests peuvent être utiles lors de recherches épidémiologiques et lors de cas cliniques obscurs.

### Riassunto

Il presente studio costituisce una combinazione diagnostica fra un metodo ELISA ed un Mini-Western-Blot, che permette una diagnosi immunitaria della Leishmaniosi del cane. Con l'ELISA su 26 cani con Leishmaniosi identificata parassitologicamente poterono essere individuati anticorpi contro un antigene greggio di *Leishmania donovani infantum* negli stadi promastigoti coltivati *in vitro*. La sensibilità diagnostica di questo test raggiunse il 100% e fu identica con il test indiretto dell'immunofluorescenza (IIFT). I sieri di 26 cani della Svizzera nord orientale e di 15 cani SPF risultarono negativi sia con l'ELISA sia con l'IIFT. Nei due sistemi apparvero reazioni crociate. Nell'ELISA con l'antigene *Leishmania* vennero individuati 4 cani su 14 con Babesiosi (*Babesia canis*) e 5 su 12 con Trypanosomosi (infezione con *Trypanosoma congolense* o *T. brucei*). Queste reazioni sierologiche crociate vennero esaminate più a fondo con un Mini-Western-Blot, usando un antigene *Leishmania*. Si constatò che i sieri di 17 cani prescelti affetti da Leishmaniosi presentarono una reazione nella fascia  $M_r$  40 K–30 K, che si dimostrò specifica per *Leishmania*. Inoltre vi furono reazioni nella fascia 80 K–60 K, nella quale apparvero reazioni aspecifiche e reazioni crociate. Anticopi nel sangue di cani con Babesiosi presentarono solo fasce nel campo 80 K–60 K ed in parte anche nella fascia 48 K. I sieri di cani affetti da Babesiosi poterono essere nettamente distinti da quelli dei cani con Leishmaniosi. Ciò fu possibile anche con i sieri di cani con *T. brucei* ed in alcuni con *T. congolense*. Sieri di altri pochi cani con *T. congolense* presentarono una fascia tipica per Leishmaniosi. La domanda se fra questi soggetti fosse presente una infezione doppia (*T. congolense* e *L. donovani*) rimane aperta.

Al momento attuale abbiamo dunque a disposizione per il lavoro di routine nella diagnostica della Leishmaniosi test sensibili (ELISA o IIFT) e per ulteriori ricerche un metodo specifico (Mini-Western-Blot). Entrambi possono essere usati nella ricerca epidemiologica e nei casi clinicamente non chiari.

### Summary

The present paper describes a combination of two tests, ELISA and mini-Western-blot, which allows a specific immunodiagnosis of leishmaniosis in dogs. The ELISA resulted in detecting antibodies in all sera of 26 dogs with a parasitologically proven leishmaniosis, using a crude antigen extract from *in vitro* cultivated promastigotes of *Leishmania donovani infantum*. The diagnostic sensitivity of ELISA was in accordance to that of the indirect immunofluorescence test (IIFT) and amounted to 100%. Sera of 26 control-dogs of north eastern Switzerland and of 15 SPF-dogs were all negative in ELISA and IIFT. Cross-reacting antibodies were detected with both test systems. Using ELISA and *Leishmania*-antigen, antibodies were detected in 4 from 14 dogs with a *Babesia canis* infection and in 5 from 12 dogs with trypanosomosis (infection with *Trypanosoma congolense* or *T. brucei*). Cross-reactions were visualized by mini-Western-blot. Looking at 17 sera of selected dogs with proven leishmaniosis a homogenous pattern of bands was demonstrated in the range between  $M_r$  40 K–30 K, a range which showed to be specific for *Leishmania*. Furthermore reactions were seen between 80 K–60 K, corresponding to a range of cross-reactions and non-specific reactions with serum-antibodies of dogs with babesiosis. These antibodies were also binding to a 48 K-band. In this way, sera of dogs with babesiosis could clearly be discriminated from sera of dogs with leishmaniosis. The same discrimination was also possible with sera of dogs with a *T. brucei*-infection and with sera of some dogs with a *T. congolense*-infection. Sera of some other dogs with a *T. congolense*-infection demonstrated a pattern of bands typical for leishmaniosis. Thus it remained open if these dogs were simultaneously infected with both parasite species. At present a sensitive routine screening test (ELISA or IIFT) is available for leishmaniosis as well as a specific mini-Western-blot for further investigations. Both are of potential value for epidemiologic surveys and for immunodiagnosis of doubtful clinical cases.

### 5. Literatur

*Ambroise-Thomas P.*: Etude séro-immunologique de dix parasitoses par les techniques d'immunofluorescence. Diss., Lyon (1969). — *Arnold P., Meng E., Hagen A., Suter P. F.*: Was diagnostizieren Sie? Welche Massnahmen schlagen Sie vor? Schweiz. Arch. Tierheilk. 128, 487–488 (1986). — *Berens L. R., Brun R., Krassner S. M.*: A simple monophasic medium for axenic culture of hemoflagellates. J. Parasitol. 62, 360–365 (1976). — *Bray R. S.*: Leishmaniasis in Europe — a brief note. In: Leishmaniasis (pp. 479–481). K. P. Chang & R. S. Bray (eds.). Elsevier/Amsterdam (1985). — *Chang K. P., Bray R. S.*: Leishmaniasis. Human Parasitic Diseases, Vol. 1. Elsevier/Amsterdam (1985). — *Chang K. P., Hendricks L. D.*: Laboratory cultivation and maintenance of Leishmania. In: Leishmaniasis (pp. 213–244). K. P. Chang & R. S. Bray (eds.). Elsevier/Amsterdam (1985). — *Dedet J. P., Belazzoug S.*: Leishmaniasis in North Africa. In: Leishmaniasis (pp. 353–375). K. P. Chang & R. S. Bray (eds.). Elsevier/Amsterdam (1985). — *Gottstein B., Tsang V. C. W., Schantz P. M.*: Demonstration of species-specific and cross-reactive components of Taenia solium metacestode antigens. Am. J. Trop. Med. Hyg. 35, 308–313 (1986). — *Gottstein B., Zini D., Schantz P. M.*: Species-specific immunodiagnosis of Taenia solium cysticercosis by ELISA and immunoblotting. Trop. Med. Parasit. 38, 299–303 (1987). — *Kammermann-Lüscher B.*: Leishmaniose beim Hund. Schweiz. Arch. Tierheilk. 122, 585–603 (1980). — *Reusch C., Reiter I.*: Die importierte Hundeleishmaniose: Erfahrungen zur Klinik, Diagnostik und Therapie mit Na-Stibogluconat (Pentostam®). Tierärztl. Prax. 15, 305–310 (1987). — *Reiter I., Kretzschmar A., Boch J., Krampitz H.*: 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 (1985). — *Schawaldter P.*: Leishmaniose bei Hund und Katze. Kleintierpraxis 22, 221–268 (1977).

Manuskripteingang: 31. Dezember 1987