



Baden-Württemberg

REGIERUNGSPRÄSIDIUM STUTTGART
LANDESGESUNDHEITSAMT

**ABSCHLUSSBERICHT ZUM
BMBF-FORSCHUNGSVORHABEN
02 WT 0119**

**Entwicklung von Nachweisverfahren für
Toxoplasma gondii in Roh- und Trinkwasser und
Untersuchung ausgewählter Wässer**

Januar 2001-Juli 2004

Dr. C. Wagner-Wiening, Dr. K. Hartelt, T. Feistel, D. Kliemt, Prof Dr. Dr. P. Kimmig

„Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 02WU9635/3 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor“.

Impressum

Regierungspräsidium Stuttgart
Landesgesundheitsamt
Wiederholdstr. 15, 70174 Stuttgart
Tel. 0711/1849-0, Fax 0711/1849-242
abteilung9@rps.bwl.de
www.rp-stuttgart.de
www.gesundheitsamt-bw.de

Ansprechpartner:
Dr. Christiane Wagner-Wiening
Tel. 0711/1849-217
christiane.wagnerwiening@rps.bwl.de

April 2005

Inhaltsverzeichnis

Seite

I.1.	Aufgabenstellung	4
I.2.	Planung und Ablauf des Auftrags	5
I.3.	Wissenschaftlicher und technischer Stand	6
II.1.	Methoden und Ergebnisse	8
II.1.1.	Simultane Aufkonzentrierung von Toxoplasmen-, Kryptosporidien- und Giardien-Zysten aus Wasserproben	8
II.1.2.	Detektionsverfahren zum Nachweis von Toxoplasmen, Kryptosporidien und Giardien aus Wasserproben	10
II.1.3.	Entwicklung von Methoden zur Infektkettenabklärung	13
II.1.4.	Untersuchung von Wasserproben auf Toxoplasmen, Kryptosporidien und Giardien	25
II.1.5.	Zusammenfassung	31
II.2.	Voraussichtlicher Nutzen , Verwertbarkeit der Ergebnisse	32
II.3.	Veröffentlichungen	32

I.1. Aufgabenstellung:

Nach Auftreten einer trinkwasservermittelten Toxoplasmose-Epidemie in Kanada stellte sich die Frage, inwieweit das Protozoon *Toxoplasma gondii*, das große Ähnlichkeiten mit anderen in der Trinkwasserhygiene relevanten Parasiten (*Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*) besitzt, für trinkwasservermittelte Infektionen in Deutschland in Frage kommt, vor allem in Hinblick der hohen medizinischen Relevanz dieses Krankheitserregers für Schwangere und Immunsupprimierte. Da bisher noch keine geeigneten Methoden zum Nachweis von Toxoplasmen aus Wasserproben existierten, war das Ziel des Vorhabens, eine labordiagnostische Methode zur Erfassung von Toxoplasma-Zysten aus Roh- und Reinwasserproben zu entwickeln. Die am Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg etablierte Methode zur Aufkonzentrierung der intestinalen Parasiten *Cryptosporidium* und *Giardia* mittels Envirochek-Kapsulen sollte auf den Nachweis von Toxoplasmen erweitert werden. Die anschließende Detektion des Parasiten sollte durch die Entwicklung eines Immunofluoreszenztestes gegen Zystenwandepitope der Toxoplasmen erfolgen. Durch eine Kombination des entwickelten Immunofluoreszenztestes mit dem bereits etablierten IFT-Verfahren gegen Kryptosporidien und Giardien sollte das Spektrum der Parasitenanalytik um einen weiteren wichtigen Krankheitserreger erweitert werden. Durch die Kombination unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe war eine simultane Erfassung von Kryptosporidien, Giardien und Toxoplasmen geplant. Um die trinkwasserhygienische Bedeutung von *Toxoplasma gondii* in Deutschland bewerten zu können war im weiteren Verlauf des Vorhabens geplant, ausgewählte Wässer (Oberflächen- und oberflächenbeeinflusste Wässer) mit dem entwickelten Verfahren auf Toxoplasmen zu untersuchen.

I.2. Planung und Ablauf des Auftrags

Januar 2001 -Dezember 2003	Entwicklung von Verfahren zum simultanen Nachweis von Kryptosporidien, Giardien und Toxoplasmen aus Wasserproben
Januar 2002 – Dezember 2003	Entwicklung von Verfahren zur Infektkettenabklärung bei Auftreten von Toxoplasmen- bzw. Kryptosporidien-Epidemien
Juli 2001- Juli 2003	Untersuchung von Wasserproben auf Toxoplasmen, Kryptosporidien und Giardien
Januar 2003-Juli 2004	Vergleich der unterschiedlichen Testsysteme und Auswertung der Ergebnisse

I.3. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an dem angeknüpft wurde:

Das Protozoon *Toxoplasma gondii* gehört zu den Kokzidien. Der Hauptwirt dieses Parasiten ist die Katze, in deren Darmschleimhaut die geschlechtliche Vermehrung stattfindet. Eine frisch infizierte Katze scheidet einige Wochen lang Oocysten in grosser Zahl mit dem Kot aus. Dieses sehr widerstandsfähige Dauerstadium wird über die Umwelt verbreitet und stellt die wichtigste Infektionsquelle dar. Durch die Oocysten werden Säugetiere aller Art infiziert.

Eine Infektion des erwachsenen, immunkompetenten Menschen mit dem Parasiten *Toxoplasma gondii* verläuft in der Regel subklinisch, in wenigen Fällen treten grippeartige Symptome auf. Die Bedeutung der Toxoplasmose liegt zum einen in der Möglichkeit der pränatalen Infektion. Zu dieser kommt es, wenn eine Frau sich während der Schwangerschaft erstmals infiziert. In etwa 50 Prozent der Fälle geht der Erreger auf das ungeborene Kind über und kann hier schwere Schäden verursachen. Ebenso haben immunsupprimierte Patienten ein hohes Risiko, an einer Toxoplasma-Infektion schwer zu erkranken. Nach einer abgelaufenen Infektion persistieren Zysten des Parasiten lebenslang reaktionslos in verschiedenen Organen. Kommt es zu einer Immunsuppression, z.B. nach HIV-Erkrankung, Organtransplantation oder bei Tumorpatienten, kann es zu schwer verlaufenden Toxoplasmose-Reaktivierungen kommen.

Der hauptsächliche Übertragungsweg für eine Toxoplasmose-Infektion ist noch nicht bekannt. Die Infektion von Menschen erfolgt über die orale Aufnahme von Oocysten aus Katzenkot oder durch den Verzehr von Gewebszysten in nicht gegartem Fleisch. Die Durchseuchung des Menschen steigt mit dem Lebensalter. Sie beträgt in Mitteleuropa durchschnittlich 50 Prozent.

Nach dem Auftreten hoher Seroprävalenzraten bei religiösen Volksgruppen, die sich rein vegetarisch ernähren und bei denen tierübertragende Zoonosen

aufgrund strenger Hygienevorschriften so gut wie unwahrscheinlich sind (Hall et al. 1999) stellt sich die Frage inwieweit auch Wasser ein Übertragungsweg sein kann.

Der Eintrag von Toxoplasma-Oozysten in Oberflächenwässer kann vor allem durch zystenhaltigen Katzenkot, der mit Katzenstreu über die Toilette entsorgt wird, erfolgen. Die Oozysten weisen eine sehr hohe Resistenz gegenüber Umwelteinflüssen auf, so lassen sich noch nach 200 Tagen infektiöse Stadien in Umweltproben nachweisen (Dubey 1998). Ein weiteres Kriterium ist die geringe Infektionsdosis. Schon einzelne Zysten können zu einer Toxoplasmoseinfektion führen (Were et al. 1999).

1995 wurde erstmals eine trinkwasservermittelte Toxoplasmose-Epidemie in Kanada bekannt (Bowie et al. 1997). Seither wird in den USA und anderen Ländern immer wieder die trinkwasserhygienische Relevanz dieses Parasiten diskutiert (1997 Mullens, 1998 Isaac-Renton, 1999 Aramini et al.). Inwieweit Toxoplasmen eine trinkwasserhygienische Bedeutung für Deutschland haben ist unbekannt aber aufgrund der oben genannten Gründe nicht von der Hand zu weisen. Vor allem die hohe Resistenz der Dauerstadien könnte zu Problemen vor allem in ungeschützten Oberflächenwässern bzw. Karstwässern führen, die nur durch eine chemische Desinfektion zu Trinkwasser aufbereitet werden.

Nachweisverfahren

Aufkonzentrierungsverfahren für *Toxoplasma gondii* aus Wasserproben lehnen sich an die bereits entwickelten Verfahren zum Nachweis der intestinalen Parasiten *Cryptosporidium* und *Giardia* an. Der spezifische Nachweis der Toxoplasmen erfolgt bisher aufgrund des Fehlens von Immunofluoreszenstests mit Hilfe von Maus-Inokulationstests. Der Nachweis basiert auf der Bildung von Antikörpern gegen Toxoplasmen nach Infektion. Dieses Verfahren hat abgesehen vom Aufwand erhebliche Nachteile, da eine Antikörperproduktion erst nach mehreren Tagen bis Wochen nachgewiesen werden kann.

II.1. Methoden und Ergebnisse

II.1.1. Simultane Aufkonzentrierung von Toxoplasmen-, Kryptosporidien- und Giardien-Zysten aus Wasserproben

Da sich die Parasiten *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum* bzw. *Giardia lamblia* nicht wie Bakterien aus einer geringen Wasserprobenmenge kultivieren lassen sind für die Untersuchung von Wasserproben auf diese Erreger Methoden erforderlich, die es erlauben große Wasserprobenvolumina einzuengen.

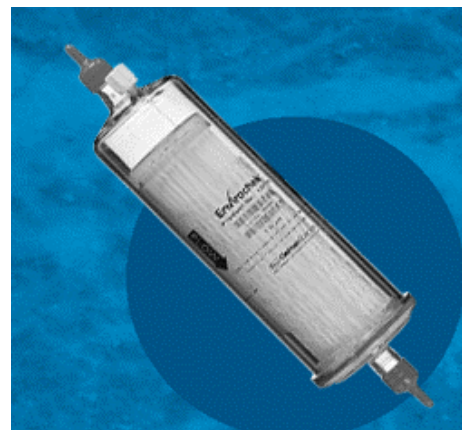
Die Methode der Aufkonzentrierung mittels Envirochek-Kapsule ist dazu geeignet, Ultraplankton bis zu einem Durchmesser von 1µm quantitativ abzuscheiden und kann somit auch zur Abtrennung von Toxoplasmen, Kryptosporidien- und Giardien-Zysten aus Wasserproben eingesetzt werden.

Dieses Verfahren wurde am LGA für die Untersuchung von Wasserproben auf Giardien und Cryptosporidien etabliert und wurde im Laufe des Projektes auf die Untersuchung von Wasserproben auf Toxoplasmen-Zysten erweitert. Hierbei sollte vor allem die simultane Erfassung von Kryptosporidien, Giardien und Toxoplasmen mit dieser Aufkonzentrierungsmethode bewertet werden.

Bestimmung der Wiederfindungsraten aus Reinwasserproben

Dazu wurden zunächst Leitungswasserproben mit Toxoplasmen, Kryptosporidien und Giardien-Zysten gespikt und die Wiederfindungsraten bestimmt.

Abb.1: Envirochek-Kapsule zur Aufkonzentrierung von Wasserproben



Das zu untersuchende Volumen der Wasserprobe wurde dazu mittels einer Schlauchpumpe durch die Filter-Kapsule gepumpt. Die in den Wasserproben enthaltenen Schwebstoffe bleiben am Filtermaterial der Kapsule hängen. Nach Beendigung der Filtration werden die Schwebstoffe mittels Elutionspuffer vom Filtermaterial gelöst und für die weitere Analytik in Zentrifugenbehälter gegeben und abzentrifugiert.

Durch Veränderung der Förderleistung der Schlauchpumpe wurden unterschiedlich gute Werte für den Abscheidegrad erreicht. Der Abscheidegrad wurde durch Auszählen der Zysten in der Neubauer-Kammer, nach Filtration und Elution, bestimmt. Der höchste Abscheidegrad von 70% für Toxoplasmen, 87% für Kryptosporidien und für Giardien mit 93 % konnte mit einer Durchlaufrate von 300 ml pro Minute erzielt werden.

Bestimmung der Wiederfindungsraten aus Rohwasserproben nach weiteren Aufreinigungsschritten

Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten aus Rohwasser wurden zu 15 aufkonzentrierten Rohwasserproben unterschiedlicher Herkunft und somit unterschiedlichem Schwebstoffgehalt in denen keine Toxoplasmen, Kryptosporidien - bzw Giardien-Zysten nachgewiesen werden konnten, Zysten dieser Parasiten zugegeben und ausgewertet. Bei Proben mit hohem Schwebstoffgehalt wurde eine Reinigung mittels Dichtegradientenzentrifugation angeschlossen (s. Tab.1).

Tab 1 : Wiederfindungsraten nach den Aufreinigungsschritten

Aufreinigungsschritt	Mittlere Wiederfindungsraten Wasserprobe1-5 (See)	mittlere Wiederfindungsraten Wasserprobe6-10 (Fluss)	Mittlere Wiederfindungsraten Wasserprobe 11-15 (Karstwasser)
Dichtegradientenzentrifugation	25 - 56 %	10 - 48 %	32 - 68 %
Waschen der Probe	10 - 45 %	10 - 35 %	30 - 60 %

Bei Rohwasserproben war eine weitere Aufreinigung des Pellets notwendig. Je nach Substratanteil und Anteil von heterogener Begleitflora schwankte die Wiederfindungsrate nach Dichtegradientenzentrifugation zwischen 10 und 68 %. Somit erlaubt die Nachweismethode in diesen Fällen nur semiquantitative Aussagen über die ursprüngliche Anzahl der Toxoplasmen, Kryptosporidien- bzw. Giardien-Zysten in der Ausgangsprobe.

II.1.2. Detektionsverfahren zum Nachweis von Toxoplasmen, Kryptosporidien und Giardien aus Wasserproben

Bei der Untersuchung von realen Wasserproben ist aufgrund der geringen Zystenzahlen und der heterogenen Begleitflora eine lichtmikroskopische Auswertung der Proben nicht möglich. Dazu werden Testverfahren benötigt die sich durch eine hohe Sensitivität und Spezifität auszeichnen. Parallel zur Detektion von Kryptosporidien und Giardien aus Wasserproben sollte daher ein Immunfluoreszenztest für Toxoplasmenzysten entwickelt werden. Hierzu wurden an der Universität Hohenheim am Institut für Parasitologie monoklonale Antikörper gegen Toxoplasmen-Zysten hergestellt.

Simultane Erfassung von Toxoplasmen, Kryptosporidien und Giardien mittels Immunfluoreszenztest

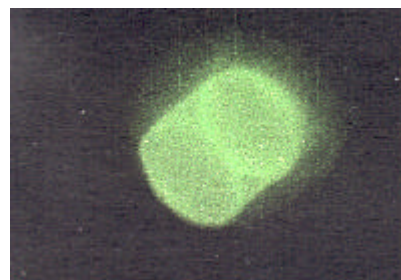
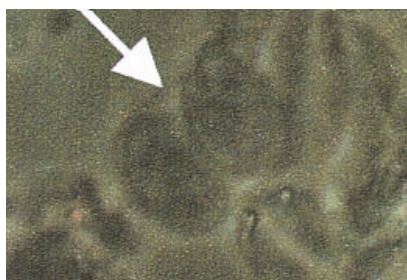
Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Toxoplasmen-Zysten

Ein Schwerpunkt der Arbeiten war die Entwicklung eines Verfahrens zur simultanen Erfassung der trinkwasserrelevanten Kryptosporidien, Giardien und Toxoplasmen aus Wasserproben. Dazu wurden „Antikörpercocktails“ kommerzieller Kits für die Detektion von Kryptosporidien und Giardien und selektierte monoklonale Antikörper gegen Toxoplasmen-Zysten eingesetzt. Mit den hergestellten fluorescein-markierten Antikörper-Lösungen sollten die Parasiten simultan erfasst werden .

Herstellung monoklonaler Antikörper (mAK) gegen *Toxoplasma gondii*

Aus den Milzen mehrfach subcutan und peritoneal mit Toxoplasma-Zysten immunisierter BALB/c- Mäuse wurden Lymphoblasten gewonnen und mit Zellen der Maus-Plasmozytomlinie P3x63Ag8.653 fusioniert. Die dadurch erhaltenen Hybridomzellen wurden in Kulturplatten vermehrt. Um die antikörperproduzierenden Klone selektieren zu können, wurde das entsprechende immunologische Detektionsverfahren (IIFT) etabliert. Die in diesem Testverfahren positiv reagierenden Klone wurden wiederholt vereinzelt (rekloniert) und dann vermehrt. Die Antigenität der eingesetzten Toxoplasmen-Zysten erwies sich als sehr gering. Es wurden insgesamt 6 Fusionen durchgeführt um geeignete Klone zu erhalten. Erst nach sechsten Fusion konnte ein reaktiver Klon selektiert werden. Der mAK zeigte vor allem eine Reaktivität mit den Sporozysten-Oberflächen (Abb.2,3). Für die fluoreszenzmikroskopische Markierung war daher ein Aufbrechen der umgebenden Oozystenwand mittels Ultraschall erforderlich.

Abb.2,3: Lichtmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung einer Toxoplasma-Zyste (beschichtet mit monoklonalem Antikörper)



Untersuchung des mAK auf Spezifität

Bei der Überprüfung der Spezifität des selektierten Antikörpers wurden keine Kreuzreaktivitäten mit Sarcocystis-, Kryptosporiden- und Eimerien-Zysten festgestellt. Der sehr nahe verwandte Vertreter der Apikomplexa *Neospora caninum* konnte nicht getestet werden, da kein Zystenmaterial

zur Verfügung stand. Bei der Überprüfung von realen Wasserproben konnten keine unspezifischen Kreuzreaktivitäten mit der isolierten Begleitflora beobachtet werden.

Simultane Erfassung von Kryptosporidien-, Giardien- und Toxoplasmen-Zysten

Zur simultanen Erfassung von Kryptosporidien-, Giardien- und Toxoplasmen-Zysten wurde der selbst hergestellte monoklonale Antikörper gegen Toxoplasmen mit dem kommerziell erhältlichen Antikörper-Testkit der Firma Meridian BioScience gepoolt. Da für die Markierung der Toxoplasmen-Zysten eine Vorbehandlung mit Ultraschall notwendig war musste überprüft werden, ob die Stabilität der Giardien- bzw. Kryptosporiden-Zysten ausreichend ist, um diese Ultraschallbehandlung auch auf diese Parasiten anzuwenden. Die durchgeführten Untersuchungen zeigten auf, daß dieses Verfahren keinen negativen Effekt auf Kryptosporidien und Giardienzysten hat. Ein Einsatz des „Antikörpercocktails“ nach Ultraschallbehandlung ist somit geeignet, um aus Wasserproben alle drei Parasiten-Stadien simultan zu erfassen. Eine Auftrennung der konzentrierten Wasserproben ist somit nicht erforderlich. (s.Abb.4,5).

Abb.4: Simultane Erfassung von Toxoplasmen, Kryptosporidien und Giardien, lichtmikroskopische Darstellung

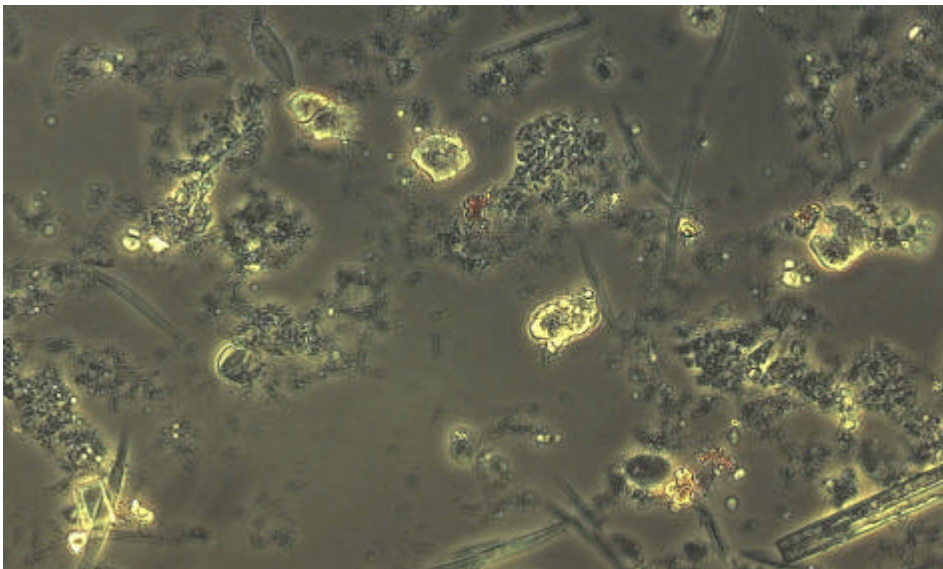
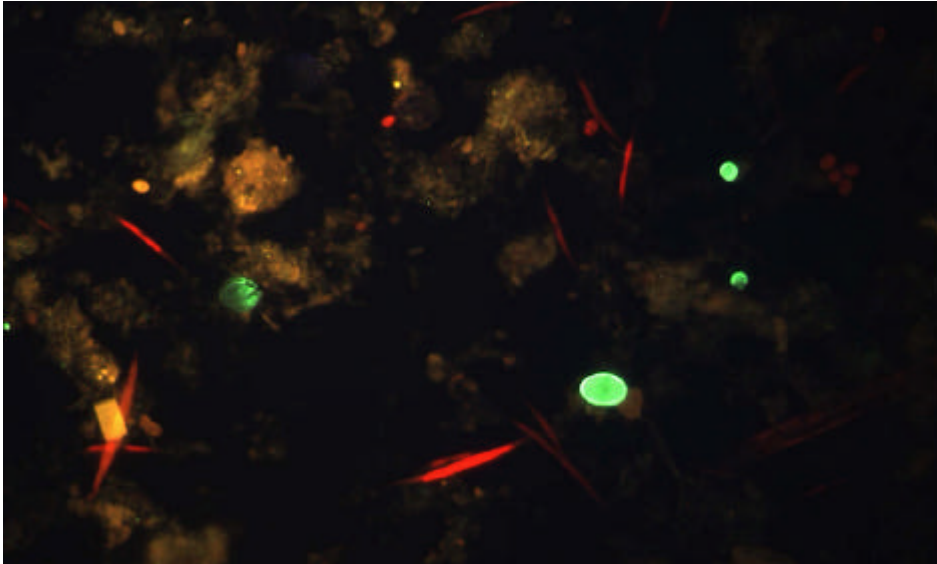


Abb.5: Simultane Erfassung von Toxoplasmen, Kryptosporidien und Giardien, fluoreszenzmikroskopische Darstellung



II.1.3: Entwicklung von Methoden zur Infektkettenabklärung

Ein weiteres Ziel des Forschungsvorhabens war es, im Rahmen der Aufklärung von möglichen Trinkwasser- bzw. Oberflächenwasser-vermittelten Infektionen Methoden zur Infektkettenabklärung zu etablieren.

Für die Infektkettenabklärung werden molekularbiologische Methoden eingesetzt, die es ermöglichen, Umwelt- und Patientenisolate anhand von genetischen Unterschieden zu differenzieren. Dabei wird durch Vergleich von Gensequenzen abgeklärt inwieweit eine Verwandtschaft der nachgewiesenen Parasitenisolate vorliegt.

Nach Vervielfältigung einer spezifischen Gensequenz mittels Polymerasekettenreaktion wird das entstandene Genfragment mittels Sequenzierung analysiert.

Nachweis von *Toxoplasma gondii* mittels Polymerase-Kettenreaktion und Sequenzierung

Entwicklung *Toxoplasma gondii* spezifischer Primer

Zur Entwicklung eines Verfahrens zur Infektkettenabklärung von Toxoplasma-Infektionen war es erforderlich, spezifische Primer neu zu entwickeln. Zielsequenz war die nicht codierende Sequenz TGR (NCBI: A26151). Die neu konstruierten Primer wurde in einer nested PCR als Startsequenzen für die 1. Amplifikation eingesetzt.

PRIMER TGR1: 5`- GTC GAC GTG TTG GGT TTG -3`

PRIMER TGR2: 5`- TGC CAG CTA ACT ACA CCT CAT -3`

Die beiden Primer amplifizieren ein 263bp Fragment.

In einer 2. Amplifikationsrunde wurden bereits veröffentlichte Primersequenzen verwendet (HOGDAL et al.).

PRIMER TGR3: 5`- GCG CCA CAT GGT CCG -3`

PRIMER TGR4: 5`- CTG ATG GGG TCA CCG C -3`

Das Amplifikationsprodukt der 2. Amplifikationsrunde (nested-PCR) besitzt eine Fragmentlänge von 220bp:

Zur eindeutigen Identifizierung Toxoplasma-spezifischer DNA ist eine hohe Spezifität der Primer unerlässlich. Zur Überprüfung der Spezifität wurden die Primer auf der NCBI-Blast-Homepage und in eigenen Versuchen überprüft.

Dabei konnte nur zu der sehr nahen verwandten Art *Neospora caninum* eine Kreuzreaktivität festgestellt werden.

Abb.6: Amplifikationsprodukt der TGR-PCR im Agarosegel

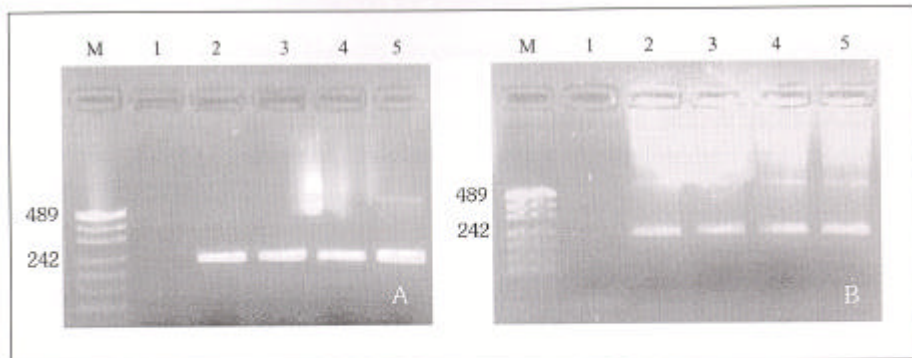


Abb. 15: Nachweisgrenze der TGR-PCR.

A: Nachweis von 10pg bis 80pg genomischer DNA

- Spur 1: negative Kontrolle
- Spur 2: Detektion von 10pg DNA
- Spur 3: Detektion von 20pg DNA
- Spur 4: Detektion von 40pg DNA
- Spur 5: Detektion von 80pg DNA

B: Nachweis von 80pg bis 650pg DNA

- Spur 1: negative Kontrolle
- Spur 2: Detektion von 80pg DNA
- Spur 3: Detektion von 160pg DNA
- Spur 4: Detektion von 220pg DNA
- Spur 5: Detektion von 650pg DNA

Um die Möglichkeit einer Nutzung der gewählten Sequenz für eine Infektkettenabklärung zu überprüfen, wurden unterschiedliche Toxoplasmen-Isolate amplifiziert und sequenziert.

Sequenz des Genlocus TGR 1A (A26151):

```

1          11          21          31          41
GTCGA CGTGT TGGGT TTGGC GCGCC ACATG GTCCG GCCGT TGTAT GGTAT
      Primer TGR1          Primer TGR3
51          61          71          81          91
GCGAT TCGTC GAGTG CATGC GCGGA TGGGT GACAG GTTGT TGGTT GTGTG
101          111          121          131          141
TCGTT ATACA GTCTG TCTGG GAGAT CGTTG GCGGT TTTGT TGAGG CGCGG
151          161          171          181          191
GAGGT AAGAG AGCAA ATGAA CGCGG GGGCG TGTGG TGTGT CTCGT GCAA
201          211          221          231          241
CTGCG GCACC ACGTA GAGAC TACTG CTGAT GGGGT CACCG CGATG AGGTG
                        Primer TGR4
251          261          271          281          291
TAGTT AGCTG GCAGC GGCGG CACTC TCGCT GGGAC ATGTC CGTGC TAGAT
      Primer TGR2
301          311          321          331          341
TGTCG GCACG GGGGT CCCTA GAAGC CGCCG GCACT CGGCA CGCAC TGTCG AC
    
```

Zum Ablauf der zyklischen Reaktion wurden hierbei folgende Parameter gewählt:

	Prä-PCR	Nested-PCR
1. Denaturierung	5 min bei 92 °C	5 min bei 92 °C
2. Denaturierung	90 sec bei 92 °C	90 sec bei 92 °C
3. Annealing	90 sec bei 55 °C	90 sec bei 55 °C
4. Elongation	90 sec bei 72 °C	90 sec bei 72 °C
5. Elongation	7 min bei 72 °C	7 min bei 72 °C
Cycles (Schritt 2-4)	45 x	45 x

Sensitivität der TGR - PCR

Die Sensitivität wurde durch eine Verdünnungsreihe genomischer *Toxoplasma*-DNA bestimmt. Die durch Halbierung der DNA-Konzentration hergestellte Verdünnungsreihe wies einen DNA-Gehalt von 1,3ng/µl bis 10pg/µl auf. Die PCR zur Amplifikation des TGR-Locus hatte eine Nachweisgrenze von 10pg genomischer *Toxoplasma*-DNA

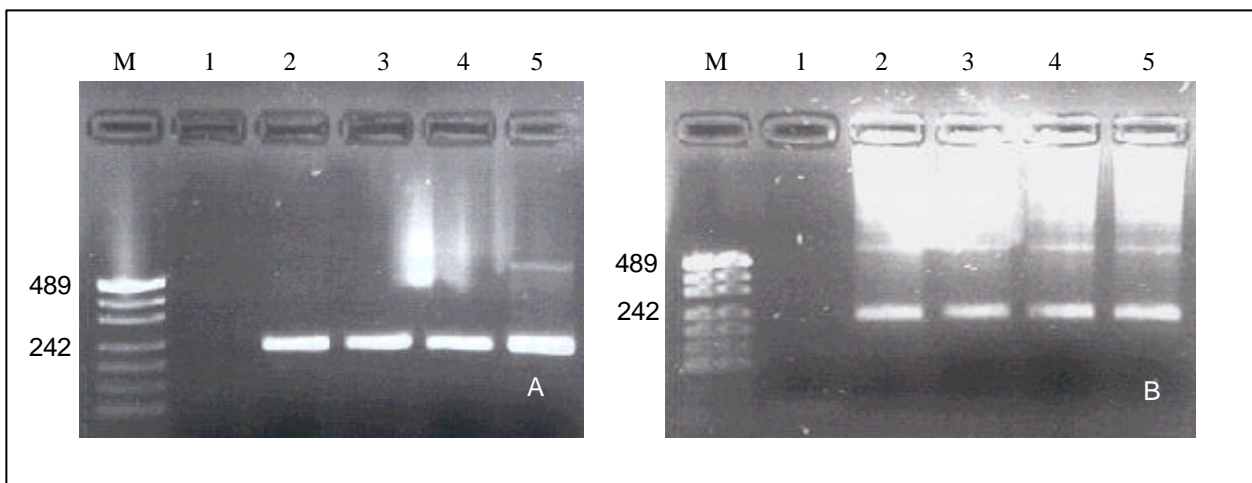


Abb.7: Nachweisgrenze der TGR-PCR.

A: Nachweis von 10pg bis 80pg genomischer DNA

- Spur 1: negative Kontrolle
- Spur 2: Detektion von 10pg DNA
- Spur 3: Detektion von 20pg DNA
- Spur 4: Detektion von 40pg DNA
- Spur 5: Detektion von 80pg DNA

B: Nachweis von 80pg bis 650pg DNA

- Spur 1: negative Kontrolle
- Spur 2: Detektion von 80pg DNA
- Spur 3: Detektion von 160pg DNA
- Spur 4: Detektion von 220pg DNA
- Spur 5: Detektion von 650pg DNA

Das Ergebnis wurde durch den Nachweis von 20 Oocysten in 10l Reinwasser bestätigt.(s.Abb 8)

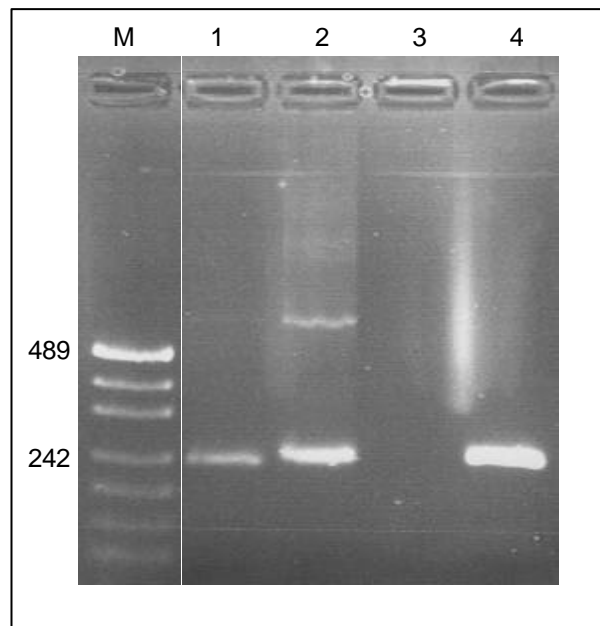


Abb.8: Sensitivität der TGR-Nachweis-PCR.
Spur 1: 20 Oocysten in Schwebstoffkonzentrat
Spur 2: 20 Oocysten aus Reinwasser
Spur 3: negative Kontrolle
Spur 4: positive Kontrolle

Sequenzierung der PCR-Produkte

Aufreinigung der Amplifikate

Im Anschluss an die nested PCR wurden die Amplifikationsprodukte mit Hilfe des QIAquick[®] PCR Purification Kits aufgereinigt.

Die Adsorption der DNA-Fragmente an die Silika-Gel-Membran der Säulen erfolgte in Anwesenheit der 5-fachen Menge an PB-Puffer, der eine hohe Salzkonzentration sowie einen pH-Wert von $\leq 7,5$ aufwies. Dieser wurde mit 30 μ l des PCR-Produktes gemischt, auf die Säule gegeben und für 1 min bei 16.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Der anschließende Waschschritt wurde mit 750 μ l PE-Puffer (1:5 mit Ethanol verdünnt, Endvolumen 500 ml) durchgeführt, um Verunreinigungen wie Salze, Enzym, ungebundene Primer und freie Nukleotide, die nicht an die Silika-Membran gebunden haben, zu eliminieren. Nach zweimaliger Zentrifugation für jeweils 1 min bei 16.000 g wurde der Durchfluss erneut

verworfen und die Silika-Gel-Membran für ~10 min bei 56 °C getrocknet, um den restlichen Alkohol zu entfernen, da er nachfolgende enzymatische Reaktionen beeinträchtigt. Die nun folgende Elution ist ebenfalls von der Salzkonzentration und dem pH-Wert des Elutionspuffers abhängig. Sie läuft unter basischen Bedingungen (pH 7,0-8,5) und geringer Salzkonzentration ab. Dazu wurden 100 µl Elutionspuffer (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) auf die Säule gegeben und nochmals bei 16.000 g für 1 min zentrifugiert. Das Eluat wurde für die Sequenzierung weiterverwendet.

Prinzip des ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzers

Beim Sequenzieren mit dem ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer werden für die vier Abbruchbasen jeweils unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe, die bei Anregung Licht verschiedener Wellenlänge emittieren, verwendet. Diese befinden sich an den Didesoxynukleotidtriphosphaten (ddNTP), die bei ihrem Einbau durch die Polymerase zum Kettenabbruch führen. Auf diese Weise entstehen DNA-Bruchstücke mit unterschiedlicher Länge, die im Gel elektrophoretisch aufgetrennt werden. Anhand des Farbsignals lässt sich die entsprechende Base in der Sequenz ermitteln. Durch die Verwendung von diesen vier Farbstoffen kann die Reaktion in *einem* Gefäß pro Probe ablaufen.

Zur Sequenzierung wird ein Gel (Performance optimized Polymer 6 (POP-6)) benötigt, das mit Hilfe einer Spritze durch eine Kunststoffkapillare gepumpt wird. Zur Detektion der Basen besitzt sie einen gläsernen Bereich, durch den ein Laserstrahl geht. Die zu sequenzierende Probe wird elektrophoretisch bei 15.000 V aufgetrennt. In diesem elektrischen Feld wandern die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Je kürzer das Stück, desto schneller passiert es das Sichtfenster mit dem Laser. Dieser regt den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff an, so dass das emittierte Licht entsprechend seiner Wellenlänge von einer Photozelle detektiert und im Computer analysiert wird.

Amplifikation

Die Sequenzierung („Cycle sequencing“), die sich an die Aufreinigung der PCR-Produkte anschließt, wurde mit dem Big Dye[®] Terminator v1.1 Cycle

Sequencing Kit durchgeführt, der sich aus dem Stofffragment der AmpliTaq (diese besitzt keine 5'→3'-Exonukleaseaktivität), den Big Dye Terminatoren, den dNTP's mit dITP anstatt dGTP und dUTP anstatt dTTP, der *rTth* Pyrophosphatase, MgCl₂ und Puffer zusammensetzt. Die AmpliTaq dient dazu, das Amplifikat zu vermehren und gleichzeitig die Abbruchbasen für die Sequenzierung einzubauen.

Der 20 µl Ansatz für die Sequenzierung enthält folgendes Reaktionsgemisch:

- 0,5 x Big Dye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit
- 1,5 x BigDye Sequencing Buffer
- 10 pmol Primer Crypto 1f MS (for) bzw. Crypto 2f MS (rev)
- 2 µl DNA-Template

Temperaturprofil der Sequenzierung:

Denaturierung	Annealing		Kühlung
Elongation			
96 °C	50 °C	60 °C	4 °C
10 sek	10 sek	4 min	∞
25 Zyklen			

Aufreinigung der Sequenzierungsprodukte und Sequenzierung

Zur Verringerung der Hintergrundfluoreszenz wurden im Anschluss an die Sequenzierung die Proben mit 2 µl 2,2 %igem SDS versetzt, für 3 min bei 94 °C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Die Behandlung mit SDS diente der Trennung von sogenannten „Farbstoffklumpen“, die durch das Aneinanderlagern ungebundener ddNTP's entstehen können.

Im nächsten Schritt wurden die Sequenzierungsprodukte mit Hilfe des DyeEx[™] 2.0 Spin Kits aufgereinigt. Dabei handelt es sich um eine Gelfiltration, bei der die im Überschuss vorhandenen BigDye Terminatoren

im Gel zurückgehalten werden, während sich die DNA-Fragmente im Durchfluss befinden.

Zur Vorbereitung des Gels wurde die Säule gemischt, um das Gelfiltrationsmaterial zu resuspendieren und anschließend für 3 min bei 700 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und das Sequenzierungsprodukt auf das Gel gegeben. Nach dem Zentrifugieren für 3 min bei 700 g wurden 4 µl des Eluats, das die gereinigte DNA enthielt, mit 20 µl TSR (Template Suppression Reagent), versetzt und anschließend in den ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer eingesetzt.

Ergebnisse der Sequenzierung von Toxoplasmen-Amplifikationsprodukten

Alle 9 sequenzierten Laborisolate unterschieden sich in 11 bis 31 Basen (5,8 – 16,4%).

Abb. 9: Vergleich aller Sequenzierungen des TGR-Locus:

	21	31	41	51	61				
TGR1A :	<u>GCGCC</u>	<u>ACATG</u>	<u>GTCCG</u>	<u>GCCGT</u>	TGTAT	GGTAT	GCGAT	TCGTC	GAGTG
ACH-1 :	<u>GCGCC</u>	<u>ACATG</u>	<u>GTCCG</u>	<u>GCCGT</u>	TGTAT	GGTAT	GCGAT	TCGTC	GGGTG
NED-4 :	<u>GCGCC</u>	<u>ACATG</u>	<u>GTCCG</u>	<u>GCCGG</u>	TGTAT	GATAT	GCGAT	TCGTC	GAGTG
BK :	<u>GCGCC</u>	<u>ACATG</u>	<u>GTCCG</u>	<u>GCCGG</u>	TGTAT	GATAT	GCGAT	TCGTC	GAGTG
JO :	<u>GCGCC</u>	<u>ACATG</u>	<u>GTCCG</u>	<u>GCCGG</u>	TGTAT	GATAT	GCGAT	TCGTC	GAGTG
KSH :	<u>GCGCC</u>	<u>ACATG</u>	<u>GTCCG</u>	<u>GCCGG</u>	TGTGT	GACAT	GCGAT	TCGTC	GAGTG
<i>N. c.</i> :	<u>GCGCC</u>	<u>ACATG</u>	<u>GTCCG</u>	<u>GCCGT</u>	TGTAT	GG TAT	GCGAC	TCGTC	GAGTG
PROBE2:	<u>GCGCC</u>	<u>ACATG</u>	<u>GTCCG</u>	<u>GCCGT</u>	GGTAT	G CGAC	TCGTC	GAGTC	GAGTC
PROBE3:	<u>GCGCC</u>	<u>ACATG</u>	<u>GTCCG</u>	<u>GCCGG</u>	TGTAT	GATAT	GCGAT	TCGTC	GAGTG
		Primer TGR3							
	66	76	86	96	106				
TGRA1 :	CATGC	GCGGA	TGGGT	GACAG	GTTGT	TGGTT	GTGTG	TCGTT	ATACA
ACH-1 :	CATGC	GCGGA	TGGGT	GAGAT	GTTAC	TTGTT	GTGTG	TCGTT	ATGCA
NED-4 :	CATGC	GCGTA	TGGGT	GAGAG	GTTAC	TGGTT	GTGTG	TCGTT	ATGCA
BK :	CATGC	GCGGA	TGGGT	GAGAG	GTTAC	TGGTT	GTGTG	TCGTT	ATGCA
JO :	CATGC	GCGGA	TGGAT	GAGAG	GTTAC	TGGTT	GTGTG	TCGTT	ATGCA
KSH :	CATGC	GCGGA	TGGAT	GAGAG	GTTAC	TGGTT	GTGTG	TCGTT	ATGCA
<i>N. c.</i> :	CATGC	ACGGA	CGGGT	GAGAG	GTTAC	TGGTT	GTGTG	TCGTT	ATGCA
PROBE2:	CATGC	GCCTA	TGGAT	AGGAG	GTTAC	CGGTT	GTGAG	TCGTT	ATGCA
PROBE3:	CATGC	GCGGA	TGGAT	GAGAG	GTTAC	TGGTT	GTGTG	TCGTT	ATGCA

	111	121	131	141	151
TGRA1 :	GTCTG T CTG	GGAGA TCGTT	GGGCG TTTTG	TTGAG GCGCG	GGAGG
ACH-1 :	G.CTG TTCTG	GGAGA TGGTC	GACCG TTTTG	TTCAG GCGCG	GGAGG
NED-4 :	GTCTG T CTG	GGAGA TGGTC	GGGCG TATTG	CCCAG GCGCG	GGAGG
BK :	GTCTG T CTG	GGAGA TGGTC	GGGCG TATTG	CCCAG GCGCC	GGAGA
JO :	GTCTG T CTG	GGAGA TGGTC	GGGCG TATTG	CCCAG GCGCG	GGAGG
KSH :	GTCTG T CTG	GGAGA TGGTC	GGGCG AATTG	CCCAG GCGCC	GGAGA
<i>N.c.</i> :	GTCTG T CTG	GGAGA TGGTC	GGGCG TATTG	CCCAG GCGCG	GGAGG
PROBE2:	GTCTG T CTA	GGAGA TGCTC	GGGCG TTATG	TTCAG GCGCG	GGACG
PROBE3:	GTCTG T CTG	GGAGA TGGTC	GGGCG TATTG	CCCAG GCGCG	GGAGG

	156	166	176	186	196
TGRA1 :	TAAGA GAGCA	AATGA .ACGC	GGGGG CGTGT	GGTGT GTCTC	GTGGC
ACH-1 :	TAAGA GAGCA	AAAGG .ACGC	GGGGG CGTGT	GCGGT GTCTC	GTGGC
NED-4 :	TAAGA GAGCA	AAAGG .ACCC	GGGGA CGTGT	GGTGT GTCTC	GTGGC
BK :	TGTTA GAAGA	AAAGG .TTGC	GGGAG CGTGT	GGTGT GTCTC	GAGGC
JO :	TAAGA GAGGA	AAAGG .ACGC	GGGGG CGTGT	GGTGT GTCTC	GTGGC
KSH :	TGTTA GAGGA	AAAGG TTCCT	GGGAG CGTGT	GGTGT GTCTC	GTGGC
<i>N.c.</i> :	TGTTA GGAGA	AAAGA TTGCG	GAGGC GTGTG	GTGTG TCTCG	.TGGC
PROBE2:	TAAGA G.AGG	AAAAG GACCC	GGGGG CGTGT	GGTGT GTCTC	GTGGC
PROBE3:	TAAGA C GAG	AAAAG GACGC	GGGGA CGTGT	GGTGT GTGTC	GAGGC

	201	211	221	231	241
TGRA1 :	AACTG CG GC	ACCAC GTAGA	GACTA <u>CTGCT</u>	<u>GATGG</u> GGTCA	<u>CCGC</u>
ACH-1 :	AACTG CC.GG	ACCAC GTAGG	GACTA <u>CAGCT</u>	<u>GATGG</u> GGTCA	<u>CCGC</u>
NED-4 :	AACTG CG.GC	ACCAC GTAGA	GACTA <u>CTGCT</u>	<u>GATGG</u> GGTCA	<u>CCGC</u>
BK :	AACTG CG.GC	ACCAC GTG.A	GACTA <u>CTGCT</u>	<u>GATGG</u> GGTCA	<u>CCGC</u>
JO :	AACTG CGTGC	ACCAC GTAGA	GAC.A <u>CTGCT</u>	<u>GATGG</u> GGTCA	<u>CCGC</u>
KSH :	AACTG CG.GC	ACCAC GTAGA	GACTA <u>CTGCT</u>	<u>GATGG</u> GGTCA	<u>CCGC</u>
<i>N.c.</i> :	AACTG CG GC	-CC-- ---GA	GACTA <u>CTGCT</u>	<u>GATGG</u> GGTCA	<u>CCGC</u>
PROBE2:	AACTG CG GC	ACCAC GTAGA	GACTA <u>CTGCT</u>	<u>GATGG</u> GGTCA	<u>CCGC</u>
PROBE3:	AACTG CG GC	ACCAC GTAGA	GACTA <u>CTGCT</u>	<u>GATGG</u> GGTCA	<u>CCGC</u>

Primer TGR4

Um die Genauigkeit der Sequenzierungen zu erhöhen, wurde das Cycle-Sequencing in sense- und antisense-Richtung durchgeführt. Die dadurch gewonnen Sequenzen wurden paarweise miteinander verglichen und von Hand mit Hilfe der Ausdrücke des Sequenzers nachgelesen.

Die folgende Tabelle zeigt die absoluten Unterschiede zwischen allen in dieser Arbeit sequenzierten Isolaten und der bereits veröffentlichten

Sequenz TGR1A. Es ist zu erkennen, dass sich jedes Isolat eindeutig in mindestens 11 Basen von einem anderen Isolat unterscheidet. Auffällig ist ebenfalls, dass die Sequenz von *Neospora caninum* im Durchschnitt mehr Unterschiede zu den *T. gondii*-Sequenzen aufwies, als die Sequenzen der *Toxoplasma*-Isolate untereinander. Daraus folgt: Die Sequenzen sind eindeutig zu unterscheiden und die Unterscheidung der zwei Gattungen *Toxoplasma* und *Neospora* ist anhand der Anzahl der Mutationen nachzuvollziehen. Besonders deutlich ist dies in den Positionen 181-196.

Tab.2 :

Übersicht über die Sequenzunterschiede zwischen allen verwendeten Isolaten.

	TGR1A	ACH-1	BK	Jo	KSH	N. caninum
TGR1A	0					
ACH1	21	0				
BK	27	28	0			
Jo	18	17	15	0		
KSH	31	30	11	15	0	
N. caninum	33	31	27	26	27	0

Die einzelnen Sequenzen zeigten somit ausreichende Unterschiede auf, um eine Differenzierung zu ermöglichen.

Nachweis von *Cryptosporidium parvum* mittels Polymerase-Kettenreaktion und Sequenzierung

Neben der im Jahr 2002 entwickelten Methode zur Sequenzierung von Toxoplasmen-Isolaten zur Infektkettenabklärung wurde eine Sequenzierung für Kryptosporidien-Isolate entwickelt.

Das entwickelte Verfahren wurde im Rahmen der Aufklärung des folgenden Ausbruchsgeschehens eingesetzt.

Typisierung von Kryptosporidien zur Verfolgung einer Schwimmbad-Infektion

Fallbericht

Im vergangenen Jahr traten einige Kryptosporidiose-Fälle in einem Landkreis von Baden-Württemberg auf, die offenbar im Zusammenhang mit einem Freibadbesuch standen. Bei den Erkrankten handelte es sich um Kinder, die im Planschbecken eines Freibads im Landkreis gebadet hatten.

Mit Hilfe eines direkten Immunfluoreszenz-Testes (IFT) konnten sowohl in den Stuhlproben als auch im Beckenwasser Kryptosporidien nachgewiesen werden. Da sich damit allein ein epidemiologischer Zusammenhang noch nicht ausreichend beweisen lässt, wurde ein molekularbiologisches Nachweisverfahren zur Typisierung von Kryptosporidien entwickelt und etabliert.

Methoden

Bisherige molekularbiologische Untersuchungen haben ergeben, dass *C. parvum* in mindestens zwei genetisch unterschiedlichen Genotypen vorkommt; Genotyp 1 bzw. H bzw. wurde ausschließlich bei humanen Infektionen gefunden, Genotyp 2 bzw. C kommt dagegen sowohl in tierischen als auch humanen Wirten vor. Mittels einer einfachen PCR, deren Primer den Mikrosatellitenloкус G35348 amplifizieren (Cacciò et al. 2000), sowie anschließender Sequenzierung war eine Unterscheidung in insgesamt sechs Subtypen möglich: Subtyp H1 und H2 innerhalb des Genotyps H und Subtyp C1 bis C4 innerhalb des Genotyps C.

Verwendetes Primersystem für *Cryptosporidium parvum*:

Nach Cacciò, S., Homan, W., Camilli, R., Traldi, G., Kortbeek, T., Pozio, E. (2000): A microsatellite marker reveals population heterogeneity within human and animal genotypes of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology* 120, 237-244

PRIMER 1: >Crypto 1f MS: 5` - CTA AAA ATG GTG GAG AAT ATT C- 3`

PRIMER 2: >Crypto 2f MS` : 5` - CAA CAA AAT CTA TAT CCT C- 3`

Basensequenz der *C. parvum*-Zielregion:

```
3` CTAAA AATGG TGGAG AATAT TCAGG AGGTT TTTAA AGATG AAAAA  
ATTAA AGGAA AAGGA AGAAT GAAAG AGGAG GAGGA AGAGG AAGAG GAAGA  
AGAAG AAGAA GAAGA AAAGG AAGAG GAGGA AGAGG AAGAA GAGGA AAAGG  
AAGAG GAAGG GAAAG AAAAA GAAGG AGATG ATGAA GAAGA TGATG GAGAA  
AAGGG GGAAA CAGAA GAGGA TATAG ATTTT GTTG 5`
```

Ergebnisse

Insgesamt wurden neun Stuhlproben sowie das Beckenwasser, bei denen mittels IFT Kryptosporidien nachgewiesen wurden, molekularbiologisch untersucht. Dabei konnte in sieben Stuhlproben sowie im Beckenwasser ein positives PCR-Ergebnis erzielt werden. Mit Hilfe der Sequenzierung konnten alle Proben dem Kryptosporidien-Subtyp H1 zugeordnet werden. Ferner wurden 4 weitere Stuhlproben von Kindern aus derselben Region untersucht, die nicht im Planschbecken waren, bei denen jedoch ebenfalls mittels IFT Kryptosporidien gefunden worden waren. In 3 Fällen war die PCR positiv, bei Sequenzierung wurde durchweg ebenfalls der Subtyp H1 identifiziert.

Diskussion

Da sowohl bei den Kindern, die das Schwimmbad besucht hatten, als auch bei denjenigen, die nicht im Schwimmbad waren, derselbe Subtyp nachgewiesen wurde, stellt sich die Frage, ob zwischen den beiden Ausbrüchen ein Zusammenhang besteht. Unter dieser Voraussetzung müsste die Infektion zunächst durch direkten Kontakt, von Mensch zu Mensch, und dann anschließend über das Beckenwasser erfolgt sein. Jedoch könnte die Infektion auch auf umgekehrtem Wege, zunächst über das Wasser und anschließend durch direkten Kontakt, zu Stande gekommen sein.

Ob tatsächlich eine Verbindung zwischen diesen Kryptosporidiose-Fällen besteht, lässt sich am ehesten anhand der geographischen Verteilung der einzelnen Subtypen verfolgen. Cacciò et al. (2000) konnten bei der Untersuchung von 48 humanen Isolaten den Subtyp H1 in 17 Proben

(35,4 %), von denen 12 Proben aus den Niederlanden und fünf aus den USA stammten, nachweisen. Ähnliche Daten ergeben sich aus einer dänischen Studie, in der der Subtyp H1 in 33,3 % (n=24) der untersuchten Proben (n=72) vorkommt, wobei die Proben nicht nur aus Dänemark, sondern auch aus Spanien, Italien, Griechenland, den USA, Afrika und Asien stammten (Enemark et al. 2002). Für Deutschland liegen bezüglich der Häufigkeitsverteilung der einzelnen Subtypen keine Daten vor. Daher lässt sich die Frage, ob bei den Kryptosporidiosen in der betroffenen Region ein epidemiologischer Zusammenhang besteht noch nicht abschließend beantworten. Mit der jetzt etablierten Methode ist eine Differenzierung in sechs Subtypen möglich. Zur Verbesserung der Infektketten-Verfolgung wird an einer weiteren Subtypisierung gearbeitet.

II.1.4. Untersuchung von Wasserproben auf Toxoplasmen, Kryptosporidien und Giardien

Zur Erprobung der etablierten Methoden zum simultanen Nachweis von Toxoplasmen, Kryptosporidien und Giardien wurden Umweltproben von drei verschiedenen Entnahmestellen untersucht. Ausgewählt wurden zwei offizielle Beprobungsstellen von Kläranlagenausläufen sowie eine Probenentnahmestelle am Neckar (Stuttgart). Mit Hilfe der unterschiedlichen Einzugsgebiete bezüglich der Stadt-/Land-Verteilung der Kläranlagen sollten die Unterschiede des Vorkommens festgestellt werden. Es wurden 53 Proben entnommen und auf Kryptosporidien, Giardien und Toxoplasmen untersucht. Da zunächst ein Nachweis der Toxoplasmen nicht mittels Immunofluoreszenztest durchgeführt werden konnte wurden die Proben halbiert. Kryptosporidien und Giardien wurden mittels IFT nachgewiesen. Toxoplasmen mittels Polymerasekettenreaktion.

Tab 3: Ergebnisse der Untersuchungen von Wasserproben auf Toxoplasmen, Kryptosporidien und Giardien.

n.b.: aufgrund des hohen Schwebstoffgehalts nicht bestimmbar

Probennummer	Entnahmestelle	Toxoplasmen-PCR	Kryptosporidien (Anzahl Zysten/10L)	Giardien (Anzahl Zysten/10L)
1	C	negativ	5	2
2	C	positiv	5	15
3	A	positiv	3	5
4	C	negativ	0	0
5	B	negativ	30	6
6	B	negativ	0	0
7	C	negativ	0	0
8	B	negativ	0	5
9	A	negativ	0	6
10	C	negativ	0	0
11	A	negativ	0	3
12	B	negativ	0	0
13	C	negativ	0	0
14	B	negativ	2	2
15	A	negativ	0	0
16	C	negativ	1	2
17	B	negativ	1	6
18	A	negativ	0	3
19	C	negativ	0	0
20	B	negativ	0	24
21	A	negativ	5	4
22	C	n.b.	n.b.	n.b.
23	A	n.b.	n.b.	n.b.
24	C	negativ	0	0
25	B	negativ	2	30
26	A	negativ	0	25
27	B	n.b.	n.b.	n.b.
28	A	n.b.	n.b.	n.b.
29	C	negativ	0	0
30	B	negativ	4	16
31	A	negativ	3	0
32	B	n.b.	n.b.	n.b.
33	A	n.b.	n.b.	n.b.
34	C	negativ	0	0

35	B	negativ	0	5
36	A	negativ	0	1
37	B	n.b.	n.b.	n.b.
38	A	n.b.	n.b.	n.b.
39	C	negativ	1	0
40	B	negativ	0	1
41	A	negativ	0	0
42	B	n.b.	n.b.	n.b.
43	A	n.b.	n.b.	n.b.
44	C	negativ	0	0
45	B	negativ	0	0
46	A	negativ	0	0
47	B	n.b.	n.b.	n.b.
48	A	n.b.	n.b.	n.b.
49	C	negativ	3	10
50	B	negativ	4	4
51	A	negativ	4	6
52	B	n.b.	n.b.	n.b.
53	A	n.b.	n.b.	n.b.

Entnahmestellen: Kläranlagenablauf 1: A, Kläranlagenablauf 2: B, Fluss: C

39 der entnommenen Wasserproben konnten auf Toxoplasmen, Kryptosporidien und Giardien untersucht werden. In 14 Fällen war aufgrund der hohen Trübung eine Analytik nicht möglich.

Die Ergebnisse der Untersuchung zeigen eine fast konstante Belastung der Entnahmestellen, sowohl der Kläranlagenabläufen als auch der Entnahmestelle am Fluss mit Kryptosporidien bzw. Giardien auf. In zwei Fällen konnte mittels Toxoplasmen-PCR eine Belastung mit Toxoplasmen nachgewiesen werden.

Überprüfung der Wasserproben mittels PCR

Von den 39 untersuchten Wasserproben waren 2 Proben in der Toxoplasmen-PCR positiv. Um eine Laborkontamination auszuschliessen wurden die gewonnenen Amplifikate mit Hilfe der Sequenzierung mit den im Labor vorhandenen Toxoplasmen-Isolaten verglichen.

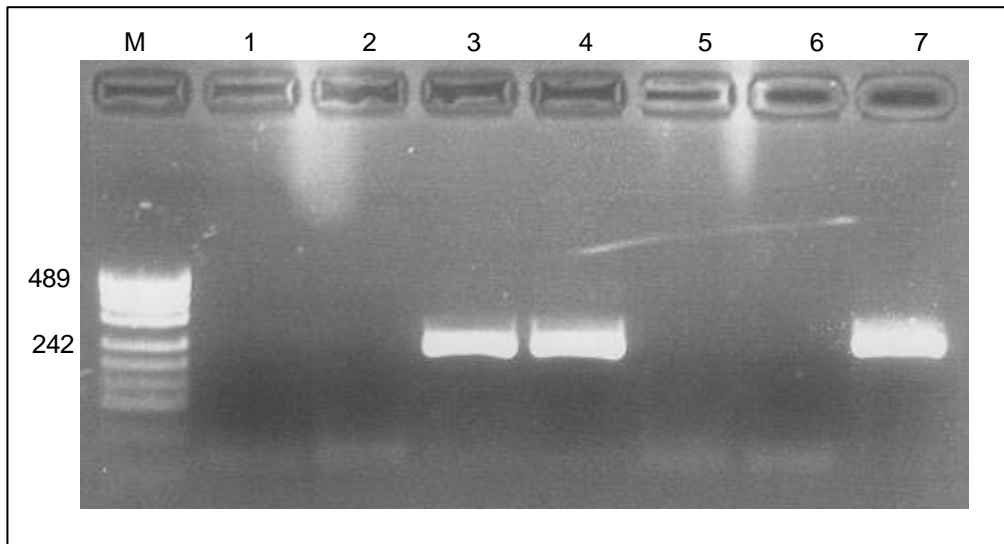


Abb.10: Nachweis-PCR des TGR-Locus der Proben 1 bis 4.

- Spur 1: negative Kontrolle
- Spur 2: Probe 1
- Spur 3: Probe 2
- Spur 4: Probe 3
- Spur 5: Probe 4
- Spur 6: negative Kontrolle
- Spur 7: positive Kontrolle

Die anschliessende Sequenzierung zeigte auf, daß es sich um unterschiedliche Isolate handelte und somit keine Laborkontamination vorlag.

Überprüfung der Wasserproben auf Kryptosporidien und Giardien mittels Immunfluoreszenz-Test (IFT)

Die Überprüfung der Wasserproben auf Zysten von *Cryptosporidium* und *Giardia* ergab folgendes Ergebnis: Von 53 Proben waren 22 positiv auf *Giardia lamblia* (s. Tab.2-4) und 15 auf Cysten von *Cryptosporidium parvum* (s. Abb.11,12)

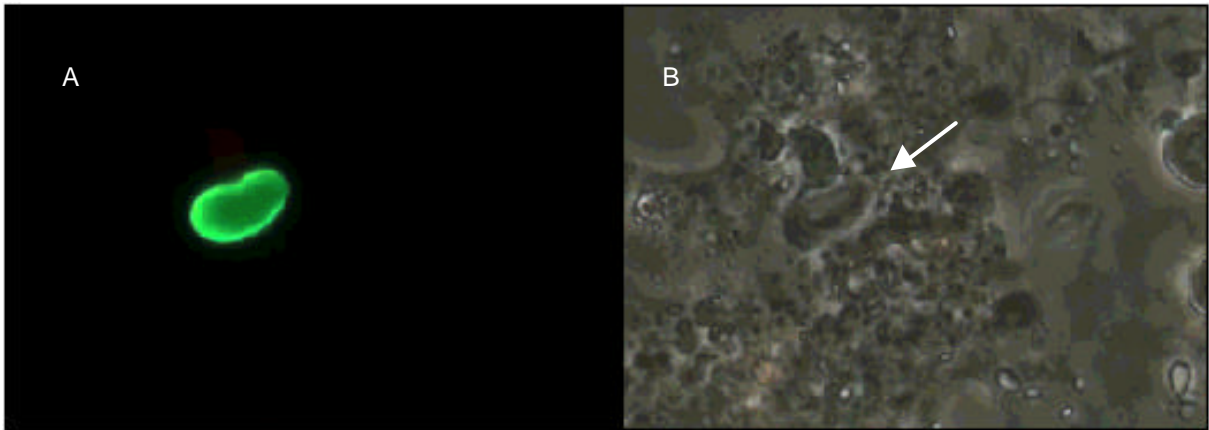


Abb.11: Cyste von *Giardia lamblia* aus Probe 24. A: FITC-immunfluoreszenzmarkiert (400x)
B: Durchlicht (400x)

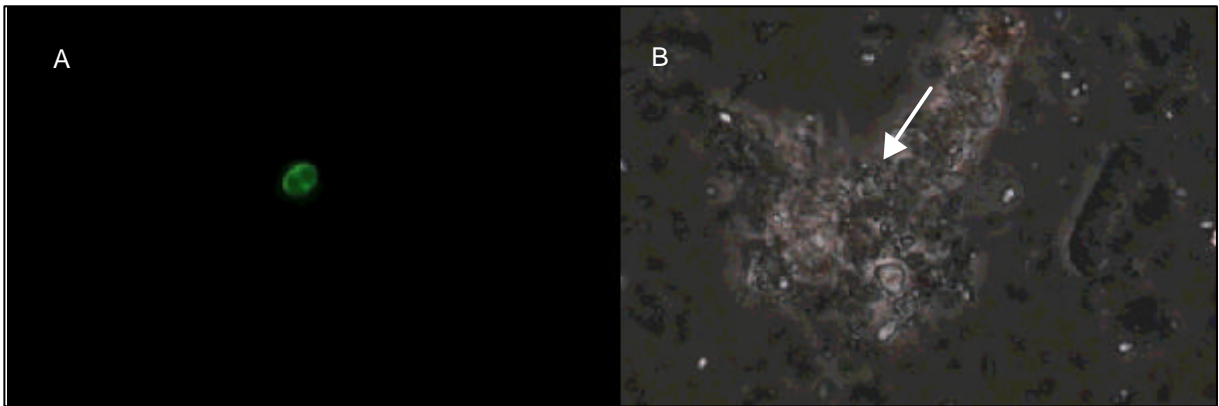


Abb12.: Cyste von *Cryptosporidium parvum* aus Probe 24. A: FITC-immunfluoreszenzmarkiert (400x)
B: Durchlicht (400x)

Betrachtung der Stadt-/Land-Verteilung des Vorkommens von *Toxoplasma gondii* in Rohwasser:

Eine Aussage über die Kontamination verschiedener Einzugsgebiete (Stadt/Land) und eines Oberflächengewässers durch Oocysten von *Toxoplasma gondii* war anhand von zwei positiven Proben nicht zu treffen.

II.1.5. ZUSAMMENFASSUNG:

Im Laufe des Projektes konnten Verfahren zum simultanen Nachweis von Toxoplasmen, Kryptosporidien und Giardien entwickelt werden.

Das Verfahren der Aufkonzentrierung von Wasserproben mittels Envirochek-Kapsulen wurde auf den Parasiten *Toxoplasma gondii* erweitert.

Gegen Toxoplasma-Zysten wurden monoklonale Antikörper entwickelt und mit Fluoreszein markiert. Damit ist es jetzt möglich, durch Poolen dieses Antikörpers mit bereits im Handel erhältlichen Antikörpern gegen Kryptosporidien- und Giardien-Zysten diese drei Parasiten simultan nachzuweisen. Darüberhinaus wurden für Toxoplasmen und Kryptosporidien molekularbiologische Methoden zur Stammtypisierung etabliert, die es erlauben, Infektketten zu verfolgen und damit Aufschluß über mögliche Infektionsquellen zu erhalten.

Insgesamt wurden 53 Wasserproben aus unterschiedlichen Entnahmestellen aufbereitet und auf Toxoplasmen, Kryptosporidien und Giardien untersucht. Dabei konnte in zwei Umweltproben genomische DNA von *Toxoplasma gondii* nachgewiesen werden. Durch eine angeschlossene Sequenzierung ließ sich zeigen, daß es sich um separate Toxoplasmen-Isolate handelte, und nicht der nah verwandte Parasit *Neospora caninum* mit der PCR erfaßt worden war.

Kryptosporidien konnten in 11, Giardien in 22 Wasserproben nachgewiesen werden.

Mit den jetzt etablierten Nachweismethoden sollten in Zukunft weitere Wasserproben auf Oocysten von *Toxoplasma gondii* untersucht werden, um die epidemiologische Bedeutung dieses Parasiten in Rohwässern weiter abzuklären.

II.2. Voraussichtlicher Nutzen, Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die Erweiterung der Parasitenanalytik aus Wasser auf den Nachweis von *Toxoplasma gondii* stellt einen wichtigen Beitrag zur Abklärung trinkwasserrelevanter Krankheitserreger dar. Da der Übertragungsweg für viele Toxoplasmose-Erkrankungen unklar ist, kann mit Hilfe der entwickelten Methoden der Übertragungsweg Wasser abgeklärt werden. Dabei kann das Landesgesundheitsamt die Funktion eines Referenzlaboratoriums für den Nachweis von Parasiten aus Wässern wahrnehmen. Unabhängig von der aktuellen epidemiologischen Relevanz von Toxoplasmen sollte zumindest bei speziellen Problemen wie z.B. Störfällen ein Toxoplasma-Nachweisverfahren in einem Referenzlabor zur Verfügung stehen. Die Erweiterung der Analytik auf die Genotypisierung zur Infektkettenabklärung stellt ein wichtiges Instrumentarium für die epidemiologische Surveillance dar und kann bei Auftreten von Epidemien zu einer schnellen Aufklärung von Übertragungswegen führen. Mit dem im Jahr 2003 entwickelten Verfahren zur Abklärung von Infektketten für Kryptosporidien-Isolate und der geplanten Erweiterung auf Giardien-Isolate stehen dem LGA geeignete Methoden für weitere trinkwasserrelevante Erreger zu Verfügung.

II.3. Veröffentlichungen

Liegen bisher nicht vor.