

Zur Diagnostik der *Leishmania*-Infektionen

Diagnosis of *Leishmania* infections

Gabriele Schönian^{1,*}, Amer Al-Jawabreh^{1,2} und Wolfgang Presber¹

¹ Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsmedizin Berlin Charité, Berlin, Deutschland

² Islah Charitable Social Society, Jericho, Palästina

Zusammenfassung

Mehr als 20 Leishmanien-Spezies sind für den Menschen pathogen. Leishmaniosen kommen in über 100 Ländern endemisch vor. In den letzten Jahren haben sie in Südeuropa auch eine besondere Bedeutung als Erreger von Koinfektionen mit HIV erlangt. Neben der Einschleppung der Krankheit durch infizierte Personen oder Hunde erscheint auch eine Übertragung des Erregers in Deutschland selbst möglich. Damit gewinnt die Diagnostik von Leishmaniosen an Bedeutung.

Der mikroskopische Nachweis der Erreger in Biopтата (Ulkusrand, Lymphknoten, Knochenmark, Milz und Leber) ist der Goldstandard. Neben einigen Antigen- und Antikörpernachweisen bei generalisierten Erkrankungen werden immer häufiger PCR-Nachweise eingesetzt. Vorteile der PCR sind ihre hohe Empfindlichkeit und hohe Spezifität wie auch die Tatsache, dass sie eine Spezies- oder sogar Subspezies-Diagnose ermöglicht. Auch auf Filterpapier getrocknete Proben oder Giemsa-gefärbte Objektträger sind als Untersuchungsmaterial geeignet.

Schlüsselwörter: Anzucht; Kala Azar; Leishmaniosen; Mikroskopie; Orientbeule; PCR.

Abstract

More than 20 species of *Leishmania* are pathogenic for human beings, and leishmaniasis are endemic in more than 100 countries. In the Mediterranean part of Europe, they emerged as co-infecting agent in HIV-patients. In addition to importation by humans, especially dogs may bring *Leishmania* to Germany, where a transmission by sand flies seems to be possible. Thus, the diagnosis of leishmaniasis is of increasing importance.

*Korrespondenz: Dr. Gabriele Schönian, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsmedizin Berlin Charité, Dorotheenstrasse 96, 10098 Berlin, Deutschland
Tel: +49 030-450524028
Fax: +49 030-450524902
E-mail: gabriele.schoenian@charite.de

Microscopic proof of *Leishmania* in biopsies (of the sore, lymph nodes, bone marrow, spleen, or liver) is the gold standard. Besides some tests to detect antigens or antibodies, especially PCR is becoming increasingly useful. Combining high sensitivity and high specificity, PCR enables the differentiation between species and often subspecies. Another advantage is that PCR may be carried out using dried material spotted on filter paper or even stained slides.

Keywords: culture; kala azar; leishmaniasis; microscopy; oriental sore; PCR.

Biologie der Leishmanien und ihre Bedeutung - auch in Deutschland

Gegenwärtig sind mindestens 20 humanpathogene Arten der Leishmanien bekannt, die, in Abhängigkeit von der Virulenz der Erreger und der Immunabwehr des Wirtes, unterschiedliche kutane und/oder viszerale Krankheitsbilder beim Menschen hervorrufen (Tabelle 1). Leishmaniosen stellen ein wichtiges globales Gesundheitsproblem dar. Etwa zwei Millionen Menschen in 88 tropischen und subtropischen Ländern der Alten (AW) und der Neuen Welt (NW) erkranken jährlich an den unterschiedlichen Formen dieser Parasitose [1, 2]. Die derzeit verfügbaren Chemotherapeutika sind teuer, müssen, mit Ausnahme von Miltefosin, parenteral verabreicht werden und haben zahlreiche Nebenwirkungen [3].

Leishmanien sind zu den Protozoen gehörende Flagellaten, die durch weibliche Schmetterlingsmücken der Gattungen *Phlebotomus* (AW) und *Lutzomyia* (NW) übertragen werden. Die Stiche dieser behaarten, sehr kleinen Mücken sind schmerzhaft. Körperbedeckende Kleidung, Repellentien, Insektizide und engmaschige, imprägnierte Bettnetze (0,5 mm) sind daher die Prophylaxe der Wahl. Andere Übertragungswege, wie z. B. Mutter-Fötus-Übertragung, Bluttransfusionen, Organ-(Leber-)transplantationen oder i.v. Drogenmissbrauch, galten früher als selten, werden heute aber zunehmend beschrieben [4-7].

In der Mücke kommen die Leishmanien im Darm als begeißelte promastigote Form vor. Die Erreger werden nicht mit dem Speichel auf den neuen Wirt übertragen, sondern in die "Stichwunde" erbrochen, da die Mücke

Tabelle 1 Vorkommen, Klinik, Vektoren und Reservoirwirte der wichtigsten humanpathogenen *Leishmania*-Arten.

Erreger	Krankheitsbild	Wirte	Vektoren	Vorkommen
<i>L. donovani</i>	VL (PKDL, CL) Kala Azar, Orientbeule	nur Mensch (Hunde im Sudan?)	<i>Ph. orientalis</i> <i>Ph. martini</i> <i>Ph. argentipes</i>	Sudan Kenia, Äthiopien Nordost-Indien, Nepal, Bangladesh
<i>L. infantum</i> (Syn. <i>L. chagasi</i>)	VL, CL HIV-Koinfektionen Kala Azar, Orientbeule	Mensch und Caniden (Zoonose)	<i>Ph. ariasi</i> <i>Ph. perniciosus</i>	Südfrankreich Zentrales und westliches Mittelmeergebiet (Europa, Nordafrika) Mittelmeergebiet bis Iran Zentral- und Südamerika
<i>L. tropica</i>	CL, LR Orientbeule, trockene Form	nur Mensch	verschiedene <i>Lu. longipalpis</i> , <i>Lu. evansi</i> <i>Ph. sergenti</i> <i>Ph. Guggisbergi</i> u. a.	Zentral- bis Südwest-Asien Äquatorial- und Südwestafrika, Kenia und Namibia
<i>L. major</i>	CL Orientbeule, feuchte Form	Nagetiere, Mensch (Zoonose)	<i>Ph. papatasi</i>	Nordafrika, Südwest- und Zentralasien
<i>L. aethiopica</i>	CL, DCL Chronische Orientbeule	Nagetiere, Mensch (Zoonose)	<i>Ph. duboscqi</i> <i>Ph. longipes</i> <i>Ph. pedifer</i>	Westafrika bis Kenia, Sahelzone Äthiopien, Kenia
<i>L. braziliensis</i> complex*	CL, MCL, DCL Espundia	Mensch tierisches Reservoir? (Zoonose)	<i>Lu. wellcomei</i> <i>Lu. whitmani</i>	Südamerika
<i>L. guyanensis</i>	CL, MCL, DCL	Mensch, Faultier (Zoonose)	<i>Lu. umbratilis</i> <i>Lu. whitmani</i> <i>Lu. anduzei</i>	Guayana
<i>L. panamensis</i>	CL, MCL, DCL	Mensch, Faultier (Zoonose)	<i>Lu. Trapidoi</i> <i>Lu. Ylephiletor</i> <i>Lu. Gomezi</i> <i>Lu. panamensis</i>	Panama
<i>L. peruviana</i>	CL (Uta)	Transmission hauptsächlich über Mensch	<i>Lu. Verrucarum</i> <i>Lu. Peruensis</i> <i>Lu. ayacuchensis</i>	Trockentäler in den westperuanischen Anden
<i>L. mexicana</i>	CL (MCL) Chiclero's Ulkus	Mensch, Nagetiere (Zoonose)	<i>Lu. Olmeca</i> <i>Lu. anthrophora</i>	Zentralamerika Texas
<i>L. amazonensis</i>	CL, DCL	Mensch, Opossum (Zoonose)	<i>Lu. flaviscutellata</i>	Südamerika, nördlich des Amazonas

Adaptiert nach [2]. CL: kutane Leishmaniose, DCL: diffuse kutane Leishmaniose, LR: Leishmaniose-Rezidiv, Lu.: Lutzomyia, MCL: mukokutane Leishmaniose, Ph.: Phlebotomus, VL: viszerale Leishmaniose.

infolge einer durch die Parasiten zerstörten Kardialklappe den Unterdruck zum Saugen nicht aufrechterhalten kann.

Wenn geeignete Vektoren vorhanden sind, können die Erreger auch in Ländern übertragen werden, in denen die Krankheit bisher nicht endemisch war. Die geographische Verbreitung, das endemische Vorkommen und die Transmissionsperiode der unterschiedlichen Leishmanien-Spezies korrelieren mit der Verbreitung und der Menge der vorhandenen Vektoren.

Die meisten Leishmaniosen sind Zoonosen. Caniden oder verschiedene Nagetiere sind die wichtigsten Reservoir für die Parasiten. In Lateinamerika sind aber auch Opossum, Faultier und Gürteltier als Reservoir beschrieben. Hunde sind wegen ihrer Nähe zum Menschen als Reservoir für *L. infantum/chagasi* von besonderer Bedeutung. Lediglich für *L. donovani* und *L. tropica* wurden bisher keine tierischen Reservoir identifiziert [2].

Leishmanien kommen im Gegensatz zu den mit ihnen verwandten Trypanosomen im Vertebratenwirt – also

auch im Menschen – immer intrazellulär vor. In den Wirtszellen, den Makrophagen, wandeln sie sich in geißellose (amastigote) Formen um, die nur noch 2–5 µm groß sind. Durch Zelltod werden sie freigesetzt und können neue Zellen infizieren. Die Inkubationszeit kann von zwei Wochen bis zu zwei bis drei Jahren betragen.

In Europa sind viszerale und kutane Erkrankungen durch *Leishmania infantum* im Mittelmeergebiet endemisch. In den letzten Jahren wurde aus Italien, Frankreich, Spanien und Portugal über einen Anstieg von *Leishmania*-HIV-Koinfektionen mit einer eher untypischen Symptomatik berichtet [7]. Darüber hinaus ist sowohl der Verlauf einer Infektion mit bekannten Spezies schwerer und es treten Erkrankungen auf, die durch Spezies hervorgerufen wurden, bei denen ein humanpathogenes Potential bisher unbekannt war [7]. Hieraus leiten sich neue Anforderungen an die Diagnostik ab.

Abhängig von der infizierenden Art und vom Immunstatus des Patienten können Leishmanien unterschiedliche Krankheitsbilder hervorrufen (Tabelle 1).

Kutane Leishmaniosen (CL), auch als *Orientbeule*, Aleppo-, Bagdad- oder Delhibeule bekannt, stellen sich als meist schlecht heilende, nicht juckende Läsionen häufig an unbedeckten Körperstellen dar:

- große, “feuchte” Nekrosen (mit schlechterer Heilungstendenz):
oft *L. panamensis*, *L. braziliensis* oder
- kleinere, oft indolente, “trockene” Ulzerationen:
oft *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. peruviana*.

Die Durchmesser können wenige Millimeter bis einige Zentimeter betragen. Bei *L. major* sind multiple Läsionen häufig. Als Besonderheit können die drainierenden Lymphknoten befallen sein, was eine lymphogene Ausbreitung zur Folge hat. Multiple Läsionen, die den Lymphbahnen folgen, auch als disseminierte kutane Leishmaniose bekannt, sind insbesondere bei Infektionen mit *L. guyanensis* beschrieben.

Obwohl bei kutanen Erkrankungen oft keine oder wenig Antikörper nachweisbar sind, besteht in der Regel eine mehrjährige oder lebenslange Immunität. Ein Hauttest kann lebenslang positiv sein. 90% der Fälle von CL werden aus Afghanistan, Saudi-Arabien, Algerien, Brasilien, Iran, Irak, Syrien und Sudan berichtet. Die Diagnose in Endemiegebieten erfolgt klinisch und durch den mikroskopischen Nachweis der Erreger im Biopat vom Ulkusrand.

Eine schwerere Verlaufsform der kutanen Leishmaniose ist die *diffuse kutane Leishmaniose (DCL)*. Sie ist das Ergebnis einer relativen Anergie. Im Gegensatz zur “normalen” kutanen Leishmaniose können reichlich Erreger im Biopatmaterial nachgewiesen werden. Bisher wurden derartige, oft entstellende Krankheitsbilder aus Lateinamerika (Venezuela und der Dominikanischen Republik) und Afrika (Äthiopien und Kenia – meist hervorgerufen durch *L. aethiopica*) beschrieben. Insbesondere in Afrika wurden diese Verläufe anfänglich als lepromatöse Lepra fehldiagnostiziert.

Die *mukokutane Leishmaniose (MCL)* ist besonders in Lateinamerika häufig. Die bekannteste Form ist die *Espundia*, hervorgerufen durch *L. braziliensis*. Oft tritt sie, teilweise auch nach Jahren, nach der Abheilung einer Primärläsion auf. In der Regel sind dann Nasen- oder Mundschleimhaut betroffen. Es können sich entstellende Destruktionen im Gesicht entwickeln. Schwere Defekte des weichen und auch harten Gaumens können, insbesondere wenn sie das Schlucken beeinträchtigen, zu lebensbedrohlichen Komplikationen führen.

Eine Sonderform stellt das Chiclero’s Ulkus dar, welches durch Haut- und Knorpeldefekte am äußeren Ohr charakterisiert ist. Das Chiclero’s Ulkus, hervorgerufen durch *L. mexicana*, ist eine “Berufskrankheit” der Kautschuksammler (Chiqueros).

In der AW ist dieser Krankheitsverlauf selten. Von mukokutanen Leishmaniosen wird aber aus dem Sudan berichtet. Dabei scheint die Läsion an der Eintrittsstelle oder auf einem nahe gelegenen Schleimhautareal aufzutreten.

Bei diesen “chronischen Verläufen” sind die Erreger in den Läsionen mit den klassischen Methoden oft nur schwer nachzuweisen. Antikörperrnachweise (ELISA, IFAT) oder Hautteste sind deshalb die vor Ort gebräuchlichsten Methoden der Diagnostik.

Viszerale Leishmaniose (VL; Kala Azar oder die “Schwarze Krankheit”) ist die schwerste Verlaufsform. 90% der Erkrankungen treten auf dem indischen Subkontinent, im Sudan, in Kenia sowie in Brasilien auf. Die durch *L. donovani* bzw. *L. chagasi* (Synonym für *L. infantum*) hervorgerufene Krankheit kann mit einer Ulzeration an der Bissstelle beginnen. Kala Azar ist durch Spleno- und/oder Hepatomegalie und progressive Kachexie gekennzeichnet und verläuft unbehandelt oft tödlich. Anämie, Leukopenie und Thrombozytopenie sind häufig, Lymphadenopathien dagegen sind eher selten.

Die infantile viszerale Leishmaniose wird durch *L. infantum* hervorgerufen und ist im Mittelmeerraum verbreitet. Bei immunkompetenten Erwachsenen verläuft die Infektion asymptomatisch, subklinisch mit spontaner Ausheilung oder mit einer kutanen Symptomatik. Zunehmend wird von Koinfektionen von *L. infantum* mit HIV mit oft schwersten Verläufen aus dem Mittelmeerraum (Spanien, Italien, Frankreich) berichtet [7].

Eine besondere Verlaufsform ist das *Post-Kala-Azar Dermal Leishmanoid (PKDL)*. Teilweise bis zu zwei Jahre nach erfolgter Therapie entwickeln Patienten, die scheinbar von einer durch *L. donovani* verursachten Kala-Azar geheilt wurden, eine PKDL. Ob das auf eine Parasitenaussaat nach einer unzureichenden Therapie oder aber auf eine neue Infektion zurückzuführen ist, konnte noch nicht geklärt werden. Typisch sind zum Teil sehr große, noduläre oder erythematöse Veränderungen der Haut. Auch Fälle von PKDL ohne bekannte vorherige viszerale Leishmaniose sind beschrieben. Epidemiologisch bedeutsam sind diese Patienten, weil sie in Indien und im Sudan als Reservoir für *L. donovani* gelten.

Die jeweils typischen klinischen Bilder sind, insbesondere in Endemiegebieten, eine wichtige Grundlage für die Diagnosestellung. Die Bestätigung im Labor erfolgt in der Regel durch den mikroskopischen Nachweis von Parasiten im Gewebe oder durch die Anzucht des Erregers. (Zu Antigen- und Antikörperrnachweisen sowie molekularen Techniken siehe unten.)

Die Therapie erfolgt in den meisten Endemiegebieten noch mit fünfwertigen Antimonpräparaten wie Natriumstibogluconat (Pentostam) oder Meglumin-Antimonat (Glucantime), die über drei Wochen appliziert werden. Amphotericin B (insbesondere als Ambisome), Pentamidin oder Paromomycin bzw. Azole wie Itraconazol sind Alternativen. Miltefosine, ein Präparat aus der Onkologie, ist für die Therapie der viszeralen Leishmaniose in Indien erfolgreich klinisch getestet worden.

Die Identifizierung des infizierenden Agens ist für die Prognose und die Therapie der unterschiedlichen Leishmaniosen von großer Bedeutung. Die bisherige Klassifizierung der Leishmanien basiert hauptsächlich auf ihrer geographischen Herkunft, dem biologischen Verhalten

der Parasiten in ihrem Vektor und auf dem klinischen Bild. Durch den zunehmenden Reiseverkehr treten Leishmaniosen immer häufiger auch in nicht-endemischen Gebieten auf. Bei der Mehrzahl der nach Deutschland importierten Fälle von VL, MCL und CL handelt es sich um deutsche Touristen, die sich meist bei Aufhalten im Mittelmeergebiet oder in Südamerika infiziert haben. Leishmaniosen werden aber auch bei Besuchern oder Immigranten aus den Endemiegebieten diagnostiziert [8]. Es wird angenommen, dass sich die Vektoren infolge der globalen Erwärmung weiter nach Norden ausbreiten werden. Wenn diese Annahme richtig ist, stellen importierte Leishmaniosen eine potenzielle Infektionsquelle für diese Sandmücken dar. Von besonderer Bedeutung sind infizierte Hunde, die in steigender Zahl aus Endemiegebieten als Haustiere importiert werden bzw. ihre Besitzer dorthin in den Urlaub begleitet haben [9]. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass inzwischen auch eine erste, vermutlich autochthone, viszerale Leishmaniose bei einem deutschen Kind [10] sowie eine kutane Leishmaniose bei einem deutschen Pferd [11] beschrieben wurden. Da die Reisenden oft erst Monate nach ihrer Rückkehr das volle klinische Bild einer Leishmaniose entwickeln, wird die Erkrankung nicht mehr mit der Reise in Verbindung gebracht und oft falsch oder mit Verzögerung diagnostiziert. Bei Patienten, die mehrere Endemiegebiete oder Gebiete bereist haben, in denen mehrere Leishmania-Arten endemisch sind, ist eine geographische Zuordnung nicht möglich.

Untersuchungsmethoden

Mikroskopische Untersuchung

Die mikroskopische Untersuchung von Ausstrichen oder Tupfpräparaten von Hautulcerationen, Lymphknoten-, Milz-, Leber- oder Knochenmarkaspiraten oder Punktionen gilt noch heute, neben der Anzucht, in der Leishmaniendiagnostik als Goldstandard (Abbildung 1) [12, 13]. Die Mikroskopie ist eine schnelle, aber nicht sehr sensitive Methode. Die höchste Empfindlichkeit für die VL-Diagnostik wird mit Präparaten von Milz- (80–98%) und Knochenmarkaspiraten (60–85%) erreicht, während Lymphknotenaspirate mit einer Sensitivität von maximal 50% eher ungeeignet sind. Eine sichere Diagnose erfordert einige Erfahrung und Geduld. Die WHO verlangt, dass beim mikroskopischen Nachweis 1.000 Gesichtsfelder durchgemustert werden. Der mikroskopische Nachweis ist dann beweisend. Nach WHO-Kriterien kann in Milzaspiraten die durchschnittliche Parasitendichte pro Gesichtsfeld mit “+” bis “6+” halb-quantitativ erfasst werden (Tabelle 2). Ähnliche Kriterien wurden für die Bewertung von Ausstrichen von Patienten mit CL vorgeschlagen.

Die offensichtlichen Nachteile des mikroskopischen Nachweises sind mögliche subjektive Fehler, die stark von der (fehlenden) Erfahrung abhängen, und die

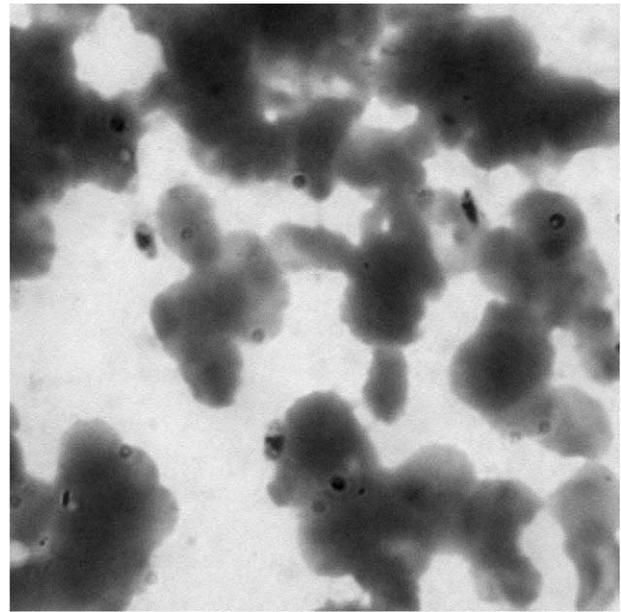


Abbildung 1 Giemsa-gefärbtes Abklatschpräparat des skarifizierten Ulkusrandes eines Patienten aus Palästina. Deutlich sind bei 1.000-facher Vergrößerung die länglichen Leishmanien zwischen den Erythrozyten zu sehen.

Unmöglichkeit, Erreger in schlecht oder zu stark gefärbten Arealen oder bei Überlagerung mit anderen Strukturen festzustellen. Eine Verbesserung kann hier die PCR bringen, die auch noch aus Material von gefärbten Objektträgern möglich ist. Zur Spezies-Identifizierung kann die mikroskopische Untersuchung nicht beitragen, da sich die Leishmanien-Arten morphologisch nicht unterscheiden.

Serologische Antikörpernachweise

Die meisten der etablierten serologischen Antikörpernachweise sind für den Nachweis der VL, besonders in Endemiegebieten, relativ gut geeignet [13], versagen aber bei CL und *Leishmania*-HIV-Koinfektionen [14].

Der indirekte Fluoreszenz-Antikörper-Test (IFAT) ist einer der empfindlichsten verfügbaren Teste. Der Antikörpernachweis wird bei viszeraler Leishmaniose schon in

Tabelle 2 Halbquantitative Bewertung von mikroskopischen Präparaten bei viszeraler Leishmaniose (“grading”).

Grade	durchschnittliche Parasitendichte
6+	> 100 Parasiten/1 Gesichtsfeld
5+	10–100 Parasiten/1 Gesichtsfeld
4+	1–10 Parasiten/1 Gesichtsfeld
3+	1–10 Parasiten/10 Gesichtsfelder
2+	1–10 Parasiten/100 Gesichtsfelder
1+	1–10 Parasiten/1.000 Gesichtsfelder
0	0 Parasiten/1.000 Gesichtsfelder

Bei der kutanen Leishmaniose erfolgt wegen der geringeren Erregerdichte nur eine Bewertung bis “4 +”. Adaptiert nach [12].

frühen Stadien der Infektion positiv. Bei Verwendung von Promastigoten als Antigen gibt es allerdings eine Kreuzreaktion mit Trypanosomen.

Der direkte Agglutinationstest (DAT) ist ebenfalls empfindlich und spezifisch. Bei diesem Test wird eine Suspension gefärbter (im Einzelfall lyophilisierter) Promastigoten zum Nachweis der spezifischen Antikörper verwendet. Der DAT wurde für Feldbedingungen entwickelt und ist daher in der Durchführung sehr einfach. Nachteilig sind die lange Inkubationszeit (18 h) und die Notwendigkeit, Serienverdünnungen des Serums zu testen.

Auf der Grundlage unterschiedlicher Antigene wurde eine Reihe von ELISA-Testen entwickelt, die sowohl im Labor als auch unter Feldbedingungen zum Nachweis einer VL einsetzbar sind. Im Vergleich haben sich Tests auf der Basis von rekombinantem k39-Antigen (rK39) als die empfindlichsten erwiesen. Mit ihnen ist auch eine Infektion bei immunkompromittierten Patienten nachweisbar. Inzwischen ist auch ein Strip-Test auf dem Markt.

Bei vergleichenden Untersuchungen haben sich sowohl der DAT als auch der rK39-Dipstick-Test in Endemiegebieten für das Screening von Patienten mit Verdacht auf VL als gut geeignet erwiesen. Bei einem niedrigen DAT-Titer oder negativem rK39-Dipstick-Befund kann VL sicher ausgeschlossen werden. Als Bestätigungstest können beide Methoden jedoch nur in Endemiegebieten mit einer hohen Wahrscheinlichkeit für VL angewendet werden. Auf Grund seiner einfacheren Durchführung wird dabei der rK39-Dipstick-Test bevorzugt [13, 15]. Alle serologischen Verfahren können jedoch nicht zwischen klinischen, subklinischen oder bereits zurückliegenden Infektionen unterscheiden.

Ein Latex-Agglutinationstest (KAtex), der für einen Antigennachweis aus dem Urin entwickelt wurde, zeichnet sich durch eine hohe Spezifität für den Nachweis einer VL aus, seine Sensitivität ist jedoch noch nicht zufriedenstellend. Bedingt durch seine hohe Spezifität hat dieser Test einen hohen positiven Vorhersagewert. Jeder positiv getestete Patient ist somit therapiebedürftig [16]. Der Antigentest im Urin ist zweifellos eine interessante Methode, die auch zur Therapiekontrolle eingesetzt werden kann und sicher weiter entwickelt und verbessert werden sollte.

Kulturelle Anzucht

Die kulturelle Anzucht der Parasiten wird bei geringer Erregerdichte angewendet oder wenn auf Grund der heterogenen Verteilung der Erreger im Untersuchungsmaterial die mikroskopische Untersuchung nicht sicher genug ist.

Dabei werden Zellzuchtmedien wie NNN-Medium, Schneider's Drosophila-Medium, aber auch supplementiertes RPMI 1640 eingesetzt. Man muss bei der Anzucht berücksichtigen, dass die unterschiedlichen Medien für die verschiedenen Spezies jeweils unterschiedlich gut

geeignet sind. Unter optimalen Bedingungen sind die typischen, beweglichen Promastigoten frühestens nach zwei bis drei Tagen zu sehen. Als negativ sollte eine Kultur erst nach drei Wochen angesehen werden.

Ein weiterer wichtiger Nachteil der Anzucht besteht darin, dass mögliche Mischinfektionen übersehen werden, da in der Regel eine schneller wachsende Spezies die andere bei der Anzucht überwuchert.

Eine Speziesdiagnose kann mit keiner der bisher beschriebenen Methoden gestellt werden. Dies ist nur durch Bestimmung der Isoenzymmuster von kultivierten Parasiten oder mittels PCR oder anderer molekularer Techniken (z. B. in situ Hybridisierung) möglich.

Bestimmung von Isoenzymmustern

Der Goldstandard der Feintypisierung für Leishmanien ist noch immer die Bestimmung von Isoenzymmustern (Zymodemen) [17]. Diese Methode ermöglicht sowohl eine Artdifferenzierung als auch eine epidemiologische Feintypisierung der Leishmanien auf Subspezies-Ebene, was für viele Fragestellungen von Bedeutung ist. Nach elektrophoretischer Auftrennung definierter Enzymproteine (Housekeeping-Enzyme) wird ihre jeweilige Position durch Reaktion mit geeigneten Substraten sichtbar gemacht. Verschiedene Isoenzyme unterscheiden sich in ihren Wanderungsgeschwindigkeiten. Durch die Untersuchung einer ausreichend großen Anzahl unterschiedlicher Enzyme lassen sich jeweils typische Enzymmuster erkennen und den so genannten Zymodemen zuordnen [18, 19]. Nachteile der Methode sind ein grosser Zeit- und Arbeitsaufwand, die Notwendigkeit einer kulturellen Anzucht der Erreger und die Abhängigkeit ihrer Aussage von der Expression der Enzymgene. Sie bleibt deshalb spezialisierten Laboratorien vorbehalten. Die Methode ist auch zunehmend umstritten, da sie einen Phänotyp charakterisiert, der unter dem Einfluss der Kultivierung modifiziert werden kann. Ziel sollte eine Methode sein, die eine Unterscheidung auf Grundlage des Genotyps ermöglicht.

Molekulare Methoden

Wie bei anderen Erregern auch sind molekulare Methoden (insbesondere die PCR) bei der Diagnostik der Leishmaniosen langsam aber sicher auf dem Vormarsch. Dies verdanken sie ihrer hohen Sensitivität, die mit einer hohen Spezifität gekoppelt ist, aber auch der Tatsache, dass dabei der jeweilige Genotyp und nicht ein möglicherweise von Kulturbedingungen abhängiger Phänotyp bestimmt wird. Für den Nachweis von Leishmanien mit der PCR hat sich die Amplifizierung verschiedener "multi-copy"-Zielsequenzen bewährt, die auch eine ausreichende Sensitivität des Nachweises gewährleisten. Es handelt sich dabei insbesondere um die Amplifikation der Kinetoplasten-Minircle-DNA (ca. 1.000 Kopien pro Zelle), des Mini-Exon-Gens (100–200 Kopien pro Zelle), variabler Sequenzen des ssu rRNA-Gens und des "internal transcribed spacer" (ITS) im ribosomalen Operon (20–40

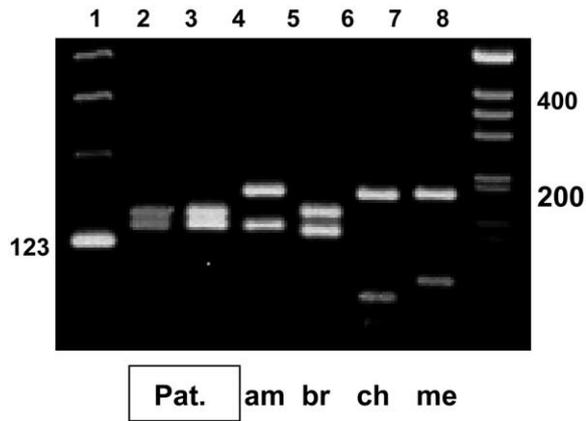


Abbildung 2 Identifizierung einer Patientenprobe (Pat.) als *L. braziliensis* complex mit Hilfe der ITS1-PCR. Das ITS1-PCR-Produkt wurde mit dem Restriktionsenzym Hae III verdaut, um das Spezies-spezifische Fragmentmuster zu erzeugen. Als Vergleich sind Referenzstämme für *L. amazonensis* (am), *L. braziliensis* (br), *L. chagasi* (ch) und *L. mexicana* (me) aufgetragen.

Kopien pro Zelle). Die beiden letzten Methoden wurden mit Hilfe von Blutproben validiert, denen unterschiedliche Mengen von *L. donovani*- oder *L. infantum*-Promastigoten zugesetzt wurden. Sowohl mit der ssu rRNA-PCR als auch mit der ITS1-PCR konnten zwei Parasiten pro Probe nachgewiesen werden. Eine Speziesidentifizierung ist aber nur mit der ITS1-PCR möglich. Durch eine Spaltung des PCR-Produkts mit dem Restriktionsenzym Hae III (Abbildung 2) oder der Sequenzierung des Amplifikates können nahezu alle humanpathogenen Spezies identifiziert werden [20]. Ein wichtiger Vorteil der PCR-Verfahren ist, dass sie auch für mit Bakterien oder Pilzen kontaminierte Proben eingesetzt werden können, da die jeweiligen Erreger ohne die Gefahr des Überwucherns während der Anzucht nachgewiesen werden können.

Grundvoraussetzung für eine hohe Empfindlichkeit beim PCR-Nachweis ist eine hocheffiziente DNA-Extraktion aus dem klinischen Material. Bei einem Vergleich schnitt die klassische Phenol-Chloroform-Methode deutlich besser ab als die Chelex- oder Dextranblau-Extraktionsverfahren. Mehrere kommerzielle Extraktionskits lieferten, bei höheren Kosten, gleich gute Resultate [20].

Für eine sichere Auswertung der PCR-Ergebnisse sind Kontrollen besonders wichtig. Neben zwei Positivkontrollen (hoch- und niedrigpositiv) und der Negativkontrolle gehören dazu auch Inhibitions- und Präparationskontrollen. Damit sollen einmal Kontaminationen und somit falsch-positive Ergebnisse, aber auch Fehler bei der DNA-Extraktion und eine mögliche Hemmung der PCR, die ein falsch-negatives Ergebnis zur Folge hätten, ausgeschlossen werden. Im Kontext der in der MiQ "Nukleinsäure-Amplifikationstechniken" [21] vorgeschriebenen Kontrollen, Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen und Kriterien zur Befundinterpretation ist die PCR eine sichere, empfindliche und spezifische Methode. Inzwischen sind in vielen Laboratorien PCR-

Nachweise von Leishmanien etabliert und zum Teil auch schon akkreditiert worden.

Moderne Methoden zur Stammtypisierung bei Leishmanien, auf die hier nicht im Detail eingegangen werden soll, beruhen auf der Amplifizierung hochvariabler Genomabschnitte. Derartige Techniken sind für epidemiologische Untersuchungen unverzichtbar. Nur mit ihrer Hilfe kann geklärt werden, ob bei HIV-infizierten Patienten andere Leishmanien-Stämme eine Rolle spielen als bei immunkompetenten und ob die PKDL nach überstandener VL auf einen Relaps (z. B. nach Therapieversagen) oder auf eine Reinfektion zurückzuführen ist.

Untersuchungsmaterial

In Abhängigkeit von der Art der Erkrankung und der Fragestellung eignen sich unterschiedliche Materialien (Tabelle 3).

Punktat- oder Biopsiematerial

Ist geeignet bei VL, MCL und CL. Es sollte dabei stets ausreichend Material für unterschiedliche Methoden entnommen werden. Wenn die Möglichkeit zur Durchführung eines PCR-Nachweises besteht, sollte immer Material für die PCR bereitgestellt werden. Dabei hat es sich als besonders günstig erwiesen, die Proben auf steriles Filterpapier aufzutragen und nach dem Trocknen zu versenden.

Knochenmarkbiopsat 0,2–0,3 ml werden unter Zusatz von Antikoagulantien steril in geeignete Probenröhrchen (Rücksprache mit dem Labor) für die Anzucht oder die PCR gegeben und Ausstriche von zellreichem Material werden für die Mikroskopie angefertigt. Nach dem Lufttrocknen und Fixieren mit Methanol sind die Präparate lagerfähig und können leicht versandt werden.

Organbiopsat/-aspirat (Milz, Lymphknoten, Leber) Jeweils stecknadelkopfgroße Proben werden in Kulturgefäße gegeben. Wenn ausreichend Material vorhanden ist, können von den Schnittflächen Tupfpräparate für die Mikroskopie angefertigt werden. Nach dem Lufttrocknen und Fixieren mit Methanol sind die Präparate lagerfähig und können auch leicht versandt werden.

Hautbiopsat Nadelbiopsate (Aspirate) werden vom Ulkusrand (Randwall) durch seitliches Einstechen von der Peripherie her gewonnen. Für die Mikroskopie werden die Zellen auf Objektträger gegeben. Nach dem Lufttrocknen und Fixieren mit Methanol sind die Präparate lagerfähig und können auch leicht versandt werden. Für die Anzucht wird die Spritze mit Kulturflüssigkeit ausgespült und die Zellsuspension in ein Kulturgefäß gegeben. Wenn möglich sollte das Material für die PCR auf Filterpapier aufgetropft und nach dem Trocknen versandt werden.

Blut oder Buffy-Coat

Können bei VL, MCL und CL für die PCR eingesandt werden. Zitrat- oder EDTA-Blut sind geeignet, Heparinblut kann jedoch nicht verwendet werden, da Heparin die PCR hemmt. Auf Filterpapier aufgetragene und getrocknete Blutstropfen sind eben-

Tabelle 3 Zusammenstellung der möglichen Untersuchungsmethoden, bezogen auf die jeweiligen Erkrankungen und Untersuchungsmaterialien.

Erkrankungen	Untersuchungsmaterialien		
	Untersuchungsmethode:		
VL	Bioptat/Aspirat	Blut	Serum
	Knochenmark/Milz		
	Mikroskopie Anzucht PCR	PCR	Antikörpernachweis
MCL	Haut/Schleimhaut		
	Mikroskopie Anzucht PCR	PCR	Antikörpernachweis
	Haut		
CL	Mikroskopie Anzucht PCR	PCR	ungeeignet

falls geeignete Proben, leicht zu gewinnen und gut zu versenden. Auch wenn im Einzelfall (VL) mit Leishmanien infizierte Zellen im Blutaussstrich nachgewiesen wurden, ist der mikroskopische Nachweis aus dem Blut keine ausreichend sichere Methode.

Serum zum Antikörpernachweis

Ist nur für die Diagnostik und Verlaufskontrolle viszeraler Leishmaniosen (VL und MCL) von Bedeutung. Dazu gehört auch die viszerale Leishmaniose bei Hunden.

Besondere Materialien

Für die PCR kann auch das Material von gefärbten Objektträgern verwendet werden. Wenn das Material für die PCR benutzt wird, sollte es nicht in Formalin gebettet werden. Falls erforderlich, sind die Lagerung und der Transport in Alkohol geeignet. Von den Objektträgern wird das Material abgekratzt und für die Extraktion der DNA verwendet. Auch in Paraffin eingebettete Biopate können für die PCR eingesandt werden.

Bei Hunden hat sich Tränenflüssigkeit, entnommen mit sterilen Tupfern, als optimales Material für die PCR erwiesen.

Für epidemiologische Untersuchungen können Schmetterlingsmücken zur mikroskopischen Speziesbestimmung oder in Alkohol, tiefgefroren oder auf Filterpapier zerdrückt für die PCR eingesandt werden.

Da die Leishmaniendiagnostik in Deutschland nicht zu den häufig anfallenden Routineaufgaben gehört, sollte man in Einzelfällen mit dem Labor absprechen, welche Materialien bei der entsprechenden Verdachtsdiagnose und für die im Labor durchgeführten Methoden am besten geeignet sind.

Transport

Wenn noch lebensfähige Erreger vorhanden sind, muss das Material gemäss den entsprechenden Richtlinien verschickt werden [22–24].

Trockene Materialien (fixierte Objektträger oder Spots auf Filterpapier) und Serumproben für den Antikörpernachweis können ohne besondere Vorkehrungen rasch mit der Post verschickt werden. In Alkohol eingelegte Proben für die PCR sollten schnell und möglichst kühl

transportiert werden. Für Materialien in Kulturflüssigkeit zur Anzucht ist ein schneller Transport bei Raumtemperatur zu gewährleisten. Insbesondere im Winter ist für Temperierung zu sorgen. Rücksprache mit dem Labor ist empfehlenswert.

Besondere Fragestellungen

Untersuchung von Hunden

Hunde haben, auch in Deutschland, eine besondere epidemiologische Bedeutung. Bei Hunden, die von ihren Besitzern mit auf Urlaubsreisen in die Endemiegebiete im nördlichen Mittelmeerraum genommen bzw. von dort mit nach Hause gebracht werden, werden inzwischen in Deutschland Leishmaniosen häufiger diagnostiziert als beim Menschen. Da in Deutschland geeignete Vektoren (*Ph. perniciosus*, *Ph. mascittii*) vorkommen, erscheint eine Übertragung vom Hund auf den Menschen möglich.

Untersuchung von Mücken

Insbesondere für epidemiologische Fragestellungen wird die Untersuchung von Mücken an Bedeutung zunehmen. Die klassischen Verfahren sind auch hier die morphologische Charakterisierung der Mückenspezies und der mikroskopische bzw. kulturelle Nachweis einer Infektion mit Leishmanien. Bei der mikroskopischen Untersuchung ist keine Speziesdiagnose möglich und auch Mischinfektionen sind nicht nachweisbar. Die Anzucht bietet die Möglichkeit der anschließenden Charakterisierung. Dabei stellt sich das Problem, dass Mischinfektionen nicht sicher nachgewiesen werden können, da, wie oben erwähnt, in der Regel bei der Kultur langsam wachsende Stämme von den schnell wachsenden überwuchert werden und verloren gehen. Auch hier bietet die PCR entscheidende Vorteile. Aus der extrahierten DNA einer Mücke können mit verschiedenen PCR-Verfahren bzw. durch den Einsatz geeigneter Primer sowohl die Spezies der Mücke sicher bestimmt als auch die Spezies der infizierenden Leishmanien auch bei Mischinfektionen und

Koinfektionen mit verwandten Flagellaten nachgewiesen werden.

Leishmanin-Hauttest (Montenegro test)

In Endemiegebieten kommt häufig der Leishmanin-Hauttest zum Einsatz. Analog zum Tuberkulin-Hauttest wird mittels inaktivierter Erreger, die intrakutan appliziert werden, eine zelluläre Immunität nachgewiesen. Bei einer aktiven viszeralen Leishmaniose (Kala Azar) ist der Hauttest meist negativ. Leishmanin ist nicht kommerziell erhältlich. Ein Nachteil dieses Testes sind unter anderem Kreuzreaktionen bei glandulärer Tuberkulose und lepromatöser Lepra. Als Screeningmethode zur Bestimmung der Prävalenz kutaner oder mukokutaner Leishmaniosen ist dieser Test jedoch regional noch von Bedeutung.

Leishmaniosen sind in Deutschland nicht meldepflichtig. Seit September 2000 existiert ein Nationales Beratungs- und Referenzzentrum am Tropeninstitut Berlin, dessen Aufgaben in der Überwachung der Häufigkeit, der Herkunft und der Art der in Deutschland beobachteten Leishmaniosen, in der Beratung der Ärzte und der verbesserten Information für Reisende bestehen [8]. Dieses Zentrum verfügt auch über die notwendigen Techniken für die Leishmaniendiagnostik bis hin zur PCR.

References

- WHO/CTD. 1998. Leishmaniasis control. Burden and trends. 1–4 (Abstracts).
- Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 2000;30:1269–81.
- Berman JD. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin Infect Dis* 1997;24:684–703.
- Meinecke CK, Schottelius J, Oskam L, Fleischer B. Subclinically infected mothers can serve as a reservoir for congenital transmission of visceral leishmaniasis: first case report and review of literature [abstract 324]. *Acta Parasitol Turcica* 1997;21(Suppl. 1):155.
- Le Fichoux Y, Quaranta JF, Aufeuve JP, Lelievre A, Marty P, et al. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in Southern France. *J Clin Microbiol* 1999;37:1953–7.
- Alvar J, Canavate C, Gutierrez-Sola B, Jimenez M, Laguna F, Lopez-Velez R, et al. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:298–319.
- Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol* 2003;97(Suppl. 1):3–15.
- Harms G, Schönian G, Feldmeier H. Leishmaniasis in Germany. *Emerg Infect Dis* 2003;9:872–5.
- Göthe R, Nolte I, Kraft W. Leishmaniasis in dogs in Germany: epidemiological case analysis and alternatives to conventional causal therapy. *Tierärztl Prax* 1997;25:68–73.
- Bogdan C, Schönian G, Banuls AL, Hide M, Pratloug F, Lorenz E, et al. Visceral leishmaniasis in a German child who had never entered a known endemic area: case report and review of literature. *Clin Infect Dis* 2001;31:302–6.
- Koehler K, Stechele M, Hetzel U, Domingo M, Schönian G, Zahner H, Burkhardt E. Cutaneous leishmaniasis in a horse in Southern Germany caused by *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol* 2002;109:9–17.
- Control of the leishmaniasis. Report of a WHO Expert Committee. *World Health Organ Tech Rep Series* 1990;793:1–158.
- Sigh S, Sivakumar R. Recent advances in the diagnosis of Leishmaniasis. *J Postgrad Med* 2003;49:55–60.
- El-Safi SH, Evans DA. A comparison of the direct agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay in the sero-diagnosis of leishmaniasis in the Sudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989;83:334–7.
- Boelaert M, Rijal S, Regmi S, Singh R, Karki B, Jacquet D, et al. A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2004;70:72–7.
- Rijal S, Boelaert M, Regmi S, Karki BM, Jacquet D, Singh R, et al. Evaluation of a urinary antigen based latex agglutination test in the diagnosis of Kala-Azar in Eastern Nepal. *Trop Med Int Health* 2004;9:724–9.
- Gardener PJ, Chance ML, Peters W. Biochemical taxonomy of *Leishmania*. II Electrophoretic variation of malate dehydrogenase. *Ann Trop Med Parasit* 1974;68:317–27.
- Chance ML, Walton BC. Biochemical characterization of *Leishmania*. Geneva: UNDP/World Bank/WHO 1982; 275–80.
- Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratloug F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestion for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp* 1990;283:1101–11.
- Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, Jaffe CL. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical cases. *Diagn Microbiol Inf Dis* 2003;47:349–58.
- Roth A, Mauch H, Göbel. MiQ 1: Nukleinsäure-Amplifikationstechniken. München: Urban & Fischer Verlag, 2001;9–29.
- Gesetz über die Beförderung gefährlicher Güter; GGBefG – Gefahrgutbeförderungsgesetz, Fassung vom 9. Oktober 1998 (BGBl. I 1998 S. 3114, vorherige Änderung 1998 S. 2037; 2001 S. 2785 Art. 250; S. 3762; 6.8.2002 S. 3082) (Gl.-Nr.: 9241–23).
- Verordnung über die innerstaatliche und grenzüberschreitende Beförderung gefährlicher Güter auf der Straße und mit Eisenbahnen; GGVE – Gefahrgutverordnung Straße und Eisenbahn vom 10. September 2003 (BGBl. I Nr. 49 vom 30.9.2003 S. 1913, ber. 2139; 4.11.2003 S. 2286⁰³; 22.3.2004 S. 454⁰⁴; 24.3.2004 S. 485^{04a}) vorherige Änderungen: 28.4.2003 S. 595.
- Thurm V, Just HM, Mauff G, Schoeller A, Tschäpe H. Versand von medizinischem Untersuchungsmaterial; Sicher und vorschriftenkonform. Publikation der Bundesärztekammer, Stand: 20.11.2003. <http://www.bundesaerztekammer.de/30/Richtlinien/Empfidx/Versand.html>