

## *Therapiekontrolle der kaninen Leishmaniose mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)*

S. Steuber<sup>1</sup>, Ines Schirrmann<sup>1</sup>, M. Greiner<sup>2</sup> und A. Moritz<sup>3</sup>

**Einleitung** Die Leishmaniose des Hundes ist eine durch einzellige Flagellaten der Gattung *Leishmania* verursachte Zoonose, deren Übertragung an das natürliche Vorkommen des Vektors, Schmetterlingsmücken der Gattung *Phlebotomus*, gebunden ist. Demzufolge beschränkt sich ihr endemisches Auftreten in Europa auf die Mittelmeeranrainerstaaten, zu denen Albanien, Griechenland, das ehemalige Jugoslawien, Italien, Frankreich, Spanien und Portugal zu zählen sind. Vornehmlich in den letzten Jahren finden sich jedoch auch im deutschsprachigen Raum Berichte, in denen eine Zunahme behandlungsbedürftiger Leishmaniosefälle in unseren nördlicheren Regionen festgestellt wird (10, 13, 24). Von den Autoren wird für diesen Anstieg neben einer gesteigerten Kenntnis in der Diagnostik der Leishmaniose vor allem die Mitnahme der eigenen Hunde in bzw. die unbeachtete Aufnahme herrenloser Hunde aus endemischen Gebieten verantwortlich gemacht.

Zur systemischen Therapie dieser unbehandelt zu mehr als 80% tödlich verlaufenden Erkrankung stehen dem Tierarzt zur Zeit eine Reihe von mehr oder weniger wirksamen Präparaten zu Verfügung (29). Allerdings ist sowohl mit den als „first line drugs“ (pentavalente Antimoniate) als auch mit den als „second line drugs“ bezeichneten Wirkstoffen (Pentamidin, Ketoconazol, Amphotericin oder auch Allopurinol) für gewöhnlich eine vollständige Erregereliminierung nicht zu erwarten (2, 16, 18, 23). Häufig muß sogar mit einem Rezidivieren der Erkrankung gerechnet werden, woraus ein ständiges Bestreben nach Optimierung traditioneller Therapiekonzepte resultiert (5, 7, 17, 23).

Für die Verlaufskontrolle solcher therapeutischen Interventionen sind die klassischen parasitologischen Direktmethoden wie Blut- oder Knochenmarkausstrich aufgrund der zu geringen Sensitivität nur wenig geeignet, weshalb nach Abschluß der Therapie ein Erregernachweis in der Regel kaum mehr zu führen ist. Die alternative Möglichkeit eines diagnostischen Tierversuches sollte abgelehnt werden, da diesem die Kultivierung überlegen ist (27). Jedoch erfordert die zeit- und arbeitsintensive Kultivierung einiges an Erfahrung, zudem kann nur frisches Probenmaterial eingesetzt werden (20). Auch indirekte serologische Methoden besitzen für die Durchführung einer Therapiekontrolle mitunter nur begrenzt Aussagekraft (12).

Seit einigen Jahren steht nun aber mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ein neuartiges spezifisches und hochsensitives Nachweisverfahren zu Verfügung, deren diagnostischer Wert bereits bei den vielfältigen Formen der humanen (1, 3, 11, 15, 22, 28), aber auch kaninen Leishmaniose (4, 11, 19, 20) genutzt werden konnte.

Ziel der vorliegenden Studie war es daher, zu prüfen, ob sich die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als begleitende Therapiekontrolle zum Erregernachweis eignet – hier zunächst für die Behandlung mit pentavalenten Antimoniaten.

<b>Material und Methoden</b>	Sieben Hunde mit gesicherter kutano-visceraler Leishmaniose wurden jeweils vor, teilweise während und nach einem Therapiezyklus (TZ) mit Glucantime® (Rhône Mérieux/Lyon) Vollblut- (VB) Proben und Knochenmark- (KM) Punktate entnommen. Die Proben wurden nach Entnahme entweder bei -20°C eingefroren oder in Kulturmedium (RPMI mit 20% FKS, 100 E./ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1 mMol L-Glutamin) für den Versand aufbewahrt. Ein TZ bestand aus 10 Injektionen, für die ersten beiden Tage jeweils 50 mg Megluminantimoniat/kg KGW, ab dem 3.-10. Tag 100 mg/kg KGW, langsam i. v. Wurden ein weiterer TZ durchgeführt, erfolgte eine Behandlungspause von ca. 10-14 Tagen. Patient 3 war durch den Haustierarzt bereits mit Allopurinol vorbehandelt worden, während Patient 5 als Rezidivpatient wiedervorstellig war. Dieser Patient hatte bereits 10 Monate zuvor zwei Glucantime-Therapiezyklen nach obigen Schema erhalten und wurde daher einem 3. TZ unterworfen. Bei Hund 1 und 2 wurde jeweils nur ein Behandlungszyklus durchgeführt.
Patienten	
Knochenmarkpunktion	Für die Entnahme des KM wurden die Haare über dem Kreuzbeinhöcker entfernt sowie die Haut und das schmerzempfindliche Periost mit Lidocain 1% anästhesiert. Anschließend wurde mit einer Mehrfachpunktionskanüle nach KLIMA-ROSENEGGER bzw. einer Sternal/Iliac Aspiration Needle ILLINOIS Haut, Unterhaut und Corticalis des Tuber sacrale in einem Winkel von 45° zur Längsachse des Tieres durch leicht drehende Bewegung durchdrungen. Das Erreichen des Markraumes löste eine Schmerzreaktion aus, welche bei festsitzender Kanüle die korrekte Lage bestätigte. Nach Entfernung des Mandrins konnten etwa 0,5 ml KM entnommen werden.  Als Negativkontrolle wurden regelmäßig VB- oder KM-Proben von weiteren sieben Hunden mit- untersucht. Als interner Qualitätsstandard wurden die Proben jedoch erst nach Beurteilung der jeweiligen PCR identifiziert.
Leishmanien	Zur Spezifitäts- und Sensitivitätsprüfung gelangten Kulturformen von <i>L. infantum</i> sensu stricto (Stamm C/ITA/79/ISSB-Ricky, isoliert vom Hund); <i>L. donovani</i> (Stamm LV 9), <i>L. tropica</i> (Stamm 11/2gb/91 isoliert vom Menschen); <i>L. major</i> (Stamm LV 39) und <i>L. enriettii</i> (Ursprung Brasilien).
DNA-Extraktion und Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	Die DNA wurde standardisiert unter Verwendung des QIAamp Blood Kit® (Diagen, Hildesheim) aufgereinigt.  Zum Nachweis genomischer Leishmanien-DNA wurde der von PIARROUX et al. (25) beschriebene PCR-Ansatz genutzt. Hiermit kann eine hochrepetitive 100 bp-Sequenz von <i>Leishmania infantum</i> nachgewiesen werden.  Jeder Ansatz in einem Gesamtvolumen von 50 µl bestand aus 10 µl extrahierter Proben-DNA, je 0,2 mM dNTP (dUTP, dATP, dCTP, dGTP, Boehringer, Mannheim), PCR-Puffer mit 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> (Perkin Elmer, Überlingen), Taq-Polymerase (Appligene, Heidelberg) und 1µM von jedem Primer. Alle Ansätze wurden mit 50 µl Mineralöl überschichtet. Die Amplifikation erfolgte in 34 Zyklen mit einem TRIO-Thermoblock® (Biometra, Göttingen): Matrizzendenaturierung bei 94°C (1. Zyklus 3 min, jeder weitere Zyklus 30 sec), Anlagerung bei 59°C (30 sec), Verlängerung bei 70°C (30 sec, im letzten Zyklus 10 min).  Zur genaueren Artanalyse wurden zuvor positive VB- und KM-Proben mit der von RAVEL et al. (26) beschriebenen PCR-Ansatz untersucht. Die dabei eingesetzten Primer ermöglichen anhand der resultierenden Amplifikatgrößen und dem Einsatz artspezifischer Sonden, <i>L. infantum</i> (700 bp-Produkt) von <i>L. major</i> (ca. 570 bp-Produkt) deutlich zu diskriminieren. Die PCR-Ansätze in einem Gesamtvolumen von 50 µl bestanden wiederum aus 10 µl extrahierter Proben-DNA in einem PCR-Puffer mit 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> , je 0,2 mM dNTP, 2,5 U Taq-Polymerase und 1µM von jedem Primer. Alle

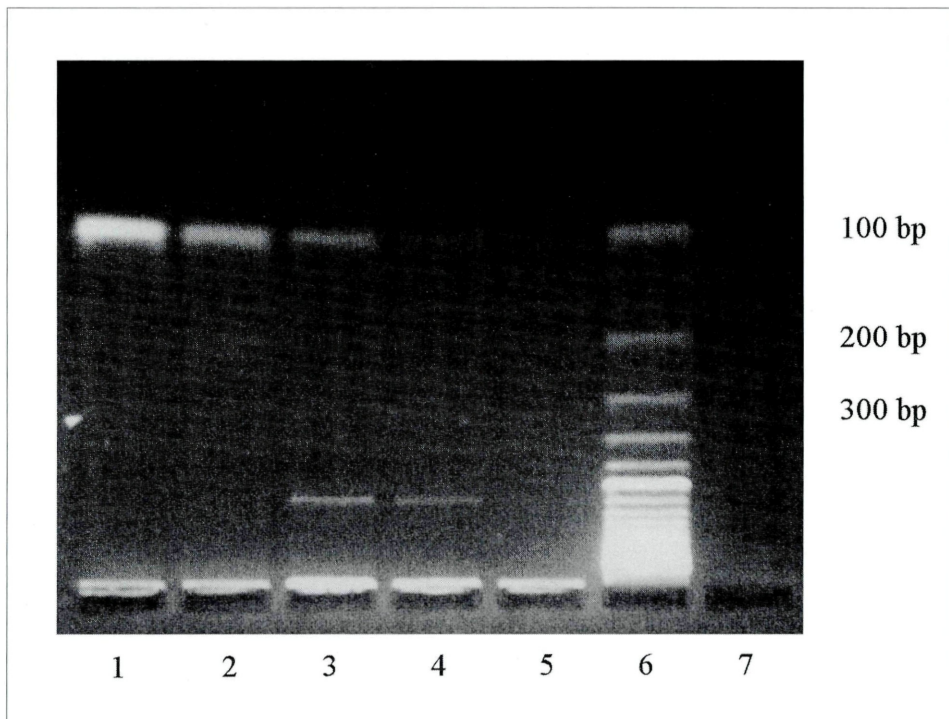


Abbildung 1:  
Analytische Sensitivität der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) von *Leishmania infantum* nach Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung in einem 4%igen Kompositgel (spezifisches Produkt bei 100 bp). Spur 1: 100 pg (1000 Zellen); Spur 2: 10 pg (100 Z.); Spur 3: 1 pg (10 Z.); Spur 4: 0,1 pg (1 Z.); Spur 5: Negativkontrolle 0,7 µg Hunde-DNA (ca.  $10^5$  Hundeleukozyten); Spur 6: 100 pg-Leiter; Spur 7: H<sub>2</sub>O. Alle *Leishmania*-DNA Proben wurden unter Zusatz von  $10^5$  Hundeleukozyten (ca. 0,7 µg DNA) amplifiziert.

Erregernachweis in klinischem Probenmaterial mittels PCR-Kontrolle

Sonden wurden durch sequentielle Amplifikation der jeweiligen spezifischen PCR-Amplifikate aus *L. infantum* (100 bp- und 700 bp-Produkt) und *L. major* (570 bp-Produkt) und anschließender Aufreinigung über eine Qiagen-Sonde (Diagen, Hildesheim) gewonnen.

Möglichen Kreuzkontaminationen wurde durch die Verwendung von Aerosol-geschützten Filterspitzen und Einmalhandschuhen, strikte Raumtrennung zwischen Probenaufbereitung, PCR-Ansatz (UV-bestrahlte Laminar-Flow Bench), Amplifikation und Gelelektrophorese vorgebeugt.

### Ergebnisse

Analytische Sensitivität und Spezifität der PCR: Zur Bestimmung der Sensitivität der PCR nach PIARROUX (25) wurde eine Verdünnungsreihe aufgereinigter *L. infantum*-DNA vorbereitet und anschließend amplifiziert. Noch mindestens 0,1 pg (1 Parasit) konnte unter Zusatz der DNA von  $10^5$  Hundeleukozyten (ca. 0,7 µg DNA) nachgewiesen werden (Abb. 1). In der Spezifitätsprüfung zeigten *L. infantum* und *L. donovani* (je 100 pg) das erwartete Amplifikationsprodukt von 100 bp. Der verwendete *L. major*-Stamm reagierte dagegen nur schwach und war unter den gleichen Versuchsbedingungen erst nach Southern Blot-Hybridisierung nachweisbar. *L. tropica* und *L. enriettii* erbrachten kein entsprechendes Amplifikationsprodukt (ohne Abb.).

Die PCR nach RAVEL (26) ergab unter unseren Versuchsbedingungen eine Nachweisgrenze von 1 pg (etwa 10 Parasiten) im Beisein der DNA von  $10^5$  Hundeleukozyten. Die Berechnung der Länge mittels Gelanalyse-Software (Phoretix 1D) ergab für *L. infantum* das erwartete 700 bp- und für *L. major* ein 570 bp- Produkt (ohne Abb.).

Alle regelmäßig mitgeführten VB- und KM-Proben (n=20) der Kontrolltiere erwiesen sich sowohl in der Gelanalyse als auch im Southern Blot als negativ (Spezifität 100%).

Alle 7 Patienten konnten vor Therapiebeginn mit Hilfe der PCR als positiv erkannt werden. Dabei gelang bei sechs Hunden die PCR-Diagnostik bereits aus dem Blut. Lediglich Patient 5, ein Reizdiverpient, war im Blut PCR-negativ. In diesem Fall gelang der Leishmaniennachweis mit Hilfe der

Ansätze wurden mit 50 µl Mineralöl überschichtet. Die Amplifikation erfolgte in 45 Zyklen: Matritzendenaturierung bei 92°C (1. Zyklus 5 min, jeder weitere Zyklus 30 sec), Anlagerung bei 62°C (30 sec), Verlängerung bei 70°C (30 sec, im letzten Zyklus 2 min).

### Nachweis der Amplifikate

Die Visualisierung der Amplifikationsprodukte erfolgte durch Submarine-Minigel-Elektrophorese in einem mit Ethidiumbromid gefärbten 4%igem Kompositgel (Biozym, Hess. Oldendorf). Für die anschließende Gelauswertung stand die Phoretix 1D Gel-Analysis Software (Südlaborgeräte, Gauting) zur Verfügung.

Die Spezifität der Amplifikationsprodukte wurde nach Southern Blot-Hybridisierung mit den jeweiligen Peroxidase-markierten Sonden im „Enhanced Chemilumineszenz Verfahren“ (Amersham, Braunschweig) nach Angaben des Herstellers bestätigt. Die hierfür benötigten DNA-

Tabelle 1:

Monitoring von sieben Hunden mit Leishmaniose vor, während und nach bis zu drei Therapiezyklen (TZ) mit Glucantime®.

Hund Nr.	Proben-Material <sup>A</sup>	vor 1. TZ	während 1. TZ	nach 1. TZ	nach 2. TZ	vor 3. TZ	nach 3. TZ	Nach-Kontrolle <sup>B</sup>
1	VB	positiv*	negativ*	negativ*	- <sup>C</sup>	-	-	-
	KM	positiv	-	positiv	-	-	-	-
2	VB	positiv	positiv	negativ	-	-	-	negativ
	KM	positiv	-	negativ	-	-	-	negativ
3	VB	positiv	-	positiv	negativ	-	-	-
	KM	-	-	-	negativ	-	-	-
4	VB	positiv	positiv	positiv	positiv	-	-	-
	KM	positiv	-	positiv	-	-	-	-
5	VB	-	-	-	-	negativ*	negativ*	negativ*
	KM	-	-	-	-	positiv	positiv	positiv
6	VB	positiv	positiv	positiv	negativ	-	-	-
	KM	positiv	-	positiv	positiv	-	-	-
7	VB	positiv	-	-	negativ	-	-	positiv*
	KM	-	-	positiv	positiv	-	-	-

<sup>A</sup> VB = Vollblut; KM = Knochenmark

<sup>B</sup> frühestens 1 Monat nach dem letzten Behandlungszyklus

<sup>C</sup> keine Probenahme

\* PCR-Diagnostik aus Vollblutproben ohne Aufbewahrung im Transportmedium

PCR jedoch im Knochenmark. Nach dem 1. TZ erwies sich das Blut bei zwei Patienten (Nr. 1, 2) als negativ. Bei Patient 1 ergab dagegen das Knochenmark einen positiven Befund, während Patient 2 auch im Knochenmark negativ getestet wurde. Bei vier Patienten konnte darüber hinaus ein 2. TZ diagnostisch begleitet werden. In diesen Fällen konnte der Leishmanien-Nachweis nach Abschluß der Therapie im Blut lediglich bei Patient 4 geführt werden. Alle anderen Patienten waren jedoch Knochenmark PCR-positiv. Rezidivpatient 5 erwies sich nach Abschluß des 3. TZ im Blut als negativ, im Knochenmark dagegen weiterhin als positiv.

Eine genaue Übersicht ist aus Tab. 1 ersichtlich.

Die zusätzliche Artdifferenzierung ergab lediglich bei vier Patienten vor Therapiebeginn das *L. infantum* spezifische 700 bp-Produkt. Auch der Einsatz von artspezifischen *L. infantum*- bzw. *L. major*-Sonden zur Sensitivitätssteigerung ermöglichte keine weitere Interpretation. Nach Therapieende wurde keine der untersuchten Proben mehr positiv getestet (ohne Abb.).

Bei insgesamt 18 VB- und 10 KM-Proben konnte der Einfluß des Probenversandes auf die PCR verglichen werden. Hierbei zeigte sich, daß der Versand von Vollblutproben in einem Kulturmedium die PCR-Diagnostik gegenüber dem Versand von eingefrorenen Material erheblich verbessert. Bei KM-Punktionen konnte ein solcher Unterschied nicht festgestellt werden (Tab. 2).

## Diskussion

Die vorliegenden Resultate belegen, daß mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auch beim Hund ein sensitives und spezifisches Verfahren zur Diagnostik der Leishmaniose zur Verfügung steht. Als vorteilhaft erwies sich bei fünf Patienten der Probenversand im Kulturmedium, wodurch vor Therapiebeginn die Leishmaniose auch aus den untersuchten Blutproben mittels PCR bestätigt werden konnte. Nach dem Therapieende war der Erregernachweis jedoch aus dem Blut allein nicht mehr sicher zu führen. Lediglich ein behandelter Hund reagierte im Blut weiterhin PCR-positiv. In allen anderen Fällen mußte zum Erregernachweis die Knochenmarkpunktion herangezogen werden. Repräsentativ ist die begleitende Therapiekontrolle eines therapierten Hundes in Abbildung 2 dargestellt. Wie aus dieser Abbildung hervorgeht, ließ sich die Persistenz der Leishmanien letztlich nur noch aus dem gleichzeitig entnommenen Knochenmark bestätigen. Diese Ergebnisse decken sich weitestgehend mit den Erfahrungen beim Menschen (1). So reagierte zwar eine signifikante Anzahl von behandelten Kala-Azar-Patienten (*L. donovani*) mit zumeist langer Krankheitsgeschichte im Knochenmark positiv, im Blut dagegen in aller Regel negativ. Hieraus kann gefolgert werden, daß nur im unbehandelten Frühstadium der Erkrankung Leishmanien im genügender Anzahl zur PCR-Diagnostik im Blut zirkulieren.

Nach Beendigung der Therapie konnten bei sechs der sieben therapeutisch begleiteten Hunde die Persistenz der Leishmanien demonstriert werden. Lediglich ein Hund erwies sich sowohl im

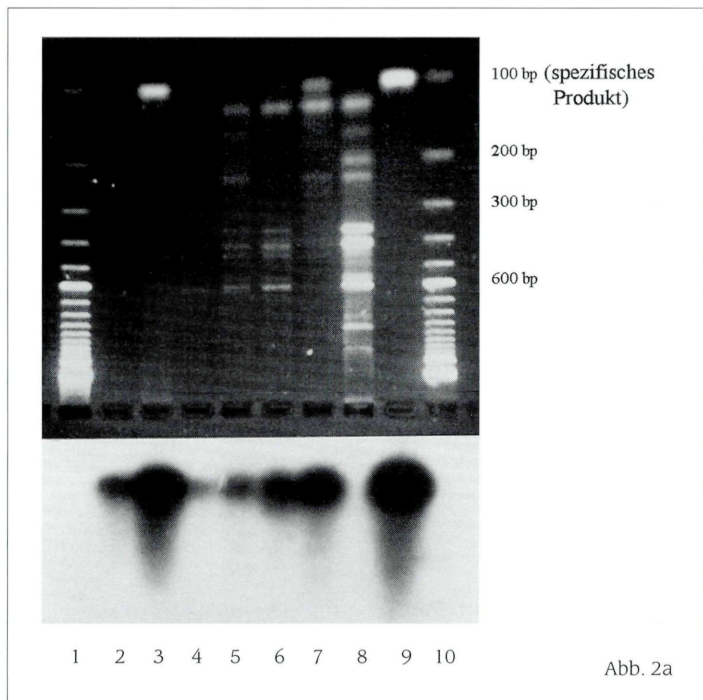


Abb. 2a

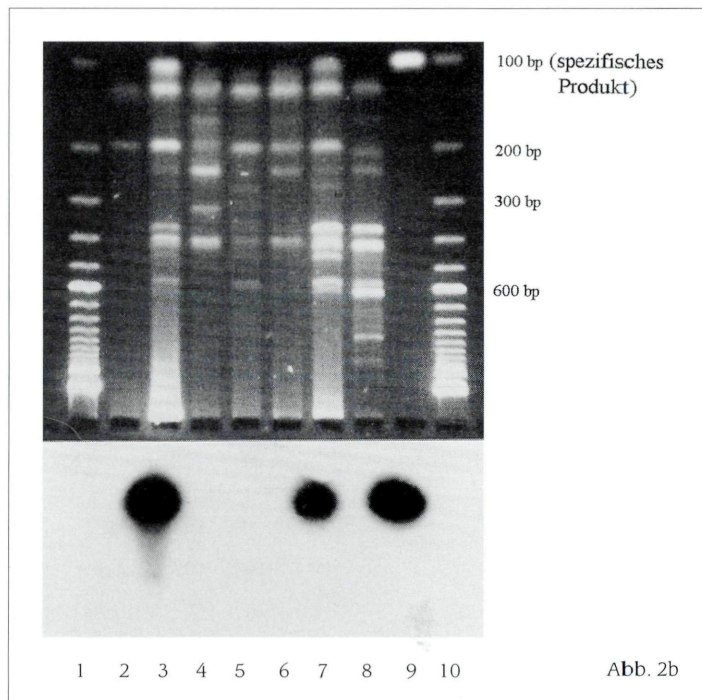


Abb. 2b

Abbildung 2.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR) aus Vollblutproben (VB) und Knochenmarkpunktaten (KM) im Verlauf der Therapie mit Glucantime® bei caniner Leishmaniose (Fallbeispiel Patient 6). Gelelektrophorese der Amplifikate in einem 4%-igem Kompositgel. Das spezifische Leishmania-Amplifikat liegt bei 100 bp.

Abbildung 2a: 1. Therapiezyklus: Oben: Spur 1 und 10: 100 bp-Leiter; Spur 2: VB (Tag 0); Spur 3: KM (Tag 0) Spur 4: VB (Tag 4); Spur 5: VB (Tag 6); Spur 6: VB (Tag 10); Spur 7: KM (Tag 10); Spur 8: Negativkontrolle (Hunde-DNA); Spur 9: *L. infantum* (100 pg = 1000 Zellen). Unten: Southern- Blot Hybridisierung des Gels mit einer spezifischen *L. infantum*-Sonde (100 bp) im Enhanced Chemilumineszenz-Verfahren (ECL).

Abbildung 2b: 2. Therapiezyklus: Oben: Spur 1 und 10: 100 bp-Leiter; Spur 2: VB (Tag 0); Spur 3: KM (Tag 0) Spur 4: VB (Tag 3); Spur 5: VB (Tag 6); Spur 6: VB (Tag 10); Spur 7: KM (Tag 10); Spur 8: Negativkontrolle (Hunde-DNA); Spur 9: *L. infantum* (100 pg = 1000 Zellen). Unten: Southern- Blot Hybridisierung des Gels mit einer spezifischen *L. infantum*-Sonde (100 bp) im Enhanced Chemilumineszenz-Verfahren (ECL).

Blut als auch im Knochenmark als PCR-negativ. Eine zusätzliche im Monatsabstand bei diesem Patienten durchgeführte Untersuchung sowohl des Blutes als auch des Knochenmarks blieb ebenfalls negativ, so daß der Hund bei vorsichtiger Einschätzung derzeit als klinisch und parasitologisch geheilt angesehen werden kann.

Für die parasitologische Verlaufskontrolle der kaninen Leishmaniose hat sich gleichfalls die in vitro-Kultivierung aus punktierten Lymphknotenpunktaten bewährt (8). Der Kulturnachweis erfordert jedoch frisches, kontaminationsfreies Probenmaterial und wird zudem als zeit- und kostenintensiv angesehen (20). Nach den nun vorliegenden Ergebnissen kann zur therapeutischen Verlaufskontrolle die PCR-Diagnostik aus Knochenmarkpunktaten als eine geeignete Alternative angesehen werden.

Während im afrikanischen Teil des Mittelmeerraumes neben *L. infantum* sporadisch auch *L. major* (21, 6) oder *L. tropica* (9) beim erkrankten Hund nachgewiesen wurde, konnte im europäischen Teil des Mittelmeerraumes bisher stets *L. infantum* als Infektionserreger bestimmt werden (6, 8). Die zur Artdifferenzierung eingesetzte PCR (26) bestätigten diese Angaben. Keine der untersuchten Proben reagierte mit einem *L. major*-spezifischen Amplifikationsprodukt. Die Tatsache, daß nicht mehr als vier der sieben untersuchten Hunde das für *L. infantum* charakteristische 700-bp Produkt zeigten, führen wir auf eine geringere Sensitivität dieser PCR zurück, da kein vor Behandlungsbeginn positiv getestetes Knochenmark nach Abschluß der Therapie mit einem spezifischen Amplifikationsprodukt reagierte.

### Zusammenfassung

Sieben Hunde mit parasitologisch gesicherter Leishmaniose wurden mit bis zu 3 standardisierten Therapiezyklen (Megluminantimoniat, 1. und 2. Tag 50 mg/kg, 3.-10. Tag 100 mg/kg) behandelt. Therapiebegleitend wurden Vollblut (VB) und Knochenmarksbiopsien (KM) mit einer Leishmania-spezifischen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und anschließender Hybridisierung untersucht. Alle 7 Patienten waren bei Therapiebeginn PCR-positiv (VB: 6 Hunde; KM: 7 Hunde).

Tabelle 2:

Einfluß des Probenversandes auf die PCR-Diagnostik der Leishmaniose.

Probenart	Versandart			
	-20°C PCR-Diagnostik		RPMI-Kulturmedium PCR-Diagnostik	
	positiv	negativ	positiv	negativ
Vollblutproben	2	16	12	6
Knochenmarkpunkt.	8	2	8	2

Bei 6 Hunden konnte nach Abschluß der Therapie Leishmanien-spezifische DNA nachgewiesen werden (VB: 1 Hund, KM: 6 Hunde). Die PCR erwies sich als geeignetes Mittel, um die Persistenz der Leishmanien nach der Therapie nachzuweisen.

### Summary

#### *Therapy monitoring of canine leishmaniosis by using the polymerase chain reaction (PCR)*

Seven dogs with parasitologically confirmed leishmaniosis were treated with up to three standardized therapeutic cycles (Megluminantimoniate, day 1 and 2: 50 mg/kg, days 3-10: 100 mg/kg). The dogs were monitored using a *Leishmania* specific polymerase chain reaction (PCR) and hybridisation of whole blood (WB) and bone marrow (BM) samples. All 7 patients were PCR positive (WB: 6 dogs; BM: 7 dogs) prior to therapy. Six dogs were still positive after therapy (WB: 1 dog; BM: 6 dogs). The PCR proved to be useful for the detection of *Leishmania* persisting after chemotherapy.

### Schlüsselwörter

Polymerase Kettenreaktion, Hund, Leishmaniose, *Leishmania infantum*, Therapiekontrolle, Glucantime.

### Danksagung

Herrn Dr. SIEGFIED BREM, BVUA Oberschleißheim, und Herrn Dr. ALBRECHT F. KIDERLEN, RKI Berlin, danken wir für die freundliche Überlassung der verschiedenen Leishmanienstämme.

## Literatur

1. ADHYA, S., CHATTERJEE, M., HASSAN, M.Q., MUKHERJEE S, SEN, S. (1995):  
Detection of Leishmania in the blood of early kala-azar patients with the aid of the polymerase chain-reaction.  
*Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 89, 622-624.
2. ALVAR, J. et al. (1994):  
Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy.  
*Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 88, 371-378.
3. ANDRESEN, K. et al. (1996):  
Evaluation of the polymerase chain reaction in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*: a comparison with direct microscopy of smears and section from lesions.  
*Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 90, 133-135.
4. ASHFORD, D. A. et al. (1995):  
Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis.  
*Am. J. trop. med. Hyg.*, 53, 251-255.
5. BELLOLI, C., et al. (1995):  
Disposition of antimony and aminosidine in dogs after administration separately and together. Implications for therapy of leishmaniasis.  
*Vet. Science*, 58, 123-127.
6. BETTINI, S. and GRADONI, L. (1986):  
Canine leishmaniasis in the mediterranean area and its implications for human leishmaniasis.  
*Insect. Sci. Applic.*, 2, 241-245.
7. CHAPMAN, W. L., HANSON, W. L., ALVING, C. R., HENDRICKS, L. D. (1984):  
Antileishmanial activity of liposome-encapsulated meglumine antimonate in the dog.  
*Am. J. Vet. Res.*, 45, 1028-30.
8. DEPLAZES, P., ARNOLD, P., SKAGGS, J., GESSLER, M. (1992):  
Parasitologische und immunologische Verlaufskontrollen während und nach Chemotherapie der Leishmaniose des Hundes.  
*Schweiz. Arch. Tierheilk.*, 134, 85-93.
9. DEREURE, J., et al. (1991):  
*Leishmania tropica* in Morocco: infection in dogs.  
*Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 85, 595.
10. EDELHOFER, R., KOSZTOLICH, A., MITTERHUBER, C.H., KUTZER, E. (1995):  
Importierte Leishmaniose-Fälle bei Hunden in Österreich -eine retrospektive Studie von 1985-1994.  
*Wien. tierärztl. Mschr.*, 82, 90-95.
11. EL-HASSAN, A. M., ZIJSLTRA, E. E., MEREDITH, S. E. O., GHALIB, H. W., ISMAIL, A. (1993):  
Identification of *Leishmania donovani* using a polymerase chain reaction in patients and animal material obtained from an area of endemic kala-azar in the Sudan.  
*Acta Tropica*, 55, 87-90.
12. FERRER, L., AISA, M. J., ROURA, X., PORTUS, M. (1995):  
Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis.  
*Vet. Rec.*, 136, 514-516.
13. GOTHE, R. (1991):  
Leishmaniosen des Hundes in Deutschland: Erregerfauna und -biologie, Epidemiologie, Klinik, Pathogenese, Diagnose, Therapie und Prophylaxe.  
*Kleintierpraxis* 36, 45-84.
14. HASSAN, M. D. Q. et al. (1993):  
Enzymatic amplification of min-exon derived RNA gene spacers of *Leishmania donovani*: primers and probes for DNA diagnosis.  
*Parasitology*, 107, 509-517.
15. LASKAY, T., MIKO, T. L., NEGESSE, Y., SOLBACH, W., ROELLINGHOFF, M., FROMMEL, D. (1995):  
Detection of cutaneous *Leishmania* infection in paraffin-embedded skin biopsies using the polymerase chain reaction.  
*Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 89, 273-275.
16. LISTE, F., GASCON, M. (1995):  
Allopurinol in the treatment of canine visceral leishmaniasis.  
*Vet. Rec.*, 137, 23-24.
17. LINDNER, T. (1995):  
Aus der Praxis: Kombinationstherapie der Hundeleishmaniose (HL), mit Megluminantimonat und Allopurinol am Beispiel einer Teckelhündin.  
*Tierärztl. Umschau*, 50, 797-798.

18. MANCIANTI, F., GRAMICCIA, M., GRADONI, L., PIERI S. (1988):  
Studies on canine leishmaniasis control. I. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment.  
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 82, 566-567.
19. MATHIS, A., DEPLAZES, P. (1995):  
PCR and in vitro cultivation for detection of Leishmania spp. in diagnostic samples from humans and dogs.  
J. Clin. Microbiol., 33 1145-1149.
20. MATHIS, A., DEPLAZES, P., KÖHLER, P., ECKERT, J. (1996):  
PCR zum Nachweis und zur Charakterisierung von Parasiten (Leishmania, Echinococcus, Microsporidia, Giardia)  
Schweiz. Arch. Tierheilk., 138, 133-138.
21. MORSY, T. A. et al. (1987):  
Natural infection of Leishmania major in domestic dogs from Alexandria, Egypt.  
Am. J. trop. med. Hyg., 37, 49-52.
22. NUZUM, E., WHITE F. 3RD, THAKUR, C., DIETZE, R., WAGES, J., GROGL, M. BERMAN, J. (1995):  
Diagnosis of symptomatic visceral leishmaniasis by use of the polymerase chain reaction on patient blood.  
J. Infect. Dis., 171 751-754.
23. OLIVA, G. et al. (1995):  
Activity of liposomal amphotericin B (AmBisome) in dogs naturally infected with Leishmania infantum.  
J. Antimicrob. Chemotherapy, 36, 1013-1019.
24. OPITZ, M. (1996):  
Hautmanifestation bei der Leishmaniose des Hundes.  
Tierärztl. Praxis, 24, 284-291.
25. PIARROUX, R. et al. (1993):  
Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence from Leishmania infantum: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction.  
Am. J. Trop. Med. Hyg., 49, 364-369.
26. RAVEL, S., CUNY, G., REYNES, J., VEAS, F. (1995):  
A highly sensitive and rapid procedure for direct PCR detection of Leishmania infantum within human peripherical blood mononuclear cells.  
Acta Tropica, 59, 187-196.
27. REITER, I., KRETZSCHMAR, A., BOCH, J., KRAMPITZ, H. (1985):  
Zur Leishmaniose des Hundes. Infektionsverlauf, Diagnose und Therapieversuche nach exp. Infektion von Beagles mit Leishmania donovani (St. Kalkutta).  
Berl. Münchner Tierärztl. Wschr., 98, 40-44.
28. SMYTH, A. J. et al. (1992):  
Rapid and sensitive detection of Leishmania kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala azar patients.  
Parasitology, 105, 183-192.
29. STEUBER, S., KROKER, R. (1994):  
Antiprotozoika.  
in: W. Löscher, F. R. Ungemach, R. Kroker: Grundlagen der Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren, 2. neub. Aufl., Parey Verlag, Berlin und Hamburg, S. 359-379.

**Korrespondenzadresse**

Dr. Stephan Steuber  
Bundesinstitut für gesundheitl. Verbraucherschutz u. Veterinärmedizin, (BgVV), FG 602  
Diedersdorfers Weg 1  
D-12277 Berlin · Bundesrepublik Deutschland



# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie](#)

Jahr/Year: 1997

Band/Volume: [19](#)

Autor(en)/Author(s): Steuber Stephan, Schirrmann Ines, Greiner M., Moritz A.

Artikel/Article: [Therapiekontrolle der kaninen Leishmaniose mit Hilfe der Polymemse-Kettenreaktion \(PCR\). 97-104](#)