

Vergleich verschiedener Untersuchungsmethoden

Nachweis von *Cryptosporidium* spp. und *Giardia* spp. in Kotproben von Kälbern

Julia Gillhuber et al. *, München

Bei der Erstellung eines gezielten Parasitenmanagements in der Kälberaufzucht zur Vermeidung von Durchfallerkrankungen ist es nötig, die ursächlichen Erreger zu identifizieren. Neben einer klinischen Untersuchung sind dazu zusätzlich diagnostische Tests nötig. Ziel der Studie war es, verschiedene koprodiagnostische Tests zum Nachweis von *Giardia* spp. und *Cryptosporidium* spp. in Kälberkotproben zu bewerten. Aktuell ist in Süddeutschland von einer Prävalenz von 7,2 % bzw. 41,3 % (Gillhuber et al. in Vorbereitung) auszugehen.

Insgesamt wurden 340 Kotproben von klinisch durchfallerkrankten und klinisch gesunden Kälbern aus Süddeutschland auf Giardien und/oder Kryptosporidien untersucht. Diese Proben stammten alle aus Einsendungen an das Diagnostikzentrum der Vergleichenden Tropenmedizin und Parasitologie, LMU München, setzten sich aber aus zwei verschiedenen Panels zusammen, denen eine unterschiedliche Probenvorbereitung zugrunde lag. Nachdem bei allen unmittelbar nach Einsendung die Methoden Nativausstrich und MIFC durchgeführt wurden, wurden die ersten 170 Proben, die 2011 gesammelt wurden, homogenisiert, auf eine einheitliche, pipettierbare Konsistenz verdünnt und aliquotiert. Dagegen wurde das im Jahr 2012 gesammelte Panel aus 170 Proben nur homogenisiert und aliquotiert, auf eine Verdünnung wurde verzichtet. Die jeweils 170 Proben beider Panels wurden gleichzeitig und im selben Jahr ihrer Sammlung mit drei Schnelltests untersucht: dem FASTest® CRYPTO Strip, zugelassen für Rind und Igel, dem FAS-

Test® GIARDIA Strip und dem FASTest® CRYPTO-GIARDIA Strip, beides Prototypen, die für Rinder noch nicht zugelassen sind. Zusätzlich wurden 2012 alle 340 Proben mittels ProSpecT Giardia Microplate (ELISA), ProSpecT Cryptosporidium Microplate (ELISA) sowie drei weiteren ELISAs (MEGAELISA GIARDIA, MEGAELISA CRYPTO, MEGAELISA CRYPTO-GIARDIA), die für Rinder zugelassen werden sollen, und mittels Direkter Immunfluoreszenz (DIF) als dritte Referenzmethode untersucht. Anschließend wurden Sensitivität und Spezifität von Schnelltests und ELISAs jeweils gegen drei (*Cryptosporidium* spp.; Nativ, MIFC DIF; 3 von 3 Methoden positiv = positiv) bzw. zwei (*Giardia* spp.; MIFC, DIF; 2 von 2 Methoden positiv = positiv) Referenzmethoden berechnet.

Beim Nachweis von Giardien hatten der MEGAELISA GIARDIA eine Sensitivität von insgesamt 92 % und eine Spezifität von 91 %, der ProSpecT Giardia Microplate (ELISA) von 96 % und 88 % und der FASTest® GIARDIA Strip von 65 % und 94 %. Für

den Nachweis von Kryptosporidien hatten der MEGAELISA CRYPTO, der ProSpecT Cryptosporidium Microplate (ELISA) und der FASTest® CRYPTO Strip eine Sensitivität von je 91 %, 94 % und 97 % und eine Spezifität von je 94 %, 91 % und 82 %. Der FASTest® CRYPTO-GIARDIA Strip hatte beim Giardien-Nachweis eine Sensitivität von 60 % bei einer Spezifität von 97 % und beim Kryptosporidien-Nachweis eine Sensitivität von 97 % bei einer Spezifität von 87 %. Sensitivität und Spezifität des MEGAELISA CRYPTO-GIARDIA lagen bei 93 % bzw. 87 %. Die Ergebnisse der beiden Panels sind in Tabelle 1 getrennt dargestellt. Dabei fällt besonders der große Unterschied hinsichtlich der Giardien-Sensitivität der beiden giardiennachweisenden Schnelltests auf.

Beim Nachweis von Giardien weisen der FASTest® GIARDIA Strip und der FASTest® CRYPTO-GIARDIA Strip in beiden Panels gute Spezifitäten auf. Eine gute Sensitivität beider Tests zeigt sich nur beim Panel 2011, das auf eine pipettierbare Konsistenz verdünnt wurde, nicht aber



bei den unverdünnten Proben von 2012. Dies zeigt, wie stark die Probenvorbereitung Einfluss auf eine wissenschaftliche Studie, die immer auf idealen Laborbedingungen basieren sollte, haben kann. Sowohl bei den Schnelltests als auch bei den drei MEGAELISAs werden Oberflächenantigene, die von den Kryptosporidium-Oozysten bzw. den Giardia-Zysten/Trophozoiten abschilfern, nachgewiesen. Je flüssiger eine Probe im Nativzustand ist bzw. durch Verdünnen wird (entsprechend Panel 2011), umso homogener sind die Kryptosporidien bzw. Giardien darin verteilt und umso mehr Oberflächenanti-

gene können in Lösung gehen. Ein möglicher Grund für die großen Sensitivitätsunterschiede der giardiennachweisenden Schnelltests im Vergleich zu den geringen Abweichungen kryptosporidiennachweisender Schnelltests könnte in den Größenunterschieden der Kryptosporidien-Oozysten im Vergleich zu den Giardien-Zysten/Trophozoiten begründet liegen. Je kleiner der Erreger ist, umso homogener ist die Verteilung in der Nativprobe und damit auch in der Pufferlösung. Zusätzlich darf nicht vergessen werden, dass der FASTest® CRYPTO Strip bereits für das Rind zugelassen ist, während es sich bei den beiden anderen Schnelltests um Prototypen handelt. Der eher geringe Sensitivitätsunterschied der beiden Panels bei den Giardien-ELISAs kann methodenbedingt durch die verlängerte Inkubationszeit, Antigen-Antikörper-Bindung in horizontaler Flüssigkeitsphase sowie Waschschrritte im Vergleich zur fünf-minütigen Schräginkubation mittels Schnelltest erklärt werden. Beim Nachweis von Kryptosporidien hatten der FASTest® CRYPTO Strip sowie der FASTest® CRYPTO-GIARDIA Strip die höchste Sensitivität, beide sind somit vor Ort ohne großen Zeit- und Kostenaufwand einsetzbar. Alle fünf durchgeführten ELISAs hatten durchweg gute Ergebnisse in Sensitivität und Spezifität. Insgesamt stellen diese Tests eine Alternative (alle ELISAs, FASTest® CRYPTO Strip) bzw. eine Ergänzung (Schnelltests) in der Diagnostik von *Giardia* spp. und *Cryptosporidium* spp. dar, können aber die mikroskopische Untersuchung nicht ersetzen.

Danksagung

Wir danken MEGACOR Diagnostik GmbH für die finanzielle Unterstützung und im Besonderen Frau Dr. Kern (MEGACOR Diagnostik GmbH), Frau Fischer (R-Biopharm AG) und Frau Döflinger (R-Biopharm AG) für die tolle Zusammenarbeit.

* weitere Autoren: Christiane Schrödl, Kurt Pfister, Miriam Scheuerle

Tab. 1: Sensitivität und Spezifität verschiedener Tests zum Nachweis von *Giardia* spp. und *Cryptosporidium* spp. in Kotproben.

Genus und Test	Sensitivität (%)			Spezifität (%)		
	2011 (n=170)	2012 (n=170)	ges. (n=340)	2011 (n=170)	2012 (n=170)	ges. (n=340)
<i>Giardia</i>						
FASTest® GIARDIA Strip	85	57	65	94	93	94
FASTest® CRYPTO-GIARDIA Strip	92	49	60	96	98	97
MEGAELISA GIARDIA	100 (n=169)*	89 (n=168)*	92 (n=337)*	90 (n=169)*	92 (n=168)*	91 (n=337)*
ProSpecT Giardia Microplate	100	94	96	87	89	88
<i>Cryptosporidium</i>						
FASTest® CRYPTO	100	95	97	82	83	82
FASTest® CRYPTO-GIARDIA Strip	100	95	97	85	89	87
MEGAELISA CRYPTO	93	89	91	95	92	94
ProSpecT Cryptosporidium Microplate	98	89	94	94	88	91
<i>Cryptosporidium/Giardia</i>						
MEGAELISA CRYPTO-GIARDIA	96	90	93	82	93	87

*Testung bei grenzwertigem Ergebnis nicht in Auswertung miteinbezogen.

**KONTAKT****Julia Gillhuber**

Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie | Tierärztliche Fakultät Ludwig-Maximilians-Universität München Leopoldstraße 5 | 80802 München Julia.Gillhuber@tropa.vetmed.uni-muenchen.de