

Amtliche Methodensammlung

Toxoplasma gondii

1. Charakterisierung der Infektion
2. Untersuchungsmaterial
3. Untersuchungsgang

Toxoplasma gondii

1. Charakterisierung der Infektion

1.1 Erreger

Toxoplasma (T.) gondii ist ein sich obligat intrazellulär vermehrender protozoärer Parasit, der vermutlich alle warmblütigen Vertebraten infizieren kann.

Feliden, wie zum Beispiel die Hauskatze, können als Endwirte von *T. gondii* im Kot Dauerstadien des Parasiten (Oozysten) ausscheiden, die in der Umwelt längere Zeit überlebensfähig und infektiös sind. Kontaminationen von Nahrungsmitteln oder des Trinkwassers mit Oozysten können Infektionen bei Zwischenwirten (z. B. beim Menschen) verursachen.

T. gondii hat eine große zoonotische Bedeutung. Bis zu einem Drittel der Menschheit ist mit *T. gondii* infiziert. In Deutschland haben je nach Altersgruppe bis zu zwei Drittel der Bevölkerung Antikörper gegen das Tachyzoiten-Stadium des Parasiten. Die meisten Primärinfektionen beim Menschen verlaufen asymptomatisch; manche der postnatal infizierten Patienten erkranken an einer Lymphadenopathie oder einer okulären Toxoplasmose. Eine primäre während der Schwangerschaft erworbene Infektion kann den Föten schwer schädigen. Bei immunsupprimierten Patienten kann eine Reaktivierung latenter Infektionen zu lebensbedrohlichen Enzephalitiden führen.

Infektionen des Menschen werden vor allem durch den Verzehr von rohem oder nicht ausreichend erhitztem Fleisch verursacht, das lebende, enzystierte Stadien (Bradyzoiten) von *T. gondii* enthält, oder durch die Aufnahme von Oozysten-kontaminiertem Wasser oder Nahrungsmitteln, die aus dem Kot infizierter Feliden stammende Oozysten enthalten. Nach der Infektion bilden sich im infizierten Zwischenwirt Tachyzoiten, das sind die sich rasch intrazellulär vermehrenden Stadien, die zum Untergang der von ihnen infizierten Zellen führen.

1.2 Klinische Symptomatik bei Tieren

T.-gondii-Infektionen verlaufen bei Menschen und Tieren meist unbemerkt. In Abhängigkeit von der Tierart, dem immunologischen Status des Wirts, seines Alters oder auch in Abhängigkeit von der Virulenz des *T.-gondii*-Stamms können klinische Symptome auftreten und die Infektion kann sogar zum Tod des Wirts führen.

Die Vermehrung des Tachyzoitenstadiums ist für Gewebeschäden in infizierten Zwischenwirten verantwortlich. Daher hängen klinische Symptome sehr stark von der Zahl der freigesetzten Tachyzoiten-Stadien ab und auch davon, ob das Immunsystem des Wirtes in der Lage ist, die Weiterverbreitung der Tachyzoiten und damit das Ausmaß der Organschädigungen zu limitieren. Da adulte, immunkompetente Tiere die Tachyzoitenausbreitung kontrollieren können, verläuft eine *T.-gondii*-Infektion in der Regel subklinisch oder mit nur milden klinischen Symptomen.

Bei jungen Tieren (z. B. Welpen, jungen Katzen und Ferkeln) kann sich die Tachyzoiteninfektion gelegentlich systemisch ausbreiten und zu interstitieller Pneumonie, Myokarditis, Lebernekrose, Meningoenzephalomyelitis, Chorioretinitis, Lymphadenopathie und zu Myositis führen. Klinische Symptome sind Fieber, Durchfall, Husten, Luftnot, Ikterus und Krämpfe. Die Tiere können versterben. Auch immunsupprimierte Tiere (z. B. Katzen, die sich mit Felinen Immundefizienz-Virus infiziert haben) können sehr empfänglich für Infektionen mit *T. gondii* sein und generalisierte Toxoplasmosen entwickeln.

T. gondii ist eine wichtige Ursache für Aborte und Todgeburten bei Schafen, Ziegen und gelegentlich auch bei Schweinen. Nach der Infektion können Tachyzoiten über das Blut der tragenden Tiere zu den fötalen Anteilen der Plazenta vordringen und dort Nekrosen verursachen. Eine Mineralisation der Kotyledonen ist typisch. Tachyzoiten können aber auch weiter bis in die Föten vordringen und dort zu herdförmigen Nekrosen in zahlreichen Organen führen.

Feliden sind Endwirte von *T. gondii*, d. h. Oozysten können im Kot ausgeschieden werden. In seltenen Fällen kann es dadurch zu Durchfällen bei infizierten Feliden kommen.

Tiere können sich durch orale Aufnahme von sporulierten Oozysten aus Kot von Feliden, unzureichend gegartem Fleisch infizierter Zwischenwirte oder durch diaplazentare Übertragung anstecken.

1.3 Differentialdiagnose

Da die klinischen Symptome bei *T. gondii*-Infektionen in der Regel unspezifisch sind, kommen zahlreiche - auch im Folgenden nicht explizit genannte - Differentialdiagnosen in Betracht.

Bei Aborten bei Schafen und Ziegen sollte auch an Infektionen mit *Chlamydia abortus*, Pestivirus, *Campylobacter fetus subsp. fetus*, *C. jejuni*, *Salmonella spp.*, *Coxiella burnetii* und *Neospora caninum* (Neosporose) gedacht werden.

Neurologische Erkrankungen bei Hunden könnten außer durch eine Toxoplasmose auch durch Neosporose, Staupe, Tollwut, Neuroborreliose oder Pseudowut entstehen. Systemische neurologische Erkrankungen bei Katzen können auch durch ein Lymphom, Kryptokokkose, durch Infektion mit dem Feline-Infektiöse-Peritonitis-Virus, mit dem Felinen Leukämievirus oder dem Felinen Immundefizienz-Virus ausgelöst werden.

Bei systemischen Erkrankungen bei Hunden sollte auch an eine Infektion mit dem Caninen Adenovirus-1 gedacht werden.

Respiratorische Erkrankungen bei Hunden und Katzen könnten bakterielle, virale oder mykotische Ursachen haben.

Toxoplasma gondii

1.4 Diagnostische Indikation

Diagnostische Indikationen sind das Auftreten von Erkrankungen mit der oben aufgeführten Symptomatik oder von Aborten bei Schafen, Ziegen und Schweinen. Durchfälle bei Feliden sollten zum Anlass für eine Kotuntersuchung genommen werden, bei der auch auf einen Befall mit *T. gondii* zu achten ist.

Toxoplasmose ist eine Zoonose; Monitoring und Überwachen sind weitere diagnostische Indikatoren.

1.5 Zuständige Untersuchungseinrichtung

- Veterinäruntersuchungs-, Tiergesundheitsämter
- Staatliche Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsämter der Bundesländer
- Nationales Referenzlabor (NRL) für Toxoplasmose im Institut für Epidemiologie des Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Südufer 10, D-17493 Greifswald-Insel Riems, Tel. 038351 7-1658, -1695, -1544 (für abklärende Untersuchungen).

1.6 Rechtsgrundlagen

Bei der Toxoplasmose handelt es sich um eine meldepflichtige Tierkrankheit (Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten in der Fassung der Bekanntmachung vom 20.12.2005). Gemäß Artikel 4 Absatz 1 bis 3 der Richtlinie 2003/99/EG gehört die Toxoplasmose zu den je nach epidemiologischer Situation überwachungspflichtigen Zoonosen.

2. Untersuchungsmaterial

Bei **Zwischenwirten** kann der indirekte Nachweis einer *T.-gondii*-Infektion über spezifische Antikörper gegen *T.-gondii*-Tachyzoiten im **Serum**-, im **Plasma** oder im **Fleischsaft** *intra vitam* oder *post mortem* erfolgen. Auch Feliden, die Endwirte für *T. gondii* sein können, können dem Parasiten als Zwischenwirte dienen und an der Toxoplasmose erkranken. **Körpergewebe** können histologisch und immunhistologisch auf *T.-gondii*-Stadien untersucht werden und den direkten Erregernachweis ermöglichen. Da beim histologischen Nachweis auch andere Protozoen-Infektionen differentialdiagnostisch infrage kommen, müssen histologische Befunde mittels eines spezifischen Nukleinsäurenachweises (PCR) bestätigt werden. Der Nachweis von *T. gondii* in Körpergeweben infizierter Zwischenwirte kann auch durch die Inokulation von Versuchstieren mit enzymatisch behandelten Präparationen dieser Körpergewebe erreicht werden.

Bei **Feliden**, die *T. gondii* nur als Endwirte dienen, führt die Infektion zur Oozystenausscheidung. Da andere Stadien als Tachyzoiten an diesem Entwicklungsabschnitt beteiligt sind, lässt die serologische Untersuchung mit Tachyzoitenantigen keine Aussage über eine in der Vergangenheit, zum Untersuchungszeitpunkt oder zukünftige Oozystenausscheidung zu. Endwirte können nur über einen direkten Nachweis von *T.-gondii*-Oozysten im **Kot** der Feliden, d. h. über eine koproscopische Untersuchung identifiziert

werden. Da andere Protozoen-Infektionen bei der Katze zur Ausscheidung morphologisch ähnlicher Oozysten führen können, müssen positive koproskopische Befunde mittels eines spezifischen Nukleinsäurenachweises (PCR) oder durch Tierversuch (z. B. durch orale Inokulation in Mäuse) bestätigt werden.

2.1 Untersuchungsmaterial für den Erregernachweis

Kotproben (ca. 5 - 10 g) und Körpergewebe infizierter Zwischenwirte (z. B. Abortmaterial) sind nativ an Untersuchungseinrichtungen zu versenden. Gegebenenfalls ist auf eine ausreichende Kühlung der Körpergewebe zu achten, um eine Einschränkung der Untersuchbarkeit durch Autolyse zu verhindern.

2.2 Untersuchungsmaterial für den Antikörpernachweis

Für den Antikörpernachweis können Vollblut, EDTA-Blut oder mindestens 500 µl Serum bzw. Plasma eingeschickt werden.

3. Untersuchungsgang

3.1 Antikörpernachweis

3.1.1 Immunfluoreszenztest

Folgende Immunfluoreszenztests sind zum Nachweis *T.-gondii*-spezifischer Antikörper vom FLI zugelassen worden:

Kurzbezeichnung	Tierart	Probenarten (Isotyp)	Hersteller	Zulassung
Anti-Toxoplasma-gondii-IIFT Katze (IgM)	Katze	Blutserum, Plasma (IgG)	EUROIMMUN	FLI-B 567
Anti-Toxoplasma-gondii-IIFT Katze (IgG)	Katze	Blutserum, Plasma (IgG)	EUROIMMUN	FLI-B 567
MegaFLUO TOXO-PLASMA g.	Katze	Serum (IgG)	MegaCor GmbH	FLI-C 032

Für Tierarten, für die keine kommerziellen Antikörpernachweisverfahren verfügbar sind, könnten kommerziell angebotene Immunfluoreszenzobjektträger, die mit *T.-gondii*-Tachyzoiten beschichtet sind, mit entsprechenden speziesspezifischen Konjugaten kombiniert zum Nachweis von Antikörpern verwendet werden (siehe **Anhang 1**).

Toxoplasma gondii

3.1.2 ELISA

Folgende ELISA zum Nachweis *Toxoplasma-gondii*-spezifischer Antikörper sind vom FLI zugelassen worden:

Kurzbezeichnung	Tierart	Probenarten	Hersteller	Zulassung
IDEXX Toxotest	Schaf, Ziege	Blutserum, Plasma	IDEXX	BGVV-B 318
ID Screen Toxoplasmosis Indirect	Rind, Schaf, Ziege, Hund, Katze Schwein	Blutserum, Plasma Blutserum, Plasma, Fleischsaft	IDVET	FLI-B 550
PrioCheck Toxoplasma Ab porcine	Schwein	Blutserum, Plasma, Fleischsaft	Prionics AG	FLI-B 528
pigtype Toxoplasma AB	Schwein, Wildschwein Schaf, Ziege, Rind, Hund, Katze Fuchs	Blutserum-, Plasma, Fleischsaft Blutserum-, Plasma Fleischsaft	Qiagen INDICAL BIOSCIENCE	FLI-B 564

3.2 Mikroskopischer Erregernachweis

3.2.1 Mikroskopischer Erregernachweis in Gewebeproben

Für den mikroskopischen Nachweis von *T. gondii* können konventionelle histologische Verfahren angewendet werden. In Giemsa-gefärbten Abklatschpräparaten zeigen gut erhaltene *T. gondii* (5 bis 8 µm lang und 2 bis 3 µm breit) eine sichelförmige Gestalt. Degenerierende *T. gondii* haben allerdings eine ovale Form. In Schnitten erscheinen *T. gondii* oft oval oder rund. Gelegentlich können Gewebezysten von *T. gondii* beobachtet werden, die je nach Alter der Zyste wenige oder tausende von Bradyzoiten enthalten. Gewebezysten können einen Durchmesser von ca. 70 µm erreichen, in der Muskulatur bisweilen einen Durchmesser von bis zu 100 µm. Gewebezysten sind von einer deutlichen Zystenwand (< 0,5 µm) umgeben; sie enthalten Bradyzoiten, die sich lichtmikroskopisch nicht von Tachyzoiten unterscheiden lassen.

3.2.2 Mikroskopischer Erregernachweis in Kotproben

Für den mikroskopischen Erregernachweis können konventionelle parasitologische Untersuchungsmethoden angewendet werden. Da *T. gondii*-Oozysten sich morphologisch nicht von Oozysten anderer Kokzidien (z. B. *Hammondia hammondi*) unterscheiden lassen, ist der Nachweis von Oozysten mit einem Durchmesser von 11 bis 15 µm nicht ausreichend, um eine *T.-gondii*-Infektion zu diagnostizieren. Befunde müssen mittels eines spezifischen Nukleinsäurenachweises (PCR) bestätigt werden.

3.3 Erregernachweis mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.3.1 Erregernachweis in Gewebeproben mittels PCR

Als Analyte dienen DNA-Proben, die aus Körpergeweben infizierter Zwischenwirte gewonnen wurden. Zur Isolierung dieser Gewebe-DNA können konventionelle Labormethoden und kommerzielle Aufreinigungsverfahren verwendet werden. Ein geeignetes spezifisches und sensitives PCR-Nachweisverfahren ist in **Anhang 2** beschrieben. Es beruht auf der Amplifikation eines Bereichs eines nicht-kodierenden 529 bp-großen Fragments, welches ungefähr 200- bis 300-fach wiederholt im Genom von *T. gondii* vorkommen soll (Homan *et al.*, 2000; Reischl *et al.*, 2003).

3.3.2 Erregernachweis in Kotproben mittels PCR

Bei der Isolierung von Oozysten-DNA aus Kotproben sollten zuvor validierte oder publizierte kommerzielle Verfahren eingesetzt werden (z. B. Herrmann *et al.*, 2012). Ein geeignetes Verfahren zur DNA-Extraktion aus Oozysten ist in **Anhang 3** beschrieben.

Zur Isolierung der Oozysten können auch konventionelle parasitologische Untersuchungsmethoden bestehend aus einem Sedimentations- mit anschließendem Flotationsschritt mittels konzentrierter Zuckerrösung zur Anreicherung der Oozysten angewandt werden (Schaes *et al.*, 2005, 2008 a, b).

4. Literatur

- Herrmann, D.C., Pantchev, N., Globokar Vrhovec, M., Maksimov, A. Conraths, F.J., Schares, G., 2011. Comparison of different commercial DNA extraction kits to detect *Toxoplasma gondii*-like oocysts in cat faeces. Berl. Muench. Tieraerztl. Wochenschr. 124, 497-502.
- Homan, W.L., Vercammen, M., Debraekeleer, J. and Verschueren, H., 2000. Identification of a 200-to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. Int. J. Parasitol. 30, 69-75.
- Reischl, U., Bretagne, S., Krüger, D., Ernault, P., Costa, J.M., 2003. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. BMC Infect. Dis. 3:7.
- Schares, G., Pantchev, N., Barutzki, D., Heydorn, A.O., Bauer, C., Conraths, F.J., 2005. Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. Int. J. Parasitol. 35, 1525-1537.
- Schares, G., Globokar Vrhovec, M., Pantchev, N., Herrmann, D.C., Conraths, F.J., 2008 a. Occurrence of *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* oocysts in the faeces of cats from Germany and other European countries. Vet. Parasitol. 152, 34-45.
- Schares, G., Herrmann, D.C., Beckert, A., Schares, S., Hosseinejad, M., Pantchev, N., Vrhovec, G.M., Conraths, F.J., 2008 b. Characterization of a repetitive DNA fragment in *Hammondia hammondi* and its utility for the specific differentiation of *H. hammondi* from *Toxoplasma gondii* by PCR. Mol. Cell. Probes 22, 244-251.

Anhang

Anhang 1 – Laboranweisung zum Nachweis von *Toxoplasma gondii*-spezifischen Antikörpern mittels Immunfluoreszenztest

Prinzip

Material

Reagenzien

- 4 x FA-Waschpuffer: Na₂CO₃, 11,4 g, NaHCO₃, 33,6 g, NaCl, 8,5 g, Aq. bidest. ad 1 Liter, pH 9,0
- PBS, pH 7,2
- Spezies-spezifisches Konjugat (FITC, Alexa488)
- Fluoreszenzerhaltungspuffer: 3,5 g 1,4 diazobicyclo[2,2,2]-octane (DABCO, Sigma) in 90 ml Glycerol und 10 ml PBS, pH 7,2
- 0,2 % Evans Blue
- Azeton

Verbrauchsgegenstände

- Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen
- Immunfluoreszenzobjektträger (OTs) mit ca. 5×10^4 Tachyzoiten pro Untersuchungsfeld

Geräte

- Fluoreszenzmikroskop

Durchführung

- Fixierung der Objektträger (kann entfallen, falls OTs schon fixiert vorliegen): Inkubation der OTs in -20 °C kaltem Azeton für 8 min.
- Lagerung der OTs bis zum Auftragen der Serumverdünnungen bei Raumtemperatur (RT) in PBS.
- Inkubation mit den Serumverdünnungen: Die in PBS verdünnten Seren (jeweils 10 - 15 µl pro Feld, Verdünnung 1 : 25, 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200, 1 : 400, ...) werden auf den fixierten OTs inkubiert (30 min, 37 °C). Anschließend werden die Serumverdünnungen wieder abgesaugt, die Objektträger mit 1 x FA-Waschpuffer vorsichtig abgespült und für 8 min im 1 x FA-Waschpuffer inkubiert. Anschließend werden die OTs wieder in PBS inkubiert (1 min).
- Auftragen des Konjugats (10 µl pro Vertiefung) in einer Verdünnung von 1 : 50 (v/v) in PBS mit einem Zusatz von Evans Blue (0,2 % [w/v]; 30 min, 37 °C).
- Konjugat absaugen, die Objektträger mit 1 x FA-Waschpuffer abspülen und für 8 min im 1 x FA-Waschpuffer inkubieren. Anschließend werden die OTs wieder in PBS inkubiert (1 min).
- Eindecken der Objektträger mit Fluoreszenzerhaltungspuffer und einem Deckglas.
- Auswertung des Tests: in der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung werden Reaktionen positiv beurteilt, bei denen eine vollständige periphere Fluoreszenz der Tachyzoiten vorliegt.

Toxoplasma gondii

Anhang 2 - Laboranweisung zum Nachweis von *Toxoplasma gondii* Desoxyribonukleinsäuren mittels konventioneller Polymerase-Kettenreaktion, Primer Tox-8 und TOX5

Prinzip

Mit Hilfe der Primer Tox-8 (Reischl *et al.*, 2003) und TOX5 (Homan *et al.*, 2000) wird ein ca. 450-bp-langer Bereich auf einem nicht-kodierenden 529-bp-langen Fragment von *T. gondii* amplifiziert, welches ungefähr 200- bis 300-fach wiederholt im Genom von *T. gondii* vorkommen soll (Homan *et al.*, 2000).

Material

Reagenzien

- Alle Reagenzien werden bei -20 °C gelagert.
- DNase/RNase freies Wasser [Hersteller: z. B. SIGMA Aldrich]
- PCR-Reagenzienkit mit *Taq* Polymerase, PCR-Pufferstammlösung und MgCl₂-Lösung [Hersteller: z. B. STRATEC MOLECULAR]
- Bovines-Serum-Albumin-Lösung (BSA): 200 µg BSA [Hersteller: z. B. Carl Roth] gelöst in 1 ml DNase/RNase freiem Wasser
- Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP: 12,5 mM von dATP, dTTP, dCTP und dGTP) [Hersteller: z. B. STRATEC MOLECULAR]
- Tox-8 (5'-CCC AGC TGC GTC TGT CGG GAT-3') (100 pmol/µl) [Hersteller: z. B. MWG]
- TOX5 (5'-CGC TGC AGA CAC AGT GCA TCT GGA TT-3') (100 pmol/µl) [Hersteller: z. B. MWG]
- **Interne Kontrolle**, die mit den Primern reagiert, aber zu einem Produkt führt, das eine Größe hat, die von der Größe des für *T. gondii* spezifischen Produkts abweicht. Als **interne Kontrolle** kann eine Plasmid-DNA verwendet werden. Diese basiert auf einem klonierten Amplifikationsprodukt. Zur Herstellung des **etwa 230 bp** großen Amplifikationsproduktes für die interne Kontrolle kann ein PCR-Produkt verwendet werden, das mit folgenden Primern aus *T. gondii*-DNA amplifiziert wurde (TIC1: 5'-CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATTTCCCTCACCTCGCCTTCATCTACAGT-3'; Tox-8).
- 100 bp Längenstandard 50 ng/µl [Hersteller: z. B. STRATEC MOLECULAR]
- TBE-Puffer (siehe Sambrook, Fritsch, Maniatis. 1989. Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press)
- Agarose [Hersteller: z. B. Biochrom]
- Probenladepuffer (siehe "Loading buffers for agarose gels" in Sambrook, Fritsch, Maniatis. 1989. Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press)

Verbrauchsgegenstände

- Pipettenspitzen
- Reaktionsgefäße (0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml groß)

Geräte

- Pipetten
- Kühlblock, transportabel
- Thermocycler

Durchführung

Eine elektronische Protokollvorlage wird für jeden Reaktionsansatz um den Eintrag der Probenanzahl, des Templatevolumens sowie der Probenbezeichnung ergänzt und dient als individuelle Arbeitsanweisung. Folgende Endkonzentrationen sollten in dem Reaktionsansatz vorliegen:

- BSA 20 µg/ml
- PCR-Pufferstammlösung, 1 x
- MgCl₂ 1,5 mM
- Primer 0,5 µM
- dNTP-Mischung, 250 µM je Desoxyribonukleosidtriphosphat
- interne Kontrolle in geeigneter Konzentration
- Taq-Polymerase 1 U/25 µl

Bei jeder PCR sind jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitzuführen; dabei handelt es sich bei der Positivkontrolle um *T. gondii*-DNA (100 ng/ml; Stamm RH; DNA aus einer infizierten Zellkultur gewonnener Tachyzoiten) und bei der Negativkontrolle um DNase/RNase freies Wasser.

Einzelreagenzien des PCR Testkits (außer *Taq* Polymerase) werden bei Raumtemperatur aufgetaut und vor Gebrauch gemischt.

0,2-ml-Reaktionsgefäße werden beschriftet und im Kühlblock gekühlt.

Erstellen des Mastermix:

- **Einzelreagenzien** werden in einem entsprechenden Reaktionsgefäß (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml; im Kühlblock), gemäß des erstellten Protokolls vereint. Die *Taq* Polymerase wird dem Mastermix zuletzt zugegeben.
- Dem **Mastermix** wird die interne Kontrolle an einem separaten Arbeitsplatz (getrennt von der Herstellung des Mastermix) zugegeben. Nach gründlichem Durchmischen durch Auf- und Abpipettieren wird der Mastermix, je nach Protokoll auf die vorbereiteten 0,2 ml Reaktionsgefäße verteilt. Eine Luftblasenbildung ist zu vermeiden.
- Anschließend wird die **Proben-DNA** den einzelnen Reaktionsgefäßen (Volumen dem Protokoll entsprechend) zugesetzt. Eine Luftblasenbildung ist zu vermeiden.
- Die Reaktionsgefäße werden im Thermocycler entsprechend der festgelegten Reaktionsbedingungen inkubiert.
- **Reaktionsbedingungen im Thermocycler**
 - Initialdenaturierung 94 °C 1 min
 - 35 Zyklen
 - Denaturierung 94 °C 1 min
 - Annealing 60 °C 1 min
 - Elongation 72 °C 1 min
 - Finale Elongation 72 °C 10 min

Toxoplasma gondii

Die Reaktionsgefäße werden dem Thermocycler entnommen und bis zur Auswertung im Agarosegel bei 4 bis 8 °C gelagert.

Auswertung

- **Agarosegelelektrophoresebedingungen:** Die Auswertung der Amplifikate erfolgt in einem 1,5%igen Agarosegel mit 0,5 x TBE Puffer. Dabei werden 5 µl Amplifikat mit 1 µl Probenladepuffer (Bromphenolblau ohne Xylencyanol) gemischt und in die Vertiefungen des Gels pipettiert.
- **Laufbedingungen:** Bei einer angelegten Spannung von 80 bis 120 Volt erfolgt die horizontale Auftrennung der amplifizierten DNS für ca. 45 bis 60 min (spannungsabhängig).
- Die **Fragmentgröße der Amplifikationsprodukte** wird mit Hilfe des mitgeführten 100-bp-Längenstandards ermittelt.
- Die **Dokumentation** des PCR-Resultats erfolgt durch elektronische Aufzeichnung (Fotografie) des durch UV-Licht beleuchteten Gels (mittels Transilluminator und Digitalkamera), durch Anheften/Kopie der Fotografie ans/ins Protokoll und durch Beschriftung der Fotografie analog der im Protokoll verwendeten Probenbezeichnungen.
- **Beurteilung** einzelner Reaktionen: Eine Probe ist dann positiv, wenn die Größe des während der Amplifikation entstandenen Produkts mit der des für die Positivkontrolle ermittelten Amplifikats (ca. 450 bp) übereinstimmt. Sind die Größen unterschiedlich oder gibt es keine sichtbaren Banden, ist die Probe negativ.

Anhang 3 – Laboranweisung zur Gewinnung von DNA aus Fleischfresser-Kotproben

Prinzip

Die nach Sedimentation- und Flotation mittels hochkonzentrierter Zuckerlösung gewonnenen Oozysten werden zunächst mit Natriumhypochlorid behandelt, um die äußerste Schicht der Oozysten zu entfernen. In dem folgenden Schritt werden die Zystenwände und die darin enthaltenen Inhalte (z. B. Sporozoit, Sporoblasten) mit Hilfe von Proteinase K verdaut und gelöst. Die darin enthaltene DNA wird durch Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktionen gereinigt und schließlich mittels Ethanol gefällt.

Material

Reagenzien

- PBS: 300 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM NaH₂PO₄
- Natriumhypochlorit, wässrige Lösung, ≥ 4 % als aktive Chloridionen (z. B. Sigma-Aldrich 23,930-5)
- OOC-Lyse-Puffer (pH 9,5): 600 mM EDTA, 1,3 % (v/v) N-lauroylsarcosine, 2 mg/ml Proteinase K
- OOC-CTAB-Puffer: 2 % (w/v) Cetyl-trimethyl-ammonium-bromid, 1,4 M NaCl, 0,2 % (v/v) Mercapthoethanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan
- Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) (z. B. Sigma P3803)
- 4 M NaCl
- 96 % (v/v) Ethanol
- 70 % (v/v) Ethanol

Verbrauchsgegenstände

- 15 ml Zentrifugenröhrchen, spitz zulaufend
- Gestopfte Pasteurpipetten
- Reaktionsgefäße (1,5 ml)
- Pipettenspitzen

Geräte

- Zentrifuge
- Wasserbad, 37 °C
- Abzug

Toxoplasma gondii

Durchführung

- Oozysten 4-mal durch Zentrifugieren/Aufschütteln in 15 ml PBS waschen (1100 x g, 7 min, ohne Verwendung einer Bremse) in 15 ml PBS.
- Inkubation des Oozystenpellets und der Kontaminanten (bis zu 0,5 ml) in 2 ml Natriumhypochlorit (30 min, 37 °C).
- Anschließend Zugabe von bis zu 15 ml H₂O und Zentrifugation (7 min, 1100 x g, ohne Bremse).
- Aufnahme des Pellets mit PBS und Waschen durch 3-maliges Zentrifugieren/Aufschütteln in 15 ml PBS (7 min, 1100 x g, ohne Bremse).
- Nach einer letzten Zentrifugation wird das Pellet in 1 ml PBS aufgelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gefüllt.
- Oozysten durch Zentrifugieren pelletieren (7 min, 1100 x g, ohne Bremse).
- Sorgfältig möglichst viel an Überstand entfernen und drei Einfrieren-Auftauen-Zyklen anwenden: Einfrieren -20 °C (10 min), Auftauen Raumtemperatur (2 min).
- Das Pellet in 100 µl OOC Lysispuffer aufnehmen und inkubieren (45 min, 65 °C).
- 400 µl OOC-CTAB-Puffer zugeben (60 min, 60 °C).
- 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) zugeben, extrahieren (50 x wenden) und anschließend zentrifugieren (7 min, 13.000 x g).
- Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß füllen und erneut mit 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) extrahieren (50 x wenden). Anschließend zentrifugieren (7 min, 13.000 x g).
- Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß füllen; die DNA durch Zugabe von 0,04 Volumen einer 4 M NaCl-Lösung und 2 - 3 Volumen einer -20 °C kalten 96%igen (v/v) Ethanol/Wasser fällen (nach Zugabe der Fällungslösungen wenigstens 20 - 30 min bei -20 °C inkubieren).
- 15 min mit 13.000 x g zentrifugieren. Anschließend Überstand abgießen.
- Waschen des DNA-Pellets mit 70 % (v/v) Ethanol/Wasser und zentrifugieren für 15 min bei 13.000 x g.
- Verwerfen des Ethanolüberstandes und Lufttrocknen des DNA-Pellets.
- Auflösen der DNA in doppelt destilliertem Wasser für wenigstens 12 Stunden bei 4 °C.
- Verwendung von 2,5 - 10 µl der gelösten DNA für die PCR.

Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Südufer 10, D-17493 Greifswald - Insel Riems, www.fli.de