Zeitschrift: Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires

Herausgeber: Gesellschaft Schweizer Tierärztinnen und Tierärzte

Band: 138 (1996)

Heft: 3

Artikel: PCR zum Nachweis und zur Charakterisierung von Parasiten (Leishmania, Echinococcus, Microsporidia, Giardia)

Autor: Mathis, A. / Deplazes, P. / Köhler, P.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-590530

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 25.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Institut für Parasitologie der Universität Zürich

PCR zum Nachweis und zur Charakterisierung von Parasiten *(Leishmania, Echinococcus, Microsporidia, Giardia)*

A. Mathis, P. Deplazes, P. Köhler, J. Eckert

Zusammenfassung

Die Anwendung der PCR wird an vier Beispielen zur Diagnostik und Charakterisierung von Parasiten diskutiert. (1) Mit einer von uns evaluierten PCR lassen sich Leishmanien in Lymphknoten- bzw. Knochenmarkspunktaten mit ausgezeichneter Sensitivität nachweisen, die jener des kulturellen Nachweises entspricht. (2) Im Prinzip lassen sich einzelne Eier von *Echinococcus multilocularis* («gefährlicher Fuchsbandwurm») mit der PCR nachweisen und identifizieren, doch ist wegen PCR-Hemmstoffen in Fuchslosungen eine aufwendige Probenaufarbeitung notwendig. (3) Die Charakterisierung von Sporen von *Encephalitozoon*-ähnlichen Microsporidien aus Kaninchen, Farmfüchsen und Menschen durch Analyse des amplifizierten SSU rRNA-Gens lieferte erstmals die Bestätigung, dass *E. cuniculi*-Isolate aus Menschen und Tieren nicht unterscheidbar sind und Bedeutung als opportunistische Parasiten bei HIV-infizierten Patienten haben. (4) *Giardia*-Isolate, die aus Menschen, Kälbern, Schafen und einem Hund in der Schweiz gewonnen wurden, konnten durch die Analyse der amplifizierten Gene, die für varianten-spezifische Oberflächenproteine des Parasiten kodieren, in drei verschiedene genetische Gruppen eingeteilt werden. Dabei wurden keine Anhaltspunkte für das Vorhandensein einer Wirtsspezifität dieser Genotypen gefunden.

Schlüsselwörter: **PCR – Diagnose – Charakterisierung – Parasiten – Hemmung**

PCR for detection and characterisation of parasites *(Leishmania, Echinococcus, Microsporidia, Giardia)*

The application of PCR for the diagnosis and the characterisation of parasites is discussed using four examples. (1) A PCR assay that was developed for the detection of *Leishmania* was shown to be as highly sensitive as in vitro cultivation of the parasites from lymph node aspirates and bone marrow biopsies. (2) Single eggs of *Echinococcus multilocularis* can principally be detected and identified by PCR. However, a cumbersome sample preparation is inevitable in order to remove PCR-inhibitory substances present in fox faeces. (3) Analysis of the amplified SSU rRNA gene of *Encephalitozoon*-like isolates from humans, rabbits and farm foxes confirmed for the first time that *E. cuniculi*-isolates from humans and animals are indistinguishable and that they are of importance as opportunistic parasites in HIV-infected patients. (4) Swiss isolates of *Giardia* originating from humans, calves, sheep and a dog could be allocated into three distinct genetic groups by analysing several PCR-amplified genes that encode for variant-specific surface proteins. There was no evidence for the presence of host-specific genotypes.

Key words: **PCR – diagnosis – characterisation – parasites – inhibition**

Allgemeine Einleitung

In der veterinärmedizinischen Parasitologie hat die PCR die Palette der Labormethoden wesentlich bereichert. Für angewandte Zwecke wird sie diagnostisch und, in stark zunehmendem Masse, als Basismethode für vergleichende genetische Untersuchungen von Parasiten eingesetzt. In der Diagnostik wurden die hohen Erwartungen an die PCR (Bruijn, 1988) allerdings bis heute nicht voll erfüllt. Wohl existieren für viele Parasiten Protokolle zu deren Nachweis mittels PCR (Persing et al., 1993), doch werden diese nur in einzelnen Fällen routinemässig eingesetzt. Ein Hauptproblem der diagnostischen PCR stellt die Probenaufarbeitung dar, u.a. weil PCR-hemmende Substanzen in diagnostischen Proben häufig vorkommen. Das ursprünglich wichtigste Problem der PCR, Kreuzverunreinigungen von Proben mit Produkten früherer Amplifikationen, wird bei uns durch die räumliche Trennung von DNA-Aufarbeitung, Amplifikation und Analyse der PCR-Fragmente vermieden; bei der diagno-

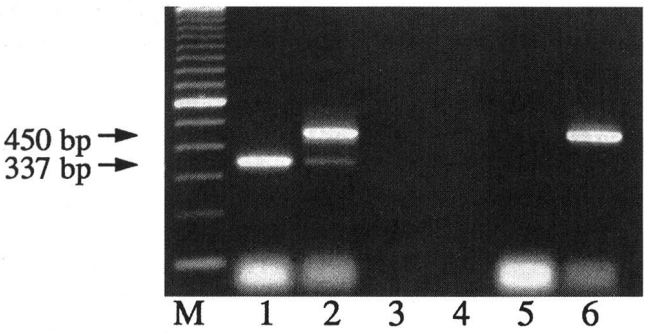

Abbildung 1: PCR zur Diagnose von Echinococcus multilocularis: *Nachweis der PCR-Produkte nach Elektrophorese im Agarose-Gel und Ethidiumbromid-Färbung. 337 bp-Fragment entspricht* Echinococcus multilocularis; *450 bp-Fragment entspricht der amplifizierten internen Kontrollsequenz.*
Eine Hemmung der PCR wird durch die verhinderte Amplifikation der in der Parallelreaktion zugesetzten internen Kontrollsequenz nachgewiesen.
M: 100 bp Marker; 1: Probe Nr. 1 (positiv); 2: Probe Nr. 1 mit zugesetzter interner Kontrollsequenz; 3: Probe Nr. 2 (nicht interpretierbar); 4: Probe Nr. 2 mit zugesetzter interner Kontrollsequenz (Hemmung); 5: Negativkontrolle ohne DNA ; 6: interne Kontrollsequenz allein.

stischen PCR verwenden wir darüber hinaus das dUTG/UNG System (enzymatisches Zerstören von Kreuzverunreinigungen). Hemmende Einflüsse von diagnostischen Proben auf die PCR werden in unseren Ansätzen durch Verwendung einer internen Kontrollzielsequenz, die in einer parallelen Reaktion amplifiziert wird, erkannt (Abb. 1).
Anhand von vier verschiedenen Fragestellungen, welche am Institut für Parasitologie in Zürich bearbeitet wurden, sollen unsere Erfahrungen mit der PCR dargestellt werden (weitere Beispiele für den Einsatz der PCR in der Parasitologie: siehe Arbeiten von Felleisen et al. in dieser Ausgabe).

Diagnostischer Nachweis von Leishmanien

Einleitung

Leishmanien sind trypanosomatide Flagellaten, die u.a. im Mittelmeerraum vorkommen und von Schmetterlingsmücken der Gattung *Phlebotomus* auf gewisse Säugetiere und auf den Menschen übertragen werden können. In der Schweiz wird Leishmaniose häufig bei Hunden nach Aufenthalten im Endemiegebiet diagnostiziert (Deplazes et al., 1992a). Diese generalisierte, oft ernst verlaufende Infektionskrankheit führt ohne Therapie in den meisten Fällen innerhalb von 2 Jahren zum Tod der Tiere. Bevor die Krankheit ausbricht, kann ein Befall mit Leishmanien jedoch jahrelang unerkannt bleiben. Im Mittelmeerraum sind Hunde die wichtigsten Reservoir-Wirte für *Leishmania infantum*, dem Erreger der humanen viszeralen Leishmaniose, einer Erkrankung, die im letzten Jahrzehnt zunehmend auch bei Aids-Patienten beobachtet wurde.
Die Diagnose einer *Leishmania*-Infektion beim Menschen und Hund wird routinemässig durch den spezifischen Antikörpernachweis gestellt. Die Serologie ist aber in bestimmten Fällen nicht zuverlässig (klinisch asymptomatische Infektionen ohne Antikörperantwort beim Hund; Hautleishmaniose des Menschen; HIV-infizierte Patienten) oder wenig aussagekräftig (Verlaufsuntersuchungen nach Chemotherapie). In diesen Fällen kann die Diagnose nach in vitro-Kultivierung der Erreger aus Lymphknoten- und Knochenmarkspunktaten gestellt werden (Deplazes et al., 1992a). Die diagnostische Kultivierung ist aber aufwendig (vor allem aus Blut), bedarf frischen Probenmaterials und versagt bei starker bakterieller Kontamination der Proben. Die Kultivierungszeit beträgt 2 bis 14 Tage (je nach Probenmaterial und Parasitendichte). Als Alternative zur diagnostischen in vitro-Kultivierung haben wir eine PCR mit dem Ziel evaluiert, eine raschere, einfache diagnostische Methode einzuführen (Mathis und Deplazes, 1995).

Material und Methoden

Zur Evaluation einer diagnostischen PCR standen Proben von Menschen (31 Hautbiopsien und von HIV-infizierten Patienten 30 Knochenmarksbiopsien und 35 Vollblut-Proben) und von Hunden (18 Lymphknotenpunktate und 13 Vollblut-Proben) mit klinischer Verdachtsdiagnose einer Leishmaniose zur Verfügung. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte durch Verdauung direkt im PCR-Puffer mit Proteinase K (bei Vollblut-Proben nach Lyse der Erythrozyten in TE-Puffer). Die PCR wurde nach Hitzeinaktivierung der Proteinase K mit Primern durchgeführt, die von der Sequenz des SSU rRNA-Gens abgeleitet wurden (van Eys et al., 1992). Zum Nachweis von Hemmung der PCR wurde eine in der Länge veränderte Zielsequenz hergestellt, die in einem parallelen Ansatz mitamplifiziert wurde (Mathis und Deplazes, 1995). Der Nachweis der amplifizierten Fragmente geschah durch Elektrophorese in 1,5%igen Agarose-Gelen. Alle Proben wurden gleichzeitig mit der von Deplazes et al. (1992b) beschriebenen diagnostischen in vitro-Kultivierung untersucht.

Resultate und Diskussion

Die Spezifität verschiedener möglicher Primer wurde zuerst theoretisch mittels Computer-gestützter Analyse durch Vergleich mit den Sequenzen in der Datenbank «GenBank» getestet. Auf diese Weise wurden die Primer 221 und 332 (van Eys et al., 1992) mit einer Spezifität für alle medizinisch wichtigen *Leishmania*-Arten abgeleitet. Experimentell konnte ein Produkt der erwarteten

Grösse mit 46 Isolaten von 9 medizinisch wichtigen Arten erhalten werden (beweist die genetische Stabilität der Zielsequenz), nicht aber mit DNA von anderen Organismen (inklusive Mensch und Hund). Bei der diagnostischen Evaluation der PCR wurde bei 70 Proben von Patienten mit klinischem Verdacht auf Leishmania-Infektion kein Produkt amplifiziert. In diesem Patientengut, bei welchem mit keiner Methode eine Leishmania-Infektion erfasst werden konnte, betrug die Spezifität 100%.
Die PCR und die in vitro-Kultivierung stimmten mit Ausnahme einer Probe (PCR falsch negativ; vermutlich wegen ungleicher Probenaufteilung) überein. Die Sensitivität des Nachweises war 100% bei Lymphknotenpunktaten von Hunden und bei Knochenmarkbiopsien von Humanpatienten. Bei 8 von 11 Proben von HIV-infizierten Patienten mit bewiesener viszeraler Leishmaniose und bei 5 von 13 Proben von Hunden mit Leishmaniose konnten die Parasiten mittels PCR aus 500 µl Blut nachgewiesen werden. Die PCR kann deshalb bei Verlaufsuntersuchungen nach Therapie bei HIV-infizierten Patienten wegen der nicht invasiven Probenentnahme dem Nachweis aus Knochenmark- und Lymphknotenpunktaten vorgezogen werden.
Zur Zeit prüfen wir, ob der Einsatz der PCR ermöglicht, die verschiedenen Leishmania-Arten und -Isolate mittels RAPD (random amplified polymorphic DNA) und SSCP (single strand conformation polymorphisms) zu unterscheiden, was die bisherigen, aufwendigen biochemischen Methoden (Isoenzymanalyse u.a.) ersetzen könnte.
Schlussfolgerungen: Diese diagnostische PCR ist praxisreif; sie zeichnet sich aus durch einfache Probenaufarbeitung, gesicherte Spezifität und Verwendung einer internen Kontrolle zum sofortigen Nachweis von falsch-negativen Ergebnissen. Sie kann deshalb die diagnostische in vitro-Kultivierung ersetzen.

Diagnostischer Nachweis von *Echinococcus multilocularis*-Eiern

Einleitung

Echinococcus multilocularis ist ein häufiger Dünndarm-Parasit von Füchsen in der Schweiz und kommt seltener auch bei Hunden und Katzen vor (Eckert et al., 1993). *Echinococcus*-Eier werden von diesen Endwirten mit dem Kot ausgeschieden und können in der Umwelt sehr lange Zeit persistieren. Nach peroraler Aufnahme der Eier durch den Zwischenwirt (im natürlichen Zyklus sind dies Kleinsäuger) können sich in dessen Leber die Larven (Metazestoden) tumorartig entwickeln. Beim Menschen (als «Fehlwirt») führt dies zur alveolären Echinokokkose (siehe auch Artikel von Felleisen et al. in dieser Ausgabe).
Die bisher sicherste Methode zur Diagnose eines intestinalen *Echinococcus*-Befalles beim Endwirt ist der Nachweis der Bandwürmer durch Darmuntersuchung nach Sektion (Eckert et al., 1991). Die Tiere müssen jedoch aus Sicherheitsgründen vorher für einige Tage bei -80 °C tiefgefroren werden, um die Eier abzutöten. *Intra vitam* ist die Diagnose schwierig, da Proglottiden unregelmässig ausgeschieden werden und die Eier morphologisch nicht von *Taenia*-Eiern zu unterscheiden sind. Alternativen zur parasitologischen Untersuchung sind der Nachweis von spezifischen Antikörpern im Blut (mit geringer Sensitivität, Gottstein et al., 1991) und der Nachweis von Parasitenantigenen im Kot (Koproantigene, Deplazes et al., 1992b). Letzterer Ansatz hat sich als vielversprechend erwiesen, weil massive Infektionen bereits in der Präpatenz (bevor Eier ausgeschieden werden) sowie auch in der Patenz erfasst werden können und die Koproantigen-Ausscheidung gut mit der Parasitenbürde korreliert. In einem kürzlich entwickelten Koproantigen-Test für *E. multilocularis* betrug die Sensitivität des Tests 96% bei Tieren, die mehr als 100 Würmer beherbergten und noch 50% bei Tieren mit einem geringen Befall von ≤ 100 *E. multilocularis* Exemplaren (Deplazes et al., 1995).
Eine genaue Identifikation von Taeniiden-Eiern ist in speziellen Fällen äusserst wichtig, zum Beispiel wenn es abzuklären gilt, ob der Kontakt von Kindern mit Fuchslosung eine Gefahr dargestellt hat. Weiter wäre eine Identifikation von einzelnen Taeniiden-Eiern aus Umweltproben wichtig, um Infektionswege für den Menschen nachzuweisen. Unser Ziel ist es, die PCR für diese Zwecke einzusetzen. Grundlage ist eine Arbeit von Bretagne et al. (1993) über ein PCR-Verfahren zum Nachweis von *E. multilocularis*-DNA aus Kot von frisch erlegten Füchsen.

Material und Methoden

Kot wurde nach der Methode von Bretagne et al. (1993) aufgearbeitet (mehrere Waschschritte in Wasser; alkalische Lyse der Eier; Phenol/Chloroform-Extraktion; DNA-Reinigung mittels Silica-Matrix [Prep-a-gene, Bio-Rad]). Die Sequenz der verwendeten Primer (abgeleitet von der flankierenden Sequenz des über 50mal pro Genom vorkommenden U1sRNA-Gens) und der für die Hybridisierung gebrauchten Sonde (Biotin-markiert) ist bei Bretagne et al. (1993) beschrieben. Die PCR wurde mit Kot von Füchsen und Hunden evaluiert. Zum Nachweis einer Hemmung der PCR wurde eine in der Länge veränderte Zielsequenz hergestellt, welche in einem parallelen Ansatz mitamplifiziert wurde (Abb. 1).

Resultate und Diskussion

Unsere ersten Erfahrungen mit dieser PCR nach Bretagne et al. (1993) zeigten, dass die sehr aufwendige DNA-Aufarbeitungsmethode nicht zuverlässig war, da sehr viele Proben die PCR hemmten. Durch zwei zusätzliche Chloroform-Extraktionen konnte diese Hemmung bei Hundekot eliminiert werden, nicht aber bei Fuchskot, bei dem auch durch weitere Aufarbeitungschritte die Hemmstoffe nicht entfernt werden konnten. Deshalb ar-

beiten wir zur Zeit daran, die Probenaufarbeitung prinzipiell zu ändern. Ein erster Ansatz dazu ist die Anreicherung der Eier mittels Sieben mit abnehmender Maschenweite und Verwendung der Fraktion im 20 µm Sieb für die DNA-Aufarbeitung (Durchmesser der Eier: 32 µm). Diese Fraktion kann zuerst mikroskopisch auf das Vorhandensein von Taeniiden-Eiern untersucht werden. Erste Ergebnisse mit dieser Methode zeigen, dass Hemmstoffe der PCR effizient entfernt werden.
Schlussfolgerungen: Der Nachweis von *E. multilocularis*-Eiern mit Hilfe der PCR wird wohl auch in Zukunft nur für spezielle Zwecke und als Bestätigungsmethode eingesetzt werden können. Für grossangelegte epidemiologische Untersuchungen von Karnivoren auf Befall mit *E. multilocularis* ist der Koproantigentest besser geeignet.

Charakterisierung von Microsporidien-Arten

Einleitung

Microsporidien sind bei Wirbellosen und Wirbeltieren weit verbreitete, sporenbildende, intrazellulär lebende Protozoen. Die Art *Encephalitozoon cuniculi* parasitiert in verschiedenen Säugetieren (Canning und Lom, 1986). *E. cuniculi,* in der Schweiz bei Kaninchen weit verbreitet, kann bei diesen Tieren zu schweren neurologischen Symptomen (Torticollis) führen.
Microsporidien haben in jüngster Zeit als opportunistische Erreger bei HIV-infizierten Patienten Bedeutung erlangt (Weber und Deplazes, 1995). Drei neue Arten wurden erst kürzlich entdeckt (*Enterocytozoon bieneusi, Encephalitozoon hellem* und *Septata intestinalis*), welche bis jetzt nur beim Menschen nachgewiesen wurden. Sporen von *E. hellem* und *S. intestinalis* sind im Mikroskop nicht von denjenigen von *E. cuniculi* aus Tieren unterscheidbar; sie müssen deshalb als «*Encephalitozoon*-ähnlich» angesehen werden. Deshalb bleiben frühere Berichte über *E. cuniculi*-Infektionen beim Menschen hinsichtlich der Artidentität unklar. Weiter ist die Entdeckung eines möglichen Tier-Reservoirwirtes der Microsporidien, die den Menschen infizieren, von grosser Bedeutung. Wir haben daher *Encephalitozoon*-ähnliche Sporen aus Mensch und Tieren isoliert, kultiviert und mittels Western Blot- und PCR-Restriktionsenzym-Analyse des SSU rRNA Genes mit Referenzisolaten verglichen (Deplazes et al. Publikation eingereicht).

Material und Methoden

Encephalitozoon-ähnliche Sporen wurden durch Zentrifugation im Percoll-Gradient aus Urin, Stuhl und Bronchoalveolar-Spülflüssigkeiten von 7 HIV-infizierten Patienten sowie von Urin, Hirn und Niere von 9 Kaninchen und von 3 Farmfüchsen (aus Norwegen) konzentriert. Die Sporen wurden in MRC 5-Zellen (menschliche embryonale Lungen-Fibroblasten) kultiviert. Sporen aus zerfallenen Zellen wurden aus der Kultur geerntet und mittels Western-Blot-Analyse (WBA) und Restriktionsenzym-Analyse (PCR-REA) des mit PCR amplifizierten, gesamten SSU rRNA Gens charakterisiert.

Resultate und Diskussion

Die in vitro-Kultivierung gelang mit allen Isolaten aus Tieren und mit 6 von 7 Isolaten aus HIV-infizierten Patienten. Von dem nicht kultivierbaren Isolat konnten genügend Sporen für die Charakterisierung direkt aus dem Stuhl gewonnen werden. Die Analyse der Isolate mit WBA und PCR-REA (Doppelspaltung mit den Restriktionsenzymen *Mbo*I und *Hpa*II) ergab übereinstimmende Resultate: Alle Isolate aus Kaninchen und aus Farmfüchsen sowie 3 Isolate aus HIV-infizierten Patienten waren nicht von einem *E. cuniculi*-Referenzisolat unterscheidbar; weitere 3 Isolate aus Menschen wurden als *E. hellem* und ein Isolat als *S. intestinalis* identifiziert. Die Bestimmung der Sequenz der SSU rRNA eines *E. cuniculi*-Isolates vom Menschen ergab eine 99,85%ige Übereinstimmung mit derjenigen eines Isolates aus Kaninchen.
Bis jetzt wurden erst wenige Microsporidien-Isolate aus Menschen und Tieren immunologisch und molekularbiologisch charakterisiert. Alle 12 morphologisch *Encephalitozoon*-ähnlichen Isolate aus Kaninchen und Farmfüchsen sowie 3 von 7 Isolaten aus Menschen wurden mit molekularen Methoden als *E. cuniculi* identifiziert. Bei diesen 15 Isolaten war keine intraspezifische Variabilität erkennbar.
Schlussfolgerungen: Diese molekularbiologischen Daten beweisen erstmals, dass *E. cuniculi*-Isolate aus Menschen und aus Tieren (Kaninchen, Farmfüchsen) übereinstimmen und bei HIV-infizierten Patienten von Bedeutung sind.

Charakterisierung von Giardia-Isolaten

Einleitung

Protozoen der Gattung *Giardia* sind weltweit verbreitete, fakultativ pathogene Darmparasiten von Wirbeltieren. Sie sind auch in der Schweiz recht häufig, u.a. bei Mensch, Hund, Katze, Rind, Schaf und Ziege. Bezüglich der Klassifizierung und Wirtsspezifität dieser Organismen bestehen noch erhebliche Unsicherheiten, und auch die Rolle von Tieren als potentielle Reservoire für *Giardia*-Infektionen des Menschen ist noch nicht definitiv gesichert. Nach Felice (1952) werden die von Haustieren und Menschen stammenden Isolate zur morphologisch definierten Gruppe von *G. duodenalis* gerechnet. Enzymelektrophoretische und molekulare Analysen haben für diese Gruppe jedoch beträchtliche genetische Unterschiede zwischen verschiedenen Isolaten ergeben. Für eine grosse Zahl von in Australien gewonnenen *Giardia*-Isolaten vom Menschen haben neuere Untersuchun-

gen eine vorläufige Einteilung in einen 4 Genotypen umfassenden Artenkomplex ergeben (Andrews et al., 1989; Ey et al., 1993). In unseren Arbeiten wurden in der Schweiz aus tierischen Wirten und Menschen gewonnene *Giardia*-Isolate mit Hilfe molekularer Techniken auf das Vorkommen wirtsspezifischer Genotypen und deren genetische Beziehung zu in anderen Ländern gewonnenen *G. duodenalis*-Isolaten untersucht (Ey et al., 1995). Dafür haben wir die für *Giardia* typischen variantenspezifischen Oberflächenproteine (VSPs) eingesetzt. Diese stellen ausgezeichnete Kandidaten für Untersuchungen zum Nachweis genetischer Unterschiede innerhalb dieser Parasitengruppe dar, da sie nur geringe Sequenzhomologien aufweisen. In unseren Untersuchungen haben wir Segmente von Genen, die für drei verschiedene VSPs kodieren, mit Hilfe der PCR-Technik amplifiziert und die Grösse und Restriktionsenzymmuster der erhaltenen Produkte zur genetischen Charakterisierung der Isolate eingesetzt.

Material und Methoden

Die verwendete genomische DNA stammte aus 9 axenisch kultivierten *Giardia*-Isolaten, die aus 4 verschiedenen Wirtstieren in verschiedenen Regionen der Schweiz gewonnen worden waren (Stranden et al., 1990). Die DNA wurde nach der von Ey et al. (1995) beschriebenen Methode isoliert. Segmente der VSP-Gene *tsp*11, *tsa*417 und *vsp*1267 wurden mit der PCR amplifiziert und mit den erhaltenen Produkten Restriktionsenzymmuster erstellt. Es wurden vier verschiedene PCR-Tests durchgeführt. Der erste diente dazu, semi-konservierte 0,52 kbp Zielsequenzen, die nahe verwandten VSP-Genen (*tsp*11 und *tsa*417) gemeinsam sind, zu amplifizieren. Die 0,52 kbp Produkte dieser Gene sind diagnostisch für Isolate der von Andrews et al. (1989) beschriebenen genetischen Gruppen I und II. Die übrigen PCR-Tests dienten dazu, die nahezu vollständigen Sequenzen der oben erwähnten drei VSP-Gene zu amplifizieren. Die experimentellen Einzelheiten zu den PCR-Tests, der Agarose-Gelelektrophorese und zur Erstellung der Restriktionsenzymmuster wurden von Ey et al. (1995) beschrieben.

Resultate und Diskussion

Neun in der Schweiz gewonnene *Giardia*-Isolate aus Menschen und 3 verschiedenen Wirtstierarten wurden mit Hilfe der PCR unter Verwendung verschiedener VSP-Gensegmente analysiert. Die Grösse und Restriktionsenzymmuster der erhaltenen PCR-Produkte erlaubte eine Einteilung der Isolate in drei verschiedene Genotypen. Die DNA aller Isolate lieferte ein für die genetischen Gruppen I und II charakteristisches 0,52 kbp PCR-Produkt. Die Ergebnisse der detaillierten Analyse an amplifizierten Fragmenten der Gene *tsp*11, *tsa*417 und *vsp*1267 sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Diese zeigt für 5 Isolate, die von einem Schaf (S1), 3 Kälbern (R1, R2, R3) und einem Hund (H1) stammten, keine Unterschiede hinsichtlich Grösse und Restriktionsenzymmustern zu PCR-Produkten, die mit denselben Methoden von aus Menschen gewonnenen Isolaten in Australien hergestellt wurden (Ey et al., 1993) und der genetischen Gruppe I angehören. Drei aus 2 Schafen (S2, S3) und einem Menschen gewonnene Isolate (M3) bildeten einen zweiten, mit der Gruppe I nahe verwandten Genotyp. Die DNA eines weiteren, aus einem Menschen stammenden Isolates (M3), ergab *vsp*1267- und *tsp*11-Fragmente, deren Grösse und Bandenmuster für Isolate der genetischen Gruppe II charakteristisch sind (Ey et al., 1993). Schlussfolgerungen: Unsere Ergebnisse bestätigen damit frühere Befunde (Andrews et al., 1989; Ey et al., 1993), dass mit Hilfe der Analyse von PCR-Produkten *Giardia*-Isolate voneinander unterschieden und bestimmten genetischen Gruppen zugeordnet werden können. Die Gemeinsamkeiten in den genetischen Eigenschaften, die sich dabei zwischen Schweizer und australischen Isolaten ergeben haben, weisen auf die weltweite Verbreitung der von Andrews et al. (1989) definierten Genotypen I und II hin. Ausserdem steht das in unserer Untersuchung nachgewiesene Fehlen einer Wirtsspezifität in Übereinstimmung mit anderen Befunden, wonach eine wechselseitige Übertragbarkeit des Parasiten zwischen Mensch und Tier möglich ist.

Tabelle 1: Einteilung von 9 Schweizer G. duodenalis-*Isolaten in drei nahe verwandte genetische Gruppen mit Hilfe der Analyse von VSP-Genen*

		PCR-Produkte von drei VSP-Genen (kbp)		
Gruppe	Isolat[b]	*tsp*11	*tsa*417	*vsp*1267
I[a]	S1, R1, R2, R3, H1	1.8[c]	1.9	1.8[f]
Neu	S2, S3, M3	1.8[d]	1.9	keine
II[a]	M2	1.8[e]	1.9	1.6[g]

[a] Von den von Andrews et al.(1989) definierten genetischen Gruppen I und II nicht zu unterscheiden (Ey et al., 1993).
[b] H = Isolat vom Hund, M = Isolat vom Menschen, R = Isolat vom Rind, S = Isolat vom Schaf.
[c-g] Unterschiedliche Restriktionsenzym-Muster.

Literatur

Andrews R.H., Adams M., Boreham P.F.L., Mayrhofer G., Meloni B.P. (1989): *Giardia intestinalis:* Electrophoretic evidence for a species complex. Int. J. Parasitol. *19*, 183–190.

Bretagne S., Guillou J.P., Morand M., Houin R. (1993): Detection of *Echinococcus multilocularis* DNA in fox faeces using DNA amplification. Parasitology *106*, 193–199.

Bruijn M.H.L. (1988): Diagnostic DNA amplification: No respite for the elusive parasite. Parasitology Today. *4*, 293–295.

Canning E. U., Lom J. (1986): The microsporidia of vertebrates. Academic Press, London. 289 pp.

Deplazes P., Alther P., Mathis A., Skaggs J., Eckert J. (1995): Coproantigen detection for diagnosis of *Echinococcus multilocularis* in foxes. Proc.15th Int. Conf. World Assoc. Adv. Vet. Parasitol., August 30.–September 2., Yokohama, Japan (im Druck)

Deplazes P., Arnold P., Skaggs J.,Gessler, M. (1992a): Parasitologische und immunologische Verlaufskontrollen während und nach Chemotherapie der Leishmaniose des Hundes. Schweiz. Arch. Tierheilk. *134*, 85-93.

Deplazes P., Gottstein B., Eckert J., Jenkins D.J., Ewald D. Jimenez-Palacios S. (1992b): Detection of *Echinococcus coproantigens* by enzyme-linked immunosorbent assay in dogs, dingoes and foxes. Parasitol. Res. *78*, 303-308.

Eckert J., Deplazes P. (1995): Methods for surveys on Echinococcus *multilocularis* infections in final hosts. Proc. 15th Int. Conf. World Assoc. Adv. Vet. Parasitol., August 30.-September 2., Yokohama, Japan (im Druck).

Eckert J., Ewald D., Siegenthaler M., Brossard M., Zanoni R.G., Kappeler A. (1993): Der «Kleine Fuchsbandwurm» (*Echinococcus multilocularis*) in der Schweiz: Epidemiologische Situation bei Füchsen und Bedeutung für den Menschen. Bull. BAG *25*, 468-476.

Eckert J., Deplazes P., Ewald D., Gottstein B. (1991): Parasitologische und immunologische Methoden zum Nachweis von *Echinococcus multilocularis* bei Füchsen. Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. *13*, 25-30.

Ey P.L., Bruderer T., Wehrli C., Köhler P. (1995): Comparison of genetic groups determined by molecular and immunological analyses of *Giardia* isolated from animals and man in Switzerland and Australia. Parasitol. Res. (in press).

Ey P.L., Darby J.M., Andrews R.H., Mayrhofer G. (1993): *Giardia intestinalis:* detection of major genotypes by restriction analysis of gene amplification products. Int. J. Parasitol. *23*, 591.

Felice F.P. (1952): Studies on the cytology and life history pf a *Giardia* from the laboratory rat. Univ. Publ. Zool. 57, 53-146.

Gottstein B., Deplazes P., Eckert J., Müller B., Schott E., Helle O., Boujon P., Wolff K., Wandeler A., Schwiete U., Moegle H. (1991): Serological (Em2-ELISA) and parasitological examinations of fox populations for *Echinococcus multilocularis* infections. J. Vet. Med.B., *38*, 161-168.

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.

Persing D.H., Smith T.F., Tenover F.C., White T.J. (eds.) (1993): Diagnostic molecular microbiology, principles and applications. ASM Washington D.C. 641 pp.

Stranden A.M., Eckert J., Köhler, P. (1990): Electrophoretic characterization of *Giardia* isolated from humans, cattle, sheep, and a dog in Switzerland. J. Parasitol. *76*, 660-668.

van Eys G.J.J.M., Schoone G.J., Kroon N.C.M., Ebeling S.B. (1992): Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. Mol. Biochem. Parasitol. *51*, 133-142.

Weber R., Deplazes P. (1995): Neue parasitäre Erkrankungen beim Menschen: Infektionen durch Mikrosporidien und *Cyclospora* species. Schweiz. Med. Wochenschr. *125*, 909-923.

Dank

Die *Giardia*- und Microsporidien-Arbeiten wurden durch den Schweizerischen Nationalfonds (Nr. 31-36198.92 und Nr. 32-37399.93) unterstützt.

Korrespondenzadresse: Dr. Alexander Mathis, Institut für Parasitologie, Winterthurerstr. 266a, CH-8057 Zürich