©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Mitt. Österr. Ges.
Tropenmed. Parasitol. 21 (1999)
45 - 50

Klinisches Institut für Hygiene (Vorstand: Univ.-Prof. Dr. M. Rotter) der Universität Wien

Nachweis und Identifikation von Kryptosporidien in Kot-, Stuhl- und Umweltproben – Entwicklung einer Modultechnik

A. Haßl, I. Vorbeck-Meister, R. Sommer, M. Rotter

Einleitung

Kryptosporidien sind vermutlich ubiquitär vorkommende, einzellige Darmparasiten von Wirbeltieren, die in immungeschwächten Individuen schwere, teilweise lebensbedrohende Diarrhoen verursachen können. War die Kryptosporidiose noch vor 10 Jahren bei 8-12% der mitteleuropäischen HIV-positiven Personen eine gefürchtete Komplikation des AIDS (2), zeigte sich in den letzten Jahren, dass auch immunkompetente Personen während kurzer Episoden von selbstlimitierenden Durchfällen Kryptosporidien ausscheiden können. Ein Reservoir für diese Parasiten stellen Wild- und Haustiere dar. Besonderes Augenmerk verdienen in diesem Zusammenhang „exotische" Streicheltiere wie Eidechsen, Schildkröten und Schlangen sowie deren Futtertiere, meist Mäuse, da diese Tiere manchmal in engem körperlichen Kontakt mit den Terrarianern leben und das Risiko eines kreuzweisen Keimausstauschs bisher unbekannt ist. Dies liegt im Falle der Kryptosporidiose unter anderem auch daran, dass die Gattung *Cryptosporidium* aus einer noch nicht sicher bekannten Anzahl von schwer differenzierbaren Arten besteht, die sich in der Strenge ihrer Wirtsspezifität und ihrem Wirtsspektrum unterscheiden (15). Daher sind auch die jeweiligen Hauptinfektionswege bisher immer noch nicht vollständig geklärt. Die Nutztier-pathogene und auch immunkompetente Menschen infizierende Form *Cryptospridium (C.) parvum* „calf" scheint hauptsächlich durch fäkal verunreinigtes Trink- und Badewasser übertragen zu werden, wohingegen *C. parvum* „human", der Erreger der AIDS-assoziierten, lebensbedrohenden Kryptosporidiose, direkt von Mensch zu Mensch übertragen wird.

Die unübersichtliche Situation in der Laboratoriumsdiagnostik von Kryptosporidien-Vorkommen, die Vielfalt an unterschiedlichen Verfahren und die Problematik eines Parasiten-Nachweises in Wässern haben uns bewogen, ein Verfahrensschema zu entwickeln, das die unterschiedlichen Formen der Gewinnung und Aufarbeitung von Proben berücksichtigt, aber mit vergleichbaren oder gleichen Detektionstechniken („downstream") arbeiteten. Dabei wurde besonderer Wert auf den Aufbau eines modularen Systems gelegt, das eine spätere Optimierung der einzelnen Komponenten zulässt und gleichzeitig offen ist für kommende Aufgabenstellungen (z. B. Feststellung der Infektiosität).

Methoden

Ziel der Arbeit war es, das Untersuchungsschema aus etablierten, in der Literatur gut dokumentierten oder von uns früher entwickelten und überprüften Einzelverfahren modular zusammenzusetzen. Folgende Module (Mx) erwiesen sich dafür als geeignet (die Abkürzungen entsprechen den in Abb. 1 verwendeten):

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

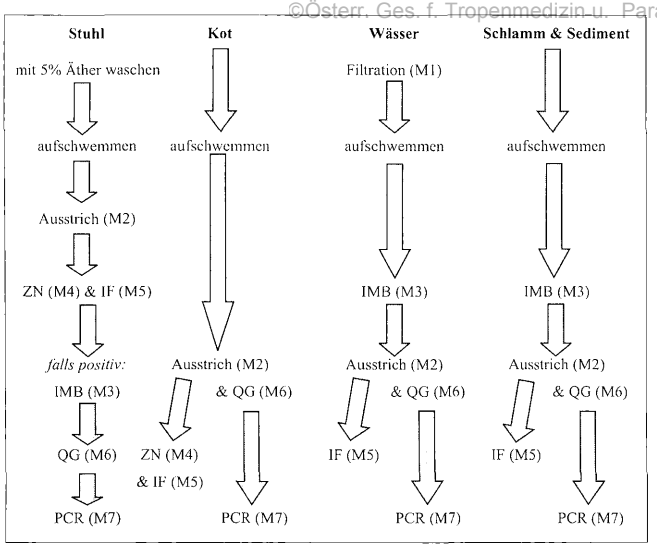

Abbildung 1:

Diagramm der Abfolge von Untersuchungen (flow chart) zum Nachweis von Kryptosporidien in unterschiedlichen Materialien.

Abkürzungen:

Mx: Modul x
IMB: Isolierung durch Immunmagnetobeads
QG: DNS-Isolierung durch Affinitätschromatographie
ZN: modifizierte Ziehl-Neelsen Färbung
IF: Immunofluoreszenzfärbung
PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion

Modul 1:
Wasserproben: 100-1000 Liter Wasser werden über Filtrationskartuschen (Envirochek, Pall GelmanSciences, Ann Arbor, MN, USA), nominale Porenweite 1 µm, oder über Membranfilter gefiltert und das Konzentrat nach den Angaben des Herstellers aus den Kartuschen ausgewaschen.

Modul 2:
Feste Proben: Das Untersuchungsmaterial wird in dünner, durchscheinender Schicht auf Maskenglasobjektträger aufgebracht, getrocknet und 5 min in Methanol fixiert.

Modul 3:
IMB: Isolierung der Kryptosporidien-Oozysten mittels magnetischer Separation durch an spezifische Antikörper gebundene Eisenpartikel (Immunobeats) nach Angaben des Herstellers (DYNAL G-C Combo Kit; DYNAL GmbH; Hamburg, D).

Modul 4:
ZN: Unspezifische Färbung aller Kryptosporidien-Arten durch eine modifizierte Ziehl-Neelsen Färbung.

Modul 5:
IF: Direkte Immunfluoreszenzfärbung von Kryptosporidien durch Fluoreszenz-markierte monoklonale Antikörper nach Angaben des Herstellers (Merifluor, Meridian Diagnostics, Inc. Cincinnati, OH, USA).

Modul 6:
QG: Die Isolierung der genomischen DNS aus den Zellen des Probenmaterials erfolgte mittels Adsorptionsreinigung (QIAamp Tissue Kit bzw. QIAamp Blood Kit, QIAGEN GmbH, Hilden, D).

Modul 7:
PCR: Die von uns verwendete Technik ist eine „single step" Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zum Nachweis des Gens für den internal transcribed spacer 1 (ITS1) der 18S ribosomalen RNA-Untereinheit, in der Annealing-Temperatur verändert gegenüber der Literaturangabe (10), nämlich um zwei Grad erhöht um eine spezifischere Primer-Bindung zu erreichen. Die Sequenzen der beiden Primer können aus dem Anhang abgeleitet werden. Die Detektion der Amplifikate erfolgte mittels Flachbett-Gelelektrophorese und Silber-Färbung (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Wien, Österreich). Der Nachweis von PCR-Hemmern im Untersuchungsmaterial erfolgte durch eine kompetitive PCR, d. h. einer PCR mit spezifischer DNS (Positivkontrolle) und Untersuchungsmaterial.

Bisher wurden 450 Kotproben von Reptilien, 120 Stuhlproben, 4 Trinkwasserproben und 6 Sediment-, Oberflächen- und Abwasserproben nach dem beschriebenen Schema getestet, zudem 105 Trinkwasserproben.

Ergebnisse

Es konnte ein Verfahrensschema erarbeitet werden, das ausgehend von der Art des Probenmaterials von unterschiedlichen Aufarbeitungstechniken zu einheitlichen Identifizierungstechniken führt und an seinem Ende Raum für Erweiterungen in Form zusätzlicher Tests lässt. Das Schema ist in Abbildung 1 dargestellt. Die Unterscheidung der einzelnen Kryptosporidien-Arten kann im dargestellten Verfahren nur auf Grund der Länge des Amplifikats erfolgen, soll aber bald durch ein weiteres Modul, eine Sequenzierung des variablen Amplifikatbereichs (siehe Anhang) ersetzt werden. Die Längen und die wahrscheinlichsten Sequenzen der Amplifikate aus unseren Proben können aus dem Anhang entnommen werden. Ein Beispiel für den erfolgreichen Nachweis von verschiedenen Kryptosporidienarten in unserer Amplifikationstechnik ist in Abbildung 2 dargestellt.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

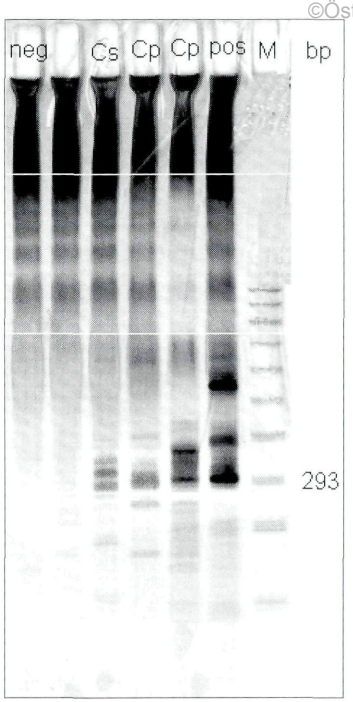

Abbildung 2:

DNS-Elektrophorese des PCR-Amplifikats.

Abkürzungen:

M: Grössenmarker
bp: Basenpaare
pos/neg: positive bzw. negative Kontrolle
C.p.: *Cryptosporidium parvum*
C.s.: *Cryptosporidium serpentis*

Diskussion

Der Nachweis von Kryptosporidien in verschiedenen Arten von Untersuchungsmaterial gestaltet sich deshalb schwierig, weil divergierende Fragestellungen zugrunde liegen: Bei der Untersuchung von Wässern sollen geringe Mengen an Parasiten in sehr großen Probenvolumina erkannt werden, die Lebensfähigkeit und Infektiosität kann aber sinnvollerweise nur von Parasitenpopulationen ermittelt werden, und das Gesundheitsrisiko für Mensch und Tier hängt von der Kryptosporidienspezies ab. Diese unterschiedlichen Fragestellungen konnten bisher nur mit einem erheblichen organisatorischen und materiellen Aufwand getrennt bearbeitet werden. Durch eine Straffung und Aufwandsoptimierung des Nachweis-Prozedere und die durch eine Verbindung von bekannten und gut charakterisierten Verfahren konnten wir ein für zukünftig autretende Fragestellungen offenenes Nachweisschema im Modulsystem erarbeiten.

Die Gattung Cryptosporidium ist ein Multi-Spezies Komplex aus derzeit acht anerkannten Arten, *C. parvum* (Formen: „calf" und „human"), *C. meleagridis, C. wrairi, C. serpentis, C. bailey, C. felis, C. nasorum, C. muris,* und möglicherweise einer weiteren, noch nicht anerkannten Art: *C. saurophilum.* Die vogelspezifischen und genetisch entfernteren Arten *C. meleagridis* und *C. bailey* werden von uns nicht bearbeitet, weil der Artstatus durch neuere Ergebnisse von Sequenzierungen wieder unsicher zu sein scheint (3). Als Modell für eine mit größter Wahrscheinlichkeit nicht humanpathogene Kryptosporidien-Art wurde von uns *C. serpentis* ausgewählt. Der Grund hierfür war, dass diese Art einerseits aus dem Kot von kranken Terrarientieren, insbesondere von Schlangen, in nutzbaren Mengen verfügbar ist, andererseits durch das regelmäßige Auftreten von Vermischungen mit *C. parvum* und *C. muris* eine besondere diagnostische Hürde darstellt. Zudem führt der Mangel an kommerziell verfügbaren Testreagenzien (6) für diese immunologisch und antigenetisch abseits stehende Kryptosporidien-Art (5) zur Entwicklung von Testrezepturen, insbesondere von PCR-Protokollen, die dann bei Fragestellungen hinsichtlich des Nachweises aller anderen Kryptosporidien-Arten anwendbar sind.

Die Auswahlkriterien für die Zusammenstellung der Testverfahren in unserem Schema waren die Möglichkeit der Vereinheitlichung der „downstream"-Techniken und der Erhalt maximaler Ungebundenheit für eine spätere Integration neuer diagnostischer Techniken. Daher wurde eine Genus-spezifische PCR als Basis-Nachweisverfahren etabliert, diese hat als unterste Detektionsgrenze das Genom von 1-10 Oozysten pro Ansatz (7), d. h. es müssen ungefähr 10-20 DNS-Vorlagen vorhanden sein. Eine Absenkung der Detektionsgrenze könnte durch die Nutzung replikativer Sequenzen im Genom von Kryptosporidien erreicht werden – analog zur Nutzung des B1-Gens bei *Toxoplasma gondii.* Solche Sequenzen sind uns aber bislang nicht bekannt. Die Optimierung der gentechnologischen Detektion muß daher über die Primer und/oder die Einführung einer Multiplex-PCR (Verminderung der benötigten Menge an Ziel-DNS durch gleichzeitige Nutzung) erfolgen (13). Eine Erhöhung der Amplifikat-Ausbeute in unserer PCR steht nicht an vordringlicher Stelle, da bei dem von uns als Standardtest verwendetem Protokoll mit 36 Zyklen aus einer Vorlage theoretisch 68,7 Milliarden Kopien des Genstückes hergestellt werden (4), genug Material für die elektrophoretische Detektion und auch für eine zukünftige, routinemässige Sequenzierung des Amplifikats. Eine Berechnung der Sensitivitäten und Spezifitäten der einzelnen Nachweisverfahren ist auf Grund der Testcharakteristika nicht möglich, die Nachweisverfahren ergänzen einander, können sich aber nicht ersetzen.

Studien über die Spezifität und Sensitivität von Färbungen im Vergleich mit der PCR haben Morgan et al. durchgeführt (11). Diese Studien erscheinen aber wegen der morphologischen Ununterscheidbarkeit der meisten Kryptosporidien-Arten und der Schwierigkeiten bei der Aufarbeitung von diagnostischem Material als fragwürdig. Besonders der hohe Fettanteil von Stuhl und das nicht seltene Auftreten von „PCR-Hemmern" machen menschliche Fäkalien zu einem relativ schlechten Substrat für gentechnologische Detektionsverfahren (16), während Kot von pflanzenfressenden Tieren gut aufschließbar ist (9). Diese Schwierigkeiten im Erarbeiten eines einheitlichen Protokolls zum DNS-Aufschluß aus Untersuchungsmaterial von mit unterschiedlichem Material kontaminier-

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at
ten Wasserproben spiegeln sich auch in der Literatur wieder (8). Nach unseren Erfahrungen dürfen Wasserproben nicht in der unspezifischen, weil alle Kryptosporidien-Arten detektierenden modifizierten Ziehl-Neelsen Färbung beurteilt werden, da Süßwasseralgen der Gattung Oozystis in dieser Färbung nicht von Kryptosporidien unterschieden werden können.

Als zukünftige Entwicklungen zeichnen sich ab, dass einerseits das amplifizierte DNS-Stück zum Zwecke der Art- und Formenbestimmung routinemäßig sequenziert wird. Allerdings unterscheiden sich die in verschiedenen Datenbanken publizierten Sequenzen teilweise so erheblich, dass nur eine Artdiagnose der größten Wahrscheinlichkeit erstellt werden kann. Andererseits wird es zu einer Infektiositäts- bzw. Lebensfähigkeitsüberprüfung von aus Wässern isolierten Kryptosporidien-Oozysten kommen. Diese Überprüfung erfolgt am einfachsten mittels Aufbringens der Kryptosporidien auf einen Wirtszellmonolayer und des Prüfens der Eindringfähigkeit der Parasiten. Solche in-vitro Verfahren kombiniert mit gentechnologischen Detektionsverfahren wurden bereits beschrieben (12, 14), haben sich jedoch bisher wegen ihrer Komplexität und ihres Aufwandes nicht allgemein durchsetzen können.

Zusammenfassung

Der Laboratoriumsnachweis von Kryptosporidien stellt je nach der Art der untersuchten Probe und/oder der Fragestellung grundlegend verschiedene Ansprüche an das diagnostische Verfahren und die Interpretation der erhaltenen Testergebnisse. Es wurde daher versucht, die „downstream" Technik der Detektion dieser ubiquitären Parasiten zu vereinheitlichen und die Probengewinnungs- und Aufarbeitungsverfahren für ein gentechnologisches Nachweisverfahren zu optimieren, um einerseits geringe Parasitenmengen zu detektieren und andererseits alle bisher bekannten Kryptosporidien-Arten sicher zu unterscheiden. Ein Verfahrensschema basierend auf modulär angeordneten, unabhängigen Bearbeitungsschritten zum Nachweis aller Kryptosporidienspezies aus unterschiedlichen Untersuchungsmaterialien wurde entwickelt und in der Praxis überprüft.

Schlüsselwörter

Cryptosporidium parvum, C. serpentis, Polymerase-Ketten-Reaktion, diagnostisches Verfahrensschema, ITS1-Sequenz.

Summary

Detection and identification of Cryptosporidia in faeces, stool and environmental samples

Laboratory techniques for the detection of *Cryptosporidia* and the interpretation of diagnostic tests differ essentially depending on the nature of samples and/or on the problems raised. We tried to standardize the downstream detection techniques for this ubiquiteous parasite and to optimize the sample preparation methods for the application of a sensitive and complete genetic engineering technique. A procedure was developed for the detection of all Cryptosporidium species in different sample materials based on modular arranged, independent processing steps and tested for its usability in pratice.

Key words

Cryptosporidium parvum, C. serpentis, polymerase chain reaction, diagnostic procedure, ITS1-sequence.

Danksagung

Die Autoren danken Frau Ilse Veits für die ausgezeichnete technische Arbeit und ihr Engagement.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Anhang

Darstellung der am besten passenden Sequenzen und der wahrscheinlichsten Längen des von uns amplifizierten DNS-Stücks von *Cryptosporidium sp.* (C.). Gen: Internal transcribed spacer 1 (ITS1) der 18S ribosomalen RNA. Datenbankabfrage nach (1), Datenbanken: GenBank + EMBL + DDBJ + PDB.

Unterstrichen: Primersequenzen
Fett: variable Region mit der Potenz zur Art- und Formerkennung.

C. p. calf: AGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCCTAACGGTCTTGTAATTGGA
C. p. human: AGTGACAAGAAATAACAATACAGGACTTTTT GGTTTTGTAATTGGA
C. muris: AGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCCTAACGGTCTTGTAATTGGA
C. serpentis: AGTGACAAGAAATAACAATACAGGGCCTAACGGTCTTGTAATTGGA

ATGAGTGAAGTATAAACCCCTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC
ATGAGTTAAGTATAAACCCCTTTACAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC
ATGAGTGAAGTATAAACCCCTTTACGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC
ATGAGTGAAGTATAAACCCCTTTACAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC

AGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAA
AGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAA
AGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAA
AGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAA

AAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATAACCTG**TAATATTACTAAGGTATATATA**
AAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTAATAATTTATA**TAAAATATTTTGATGAATATT**
AAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATAATTTA**TAATATTACCAAGGTAATTATT**
AAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTTGTATTTTTA**TAATATTATTAAGGTAATATTTA**

AATATAATCAACATCCTTCCTATTATATTTCTAAATATATAGGAAACTTTACTT
TATATAATATTAACATAATTCATATTACTATTTTTTAGTATATGAAATTTTACT
ATATTATCAACATCCTTCCTATTATATTCTAAATATATAGGAAATTTTACTTTG
TAATATCAACATCCTTCCTATTATATTTTTAATATATAGGAAATTTTACTTTGA

TGAGAAAATTAGAGTGCTTAAAGCAGG 292 bp
TTGAGAAAATTAGAGTGCTTAAAGCAGG 293 bp
AGAAAATTAGAGTGCTTAAAGCAGG 290 bp
GAAAATTAGAGTGCTTAAAGCAGG 289 bp

Literatur

1. ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402.
2. ASPÖCK, H., HASSL, A. (1990): Parasitic infections in HIV patients in Austria: First results of a long-term study. Zbl. Bakt. Hyg. 272, 540-546.
3. CHAMPLIAUD, D.; GOBET, P.; NACIRI, M.; VAGNER, O.; LOPEZ, J.; BUISSON, J.C.; VARGA, I.; HARLY, G.; MANCASSOLA, R.; BONNIN, A (1998): Failure to differentiate Cryptosporidium parvum from C. meleagridis based on PCR amplification of eight DNA sequences. Applied and Environmental Microbiology 64 (4), 1454-1458.
4. DIMITROV, D. S., APOSTOLOVA, M. (1996): The limit of PCR amplification. Journal of Theoretical Biology 178 (4), 425-426.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

5. FAYER, R.; GRACZYK, T. K.; CRANFIELD, M. R. (1995):
Multiple heterogenous isolates of Cryptosporidium serpentis from captive snakes are not transmissible to neonatal BALB/c mice (Mus musculus).
J. Parasitology 81 (3), 482-484.

6. GRACZYK, T. K.; CRANFIELD, M. R. (1996):
Assessment of the conventional detection of fecal Cryptosporidium serpentis oocysts in subclinically infected captive snakes.
Vet. Research 27 (2), 185-192.

7. JOHNSON, D. W.; PIENIAZEK, N. J.; GRIFFIN, D. W.; MISENER, L.; ROSE, J. B. (1995): Development of a PCR protocol for sensitive detection of Cryptosporidium oocysts in water samples.
Applied and Environmental Microbiology 61 (11), 3849-3855.

8. KOSTRZYNSKA, M.; SANKEY, M.; HAACK, E.; POWER, C.; ALDOM, J. E.; CHAGLA, A. H.; UNGER, S.; PALMATEER, G.; LEE, H.; TREVORS, J. T.; DE GRANDIS, S. A. (1999):
Three sample preparation protocols for polymerase chain reaction based detection of Cryptosporidium parvum in environmental samples.
J. Microbiological Methods 35 (1), 65-71.

9. LENG, X.; MOSIER, D. A.; OBERST, R. D. (1996):
Simplified method for recovery and PCR detection of Cryptosporidium DNA from bovine feces.
Applied and Environmental Microbiology 62, 643-647.

10. MORGAN, U. M.; CONSTANTINE, C. C.; FORBES, D. A.; THOMPSON, R. C. (1997):
Differentiation between human and animal isolates of Cryptosporidium parvum using rDNA sequencing and direct PCR analysis.
J. Parasitology 83 (5), 825-830.

11. MORGAN, U. M.; PALLANT, L.; DWYER, B. W.; FORBES, D. A.; RICH, G.; THOMPSON, R. C. (1998):
Comparison of PCR and microscopy for detection of Cryptosporidium parvum in human fecal specimens: clinical trial.
J. Clin. Microbiology 36 (4), 995-998.

12. ROCHELLE, P. A.; DE LEON, R.; JOHNSON, A.; STEWART, M. H.; WOLFE, R. L. (1999):
Evaluation of immunomagnetic separation for recovery of infectious Cryptosporidium parvum oocysts from environmental samples.
Applied and Environmental Microbiology 65 (2), 841-845.

13. ROCHELLE, P. A.; DE LEON, R.; STEWART, M. H.; WOLFE, R. L. (1997):
Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of Cryptosporidium parvum and Giardia lamblia in water.
Applied and Environmental Microbiology 63 (1), 106-114.

14. ROCHELLE, P. A.; FERGUSON, D. M.; HANDOJO, T. J.; DE LEON, R.; STEWART, M. H.; WOLFE, R. L. (1996):
Development of a rapid detection procedure for Cryptosporidium, using in vitro cell culture combined with PCR.
J. Eukaryotic Microbiology 43 (5), 72S.

15. XIAO, L.; SULAIMAN, I.; FAYER, R.; LAL, A. A. (1999):
Species and strain specific typing of Cryptosporidium parasites in clinical and environmental samples.
Mem. Inst. Oswaldo. Cruz 93 (5), 687-691.

16. ZHU, G.; MARCHEWKA, M. J.; ENNIS, J. G.; KEITHLY, J. S. (1998):
Direct isolation of DNA from patient stools for polymerase chain reaction detection of Cryptosporidium parvum.
J. Infect. Dis. 177 (5), 1443-1446.

Korrespondenzadresse ao Univ.-Prof. Dr. Andreas Haßl
Klinisches Institut für Hygiene der Universität Wien

Kinderspitalgasse 15
A-1095 Wien · Austria

ZOBODAT - 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: 1999

Band/Volume: 21

Autor(en)/Author(s): Hassl Andreas R., Vorbeck-Meister L., Sommer R., Rotter Manfred

Artikel/Article: Nachweis und Identifikation von Kryptosporidien in Kot-, Stuhl- und Umweltproben - Entwicklung einer Modultechnik. 45-50