

Aus dem Institut für Parasitologie und Internationale Tiergesundheit
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und dem Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
Berlin

**Molekulare Charakteristik von adulten Trematoden der Familie Opisthorchiidae
mittels PCR und RFLP-Analyse.**

**Mit einem Beitrag zum molekularen Nachweis von Eiern der Arten
Opisthorchis felineus (Rivolta, 1884) und *Metorchis bilis* (Braun, 1790)
im Kot von Füchsen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Andreas Karl Pauly
Tierarzt aus Saarbrücken

Berlin 2003

Journal-Nr.: 2737

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. L. Brunnberg

Erster Gutachter: Prof. Dr. R. K. Schuster

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. M. F. G. Schmidt

Dritter Gutachter: Prof. Dr. Dr. Th. Hiepe

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):
Parasites; Helminths; Liver flukes; Opisthorchis felinus; Molecular biology

Tag der Promotion: 15.08.2003

INHALTS VERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis

	Seite
<u>1. Aufgabenstellung</u>	1
<u>2. Literaturübersicht</u>	3
2.1. Systematik der opisthorchiiden Leberegel	3
2.2. Morphologie der Familie Opisthorchiidae	8
2.2.1. Morphologie von <i>Opisthorchis felineus</i> (RIVOLTA, 1884)	10
2.2.2. Morphologie von <i>Opisthorchis viverrini</i> (POIRIER, 1886)	12
2.2.3. Morphologie von <i>Clonorchis sinensis</i> (COBBOLD, 1875)	13
2.2.4. Morphologie von <i>Metorchis bilis</i> (BRAUN, 1790)	15
2.2.5. Morphologie von <i>Metorchis conjunctus</i> (COBBOLD, 1860)	16
2.2.6. Morphologie von <i>Metorchis xanthosomus</i> (CREPLIN, 1846)	17
2.2.7. Morphologie von <i>Pseudamphistomum truncatum</i> (RUDOLPHI, 1819)	19
2.3. Ontogenie und Epidemiologie	21
2.3.1. Ontogenie	21
2.3.2. Epidemiologie	27
2.4. Klinik, Pathologie und Pathogenese	36
2.4.1. Klinik der Opisthorchiidose	36
2.4.2. Pathologie	38
2.4.3. Pathogenese	41

2.5. Diagnostik	45
2.6. Behandlung der Opisthorchiidose	50
<u>3. Eigene Untersuchungen</u>	52
3.1. Material und Methoden	52
3.1.1. Etablierung der Lebenszyklen unter Laborbedingungen	52
3.1.1.1. Infektion der ersten Zwischenwirte	52
3.1.1.2. Infektion der zweiten Zwischenwirte und Gewinnung von Metazerkarien	55
3.1.1.3. Infektion der Endwirte	56
3.1.1.4. Parasitologische Sektionen	58
3.1.2. Molekularbiologische Methoden und Untersuchungen	60
3.1.2.1. Proben zur Gewinnung von DNA	60
3.1.2.2. Durchführung der DNA-Extraktionen	63
3.1.2.3. Primer	65
3.1.2.4. DNA-Amplifikation	67
3.1.2.5. Gel-Elektrophorese	71
3.1.2.6. RFLP-Analyse	72
3.2. Untersuchungsergebnisse	75
3.2.1. Etablierung der Lebenszyklen unter Laborbedingungen	75
3.2.1.1. Infektion der Zwischenwirtsschnecken	75
3.2.1.2. Infektion der Goldorfen	76
3.2.1.3. Ergebnisse der parasitologischen Sektionen	76

3.2.2. Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen	78
3.2.2.1. Menge und Reinheit der extrahierten DNA	78
3.2.2.2. Amplifikation mit COI-Primern und Sequenzanalyse	79
3.2.2.3. Amplifikation mit OF-Primern	82
3.2.2.4. Amplifikation mit MB-Primern	86
3.2.2.5. Testung der analytischen Sensitivität von OF- und MB-Primern	89
3.2.2.6. Nachweis von Leberegel-DNA im Fuchskot mittels OF- und MB-Primern	91
3.2.2.7. Ergebnisse der RFLP-Analyse	94
<u>4. Diskussion</u>	97
<u>5. Zusammenfassung</u>	109
<u>6. Summary</u>	112
<u>7. Literaturverzeichnis</u>	115
<u>8. Anhang</u>	128
8.1. Rezepturen	128
8.2. Partielle COI-Sequenzen der untersuchten opisthorchiiden Trematodenarten	130
Danksagung	
Lebenslauf	
Selbständigkeitserklärung	

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALT	Alanin-Amino-Transferase
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua dem.	Aqua demineralisata
Aqua dest.	Aqua destillata
AST	Aspartat-Amino-Transferase
<i>B. inflata</i>	<i>Bithynia inflata</i>
<i>B. leachi</i>	<i>Bithynia leachi</i>
<i>B. tentaculata</i>	<i>Bithynia tentaculata</i>
BFAV	Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
BVL	Bundesinstitut für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
<i>C. sinensis</i>	<i>Clonorchis sinensis</i>
cm	Zentimeter
COI	Cytochrom C Oxidase I
dATP	desoxyribo-Adenosintriposphat
dCTP	desoxyribo-Cytidintriposphat
dGTP	desoxyribo-Guanosintriposphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	desoxyribo-Thymintriposphat
E/S-Antigen	exkretorisch-sekretorisches Antigen
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay

engl.	Englisch
EpG	Eier pro Gramm Kot
fg	Femtogramm
FU	Freie Universität Berlin
g	Gramm
GLDH	Glutamatdehydrogenase
gr.	Griechisch
h	Stunde
i.m.	intramuskulär
IgA	Immunglobulin A
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
ILAT	Institut für Lebensmittel, Arzneimittel und Tierseuchen
<i>J. pasqualei</i>	<i>Joyeuxiella pasqualei</i>
kg	Kilogramm
KM	Körpermasse
l	Liter
<i>M. bilis</i>	<i>Metorchis bilis</i>
<i>M. coeruleus</i>	<i>Metorchis coeruleus</i>
<i>M. conjunctus</i>	<i>Metorchis conjunctus</i>
<i>M. intermedius</i>	<i>Metorchis intermedius</i>
<i>M. pinguicola</i>	<i>Metorchis pinguicola</i>
<i>M. xanthosomus</i>	<i>Metorchis xanthosomus</i>

MAb-ELISA	monoclonal antibody-based ELISA
mg	Milligramm
MIFC	Merthiolate-Iodine-Formaldehyde-Concentration
min	Minute(n)
Mio.	Million(en)
ml	Milliliter
mM	millimolar
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	mikromolar
μm	Mikrometer
N	normal (bei Lösungen)
neg	negativ
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO-Thailand	Nordost-Thailand
Nr.	Nummer
<i>O. felineus</i>	<i>Opisthorchis felineus</i>
<i>O. viverrini</i>	<i>Opisthorchis viverrini</i>
p. inf.	post infectionem
<i>P. truncatum</i>	<i>Pseudamphistomum truncatum</i>
PCR	Polymerase chain reaction
pers. Mitteilung	persönliche Mitteilung
pg	Pikogramm
pmol	Pikomol

pos	positiv
prae inf.	prae infectionem
RNA	Ribonukleinsäure
RFLP	Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus
sec	Sekunde(n)
<i>T. crassiceps</i>	<i>Taenia crassiceps</i>
<i>T. hydatigena</i>	<i>Taenia hydatigena</i>
<i>T. polyacantha</i>	<i>Taenia polyacantha</i>
Tab.	Tabelle
U	unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
vs.	versus

Andreas Karl Pauly

Berlin, den 28.05.2003

Guineatsr. 38

13351 Berlin

Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. R. Schuster¹ und Herrn Dr. S. Steuber² für die Überlassung des Themas danken. Beide Betreuer waren stets außerordentlich hilfsbereit und standen mir direkt beim Auftreten von Problemen hilfreich zur Seite. Mein besonderer Dank gilt diesbezüglich auch Herrn Dr. P.-H. Clausen¹.

Bei Frau A. Wiemann¹ bedanke ich mich für die umfangreiche Einarbeitung auf dem Gebiet PCR. Frau Wiemann war mir bei der Bewältigung von technischen und praktischen Problemen stets eine große Hilfe.

Herrn Dr. Hotzel³ möchte ich für die Durchführung der Sequenzanalysen danken.

Ferner möchte ich mich nochmals bei den im Text genannten Personen und Institutionen bedanken, die mir bereitwillig und kostenlos Material für meine Untersuchungen zur Verfügung gestellt haben.

Mein besonderer Dank gilt weiterhin allen Beschäftigten des Instituts für Parasitologie und Internationale Tiergesundheit der FU Berlin für die herzliche Aufnahme und das stets sehr angenehme Arbeitsklima.

Beim Land Berlin möchte ich mich für die Gewährung eines Promotionsstipendiums gemäß Nachwuchsförderungsgesetz (NaFöG) bedanken, wodurch das Promotionsvorhaben in einem angemessenen Zeitraum durchgeführt werden konnte.

¹ Institut für Parasitologie und Internationale Tiergesundheit der FU Berlin

² Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), Berlin

³ Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere (BFAV), Standort Jena

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Andreas Karl Pauly
Geburtsdatum	19.02.1972
Geburtsort	Saarbrücken
Beruf	Tierarzt

Schulbildung

1978-1979	Theodor-Heuss-Grundschule in Dudweiler-Herrensohr
1979-1982	Grundschule Saarbrücken-Bruchwiese
1982-1991	Staatliches Gymnasium am Rotenbühl in Saarbrücken
17.05.1991	Allgemeine Hochschulreife

Ausbildung

1991-1992	Zivildienst beim Deutschen Paritätischen Wohlfahrtsverband
1992-1995	Studium der Biologie (Studiengang Diplom) an der Universität des Saarlandes
06.04.1995	Diplom-Vorprüfung in Biologie
1995-2001	Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin
05.02.2001	Erhalt der Approbation

Praktische Tätigkeiten

1998-1999	Tutor am Institut für Veterinär-Biochemie der Freien Universität Berlin
2001-2003	Doktorand am Institut für Parasitologie und Internationale Tiergesundheit der Freien Universität Berlin