

### **3. Eigene Untersuchungen**

#### **3.1. Material und Methoden**

##### **3.1.1. Etablierung der Lebenszyklen unter Laborbedingungen**

###### **3.1.1.1. Infektion der ersten Zwischenwirte**

Um die Lebenszyklen opisthorchiider Leberegelarten unter Institutsbedingungen zu etablieren, war es zunächst nötig, die geeigneten Zwischenwirtsschnecken zu beschaffen. Als erste Zwischenwirte kommen für *M. bilis*, *M. xanthosomus* sowie *P. truncatum* *B. tentaculata* und für *O. felineus* *B. leachi* in Frage. In Brandenburg stellten der Teltowkanal für *B. tentaculata* und der Finowkanal für *B. leachi* und *B. tentaculata* gute Sammelgebiete dar. An diesen beiden Fließgewässern konnten die Zwischenwirtsschnecken durch Absammeln der Unterseite sich in Ufernähe befindlicher Steine gewonnen werden. Vor Besatz der eigens für diese Mollusken eingerichteten und mit speziellem Schneckenwasser (Zusammensetzung siehe Rezepturanhang) befüllten Aquarien wurden die Schnecken nach Arten getrennt, über einen Zeitraum von drei Tagen und nach Bestrahlung mit einer Halogenlampe

(Bestrahlungsdauer: 30 min) auf das spontane Ausscheiden von Zerkarien untersucht. Nach Ausschluss von Spontaninfektionen mit Parthenitae opisthorchiider Trematoden erfolgte die Umsetzung der zuvor experimentell infizierten Schnecken in die vier bereitgestellten 5 l Glasaquarien, deren Boden mit grobem, sterilisiertem Kies in einer Höhe von ca. 2 cm beschichtet worden war. Jedes Becken wurde zusätzlich mit mehreren Flusststeinen ausgestattet und mit einem Aquaclear<sup>®</sup> Mini Filter der Firma Cycleguard (Vertrieb Hagen, Holm, Deutschland) versehen, welcher für eine ständige Umwälzung des Wassers und einen ausreichenden Sauerstoffeintrag sorgte. Die Wassertemperatur lag bei 22–25 °C. Als Schneckenfutter dienten Salatblätter und Sera<sup>®</sup> Vipar Hauptfutter für Zierfische (Sera, Heinsberg, Deutschland).

Die experimentelle Infektion der Schnecken erfolgte in mit Schneckenwasser befüllten großen Petrischalen. Als Infektionsmaterial kam mit Eiern von *O. felineus* oder *M. bilis* versetzter Hamsterkot (aus früheren Infektionsversuchen) sowie adulte Exemplare von *P. truncatum* und *M. xanthosomus* zum Einsatz, welche frisch aus den Gallenblasen bzw. Lebern der entsprechenden Versuchstiere (siehe 3.1.1.4) entnommen worden waren. Nach Zerdrücken der Leberegel und Ausmassieren der enthaltenen Eier auf Filterpapier erfolgte die Fütterung der Schnecken. Diese ließen sich leicht durch Zugabe mehrerer Flocken Fischfutter zu den zerquetschten Trematoden an die Futterstelle locken. Die Überprüfung der Aufnahme des

Infektionsmaterials durch die Schnecken fand am auf die Infektion folgenden Tag statt, indem von den Mollusken ausgeschiedene Kotballen mittels eines Deckglases auf einem Objektträger gequetscht und unter einem Lichtmikroskop begutachtet wurden. Bei Aufnahme der opisthorchiiden Eier durch die Schnecken ließen sich die Eihüllen mit abgesprengtem Operculum nachweisen. Das Infektionsschema der Mollusken ist in Tab. 1 dargestellt.

**Tab. 1: Infektionsschema der Zwischenwirtsschnecken**

| <b>Aquarium-Nr.</b> | <b>Schneckenart u. Anzahl</b> | <b>Infektion mit</b>                                 |
|---------------------|-------------------------------|--|
| 1                   | 30 <i>B. leachi</i>           | 3 Ballen Hamsterkot mit Eiern von <i>O. felineus</i> |
| 2                   | 30 <i>B. tentaculata</i>      | 3 Ballen Hamsterkot mit Eiern von <i>M. bilis</i>    |
| 3                   | 30 <i>B. tentaculata</i>      | 3 zerdrückte u. ausmassierte <i>P. truncatum</i>     |
| 4                   | 30 <i>B. tentaculata</i>      | 3 zerdrückte u. ausmassierte <i>M. xanthosomus</i>   |

6 Wochen p. inf. wurden die Schnecken erstmalig den Aquarien entnommen, in mit Schneckenwasser befüllte Glasgefäße umgesetzt und 30 min mit einer Halogenlampe bestrahlt. Danach erfolgte die Überprüfung auf Ausscheidung von Pleurolophozerkarien unter dem Stereomikroskop. Dieses Verfahren wurde zweimal wöchentlich über einen Zeitraum von zwei Wochen wiederholt. Bei positivem Befund erfolgte das Umsetzen der Schnecken in die entsprechenden Aquarien.

### 3.1.1.2. Infektion der zweiten Zwischenwirte und Gewinnung von Metazerkarien

Als zweite Zwischenwirte kamen schneckenfrei aufgezogene Goldorfen (*Leuciscus idus*) zum Einsatz (Tierversuchsvorhaben Nr.: 0049/01). Jeweils vier Exemplare dieser Fischart wurden mit Beginn der Ausscheidung von Pleurolophozerkarien durch die Zwischenwirtsschnecken jedem Aquarium zugesetzt (Ausnahme: Aquarium-Nr. 4, da die Schnecken keine Pleurolophozerkarien ausschieden, siehe 3.2.1.1). Als Futter diente Sera<sup>®</sup> Vipar Hauptfutter für Zierfische (Sera, Heinsberg, Deutschland). 6 Wochen p. inf. erfolgte die Tötung je einer Goldorfe pro Becken mittels Herzstich nach Betäubung durch Genickschlag. Flossen, Kopf und Muskulatur wurden mittels Scherenschlag zerkleinert, getrennt in je ein Becherglas überführt und nach Zusatz von 150 ml peptischer Verdauungslösung (Zusammensetzung siehe Rezepturanhang) pro Gefäß bei 38 °C im Wasserbad auf einer kombinierten Heiz-/Magnetrührplatte bei 500 U/min künstlich verdaut. Nach Abgießen der Suspension über ein Sieb (Maschenweite: 800 µm) zur Befreiung unverdaulicher Gewebereste, 20 minütiger Sedimentation und Dekantierung konnte die verbliebene Flüssigkeit unter dem Stereomikroskop auf Metazerkarien untersucht werden. Die Metazerkarien wurden ausgezählt, mit Coon`s-Puffer (Zusammensetzung siehe Rezepturanhang) versetzt und für die

Infektion von Endwirten verwendet. Die übrigen drei verbliebenen Goldorfen je Becken wurden als Versuchsreserve am Leben belassen.

### **3.1.1.3. Infektion der Endwirte**

Da für die Infektion von *B. tentaculata* mit Eiern von *P. truncatum* bzw. *M. xanthosomus* kein geeignetes Ausgangsmaterial zur Verfügung stand, mussten zuerst entsprechende Endwirte mit Metazerkarien oder metazerkarienhaltigem Fisch infiziert werden. Bei diesem Versuchsvorhaben kamen zwei Haushühner (*Gallus gallus* f. *domesticus*) und eine Hauskatze (*Felis silvestris* f. *catus*) zum Einsatz. Letztere sollte ursprünglich opisthorchiide Eier für den parasitologischen Kursus des Instituts für Parasitologie und Internationale Tiergesundheit der FU Berlin liefern, musste aber vorzeitig euthanasiert werden (siehe unten). Die Katze bekam Fischköpfe und Fischfilets (siehe Tab. 2) zu fressen, während die Hühner mit Metazerkarien von *M. xanthosomus* infiziert wurden, welche zuvor mittels peptischer Verdauung aus einer Ukelei (*Alburnus alburnus*) isoliert und in Coon`s-Puffer überführt worden waren. Die für diese Infektionsversuche verwendeten Fische stammten alle aus dem Teltowkanal. Das Infektionsschema ist in Tab. 2 aufgeführt.

Zur Komplettierung der Entwicklungszyklen von *O. felineus*, *M. bilis* und *P. truncatum* fanden Goldhamster (*Mesocricetus auratus*) als Endwirte Verwendung. Die Tiere wurden zunächst in einem abdeckbaren Glasgefäß mit Chloroform leicht betäubt. Danach konnten den Hamstern die sich in Coon`s-Puffer befindlichen Metazerkarien (siehe 3.1.1.2) mit Hilfe einer Glaspipette in die Backentaschen eingegeben werden. Die Infektion erfolgte nach dem in Tab. 3 aufgezeigten Schema.

Die Haltung aller aufgeführten Versuchstiere fand in der eigens hierfür eingerichteten Abteilung des Instituts für Parasitologie und Internationale Tiergesundheit der FU Berlin unter tierschutzgerechten Bedingungen statt. Pflege und Betreuung der Tiere erfolgte durch die institutseigenen Tierpfleger.

**Tab. 2: Infektionsschema der Haushühner und der Hauskatze**

| <b>Endwirt</b>   | <b>Fischart</b>                        | <b>Infektionsdosis</b>  |
|--|--|---|
| Haushuhn <sup>a</sup> Nr. 1<br>( <i>Gallus gallus</i> f. <i>domesticus</i> ) | Ukelei<br>( <i>Alburnus alburnus</i> ) | 50 Metazerkarien von <i>M. xanthosomus</i> mittels Glaspipette in Schnabelhöhle |
| Haushuhn <sup>a</sup> Nr. 2<br>( <i>Gallus gallus</i> f. <i>domesticus</i> ) | Ukelei<br>( <i>Alburnus alburnus</i> ) | 50 Metazerkarien von <i>M. xanthosomus</i> mittels Glaspipette in Schnabelhöhle |
| Hauskatze <sup>b</sup><br>( <i>Felis silvestris</i> f. <i>catus</i> )        | Aland<br>( <i>Leuciscus idus</i> )     | Je ein Kopf und ein Filet pro Tag an drei aufeinanderfolgenden Tagen ad libitum |

<sup>a</sup> Tierversuchsvorhaben Nr.: 0049/01

<sup>b</sup> Tierversuchsvorhaben Nr.: L 0016/00

**Tab. 3: Infektionsschema der Goldhamster**

| <b>Goldhamster<sup>a</sup> Nr.</b><br><i>(Mesocricetus auratus)</i> | <b>Fischart</b>                     | <b>Infektionsdosis</b><br><b>(Metazerkarienzahl)</b> |
|---|-------------------------------------|--|
| 1   | Goldorfe<br><i>(Leuciscus idus)</i> | 27 <i>O. felineus</i>                                |
| 2   | Goldorfe<br><i>(Leuciscus idus)</i> | 300 <i>M. bilis</i>                                  |
| 3   | Goldorfe<br><i>(Leuciscus idus)</i> | 100 <i>P. truncatum</i>                              |

<sup>a</sup> Tierversuchsvorhaben Nr.: 0049/01

#### **3.1.1.4. Parasitologische Sektionen**

Zur parasitologischen Sektion mussten die Versuchstiere euthanasiert werden. Dies geschah bei allen eingesetzten Tieren 4 Wochen p. inf. mit Ausnahme der Hauskatze, welche bereits 2 Wochen p. inf. aufgrund schlechten Allgemeinbefindens und Futterverweigerung über mehrere Tage vorzeitig getötet werden musste.

Die Euthanasie lief für die einzelnen Versuchstierarten wie folgt ab:

##### a) Goldhamster

Die Tiere wurden in ein abdeckbares Glasgefäß verbracht, das zuvor mit einem in Chloroform getränkten Wattebausch versehen worden war. 10 min nach Eintritt des Atemstillstandes erfolgte die Sektion durch Haut- und Muskelschnitt in der Linea alba sowie zwei

Entlastungsschnitten entlang der Rippenbögen. Nach Eröffnung der Bauchhöhle konnte die Leber mit anhängender Gallenblase stumpf herauspräpariert werden. Nach Absetzen der Gallenblase am Hauptgallengang wurde die Leber mit einem Keramikmesser in ca. 2 cm dicke Scheiben zerteilt, mit Coon`s-Puffer übergossen, durch Daumendruck gequetscht, die Gewebereste entfernt und die noch verbliebene Flüssigkeit zur Sedimentation in ein Becherglas überführt. Nach 10 min erfolgte die Durchmusterung des Sediments unter dem Stereomikroskop auf opisthorchiide Trematoden. Gallenblase und Hauptgallengang wurden durch Längsschnitt eröffnet, mit Coon`s-Puffer gespült und die gewonnene Flüssigkeit ebenfalls nach adulten Leberegel durchsucht.

#### b) Hauskatze

Nach Narkotisierung des Tieres mit 4,0 mg Xylazin und 40,0 mg Ketamin i.m. erfolgte die Euthanasie mit T 61<sup>®</sup>, das intracardial injiziert wurde. Die Sektion wurde nach Feststellung des Todes (kein auskultierbarer Herzschlag, keine Reflexe) in gleicher Weise wie oben beschrieben durchgeführt.

#### c) Haushühner

Die Hühner wurden mit Hilfe eines in Chloroform getränkten Wattebausches, der vor die Nasenöffnungen gehalten wurde, zunächst betäubt und dann durch Genickbruch getötet. Die Entnahme der Leber und Gallenblase erfolgte wie unter a) aufgeführt.



Die mittels der parasitologischen Sektionen isolierten opisthorchiiden Trematoden verschiedener Spezies dienten als Ausgangsmaterial für die Infektion von Zwischenwirtsschnecken (siehe 3.1.1.1) bzw. für die Extraktion von DNA mit nachfolgender Durchführung einer PCR (siehe 3.1.2.1).

### **3.1.2. Molekularbiologische Methoden und Untersuchungen**

#### **3.1.2.1. Proben zur Gewinnung von DNA**

Zur Etablierung einer PCR (Polymerase chain reaction) als Nachweismethode opisthorchiider Leberegel-DNA wurden als Ausgangsmaterial für die DNA-Extraktion zunächst adulte Trematoden verwendet, die aus verschiedenen Endwirten isoliert worden waren. Die in die Versuche einbezogenen opisthorchiiden Leberegelarten und deren Herkunft sind in Tab. 4 dargestellt.

**Tab. 4: Einbezogene Arten sowie Herkunft des Untersuchungsmaterials**

| <b>Spezies</b>        | <b>Wirt</b>   | <b>Herkunft<sup>a</sup></b>           |
|-----------------------|---|---------------------------------------|
| <i>O. felineus</i>    | Goldhamster<br>( <i>Mesocricetus auratus</i> )                        | experimentelle Infektion <sup>b</sup> |
|                       | Bisamratte <sup>1</sup><br>( <i>Ondatra zibethica</i> )               | Kreis Barnim                          |
|                       | Hauskatze <sup>2</sup><br>( <i>Felis silvestris</i> f. <i>catus</i> ) | Steglitz, Berlin                      |
|                       | Rotfuchs <sup>3</sup><br>( <i>Vulpes vulpes</i> )                     | Berlin                                |
|                       | Mensch <sup>4</sup><br>( <i>Homo sapiens</i> )                        | Russland: Westsibirien                |
| <i>M. bilis</i>       | Goldhamster<br>( <i>Mesocricetus auratus</i> )                        | experimentelle Infektion <sup>b</sup> |
|                       | Hauskatze<br>( <i>Felis silvestris</i> f. <i>catus</i> )              | experimentelle Infektion <sup>c</sup> |
|                       | Rotfuchs <sup>3</sup><br>( <i>Vulpes vulpes</i> )                     | Berlin                                |
|                       | Rohrweihe <sup>5</sup><br>( <i>Circus aeruginosus</i> )               | Russland                              |
| <i>P. truncatum</i>   | Mink <sup>1</sup><br>( <i>Mustela vison</i> )                         | Kreis Barnim                          |
|                       | Hauskatze<br>( <i>Felis silvestris</i> f. <i>catus</i> )              | experimentelle Infektion <sup>c</sup> |
| <i>M. xanthosomus</i> | Haushuhn<br>( <i>Gallus gallus</i> f. <i>domesticus</i> )             | experimentelle Infektion <sup>b</sup> |
| <i>O. viverrini</i>   | Goldhamster <sup>6</sup><br>( <i>Mesocricetus auratus</i> )           | Thailand                              |
| <i>C. sinensis</i>    | Goldhamster <sup>6</sup><br>( <i>Mesocricetus auratus</i> )           | Thailand                              |

<sup>a</sup> Für die Überlassung der Trematoden bzw. befallenen Lebern danke ich

<sup>1</sup> Herrn Dr. B. Specht, Hohenfinow

<sup>2</sup> dem Institut für Veterinärpathologie, FU Berlin

<sup>3</sup> dem Institut für Lebensmittel, Arzneimittel und Tierseuchen (ILAT), Berlin

<sup>4</sup> Herrn Prof. Dr. Iljinskich, Medizinische Universität, Tomsk, Russland

<sup>5</sup> Herrn Prof. Dr. Beer, Akademie der Wissenschaften, Moskau, Russland

<sup>6</sup> Herrn Dr. Smarn Tesana, Department of Parasitology, Khon Kaen University, Thailand

<sup>b</sup> Tierversuchsvorhaben Nr.: 0049/01

<sup>c</sup> Tierversuchsvorhaben Nr.: L 0016/00

Alle oben aufgeführten Leberegel, die in der DNA-Extraktion eingesetzt wurden, waren in 70%-igem Ethanol fixiert mit Ausnahme der Exemplare von *C. sinensis*, die in lyophilisierter Form vorlagen.

Zur Testung des zu etablierenden PCR-Systems auf Kreuzreaktionen mit Wirts-DNA wurden zusätzlich Proben zur DNA-Extraktion aus den verschiedenen Zwischen- und Endwirten gewonnen. Zum Einsatz kamen frische Gewebeproben von leberegelfreien Fuchslebern, aus der Muskulatur parasitenfrei aufzogener Goldorfen und von Zwischenwirtsschnecken. Bei den Schnecken wurde darauf geachtet, dass nur Kopfgewebe bei der Extraktion eingesetzt wurde, da dieses niemals von den Zwischenstadien opisthorchiider Trematoden befallen wird.

Die verwendete Menge belief sich bei allen Gewebeproben auf 200 mg.

Zur Überprüfung, ob verschiedene Zestodenspezies der Fleischfresser mit den unten angeführten Primern in der PCR reagieren, wurde DNA aus je einer Proglottide von *Joyeuxiella pasqualei*, *Taenia crassiceps*, *Taenia polyacantha*, *Taenia hydatigena* und *Mesocostoides* sp. gewonnen. Alle verwendeten Proglottiden waren in 70%-igem Ethanol eingelegt.

Für weiterführende Studien erfolgte außerdem die Extraktion von DNA aus opisthorchiiden Leberegeleiern, die im Kot experimentell infizierter Silberfüchse (*Vulpes vulpes fulva*) enthalten waren. Dieser Kot wurde von Frau K. Dell im Rahmen ihrer Promotionsarbeit am

Institut für Parasitologie und Internationale Tiergesundheit der FU Berlin zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion gesammelt, die Eizahl pro Gramm Kot (EpG) bestimmt und bei –18 °C eingefroren. Bei je zwei Füchsen lagen reine Infektionen mit *O. felineus* bzw. mit *M. bilis* vor, da diese Tiere mit experimentell infizierten Goldorfen gefüttert worden waren. Vier weitere Füchse bekamen spontan infizierte Alande bzw. Güstern zu fressen (DELL 2001).

### **3.1.2.2. Durchführung der DNA-Extraktionen**

Vor der eigentlichen DNA-Extraktion der in Alkohol eingelegten Trematoden und Bandwurmproglottiden erfolgte eine dreimalige Waschung mit Coon`s-Puffer. Danach wurde jeweils ein adulter Leberegel bzw. eine Proglottide in ein 1,5 ml Schraubdeckelgefäß (SARSTEDT<sup>®</sup>, Nümbrecht, Deutschland) überführt und die enthaltene DNA mit dem DNeasy<sup>®</sup> Tissue Kit (Qiagen<sup>®</sup>, Hilden, Deutschland) extrahiert. Bei dieser Form der Extraktion werden die im Gewebe enthaltenen Proteine zunächst unter Zusatz eines Lysis-Puffers und Proteinase K in einer Konzentration von 20 mg/ml bei 55 °C im Wasserbad und dann unter Zugabe eines zweiten Lysis-Puffers bei 70 °C im Wasserbad vollständig aufgelöst. Das Lysat konnte im nachfolgenden Präparationsschritt auf eine im Extraktions-Kit mitgelieferte QIAmp spin column<sup>®</sup> gegeben und an deren Silika-Gel Membran gebunden

werden. Nach zweimaliger Waschung mit unterschiedlichen Wasch-Puffern unter Zentrifugation bei 13000 U/min in einer Biofuge<sup>®</sup> 13 (Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland) wurde die DNA schließlich im letzten Schritt der Extraktion nach Zugabe von Elutions-Puffer ausgewaschen und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Die Menge und Reinheit der extrahierten DNA ließ sich durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm im Gene Quant RNA/DNA calculator<sup>®</sup> (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) bestimmen.

Die DNA der opisthorchiiden Leberegelier wurde mittels QIAmp<sup>®</sup> DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) aus den Kotproben der Silberfuchse isoliert. Die Verwendung eines speziellen Extraktions-Kits für Stuhlproben ist notwendig, da Kot immer Inhibitoren enthält, die sich negativ auf den Ablauf der PCR auswirken können. Jede Kotprobe wurde zunächst gründlich durchmischt, um eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Eier im Stuhl zu erreichen. Nach Einwaage von 200 mg jeder Probe in ein 2,0 ml Eppendorf<sup>®</sup>-Gefäß (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) erfolgte die Behandlung mit einem Lysis-Puffer bei 80 °C im Wasserbad. Die im Kot enthaltenen Inhibitoren ließen sich durch Zugabe jeweils einer InhibitEx<sup>®</sup>-Tablette (Qiagen, Hilden, Deutschland) zu jedem Lysat binden. Nach Zentrifugation bei 13000 U/min in einer Biofuge<sup>®</sup> 13 (Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland) wurde der Überstand abgenommen und das die Inhibitoren enthaltene Sediment

verworfen. Danach erfolgte die Proteinverdauung unter Einsatz von Proteinase K (Konzentration: 20 mg/ml) und Lysis-Puffer bei 70 °C im Wasserbad und die Bindung des gewonnenen Lysats an die Silika-Gel Membran der QIAamp spin column<sup>®</sup>. Es folgten die zweimalige Waschung mit Wasch-Puffern und schließlich die Elution der DNA mit Elutions-Puffer und anschließende Lagerung bei 4 °C im Kühlschrank.

### **3.1.2.3. Primer**

Da spezifische Primerpaare für die unterschiedlichen opisthorchiiden Trematodenspezies mit Ausnahme für *O. viverrini* (WONGRATANACHEEWIN et al. 2001) bisher nicht vorhanden waren, mussten zur Durchführung einer PCR zum Nachweis opisthorchiider Leberegel-DNA zunächst Primer ausgewählt werden, mit deren Hilfe sich mitochondriale DNA von Plathelminthen amplifizieren lässt. BOWLES & McMANUS (1994) konnten durch Einsatz solcher Primer in der PCR eine Untereinheit des mitochondrialen Cytochrom C Oxidase I Gens (COI Gen) bei verschiedenen Zestodenspezies nachweisen. Die Untereinheit dieses Gens besteht aus einer variablen Region, die von zwei konservativen Regionen eingerahmt wird. Im Bereich der konservativen Abschnitte befinden sich die Bindungsstellen der Primer. Die eingesetzten Primer werden bei BOWLES & McMANUS (1994) unter der Bezeichnung

JB3 (5' TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT 3') und JB4.5 (5' TAAAGAAAGAACAT-AATGAAAATG 3') geführt und im folgenden COI-1 und COI-2 genannt. Nach Amplifikation von Plathelminthen-DNA mittels COI-1 und COI-2 ermittelten GASSER et al. (1999) mitochondriale Cytochrom C Oxidase I - Gensequenzen von ungefähr 450 bp. Die beschriebenen Primer wurden hier erstmals zum Nachweis opisthorchiider Leberegel-DNA eingesetzt. Ihre Herstellung erfolgte durch die Firma TIB MOLBIOL (Berlin, Deutschland).

Nach Amplifikation mitochondrialer DNA von *O. felineus*, *O. viverrini*, *C. sinensis*, *M. bilis*, *M. xanthosomus* und *P. truncatum* unter Einsatz der COI-Primer wurden die Produkte zur Sequenzanalyse Dr. Hotzel (Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere (BFAV), Standort Jena) übergeben, da das Institut für Parasitologie und Internationale Tiergesundheit der FU Berlin leider nicht über die Gerätschaften zur Sequenzierung von Genen verfügt.

Anhand der von Dr. Hotzel ermittelten Sequenzen wurden zunächst für die Amplifikation der variablen Region des COI-Gens von *O. felineus* und *M. bilis* mit Hilfe eines speziell zur Primer-Synthese entwickelten Computerprogramms (Oligos<sup>©</sup> 1999-2002 Version 9.4) spezifische Primer für diese beiden häufigsten einheimischen opisthorchiiden Trematodenspezies konstruiert. Die Herstellung der ermittelten Primer erfolgte durch die Firma TIB MOLBIOL (Berlin, Deutschland). Zum Nachweis mitochondrialer DNA von *O. felineus* wurden spezifische Primer mit folgenden Sequenzen in der PCR eingesetzt: OF-1

(5`CCTATTTGGTTATGGTTTGG 3`) und OF-2 (5`CGATCTCGAGTACCGGCAAG 3`).

Die spezifische Amplifikation von *M. bilis*-DNA erfolgte mit den Primern MB-1 (5`GGGCTGGATTTGGGCACTGC 3`) und MB-2 (5`ACGATCACGAGTACCAGCAAGC 3`).

#### **3.1.2.4. DNA-Amplifikation**

Die PCR zur Amplifikation des partiellen COI-Gens erfolgte als 50,0 µl Ansatz in 1,0 ml Schraubdeckelgefäßen der Firma SARSTEDT® (Nümbrecht, Deutschland). Dabei wurden pro Ansatz 1x PCR-Puffer II (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 U Ampli Taq Gold® - Polymerase der Firma PE Applied Biosystems® (Branchburg, New Jersey, USA), jeweils 200 µM dTTP, dATP, dGTP und dCTP (pH 7,5; Amersham Pharmacia Biotech Inc.®), je 45 pmol der Primer COI-1 und COI-2 sowie 20 ng Trematoden-DNA als Template eingesetzt. Zur Verwendung kam pro Ansatz jeweils DNA nur einer opisthorchiiden Leberegelart aus je einer Extraktion. Desweiteren wurde auch Wirts-DNA von Rotfuchs, Goldorfe, *B. tentaculata* und *B. leachi* sowie DNA von *J. pasqualei*, *T. crassiceps*, *T. polyacantha*, *T. hydatigena* und *Mesocestoides* sp. (je 20 ng) in gesonderten Ansätzen verwendet, um zu prüfen, ob auch solche DNA mit den eingesetzten Primern reagiert. Um



mögliche Kontaminationen beim Ansetzen des Reaktionsgemischs nachzuweisen, erfolgte bei jeder PCR auch eine Negativkontrolle, bei der anstatt DNA RNAase/DNAase freies Wasser verwendet wurde.

Nach gründlicher Durchmischung der PCR-Reagenzien erfolgte die Überschichtung jedes Ansatzes mit einem Tropfen Mineralöl der Firma SIGMA<sup>®</sup> (Steinheim, Deutschland), um in der nachfolgenden PCR Mengenverluste durch Verdunstung zu verhindern. Zur Durchführung der eigentlichen PCR wurden die Reaktionsgefäße in die Kammer eines TRIO-Thermoblock<sup>®</sup> (Biometra, Deutschland) gestellt, der folgende zuvor programmierte Reaktionsschritte durchführte: Aktivierung der Ampli Taq Gold<sup>®</sup> - Polymerase und Denaturierung der DNA bei 95 °C für 15 min, gefolgt von einem annealing step (Anlagerung der Primer) bei 50 °C für 30 sec und einem extension step (Verlängerung der DNA-Einzelstränge) bei 72 °C für 2 min. Es folgten 39 Zyklen mit Denaturierung bei 94 °C für 30 sec, annealing bei 50 °C für 30 sec und extension bei 72 °C für 2 min. Ein letzter extension step erfolgte bei 72 °C für 10 min, bevor das Reaktionsgemisch langsam auf 4 °C heruntergekühlt wurde.

Die PCR zur Amplifikation der konservativen Region des partiellen COI-Gens von *O. felineus* und *M. bilis* mittels spezifischer Primer (OF- und MB-Primer) erfolgte in einem 50,0 µl Reaktionsvolumen in gleicher Weise. Dabei wurden pro Ansatz entweder OF-1 und OF-2

(je 45 pmol) oder MB-1 und MB-2 (je 45 pmol) eingesetzt. Alle weiteren Reagenzien lagen, wie für die Amplifikation des partiellen COI-Gens angeführt, in derselben Konzentration vor.

Zur Verwendung kam pro Ansatz jeweils nur die von einem adulten Trematoden extrahierte DNA in einer Menge von 20 ng. Zur Prüfung der Spezifität wurde die DNA von je 10 Exemplaren von *O. felineus* und *M. bilis*, welche aus unterschiedlichen Endwirten isoliert worden waren, jeweils mittels der synthetisierten, für die jeweilige Art spezifischen Primer getestet. Außerdem erfolgte die Mischung der DNA von 4 *O. felineus* mit MB-Primern und der DNA von 4 *M. bilis* mit OF-Primern, um Kreuzreaktionen zwischen Primern und nicht spezifischer DNA auszuschließen. Darüber hinaus erfolgte eine Testung der spezifischen Primer mit Wirts-DNA von Rotfuchs, Goldorfe, *B. leachi* und *B. tentaculata*, mit DNA von *P. truncatum* sowie mit DNA unterschiedlicher Zestodenspezies der Fleischfresser (siehe oben).

Zur Prüfung der analytischen Sensitivität der verwendeten OF- und MB-Primer wurden von der in Elutions-Puffer gelösten DNA eines *O. felineus* und eines *M. bilis* Verdünnungsreihen mit 1x PCR-Puffer II (Zusammensetzung siehe oben) angelegt und die Verdünnungsstufen mit dem jeweiligen spezifischen Primerpaar getestet. Der Ansatz erfolgte wiederum in einem Volumen von 50,0 µl. Folgende DNA-Mengen wurden für jede Spezies eingesetzt: 20 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg und 1 fg.

Zusätzlich erfolgte im Rahmen einer weiterführenden Studie die Testung der OF- und MB-Primer mit Leberegel-DNA, die aus Kotproben von Silberfüchsen extrahiert wurde (siehe 3.1.2.1).

Die PCR erfolgte als sogenannte "Touchdown-PCR" in einem TRIO-Thermoblock<sup>®</sup> (Biometra, Deutschland) nach folgendem Programm: Aktivierung der Ampli Taq Gold<sup>®</sup> - Polymerase und Denaturierung der DNA bei 95 °C für 15 min, gefolgt von einem annealing step bei 69 °C für 30 sec und einem extension step bei 72 °C für 2 min. Es schlossen sich 39 Zyklen an mit einer Denaturierung bei 94 °C für 30 sec, einem annealing step bei 69 °C für 30 sec, gefolgt von einem weiteren annealing step, bei dem die Anfangstemperatur von 69 °C innerhalb von 30 sec mit einem Abfall von 0,2 °C/sec auf 63 °C heruntergefahren wurde (touchdown) sowie einem extension step bei 72 °C für 2 min. Es folgte ein letzter extension step bei 72 °C für 10 min. Dann wurde das Reaktionsgefäß langsam auf 4 °C heruntergekühlt.

### 3.1.2.5. Gel-Elektrophorese

Zur bildlichen Darstellung der in der PCR gewonnenen Amplifikate erfolgte eine Gel-Elektrophorese in einem 2%-igen Agarose-Gel. Hierzu wurden 3000 mg Agarose-Gel-Pulver (Appligene oncor<sup>®</sup>, Deutschland) in 150 ml 1x Elektrophorese-Puffer (Zusammensetzung siehe Rezepturanhang) durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. 25 ml des Gels wurden mit 2,5 µl 1%-iger Ethidiumbromidlösung der Firma SIGMA<sup>®</sup> (Steinheim, Deutschland) versetzt, so dass der Farbstoff in einer Endkonzentration von 0,01% vorlag. Nach Umgießen des mit Ethidiumbromid versetzten Gemischs in den Einsatz einer Biometra<sup>®</sup> Agargel Minikammer (Biometra, Deutschland) erfolgte die Herstellung der 12 Probetaschen (engl.: slots) durch Einsatz eines von der Firma Biometra<sup>®</sup> mitgelieferten Kammes in das noch flüssige Gel. Nach Verfestigung der Agarose bei 4 °C wurde der Einsatz in die Biometra<sup>®</sup> Agargel Minikammer eingesetzt, die zuvor mit 250 ml 1x Elektrophorese-Puffer beschickt worden war.

Nach Reinigung von 8,0 µl jeden Amplifikats von anhaftendem Mineröl durch Abziehen auf einem Parafilm<sup>®</sup>-Streifen erfolgte die Mischung mit 2,0 µl Probenpuffer (Zusammensetzung siehe Rezepturanhang) in einem 1,5 ml Eppendorf<sup>®</sup>-Gefäß (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Von diesem Gemisch wurden je 8,0 µl abgenommen und in je eine

Proben tasche des Gels gegeben. Um die Größe des hergestellten Amplifikats zu ermitteln, muss jeweils eine Tasche im Gel mit einer DNA-Leiter (Referenzbanden) befüllt werden. Für diesen Zweck wurde eine 50 bp DNA-Leiter der Firma Invitrogen<sup>®</sup> life technologies (Karlsruhe, Deutschland) verwendet, deren Herstellung im Rezepturanhang beschrieben ist.

Die anschließende Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 75 V für 1 h durchgeführt.

Danach wurde das Gel der Kammer entnommen und unter einem UV-Transilluminator (CAMAG PEPROSTAR II<sup>®</sup>) begutachtet. Es folgte die Fotografie des Gels mit einer Polaroid<sup>®</sup>-Kamera unter Verwendung von Filmen der Firma Polaroid<sup>®</sup> (ISO 3000/36°). Die Anfertigung der Aufnahmen erfolgte bei Blende 22 und einer Belichtungszeit von 6 sec.

#### **3.1.2.6. RFLP-Analyse**

Ein weiterer Weg der molekularen Differenzierung unterschiedlicher Spezies kann mit Hilfe der Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)-Analyse beschriftet werden. Nach Sequenzierung der COI-Amplifikate von *O. felineus*, *O. viverrini*, *C. sinensis*, *M. bilis* und *P. truncatum* wurden die Restriktionsenzyme *Hha* I und *Alu* I der Firma Appligene oncor<sup>®</sup> (Deutschland) ausgewählt, um eine RFLP-Analyse an partiellen COI-Genen der oben angeführten Arten durchzuführen. Hierzu erfolgte die Herstellung eines 30,0 µl Ansatzes, der

aus 20,0  $\mu$ l Amplifikat und 10,0  $\mu$ l „Restriktionsenzymlösung“ bestand. Die „Restriktionsenzymlösung“ für *Hha* I setzte sich wie folgt zusammen: 5 U (U = unit) Enzym (= 0,5  $\mu$ l der Stammlösung mit 10 U/ $\mu$ l) und 9,5  $\mu$ l Puffer (1 mM Tris-HCl, 5 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM 2-Mercaptoethanol, pH 8,0) unter Zusatz von 0,1  $\mu$ g BSA (= Bovines Serum Albumin). Die Zusammensetzung der Reaktionslösung für die Restriktionsendonuklease *Alu* I stellt sich wie folgt dar: 5 U Enzym (= 1,0  $\mu$ l der Stammlösung mit 5 U/ $\mu$ l) und 9,0  $\mu$ l Puffer (1 mM Tris-HCl, 1 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM 2-Mercaptoethanol, pH 7,5) unter Zugabe von 0,1  $\mu$ g BSA.

Je 20,0  $\mu$ l Amplifikat wurden durch Abziehen über Parafilm<sup>®</sup> von anhaftendem Mineralöl befreit, in ein 1,5 ml Schraubdeckelgefäß (SARSTEDT<sup>®</sup>, Nümbrecht, Deutschland) gegeben und mit 10,0  $\mu$ l der Enzymlösung jeweils nur einer Restriktionsendonuklease gründlich gemischt. Die beschriebenen Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt, um einen vorzeitigen Start der enzymatischen Reaktion zu vermeiden. Die enzymatische Spaltung erfolgte bei 37 °C über Nacht im Wasserbad. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße entnommen, die Schraubdeckel entfernt und die Produkte in einem Eppendorf<sup>®</sup> Concentrator 5301 (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei 60 °C 45 min bis zum vollständigen Flüssigkeitsentzug konzentriert, um eine bessere Darstellung der Produkte in der Gel-Elektrophorese zu gewährleisten. Nach Resuspension des Konzentrats mit 8,0  $\mu$ l

RNAase/DNAase freiem Wasser unter Zusatz von 2,0 µl Probenpuffer konnten 8,0 µl des Gemischs pro Probenflasche in der Elektrophorese eingesetzt werden. Die Gel-Elektrophorese wurde in gleicher Weise, wie unter Punkt 3.1.2.5 beschrieben, durchgeführt. Da jedoch durch den Restriktionsschnitt mit kleineren Produkten zu rechnen war, wurde anstatt des 2%-igen Agarose-Gels ein 3%-iges Agarose-Gel verwendet. Kleinere Produkte werden durch ein Gel mit höherer Konzentration stärker in Form gehalten, so dass sich bei Betrachtung unter UV-Licht verglichen mit Einsatz eines niedrig konzentrierten Agarose-Gels schärfere Banden abzeichnen.