

3.2. Untersuchungsergebnisse

3.2.1. Etablierung der Lebenszyklen unter Laborbedingungen

3.2.1.1. Infektion der Zwischenwirtsschnecken

6–8 Wochen p. inf. schieden die infizierten Zwischenwirtsschnecken die für opisthorchiide Leberegelarten typischen Pleurolophozerkarien aus. Die Ausscheidung erfolgte bei mit *M. bilis*- und *P. truncatum*-Eiern infizierten *B. tentaculata* bereits nach 42 Tagen, bei mit *O. felineus*-Eiern infizierten *B. leachi* erst nach 56 Tagen. Bei den mit *M. xanthosomus*-Eiern infizierten *B. tentaculata* konnten auch nach 8 Wochen noch keine Pleurolophozerkarien nachgewiesen werden, so dass dieser Infektionsversuch als nicht erfolgreich bezeichnet werden muss. Darüber hinaus schieden alle untersuchten Schnecken zusätzlich noch Zerkarien vom monostomen Typ (Notocotylidae) sowie Xiphidozerkarien (Plagiorchidae) aus.

3.2.1.2. Infektion der Goldorfen

Nach Tötung je einer infizierten Goldorfe pro Aquarium 6 Wochen p. inf. und anschließender peptischer Verdauung konnten die in Tab. 5 dargestellten Mengen an Metazerkarien ermittelt werden. Die Infektion der Goldorfen erwies sich somit in allen Fällen erfolgreich. Die isolierten Metazerkarien wurden zur experimentellen Infektion von Endwirten (Goldhamster) verwendet.

Tab. 5: Menge der isolierten opisthorchiiden Metazerkarien aus infizierten Goldorfen

Goldorfe Nr.	Opisthorchiide Leberegelspezies	Zahl der isolierten Metazerkarien	Infektionsdosis für Goldhamster
1	<i>O. felineus</i>	27	27
2	<i>M. bilis</i>	350	300
3	<i>P. truncatum</i>	163	100

3.2.1.3 Ergebnisse der parasitologischen Sektionen

a) Goldhamster

Bei der Sektion des mit *O. felineus*-Metazerkarien infizierten Goldhamsters konnte lediglich ein Exemplar eines adulten *O. felineus* aus dem Hauptgallengang isoliert werden, aus

welchem DNA zur Durchführung der PCR extrahiert wurde. Gallenblase, Gallengänge und Lebergewebe waren makroskopisch unauffällig.

Bei dem mit *M. bilis*-Metazerkarien infizierten Hamster fiel makroskopisch der stark dilatierte und fibrotische Ductus choledochus auf. Auch die Gallengänge und die Wand der Gallenblase waren fibrotisch verdickt. Aus der Gallenblase konnten insgesamt 30, nach Quetschung und Spülung des Lebergewebes weitere 16 adulte *M. bilis* isoliert werden. Eines dieser Exemplare wurde ebenfalls als Ausgangsmaterial für die PCR verwendet.

Bei der parasitologischen Sektion des mit *P. truncatum*-Metazerkarien infizierten Goldhamsters konnten keine Leberegel gewonnen werden. Gallenblase und Lebergewebe waren makroskopisch unauffällig.

b) Hauskatze

Bei der Sektion der Hauskatze fiel insbesondere das sehr stark dilatierte Gallengangssystem und die enorm erweiterte Gallenblase auf. Aus dieser flossen nach Eröffnung ca. 10 ml eines glasklaren, zähen Schleims ab. Insgesamt konnten aus Gallenblase und Gallengängen 98 *P. truncatum*, ca. 1200 *M. bilis* und 3 *O. felineus* isoliert werden, die als Ausgangsmaterial für die molekularbiologische Studien sowie zur Infektion von Zwischenwirtsschnecken genutzt wurden.

c) Haushühner

Bei beiden mit *M. xanthosomus*-Metazerkarien infizierten Haushühnern konnten adulte Exemplare von *M. xanthosomus* (Huhn 1: 8 Exemplare, Huhn 2: 17 Exemplare) nur aus der Gallenblase gewonnen werden. Die Gallenblasen waren leicht dilatiert, ihre Wand fibrotisch verdickt und die Oberfläche der Schleimhaut von rauher Beschaffenheit. Im Lumen der Gallenblase fanden sich neben den Leberegeln auch zahlreiche grüne Konkreme. Die isolierten Parasiten wurden für molekularbiologische Versuche und zur Infektion von *B. tentaculata* genutzt.

3.2.2. Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen

3.2.2.1. Menge und Reinheit der extrahierten DNA

Menge und Reinheit der extrahierten DNA wurden, wie unter 3.1.2.2 aufgeführt, bestimmt.

Die Menge an DNA lag bei den Extrakten der untersuchten Spezies zwischen 3,9 µg/ml und 8,7 µg/ml, durchschnittlich bei 6,3 µg/ml. Aus dieser Menge wurden jeweils 20 ng entnommen und pro Ansatz in der PCR verwendet. Für die Reinheit der DNA konnten Werte zwischen 97% und 100%, im Durchschnitt 98,5%, ermittelt werden. Dies deckt sich mit den Werten für die Menge an Protein im Extrakt, die alle unterhalb der Nachweisgrenze lagen.

3.2.2.2. Amplifikation mit COI-Primern und Sequenzanalyse

Die Amplifikation mitochondrialer DNA von *O. felineus*, *C. sinensis*, *M. bilis*, *M. xanthosomus* und *P. truncatum* lieferte unter Einsatz von COI-Primern stets Produkte von ca. 440 bp, bei *O. viverrini* hingegen ein Produkt von ca. 630 bp (siehe Abb. 7). Die Testung der DNA von Zwischenwirtsschnecke (*B. leachi*), Goldorfe (*Leuciscus idus*) und Rotfuchs (*Vulpes vulpes*) mit COI-Primern ergab ein negatives Resultat. Dagegen konnten von insgesamt 5 unterschiedlichen Zestodenspezies, die bei Fleischfressern parasitieren, ebenfalls mit Hilfe der angeführten Primer Produkte mit einer Länge von ca. 440 bp erzielt werden (siehe Abb. 8).

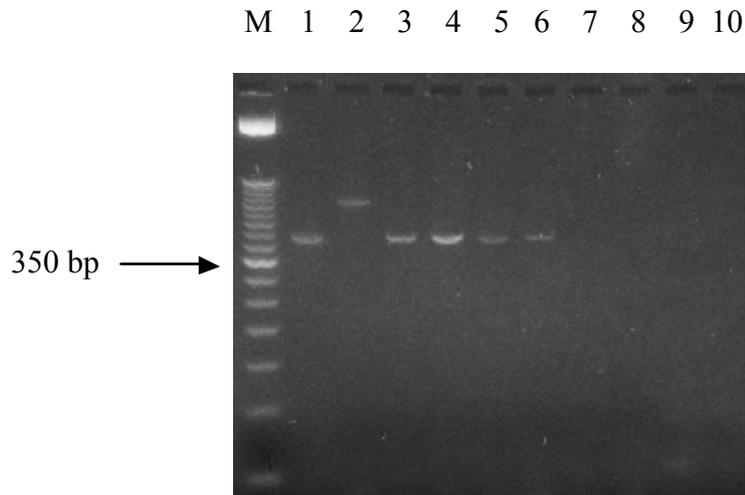


Abb. 7: COI-Amplifikate opisthorchiider Leberegelspezies und Negativkontrollen

Spur	Leberegelspezies	Isolat aus Endwirt
1	<i>O. felineus</i>	Goldhamster (<i>Mesocricetus auratus</i>)
2	<i>O. viverrini</i>	Goldhamster (<i>Mesocricetus auratus</i>)
3	<i>C. sinensis</i>	Goldhamster (<i>Mesocricetus auratus</i>)
4	<i>M. bilis</i>	Goldhamster (<i>Mesocricetus auratus</i>)
5	<i>M. xanthosomus</i>	Haushuhn (<i>Gallus gallus f. domesticus</i>)
6	<i>P. truncatum</i>	Mink (<i>Mustela vison</i>)

M = 50 bp Leiter, Spur 7: *B. leachi* (Kopfgewebe), 8: *Leuciscus idus* (Muskulatur), 9: *Vulpes vulpes* (Leber), 10: H₂O

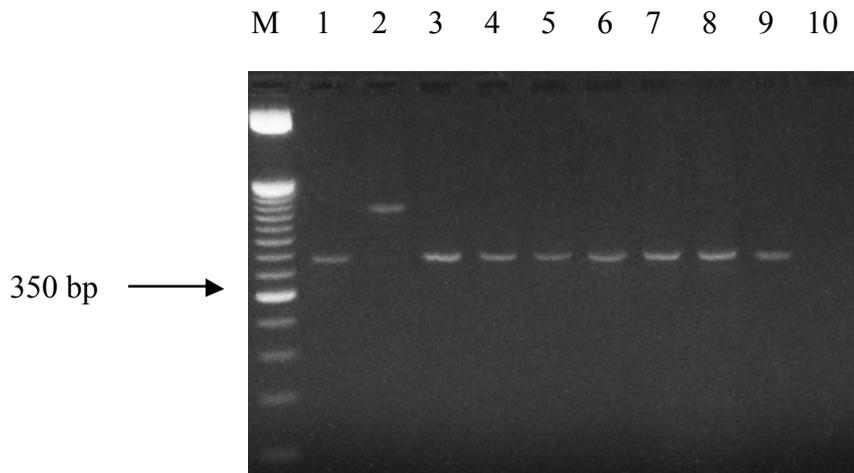


Abb. 8: COI-Amplifikate opisthorchiider Leberegelpezies und verschiedener Zestoden

M: 50 bp Leiter, Spur 1: *O. felineus*, 2: *O. viverrini*, 3: *C. sinensis*, 4: *M. bilis*, 5: *J. pasqualei*, 6: *T. crassiceps*, 7: *T. polyacantha*, 8: *T. hydatigena*, 9: *Mesocestoides* sp., 10: H₂O

Aufgrund der Kreuzreaktionen der COI-Primer mit DNA von Zestoden wurden die Produkte der opisthorchiiden Leberegelpezies zur Sequenzanalyse gegeben. Die Sequenzen der mitochondrialen partiellen COI-Gene von *O. felineus*, *C. sinensis*, *M. bilis* und *P. truncatum* wiesen jeweils eine Länge von 444 bp auf. Beim direkten Vergleich dieser vier Sequenzen konnten die in Tab. 6 angeführten Unterschiede festgestellt werden. Die Basenabfolge der Untereinheit des COI-Gens von *M. xanthosomus* weist durch Deletion der Basen in Position 417–419 im Vergleich zu den Sequenzen der oben angeführten Arten lediglich eine Länge von 441 bp auf. Die partielle COI-Sequenz von *O. viverrini* ist mit 636 bp die längste der

untersuchten Spezies. Die vollständigen Sequenzen aller untersuchten opisthorchiiden Leberegelarten befinden sich im Anhang.

Tab. 6: Unterschiede (in bp und %) im COI-Gen opisthorchiider Leberegelspezies

	<i>O. felineus</i>	<i>C. sinensis</i>	<i>M. bilis</i>
<i>O. felineus</i>	-	-	-
<i>C. sinensis</i>	51 bp = 11,48%	-	-
<i>M. bilis</i>	108 bp = 24,32%	104 bp = 23,42%	-
<i>P. truncatum</i>	65 bp = 14,64%	52 bp = 11,71%	104 bp = 23,42%

3.2.2.3. Amplifikation mit OF- Primern

Anhand der partiellen COI-Sequenz von *O. felineus* konnten mit Hilfe des Primer-Synthese-Programms Oligos[®] 1999-2002 Version 9.4 geeignete Primer (siehe 3.1.2.3) konstruiert werden, die einen Teil der konservativen Region der Untereinheit des COI-Gens, nämlich zwischen Position 90 und 290, amplifizieren. Somit ergibt die Amplifikation mitochondrialer DNA von *O. felineus* unter Einsatz von OF-Primern ein Produkt mit einer Länge von genau 201 bp. Dies konnte an 10 unterschiedlichen Exemplaren von *O. felineus*, die aus verschiedenen Endwirten isoliert worden waren, nachgewiesen werden (siehe Abb. 9). Bei

Testung der OF-Primer mit Zestoden-DNA, Zwischenwirts-DNA sowie mit DNA der einheimischen opisthorchiiden Leberegelarten *P. truncatum* und *M. bilis* traten keine Kreuzreaktionen auf (siehe Abb. 10–12). Vergleicht man das amplifizierte Produkt von *O. felineus* (201 bp) direkt mit dem entsprechenden Abschnitt der partiellen COI-Sequenz von *M. bilis*, ergibt sich ein Unterschied von 84 bp (= 41,8%).

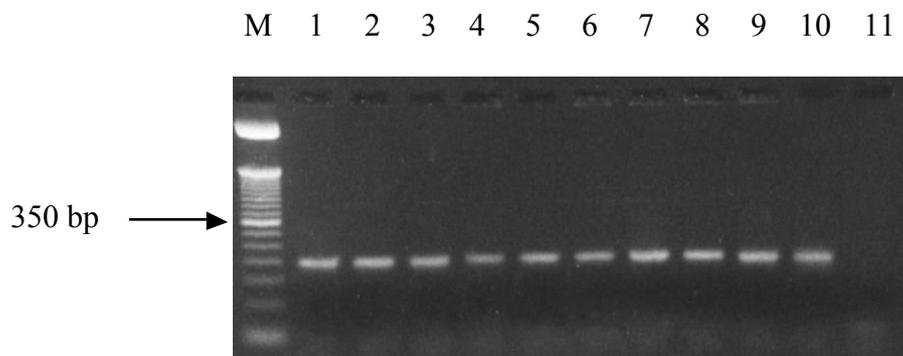


Abb. 9: OF- Amplifikate von *O. felineus*-Exemplaren aus unterschiedlichen Endwirten

Spur	Isolat aus Endwirt
1	Goldhamster (<i>Mesocricetus auratus</i>)
2	Hauskatze (<i>Felis silvestris</i> f. <i>catus</i>)
3	Rotfuchs (<i>Vulpes vulpes</i>) 1
4	Rotfuchs (<i>Vulpes vulpes</i>) 2
5	Rotfuchs (<i>Vulpes vulpes</i>) 3
6	Rotfuchs (<i>Vulpes vulpes</i>) 4
7	Rotfuchs (<i>Vulpes vulpes</i>) 5
8	Rotfuchs (<i>Vulpes vulpes</i>) 6
9	Bisamratte (<i>Ondatra zibethica</i>)
10	Mensch (<i>Homo sapiens</i>)

M = 50 bp Leiter, Spur 11: H₂O

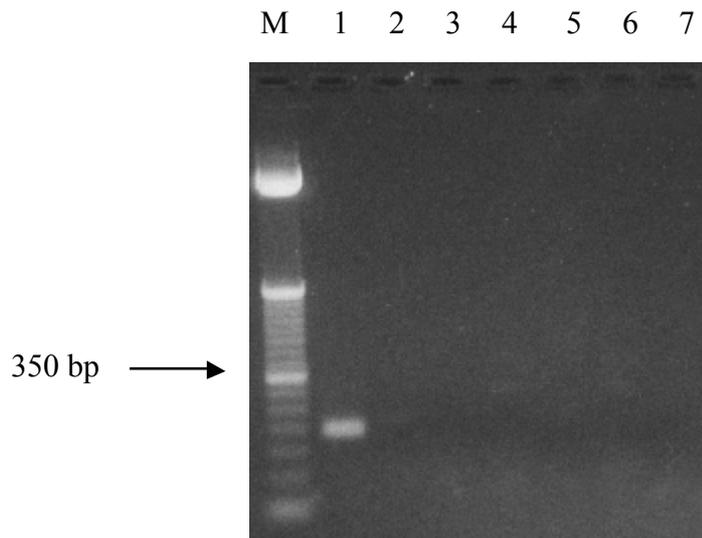


Abb. 10: Testung von OF-Primern mit DNA verschiedener Zestoden der Fleischfresser

M = 50 bp Leiter, Spur 1: *O. felineus* (Positivkontrolle), 2: *J. pasqualei*, 3: *T. crassiceps*, 4: *T. polyacantha*, 5: *T. hydatigena*, 6: *Mesocestoides* sp., 7: H₂O

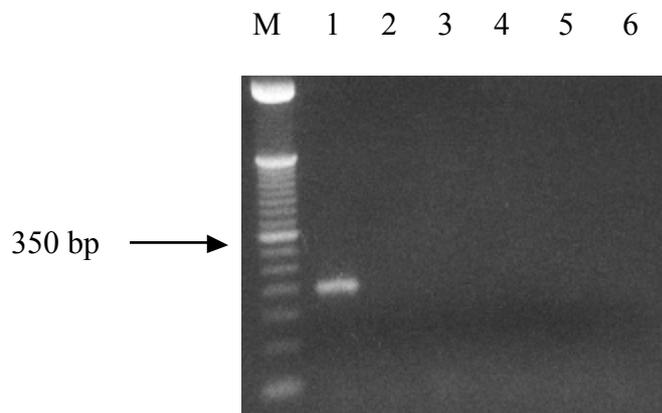


Abb. 11: Testung von OF-Primern mit *P. truncatum*-DNA und Wirts-DNA

M = 50 bp Leiter, Spur 1: *O. felineus* (Positivkontrolle), 2: *P. truncatum*, 3: *B. leachi* (Kopfgewebe), 4: *Leuciscus idus* (Muskulatur), 5: *Vulpes vulpes* (Leber), 6: H₂O

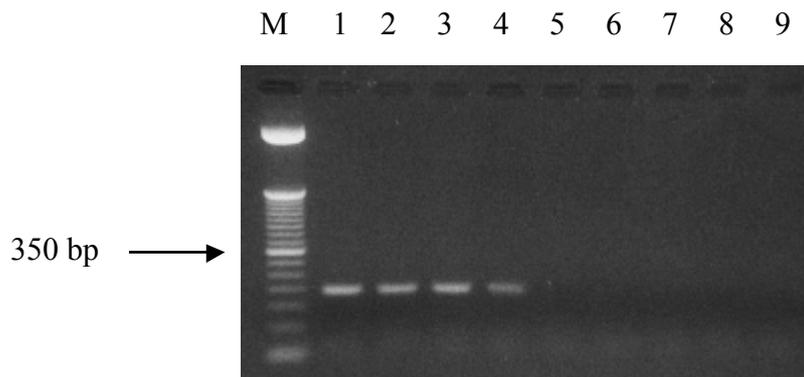


Abb. 12: Testung von OF-Primern mit DNA von *M. bilis*

Spur	Leberegelspezies	Isolat aus Endwirt
1	<i>O. felineus</i>	Goldhamster (<i>Mesocricetus auratus</i>)
2	<i>O. felineus</i>	Hauskatze (<i>Felis silvestris</i> f. <i>catus</i>)
3	<i>O. felineus</i>	Rotfuchs (<i>Vulpes vulpes</i>) 1
4	<i>O. felineus</i>	Rotfuchs (<i>Vulpes vulpes</i>) 2
5	<i>M. bilis</i>	Goldhamster (<i>Mesocricetus auratus</i>)
6	<i>M. bilis</i>	Hauskatze (<i>Felis silvestris</i> f. <i>catus</i>)
7	<i>M. bilis</i>	Rotfuchs (<i>Vulpes vulpes</i>) 1
8	<i>M. bilis</i>	Rotfuchs (<i>Vulpes vulpes</i>) 2

M = 50 bp Leiter, Spur 9: H₂O