

3.2.2.4. Amplifikation mit MB-Primern

Bei der Auswahl von spezifischen Primern zur Amplifikation der konservativen Region der Untereinheit des COI-Gens von *M. bilis* wurde in gleicher Weise vorgegangen wie unter 3.2.2.3 beschrieben. Die konstruierten MB-Primer amplifizieren ein Produkt von genau 116 bp und zwar zwischen Position 176 und 291 der partiellen COI-Sequenz. Produkte dieser Länge konnten mit Hilfe der MB-Primer bei 10 *M. bilis*-Exemplaren, die von verschiedenen Endwirten isoliert worden waren, gewonnen werden (siehe Abb. 13). Zusätzlich erfolgte eine Testung der MB-Primer mit DNA von unterschiedlichen Zestoden der Fleischfresser, von *P. truncatum*, den Zwischenwirtsspezies und mit DNA von *O. felineus*. Dabei traten mit DNA von *T. crassiceps*, *T. polyacantha*, *T. hydatigena* (Abb. 14), *Leuciscus idus* (Abb. 15) und DNA von zwei *O. felineus*-Exemplaren (Abb. 16) schwache Kreuzreaktionen auf, wobei die amplifizierten Produkte jedoch nicht im Bereich des für *M. bilis* spezifischen Produkts von 116 bp lagen. Das mit MB-Primern amplifizierte Produkt von 116 bp Länge unterscheidet sich zu 39,7% (= 46 bp) von dem entsprechenden Abschnitt der partiellen COI-Sequenz von *O. felineus*.

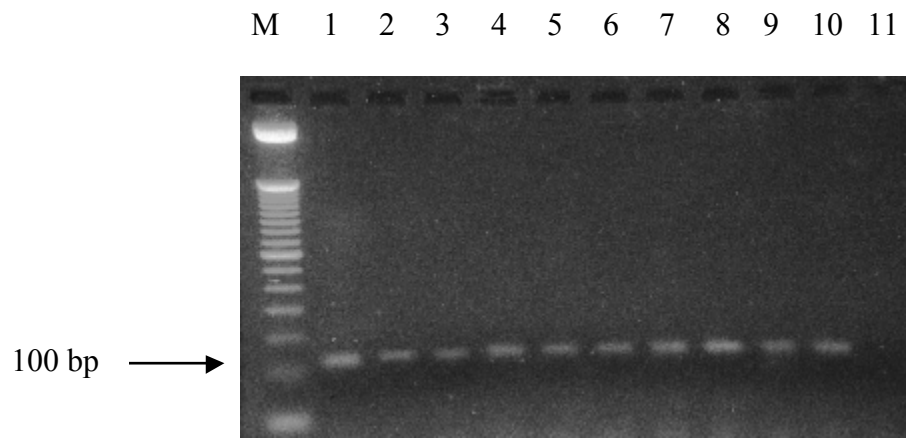


Abb. 13: MB-Amplifikate von *M. bilis*-Exemplaren aus unterschiedlichen Endwirten

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	Rotfuchs (<i>Vulpes vulpes</i>) 7
10	Rohrweihe (<i>Circus aeruginosus</i>)

M = 50 bp Leiter, Spur 11: H₂O

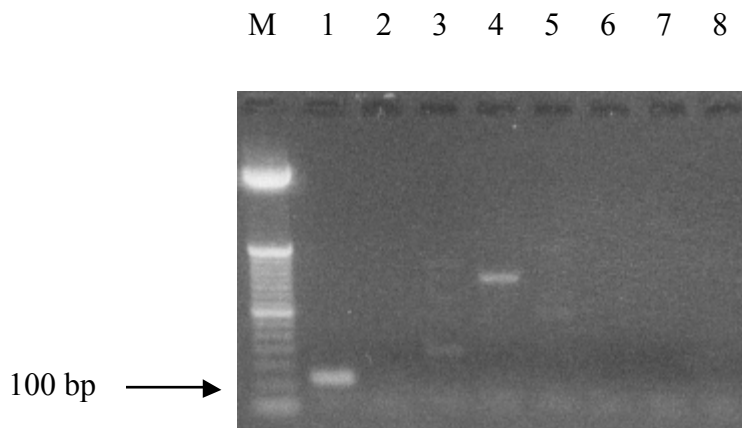


Abb. 14: Testung von MB-Primern mit DNA verschiedener Zestoden der Fleischfresser

M = 50 bp Leiter, Spur 1: *M. bilis* (Positivkontrolle), 2: *J. pasqualei*, 3: *T. crassiceps*, 4: *T. polyacantha*, 5: *T. hydatigena*, 6: *Mesocestoides* sp., 7: *Hydatigera taeniiformis*, 8: H₂O

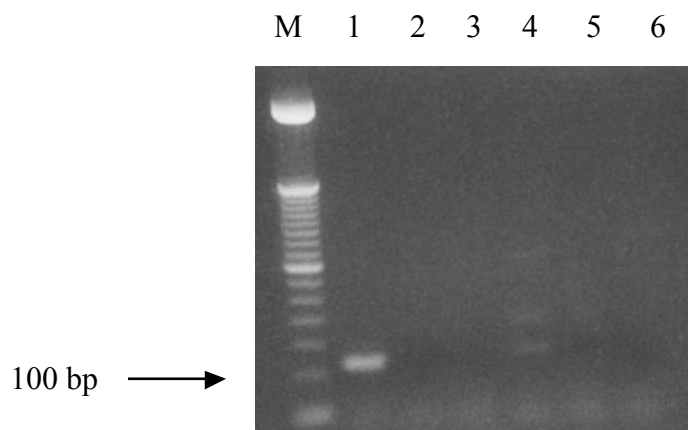


Abb. 15: Testung von MB-Primern mit *P. truncatum*-DNA und Wirts-DNA

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

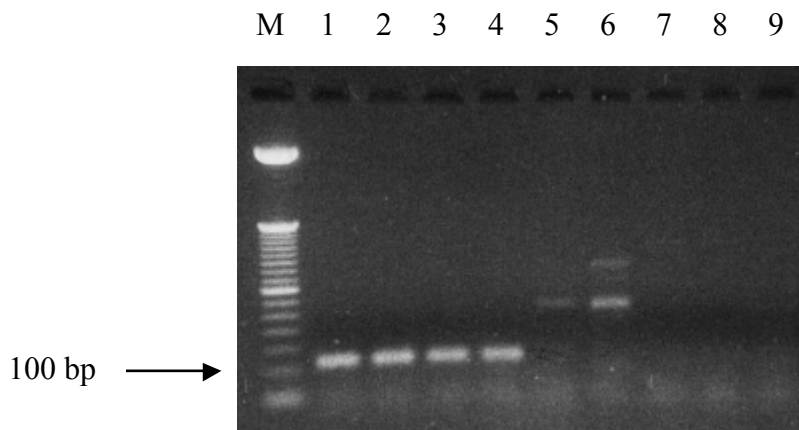


Abb. 16: Testung von MB-Primern mit DNA von *O. felineus*

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

M = 50 bp Leiter, Spur 9: H₂O

3.2.2.5. Testung der analytischen Sensitivität von OF- und MB-Primern

Bei Testung der analytischen Sensitivität der OF-Primer konnte DNA von *O. felineus* nach Verdünnung bis zu einer Menge von 10 pg nachgewiesen werden (siehe Abb. 17). *M. bilis*-DNA ließ sich bei Verwendung der MB-spezifischen Primern noch bis zu einem Gehalt von 100 fg amplifizieren (siehe Abb. 18).

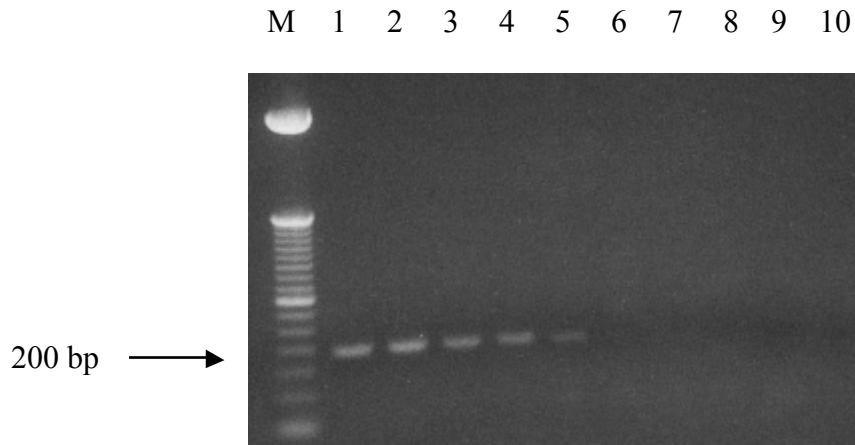


Abb. 17: Testung der analytischen Sensitivität von OF-Primern mit *O. felineus*-DNA

M = 50 bp Leiter, Spur 1: 20 ng 2: 10 ng 3: 1 ng 4: 100 pg 5: 10 pg 6: 1 pg 7: 100 fg
8: 10 fg 9: 1 fg 10: H₂O

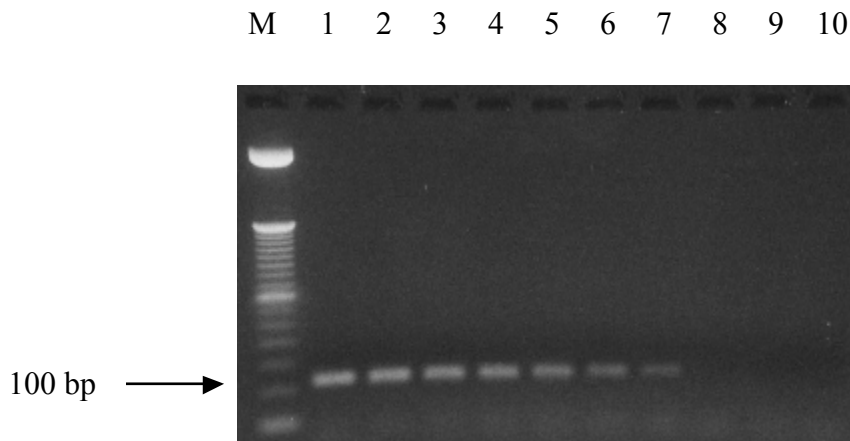


Abb. 18: Testung der analytischen Sensitivität von MB-Primern mit *M. bilis*-DNA

M = 50 bp Leiter, Spur 1: 20 ng 2: 10 ng 3: 1 ng 4: 100 pg 5: 10 pg 6: 1 pg 7: 100 fg
8: 10 fg 9: 1 fg 10: H₂O

3.2.2.6. Nachweis von Leberegel-DNA im Fuchskot mittels OF- und MB-Primer

Insgesamt wurden 12 Kotproben von 6 experimentell infizierten Silberfüchsen jeweils mit OF- und MB-Primern auf das Vorliegen von *O. felineus*- und *M. bilis*-DNA in der PCR getestet und die Ergebnisse mit den zuvor ermittelten EpG-Zahlen verglichen. Die Ergebnisse sind in Tab. 7 und Abb. 19 und 20 dargestellt. Dabei traten bei der Testung von *O. felineus*- und *M. bilis*-DNA mit den jeweiligen spezifischen Primern bei *O. felineus* zwei falsch negative Ergebnisse und bei *M. bilis* ein falsch negatives Resultat auf. Alle weiteren Resultate stimmen mit den Ergebnissen der EpG-Zählung überein.

Tab. 7: Nachweis opisthorchiider Leberegel-DNA in Kotproben von Silberföchsen unter Einsatz von OF- und MB-Primern in der PCR

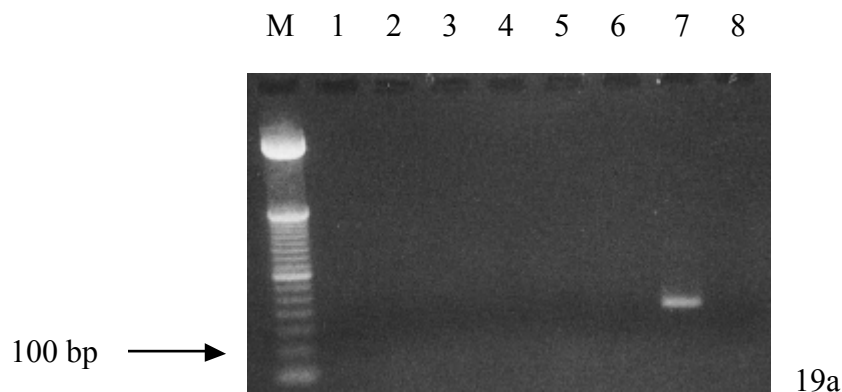
Proben-Nr.	Fuchs-Nr.	Wochen p. inf.	Lebergelspezies	EpG	OF-Primer	MB-Primer
1	1	prae inf.	neg	0	neg	neg
2	3	prae inf.	neg	0	neg	neg
3	1	3	<i>O. felineus</i> ¹	0	neg	neg
4	1	5	<i>O. felineus</i> ¹	110	neg ³	neg
5	1	6	<i>O. felineus</i> ¹	30	pos	neg
6	2	6	<i>O. felineus</i> ¹	23	neg ³	neg
7	3	3	<i>M. bilis</i> ¹	0	neg	neg
8	3	6	<i>M. bilis</i> ¹	350	neg	pos
9	3	10	<i>M. bilis</i> ¹	147	neg	pos
10	4	28	<i>M. bilis</i> ¹	50	neg	neg ³
11	5	4	unbekannt ²	1200	neg	pos
12	6	3	unbekannt ²	1663	neg	pos

¹ reine Infektion mit *O. felineus* bzw. *M. bilis*

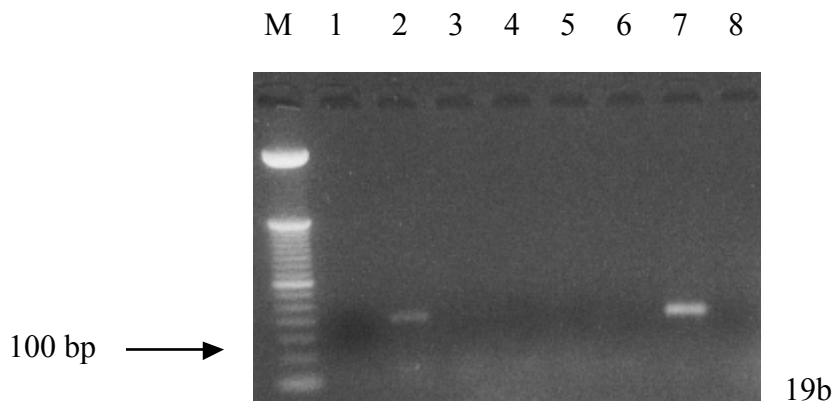
² Blindinfektion durch Verfütterung spontan infizierter Alande und Güstern aus dem Teltow-Kanal

³ falsch negatives Resultat

Abb. 19 a u. b: Testung von OF-Primern mit DNA opisthorchiider Leberegel im Fuchskot



Spur	Proben-Nr. ¹
1	3
2	7
3	12
4	11
5	1
6	2

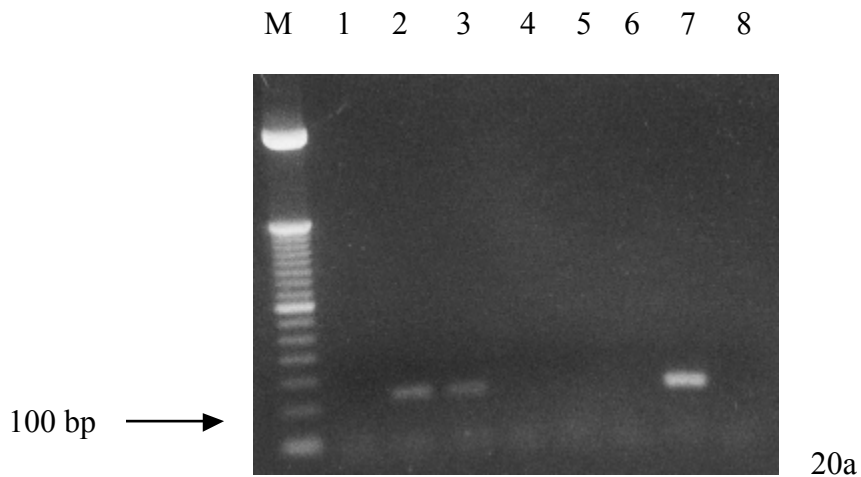


Spur	Proben-Nr. ¹
1	4
2	5
3	6
4	8
5	9
6	10

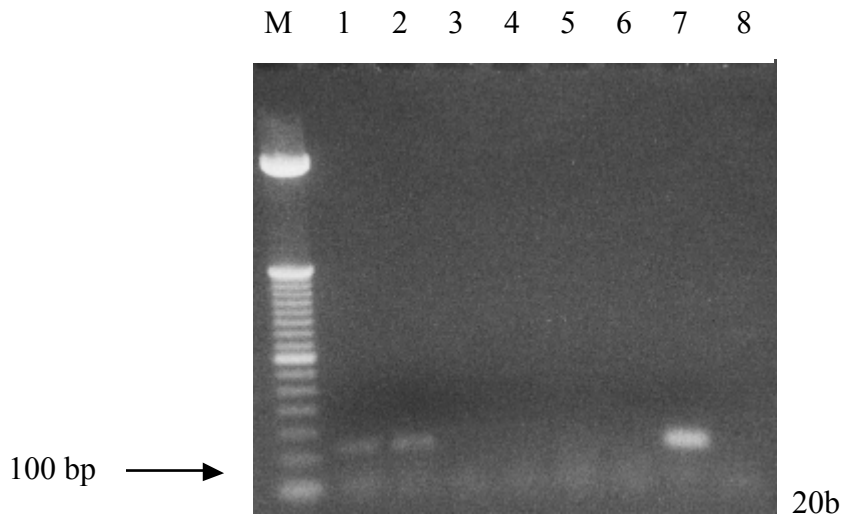
¹ entspricht der Proben-Nr. aus Tab. 7

M = 50 bp Leiter, Spur 7: *O. felineus* (Positivkontrolle), 8: H₂O

Abb. 20 a u. b: Testung von MB-Primern mit DNA opisthorchiider Leberegel im Fuchskot



Spur	Proben-Nr. ¹
1	7
2	12
3	11
4	3
5	1
6	2



Spur	Proben-Nr. ¹
1	8
2	9
3	10
4	4
5	5
6	6

¹ entspricht der Proben-Nr. aus Tab. 7

M = 50 bp Leiter, Spur 7: *M. bilis* (Positivkontrolle), 8: H₂O

3.2.2.7. Ergebnisse der RFLP-Analyse

Anhand der vorliegenden partiellen COI-Gen-Sequenzen (siehe Anhang) der untersuchten opisthorchiiden Leberegel wurden die Restriktionsenzyme *Alu* I und *Hha* I ausgewählt, um eine RFLP-Analyse durchzuführen. *Alu* I erkennt die Basenfolge AGCT und schneidet zwischen G und C (AG↓CT), während *Hha* I die Sequenz GCGC erkennt und zwischen dem zweiten G und C schneidet (GCG↓C). Betrachtet man sich die partielle COI-Sequenz von *O. felineus*, stellt man fest, dass die Basenabfolge AGCT nur einmal zwischen Position 156 und

159 auftritt. Folglich wird die komplette Sequenz nach Schnitt mit *Alu* I in zwei Teilstücke von 157 bp und 287 bp zerlegt. Die Summe der beiden Teilstücke ergibt wiederum die Länge der Gesamtsequenz von 444 bp (siehe 3.2.2.2). Bei *C. sinensis* dagegen tritt AGCT zweimal innerhalb der Sequenz auf (zwischen Position 156 und 159 und zwischen Position 208 und 211), so dass nach Restriktionsverdauung mit *Alu* I vier Teilstücke von 157 bp, 287 bp, 209 bp und 235 bp entstehen, wobei die Summe der ersten beiden und die Summe der letzten beiden Teilstücke wiederum jeweils 444 bp ergibt. Weder bei *O. felineus* noch bei *C. sinensis* kommt die Basenabfolge GCGC vor, weshalb die partiellen COI-Gene keiner der beiden Arten mit *Hha* I geschnitten werden können. Die Untereinheit der COI-Sequenz von *M. bilis* enthält sowohl die Basenabfolge AGCT (Zwischen Position 117 und 120) als auch GCGC (zwischen Position 157 und 160). Bei Einsatz von *Alu* I erhält man somit zwei Schnittprodukte (118 bp und 326 bp), deren Summe wiederum 444 bp ergibt. *Hha* I schneidet die Sequenz ebenfalls in zwei Stücke, nämlich in 157 bp und 287 bp (Summe = 444 bp). In den Untereinheiten der COI-Sequenzen von *O. viverrini* und *P. truncatum* tritt weder die Basenabfolge AGCT noch GCGC auf, wodurch das partielle COI-Gen beider Arten weder mit *Alu* I noch mit *Hha* I geschnitten werden kann.

Die oben aufgeführten theoretischen Ergebnisse ließen sich durch Restriktionsschnitt der COI-Amplifikate opisthorchiider Leberegel mit Hilfe der genannten Endonukleasen bestätigen (siehe Abb. 21). Auffallend ist, dass bei der RFLP-Analyse von *C. sinensis* nur drei Produkte sichtbar werden anstatt vier. Zwei der vier Teilstücke sind aber annähernd

gleichgroß (209 bp und 235 bp). Diese erscheinen bei der abgebildeten Auftrennung als eine Bande.

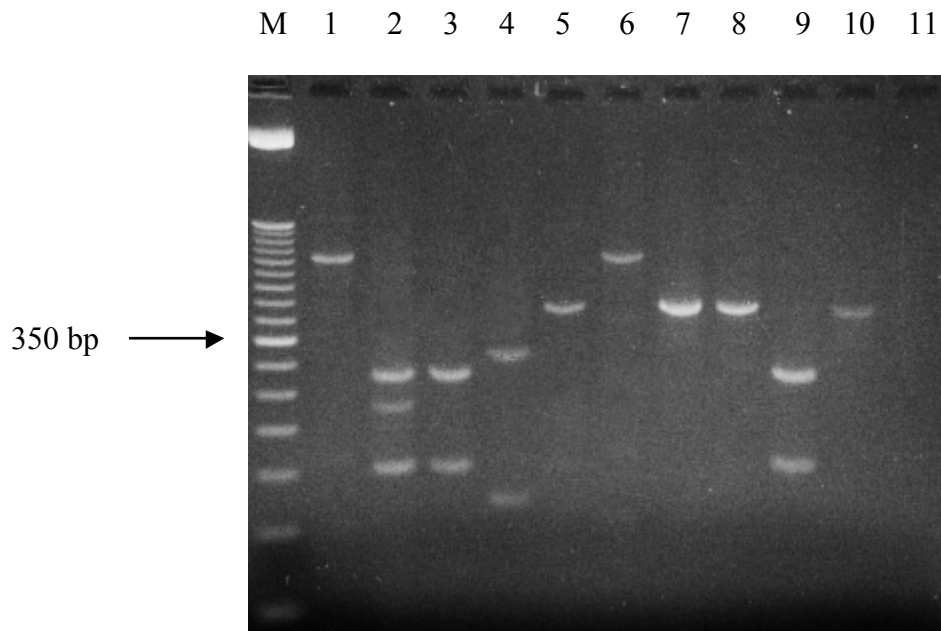


Abb. 21: RFLP-Analyse opisthorchiider Trematoden mit *Alu* I und *Hha* I

Spur	Leberegelartspezies	Endonuklease	Isolat aus Endwirt
1	<i>O. viverrini</i>	<i>Alu</i> I	Goldhamster (<i>Mesocricetus auratus</i>)
2	<i>C. sinensis</i>	<i>Alu</i> I	Goldhamster (<i>Mesocricetus auratus</i>)
3	<i>O. felineus</i>	<i>Alu</i> I	Goldhamster (<i>Mesocricetus auratus</i>)
4	<i>M. bilis</i>	<i>Alu</i> I	Goldhamster (<i>Mesocricetus auratus</i>)
5	<i>P. truncatum</i>	<i>Alu</i> I	Hauskatze (<i>Felis silvestris</i> f. <i>catus</i>)
6	<i>O. viverrini</i>	<i>Hha</i> I	Goldhamster (<i>Mesocricetus auratus</i>)
7	<i>C. sinensis</i>	<i>Hha</i> I	Goldhamster (<i>Mesocricetus auratus</i>)
8	<i>O. felineus</i>	<i>Hha</i> I	Goldhamster (<i>Mesocricetus auratus</i>)
9	<i>M. bilis</i>	<i>Hha</i> I	Goldhamster (<i>Mesocricetus auratus</i>)
10	<i>P. truncatum</i>	<i>Hha</i> I	Hauskatze (<i>Felis silvestris</i> f. <i>catus</i>)

M = 50 bp Leiter, Spur 11: H₂O