

5. Zusammenfassung

Der wiederholte Nachweis der als Zoonoseerreger geltenden opisthorchiiden Leberegel bei den entsprechenden End- und Zwischenwirten im Gebiet von Berlin-Brandenburg ließ erkennen, dass diese Trematoden auch in Deutschland eine potentielle Gefahr für die einheimische Bevölkerung darstellen. Da eine Differenzierung der Eier verschiedener opisthorchiider Leberegelspezies im Kot der Endwirte mittels Lichtmikroskopie nicht möglich ist, entstand die Idee, den Nachweis und die Unterscheidung der Eier mittels molekularbiologischer Methoden (PCR und RFLP-Analyse) zu führen. Hierfür wurde zunächst ein Verfahren entwickelt, mit welchem adulte Exemplare der verschiedenen Trematodenspezies differenziert werden konnten. Die benötigten adulten Leberegel wurden einerseits aus experimentell infizierten Säugetieren und Vögeln, andererseits aus natürlich infizierten Endwirten isoliert.

Mit Hilfe von Primern, die eine Teilsequenz der mitochondrialen Cytochrom C Oxidase I (COI) in der PCR amplifizieren, konnten Produkte von ca. 440 bp für die untersuchten opisthorchiiden Trematodenarten (*O. felineus*, *C. sinensis*, *M. bilis*, *M. xanthosomus*, *P. truncatum*) und ein Produkt von ca. 630 bp für die Spezies *O. viverrini* gewonnen werden. Auf dieser Ebene war bereits eine Differenzierung der morphologisch nicht unterscheidbaren Exemplare von *O. felineus* und *O. viverrini* möglich. Da die eingesetzten COI-Primer aber mit der DNA verschiedener Zestoden der Fleischfresser kreuz reagierten, wurden die Amplifikate

der untersuchten opisthorchiiden Trematodenspezies sequenziert, um anhand der vorliegenden Sequenzen speziesspezifische Primer zu konstruieren, die jeweils nur in der entsprechenden variablen Region der Teilsequenz des COI-Gens binden. Solche spezifischen Primer konnten zunächst für die am häufigsten vorkommenden einheimischen Arten *O. felineus* und *M. bilis* synthetisiert werden (OF- und MB-Primer). Diese wurden mit DNA von je 10 *O. felineus* und 10 *M. bilis*, die aus verschiedenen Endwirten isoliert worden waren, sowie mit DNA von *P. truncatum*, von Zestoden und mit DNA der Zwischenwirtsspezies getestet. Außerdem erfolgte die Überprüfung der analytischen Sensitivität durch Verdünnung von 20 ng DNA je eines *O. felineus*- und *M. bilis*-Isolats bis zu einem Gehalt von 1 fg. Bei den durchgeführten Versuchen ergab sich eine Spezifität von 100% für OF- und MB-Primer. Die Nachweisgrenze für *O. felineus*-DNA lag bei 10 pg, die für *M. bilis*-DNA bei 100 fg. Durch Einsatz von OF- und MB-Primern war es außerdem möglich, DNA opisthorchiider Trematodeneier im Kot experimentell infizierter Silberfische nachzuweisen und zu differenzieren. Die hierbei aufgetretenen Probleme werden in der vorliegenden Arbeit diskutiert.

Als weitere Methode der molekularen Differenzierung diente die RFLP-Analyse von COI-Amplifikaten der Spezies *O. felineus*, *O. viverrini*, *C. sinensis*, *M. bilis* und *P. truncatum* unter Verwendung der Endonukleasen *Alu* I und *Hha* I. Dabei konnte bereits durch den alleinigen Einsatz von *Alu* I eine Unterscheidung der oben angeführten Arten erreicht werden.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass die in den eigenen Untersuchungen etablierte PCR und RFLP-Analyse zur molekularen Differenzierung von opisthorchiiden Leberegeln herangezogen werden kann. Die verwendeten Methoden können als Grundlage für weiterführende Studien dienen, z.B. für den Nachweis und die Differenzierung opisthorchiider Metazerkarien im Fischgewebe oder parthenogenetischer Stadien opisthorchiider Trematoden in Zwischenwirtsschnecken.

6. Summary

Molecular characterization of trematodes of the family Opisthorchiidae using PCR and RFLP-analysis, including a contribution to the molecular detection of eggs from the species *Opisthorchis felineus* (Rivolta, 1884) and *Metorchis bilis* (Braun, 1790) in fecal samples of foxes.

Repeated findings of opisthorchiid liver flukes, which are zoonotic agents, in intermediate and definitive hosts in the area of Berlin-Brandenburg indicates, that these trematodes are a potential risk for the indigenous human population in Germany. Since the differentiation of opisthorchiid eggs, which belong to different species, is not possible in the feces of final hosts using light-microscopy, the idea was borne to detect and differentiate these eggs with molecular methods (PCR = Polymerase chain reaction and RFLP-analysis = Restrictionfragment-length-polymorphism-analysis). For this a method was developed, by the aid of which adult specimens of the different opisthorchiid species could be distinguished. The required liver flukes were isolated from experimental infected mammals and birds or from natural infected definitive hosts.

Using a primer-pair, which amplified a partial sequence of mitochondrial cytochrome C oxidase I (COI) in PCR, products of nearly 440 bp (bp = basepairs) for the examined species (*O. felineus*, *C. sinensis*, *M. bilis*, *M. xanthosomus* and *P. truncatum*) and a product of nearly

630 bp for *O. viverrini* were obtained. Already at this level the differentiation of morphologically not distinguishable specimens of *O. felineus* and *O. viverrini* was possible. Since COI-primers showed crossreactivity with the DNA of different cestodes of carnivores, the amplicons of the examined opisthorchiid trematodes were analysed by sequencing. The obtained sequences were used to construct species specific primers, which bind only in the variable region of the partial sequence of the COI-gene. Such specific primers could be synthesized first of all for the most common indigenous species *O. felineus* and *M. bilis* (OF- and MB-primers). These primers were tested with DNA of each ten *O. felineus* and *M. bilis*, which were isolated from different final hosts, as well as with DNA of *P. truncatum*, cestodes and DNA of intermediate hosts (cyprinid fish and snails of the genus *Bithynia*). Furthermore the analytical sensitivity was examined using dilutions from 20 ng of DNA to 1 fg of DNA from an *O. felineus* and a *M. bilis* sample. A specificity of 100% for OF- and MB-primers were obtained in the performed experiments. The limit to detect *O. felineus*-DNA was 10 pg, for DNA of *M. bilis* it was 100 fg.

Using OF- and MB-primers it was also possible to detect and differentiate DNA of opisthorchiid eggs in feces of experimental infected silver foxes. The problems occurring in this experiment are discussed in this thesis.

RFLP-analysis of COI-amplicons from the species *O. felineus*, *O. viverrini*, *C. sinensis*, *M. bilis* and *P. truncatum* using endonucleases *Alu* I and *Hha* I is a further method of molecular differentiation. It was already possible to differentiate all described species using *Alu* I only.

In conclusion it could be stated, that the established PCR and RFLP-analysis are suitable tools to differentiate opisthorchiid liver flukes. The developed methods are considered as a basis for further investigations, e.g. the detection and differentiation of opisthorchiid metacercariae in fishtissues or of parthenogenetic stages of opisthorchiid trematodes in snail intermediate hosts.