

## 5 Diskussion

### 5.1 Diskussion der Literatur

Der in früheren Jahren oft als Nebenbefund anderer Untersuchungen festgestellte Bandwurmbefall bei Pferden zeigt in den letzten Jahrzehnten auch im europäischen Raum eine erhebliche Steigerungsrate (FOGERTY et al., 1994; NILSSON et al., 1995; CIRAK et al., 1996; EPE et al., 2001). Dieses ist sowohl auf die verbesserte Sensitivität der Kotuntersuchung (kombiniertes Sedimentations-/ Flotationsverfahren) als auch auf die gesteigerte Aufmerksamkeit von Tierärzten gegenüber möglicher Bandwurmsymptomatik bei Pferden zurückzuführen.

Bei Pferden, die mit Bandwürmern infiziert sind, liegt kein einheitliches klinisches Erscheinungsbild vor. In Veröffentlichungen wird von schlechter Entwicklung, geringer Leistungsfähigkeit, Verdauungsstörungen (ISODA et al., 1966) und schlechtem Allgemeinbefinden, Dehydratation, beschleunigter Atmung, erhöhter Herzfrequenz, aufgegastrten Darmteilen, fehlender Darmperistaltik (BEROZA et al., 1983; COSGROVE et al., 1986; JACH und ALLMELING, 1990) berichtet. Auch unspezifische Koliksymptome werden bei Bandwurmbefall beschrieben (DIETZ et al., 1994).

Schwierigkeiten bereiten nach wie vor die sporadische Proglottidenausscheidung und die diskontinuierliche Ausscheidung von Eiern, da diese häufig in der graviden Proglottide verbleiben (FRENCH und CHAPMAN, 1993).

Die einfache Flotationsmethode, die mit 2 - 13 % nur über eine sehr geringe Sensitivität verfügt, wurde durch das kombinierte Sedimentations-/ Flotationsverfahren ersetzt. Dieses führte zu einer Verbesserung der Nachweishäufigkeit von Bandwurmeiern im Kot und damit zu einer verbesserten Sensitivität, die hier bei 50 - 60 % liegt (PROUDMAN und EDWARDS, 1992; IHLER et al., 1995; MEANA et al., 1998).

Auch das von PROUDMAN und TREES (1996) entwickelte serologische Nachweisverfahren unter Verwendung von exkretorischem oder sekretorischem Antigen brachte keine wesentliche Verbesserung der Sensitivität gegenüber dem kombinierten Sedimentations-/ Flotationsverfahren. Ebenso wie der von HÖGLUND et al. (1995) entwickelte ELISA zum Nachweis von Skolex-Antigen sind die serologischen Nachweisverfahren kein sicheres Diagnostikum, um Bandwurmeier im Pferdekot nachzuweisen.

Deshalb erschien es wichtig, ein neues Nachweisverfahren zu entwickeln, um den Bandwurmbefall des Pferdes im Kot sicher festzustellen.

Die PCR erwies sich in den letzten Jahren als geeignete Methode, um auch sehr geringe Mengen von Bandwurmgewebe nicht nur aus Eiern, sondern auch aus Resten von mazerierten Proglottiden im Kot verschiedener Tierarten zu identifizieren (DINKEL et al., 1998).

DROGEMULLER et al. entwickelten 2004 einen ITS-2-Primer, der spezifisch für *A. perfoliata* ist. Die Spezifität wurde aber nur gegenüber *P. mamillana* und einigen kleinen Strongyliden-Arten getestet, wobei sich hier keine Kreuzreaktionen ergaben. Bei der ersten praktischen Anwendung des Primers zur Diagnostik des Bandwurmbefalles des Pferdes mittels PCR im Kot wurde eine große Menge Bandwurm-DNA (6 mg pro 0,5 - 1,0 g Kot) eingesetzt, um einen Nachweis zu erbringen. In 26 Kotproben von Pferden, die natürlich mit *A. perfoliata* infiziert waren, konnte ich mit der kombinierten Sedimentations-/ Flotationstechnik bei 76,9 % nur 1 - 5 Eier pro 30 g Kot nachweisen. 19,2 % der Kotproben enthielten 5 - 10 Eier pro 30 g Kot, und in 3,9 % der Kotproben waren über 10 Eier pro 30 g Kot enthalten. Selbst wenn diese Methode nur eine Sensitivität von 50 - 60 % besitzt, zeigen die Untersuchungen, dass in den seltensten Fällen bei Pferden pro 1 g Kot 6 mg Bandwurm-DNA zu finden sein dürfte.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

Die durch Sektion von Pferden gewonnenen Zestoden der Arten *A. perfoliata* und *P. mamillana* wurden als definiertes Ausgangsmaterial für die nachfolgenden molekularen biologischen Differenzierungen verwendet.

Mit den plathelminthenspezifischen Cytochrom-C-Oxidase I Primern (COI-Primer) wurde ein Abschnitt der mitochondrialen DNA von Zestoden des Pferdes (*A. perfoliata* und *P. mamillana*) und Zestoden des Schafes (*M. expansa*) amplifiziert. Die COI-Primer amplifizierten aber auch für Nematoden des Pferdes (kleine Strongyliden) ein Produkt von ca. 440 bp. Da aber im Pferdekot häufiger Eier von Nematoden als von Zestoden vorkommen, sind die COI-Primer nicht geeignet, um Zestoden-DNA im Kot sicher nachzuweisen. Die COI-Primer würden mit der Nematoden-DNA kreuzreagieren. Aus diesem Grund war die Entwicklung neuer spezifischer Primer für die beiden in Europa am häufigsten vorkommenden Zestodenarten, *A. perfoliata* und *P. mamillana*, dringend notwendig.

Nach Amplifikation mitochondrialer DNA von *A. perfoliata*, *P. mamillana* und *M. expansa* unter Einsatz der COI-Primer wurden die Produkte sequenziert. Anhand der ermittelten Sequenzen wurden für *A. perfoliata* und *P. mamillana* mit Hilfe eines speziell zum Primer-Design entwickelten Computerprogrammes (Oligos<sup>®</sup> 1999 - 2002, Version 9.4) spezifische Primer konstruiert (Tabelle 4, Tabelle 5 und Tabelle 6).

Von den vom Computerprogramm Oligos<sup>®</sup> vorgeschlagenen Primerkombinationen mussten über 70 % verworfen werden, da diese entweder zu geringe Unterschiede in ihrer Basenabfolge besaßen, für ähnliche Produktlängen synthetisierten oder für mehr als ein Produkt gleichzeitig kodierten.

Die durch das Oligos<sup>®</sup>-Programm vorgegebenen optimalen Annealing-Temperaturen für die spezifischen Primerpaare wurden in mehreren PCR-Läufen schrittweise geändert und angepasst, um eine gemeinsame Annealing-Temperatur für alle spezifischen Primer zu erhalten. Als optimal stellte sich für die AP- und PM-Primer eine Annealing-Temperatur von 54 °C heraus.

Zur weiteren Verbesserung der PCR wurde die MgCl<sub>2</sub>-Konzentration für die AP- und PM-Primer in mehreren Versuchsdurchläufen untersucht. Eine MgCl<sub>2</sub>-Konzentration von 2,5 mM bzw. 3,0 mM erwies sich für beide Primerpaare als optimal.

Durch die Optimierung der PCR über die Annealing-Temperatur und die MgCl<sub>2</sub>-Konzentration konnte die Produktmenge der DNA (Amplifikat) erhöht werden, und es entstanden vermehrt spezifische Produkte. Außerdem können durch das Angleichen der Annealing-Temperatur und der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration beider Primerpaare bei der späteren Etablierung der PCR-Methode zum Nachweis von Bandwurmeiern im Pferdekot Kosten und Arbeitsaufwand gesenkt werden. Des weiteren vereinfacht sich die Handhabung, da nun pro PCR-Lauf gleichzeitig beide Primerpaare eingesetzt werden können (siehe Abbildung 14) und somit Labormaterial, Arbeitsschritte und Zeitaufwand verringert werden.

In mehreren Versuchsdurchläufen wurde die analytische Spezifität der AP- und PM-Primer getestet.

Der in der PCR eingesetzte Primer AP 72L/341R reagierte weder mit der DNA von Zestoden (*P. mamillana*), Trematoden (*F. hepatica*), Nematoden (*P. equorum*, Oxyuren, kl. Strongylien) des Pferdes noch mit Zestoden (*M. expansa*) des Schafes. Auch der Test auf Kreuzreaktionen mit Gewebe und Vollblut von Pferden erwies sich als negativ. Somit ergibt sich für diesen AP-Primer eine analytische Spezifität von 100 %. Mit diesem spezifischen Primer konnte noch *A. perfoliata*-DNA in einer Größenordnung von ca.

12,5 pg nachgewiesen werden.

Die Überprüfung der analytischen Spezifität und Sensitivität des für den Nachweis von *P. mamillana*-DNA entwickelten Primers PM 26L/346R erfolgte in gleicher Weise wie für den AP-Primer beschrieben. Auch der PM-Primer besitzt eine analytische Spezifität von 100 %. Hier lag die analytische Sensitivität bei einer Nachweisgrenze von ca. 1,6 pg *P. mamillana*-DNA.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten neue spezifische Primer zum Nachweis von *A. perfoliata* und *P. mamillana* entwickelt werden, die eine sehr hohe Spezifität und Sensitivität besitzen. Diese Primer können als Grundlage dienen, den Bandwurmbefall des Pferdes mit molekularbiologischen Untersuchungsmethoden sicher nachzuweisen.

Dieses hat sich bisher als schwierig erwiesen, da nur einmalig die Extraktion der Bandwurm-DNA aus dem Pferdekot gelungen ist. Das positive Ergebnis war auch nach mehreren Versuchsdurchläufen nicht mehr reproduzierbar.

Das Vorhandensein von PCR-inhibitorisch wirkenden Substanzen im Kot ist ein seit langem bekanntes und in vielen Publikationen diskutiertes und dokumentiertes Problem (MATHIS et al., 1996; ŠTEFANIĆ et al., 2004).

Die Vermutung, dass die DNA während der Extraktion nicht aufgespalten und somit mit ausgewaschen wird, konnte nicht bestätigt werden. Auch die Annahme, dass die DNA während der Extraktion durch Enzyme in kleine Bruchstücke zerlegt wird, die der Primer dann nicht mehr binden kann (da unter 20 bp Länge), erwies sich als falsch, da die nach der Extraktion der DNA aus gespikten Fohlenkotproben gemessene DNA-Menge bei ca. 2,0 µg/ml lag.

Somit ist davon auszugehen, dass zwar eine Extraktion der DNA erfolgte, aber diese während der PCR durch noch vorhandene Proteasen zerstört und/oder so gebunden wird, dass diese im Gel nicht nachweisbar war.

Auch durch den Einsatz des Chelatbildners Chelex<sup>®</sup> 100 Resin konnten nicht alle vorhandenen PCR-inhibitorischen Faktoren eliminiert werden. Vermutlich sind die Metallionen, die von Chelex<sup>®</sup> 100 Resin gebunden werden, nicht die einzigen Störfaktoren während der Extraktion und der nachfolgenden PCR.

Eine molekulare Differenzierung der verschiedenen Bandwurmarten des Pferdes wäre sinnvoll, da diese unterschiedliche pathogene Bedeutung besitzen (TAUSEND, 1990; OLIVER et al., 1977; WILLIAMSON et al., 1997).

Momentan ist der Bandwurmnachweis im Kot mit der kombinierten Sedimentations-/Flotationsmethode noch die einfachere, kostengünstigere und mit weniger gerätetechnischem Aufwand verbundene Untersuchungsmethode. Nachteilig daran ist die wesentlich geringere Sensitivität (50 - 60 %) gegenüber der molekularbiologischen Untersuchungsmethode (95 - 100 %) zum Nachweis von Bandwurminfektionen im Kot von Pferden.

Vor der Einführung der PCR als Diagnostikum des Bandwurmbefalles beim Pferd ist noch einige Forschungs- und Entwicklungsarbeit nötig. Insbesondere die DNA-Extraktion und das Entfernen von PCR-inhibitorischen Faktoren aus dem Kot sollten, möglicherweise mit einem neuen speziellen Kit, vereinfacht werden. Die PCR ist als Nachweismethode noch zu kostenintensiv, der Arbeitsaufwand und der gerätetechnische Aufwand sind zu hoch. Sollte sich aber diese Methode zum Bandwurmnachweis im Pferdekot etablieren, würde sich bei einer größeren Anzahl an zu untersuchenden Proben der Arbeitsaufwand, die Kosten für Verbrauchsmaterialien und Geräte verringern.