

4. Diskussion

Ziel des Versuchsvorhabens war es, eine Methode auf molekularbiologischer Basis zu entwickeln, mit der sich die veterinär- und humanmedizinisch relevanten opisthorchiiden Trematodenarten unterscheiden lassen. Hierzu erfolgte zunächst die Etablierung der Lebenszyklen der einheimischen Arten unter Institutsbedingungen, um definiertes Ausgangsmaterial für die nachfolgenden molekularbiologischen Untersuchungen zu erhalten. Es gelang die Zyklen von *O. felineus*, *M. bilis* und *P. truncatum* vollständig unter Laborbedingungen nachzuvollziehen. Dies bedeutet, dass die experimentelle Infektion der Zwischenwirtsschnecken (*B. leachi* für *O. felineus*, *B. tentaculata* für *M. bilis* und *P. truncatum*), des zweiten Zwischenwirtes (Goldorfen als Versuchstiere) und der Endwirte (Goldhamster als experimenteller Wirt für *O. felineus* und *M. bilis*, Hauskatze für *P. truncatum*) erfolgreich war. Besonders hervorzuheben ist hierbei die experimentelle Infektion einer Hauskatze durch Verfütterung der Filets und Köpfe von lediglich drei Alanden (*Leuciscus idus*) aus dem Teltow-Kanal. Die bei der parasitologischen Sektion festgestellte Befallsintensität von 98 *P. truncatum*, ca. 1200 *M. bilis* und 3 *O. felineus* lassen zwei Schlussfolgerungen zu: Zum einen scheint die Katze ein optimaler Endwirt für opisthorchiide Leberegel zu sein, zum anderen lässt die hohe Befallsintensität der Katze auch auf einen sehr starken Befall der verfütterten Alande mit opisthorchiiden Metazerkarien schließen. Dieser Umstand ist bereits bei SCHUSTER et al. (1998a) beschrieben, die bei der Überprüfung von

Alanden auf opisthorchiide Metazerkarien mit 90% die höchste Prävalenz aller untersuchten Weißfische feststellten. Außerdem scheint der Teltow-Kanal nur ein geeigneter Biotop für *B. tentaculata*, dem ersten Zwischenwirt von *M. bilis* und *P. truncatum* zu sein, da nur diese beiden Arten in hoher Zahl aus der infizierten Katze isoliert wurden. *B. leachi* konnte im Teltow-Kanal bis heute nicht nachgewiesen werden, so dass das Auftreten von *O. felineus*-Exemplaren bei der Versuchskatze primär durch die Tatsache zu erklären ist, dass die befallenen Alande aus einem anderen Gewässer in den Teltow-Kanal eingewandert sind. Mit letzter Sicherheit lässt sich aber auch nicht ausschließen, dass eine kleine Population der Zwischenwirtschnecke *B. leachi*, die bisher nicht lokalisiert werden konnte, im Teltow-Kanal existiert.

Die Infektion eines Goldhamsters mit insgesamt 100 Metazerkarien von *P. truncatum* blieb erfolglos. Der Hamster scheint kein Endwirt für diese opisthorchiide Leberegelart zu sein und eignet sich daher auch nicht als Experimentalwirt.

Der Lebenszyklus von *M. xanthosomus* ließ sich nur teilweise unter Institutsbedingungen nachvollziehen. Die Infektion von zwei Haushühnern mit je 50 Metazerkarien, die aus einer Ukelei (*Alburnus alburnus*) isoliert worden waren, war erfolgreich. Hierbei lag die Befallsintensität mit 8 bzw. 17 Exemplaren von *M. xanthosomus* deutlich über der, die GRÄFNER et al. (1965) bei älteren Hühnern (1-2 Exemplare) festgestellt hatten. Das Haushuhn scheint somit ein guter Experimentalwirt für diese opisthorchiide Leberegelart zu sein. Die Verfütterung von *M. xanthosomus*-Eiern an *B. tentaculata* führte dagegen nicht zur

Ausscheidung von Pleurolophozerkarien durch die Schnecken. Entweder ging die Infektion nicht an oder einzelne Schnecken starben infolge einer zu hohen Infektionsdosis noch bevor sie Zerkarien ausscheiden konnten. Aufgrund dieses unbefriedigenden Resultats war es in der Folge auch nicht möglich Goldorfen zu infizieren.

Die aus den Experimentalinfektionen gewonnenen adulten Trematoden wurden als definiertes Ausgangsmaterial für die nachfolgenden molekularbiologischen Differenzierungen verwendet. Die in Asien besonders bedeutsamen Arten *O. viverrini* und *C. sinensis* konnten ebenfalls dank Dr. Smarn Tessana, der aus experimentell infizierten Goldhamstern isolierte Exemplare zur Verfügung stellte, in die Untersuchungen mit einbezogen werden.

Als Grundlage für molekulare Untersuchungen diente zunächst die Amplifikation einer Gensequenz, über die alle Plathelminthen verfügen, nämlich die der mitochondrialen Cytochrom C Oxidase I (COI). Durch Einsatz von COI-Primern in der PCR konnten sowohl bei allen untersuchten opisthorchiiden Trematoden als auch bei verschiedenen Zestodenarten der Fleischfresser Produkte von ca. 440 bp amplifiziert werden. Einzige Ausnahme bildete die Art *O. viverrini*, bei der ein Produkt von 636 bp gewonnen wurde. Somit war bereits auf dieser Ebene eine Differenzierung zumindest einer opisthorchiiden Leberegelart möglich. Dies ist um so bedeutungsvoller, da *O. viverrini* ein großes humanmedizinisches Problem in seinem Ursprungsgebiet darstellt. Die oben angeführte Methode stellt ein leicht durchführbares Verfahren besonders zur Differenzierung adulter Exemplare von *O. felineus*

und *O. viverrini* dar, da diese sich laut WYKOFF et al. (1965) in ihrer Morphe nicht unterscheiden.

Die nach Amplifikation mit COI-Primern sequenzierten Produkte lassen deutliche Unterschiede bei allen untersuchten opisthorchiiden Trematoden erkennen. Allein anhand der Länge der Sequenz kann man einzelne Arten differenzieren. So weist die partielle COI-Sequenz von *M. xanthosomus* mit 441 bp die geringste Länge, die von *O. viverrini* mit 636 bp die größte Länge auf. Produkte von *O. felineus*, *C. sinensis*, *M. bilis* und *P. truncatum* liegen mit jeweils 444 bp im Größenbereich von *M. xanthosomus*. Die Arten *O. felineus*, *C. sinensis*, *M. bilis* und *P. truncatum* weisen die in Tab. 6 angeführten Unterschiede innerhalb der Untereinheit des Gens der mitochondrialen Cytochrom C Oxidase I auf. Somit ist *O. felineus* bezüglich dieses Genabschnittes am engsten mit *C. sinensis* verwandt, gefolgt von *P. truncatum* und *M. bilis*. *P. truncatum* steht *C. sinensis* am nächsten, dann *O. felineus* und schließlich *M. bilis*. Betrachtet man die Verwandtschaftsverhältnisse von *M. bilis* zu den anderen Arten, so steht diese opisthorchiide Trematodenart *C. sinensis* und *P. truncatum* zu gleichen Teilen am nächsten. *O. felineus* ist dagegen von *M. bilis* am weitesten entfernt. Da lediglich der Teil eines einzigen Gens untersucht wurde, sind die Ergebnisse der Verwandtschaftsanalyse jedoch nicht aussagekräftig. Um eine korrekte Aussage über die phylogenetische Verwandtschaft opisthorchiider Trematodenarten zu erhalten, müsste das gesamte Genom jeder einzelnen Art vorliegen. Dieser Vorbehalt wird auch durch die Tatsache gestützt, dass sich beispielsweise *O. felineus* und *O. viverrini* in ihrer Morphe als

adulte Formen nicht unterscheiden, bezüglich ihrer partiellen COI-Sequenz aber weiter voneinander entfernt stehen als *O. felineus* zu allen anderen morphologisch gut abgrenzbaren Trematoden.

Als weitere Methode der molekularen Differenzierung adulter opisthorchiider Trematoden kann die Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus-Analyse angesehen werden. Hierbei wird zunächst ein bestimmtes Gen, das den verschiedenen Arten einer phylogenetischen Gruppe gemein ist, mittels PCR amplifiziert. Danach werden die in der PCR gewonnenen Produkte unter Zugabe verschiedener Restriktionsenzyme geschnitten. Restriktionsendonukleasen erkennen dabei nur definierte Sequenzen im Gen und schneiden auch nur an diesen Stellen. Nach dem Schnitt können so Amplifikate, die dieselbe Bandenlänge aufweisen, differenziert werden, da bei unterschiedlichen Spezies auch unterschiedliche Schnittbandenmuster, sogenannte Restriktionsfragmente, auftreten. Unter Einsatz der Restriktionsendonuklease *Msp* I konnten z.B. Untereinheiten der COI-Gene von *Taenia saginata* und einer hiervon abweichenden asiatischen *Taenia*-Form unterschieden werden (BOWLES & McMANUS 1994).

Durch Restriktionsschnitte der COI-Amplifikate von *O. viverrini*, *O. felineus*, *C. sinensis*, *M. bilis* und *P. truncatum* mit den Enzymen *Alu* I und *Hha* I konnten diese Arten eindeutig unterschieden werden. Bereits durch den alleinigen Einsatz der Endonuklease *Alu* I ist eine

Speziesdifferenzierung von *O. felineus*, *C. sinensis* und *M. bilis* eindeutig möglich, da diese an verschiedenen Stellen der partiellen COI-Sequenz schneidet. Dieser Genabschnitt wird allerdings bei *P. truncatum* und *O. viverrini* nicht gespalten, da die *Alu* I-Zielsequenz fehlt. Die beiden letztgenannten Arten können aber anhand der Länge ihres COI-Amplifikates (444 bp vs. 636 bp) sicher voneinander differenziert werden, so dass eine Aufspaltung mittels Restriktionsenzym nicht notwendig erscheint. *Hha* I eignet sich für eine RFLP-Analyse hingegen nur eingeschränkt, da lediglich die COI-Amplifikate von *M. bilis* gespalten werden. Weitergehende Untersuchungen in der Zukunft sollten auch die für Vögel pathogene Art *M. xanthosomus* einbeziehen, um Unterschiede zur morphologisch ähnlichen Art *M. bilis* zu erkennen. Diese Art parasitiert zumindest in der Familie der Taggreifvögel, was KRONE & SCHUSTER (2002) beim Seeadler (*Haliaeetus albicilla*) durch Etablierung des Entwicklungszyklus eindeutig belegen konnten. Ob es sich bei opisthorchiiden Trematoden, die aus anderen Greifvögeln isoliert werden konnten, um *M. bilis*, *M. xanthosomus* oder weitere *Metorchis*-Arten handelt, könnte anhand der genutzten molekularen Differenzierungsmöglichkeiten geklärt werden.

Die Amplifikation mitochondrialer DNA mit COI-Primern und anschließender RFLP-Analyse stellt folglich eine gute Methode dar, um adulte opisthorchiide Trematoden zu unterscheiden.

Sie ist aber nicht zum Aufspüren von Leberegel-DNA im Kot geeignet, da die genannten

Primer mit DNA von Zestoden, mit deren Eiern oder Proglottiden in den Fäzes von Fleischfressern gerechnet werden muss, kreuz reagieren. Deswegen wurden auf Grundlage der vorhandenen Untereinheiten der COI-Sequenzen für die am häufigsten vorkommenden einheimischen opisthorchiiden Trematoden (*O. felineus* und *M. bilis*) spezifische Primer konstruiert. Es zeigte sich, dass die Amplifikation mitochondrialer DNA von *O. felineus* und *M. bilis* unter Verwendung der spezifischen Primer am besten mit der "Touchdown-PCR" durchzuführen ist. Dieses PCR-Verfahren bietet den Vorteil, dass bei hohen Annealing-Temperaturen zunächst nur die dem spezifischen Primerpaar komplementäre DNA-Zielsequenz stringent gebunden wird, während nicht bzw. teilkomplementäre DNA (z.B. Wirtstier-DNA) nicht erkannt und somit auch nicht amplifiziert wird. Das sich anschließende schrittweise Herunterfahren der Annealing-Temperatur soll dabei zu einer besseren Ausbeute des spezifischen Amplifikats führen, da Primer bei niedrigen Temperaturen besser binden. Unspezifische Produkte werden wenn überhaupt nur noch in geringem Ausmaß gebildet.

Die Testung von OF-Primern mit DNA adulter Exemplare von *O. felineus*, die aus 10 unterschiedlichen Endwirten isoliert worden waren, ergab in jedem Fall ein Produkt von ca. 200 bp. Dabei ist hervorzuheben, dass es sich bei den von SCHUSTER (pers. Mitteilung) aus der Gallenblase einer Bisamratte (*Ondatra zibethica*) isolierten opisthorchiiden Trematoden anhand des Ergebnisses der molekularen Charakteristik mit OF-Primern

tatsächlich um die Art *O. felineus* handelt. Außerdem zeigte die DNA von *O. felineus*-Exemplaren, die von einem Menschen aus Westsibirien stammten, eine positive Reaktion in der PCR mit den genannten Primern. Dies deutet darauf hin, dass auch diese Exemplare zur gleichen Art wie die aus einheimischen Endwirten isolierten Trematoden gehören. Ein Unterschied in der Artzugehörigkeit aufgrund der geografischen Verbreitung war somit nicht festzustellen. Da es vor dem 2. Weltkrieg in Deutschland in seinen heutigen Grenzen keinen Nachweis von *O. felineus* gab, lässt die Übereinstimmung der OF-Amplifikate des westsibirischen mit einheimischen Isolaten vermuten, dass diese Spezies mit infizierten Soldaten der Roten Armee oder durch importierte Katzen eingeschleppt wurde.

Die in der PCR eingesetzten OF-Primer reagierten weder mit der DNA verschiedener Zestoden noch mit der DNA von *P. truncatum* und *M. bilis*. Auch die Testung mit DNA der unterschiedlichen Wirtsspezies verlief regelmäßig negativ. Die Primer zeigen sich somit zum Nachweis von *O. felineus*-DNA als 100% spezifisch. Bei Überprüfung der analytischen Sensitivität dieser Primer konnte DNA von *O. felineus* noch in einer Menge von 10 pg nachgewiesen werden.

Die Überprüfung der Spezifität und Sensitivität der für den Nachweis von *M. bilis*-DNA konstruierten MB-Primer erfolgte in gleicher Weise wie für die OF-Primer beschrieben. Diese reagierten mit der DNA von 10 *M. bilis*-Exemplaren, die aus unterschiedlichen Endwirten gewonnen wurden. In allen Fällen ergab sich ein Amplifikat von ca. 110 bp. Hervorzuheben ist, dass die genannten Primer auch mit der DNA einer *Metorchis*-Art, die von einer

Rohrweihe (*Circus aeruginosus*) aus Russland stammte, eine positive Reaktion in gleicher Bandenlänge zeigten. Ob es sich hierbei tatsächlich um *M. bilis* oder aber eine andere *Metorchis*-Art handelt, bleibt zur Zeit noch offen, da auf Kreuzreaktionen mit anderen *Metorchis*-Arten im Rahmen dieser Arbeit nicht getestet werden konnte. Morphologisch waren die Exemplare aus der Rohrweihe jedoch nicht von *M. bilis* zu unterscheiden, was die These einer *Metorchis*-Art untermauert. Bei Austestung der MB-Primer mit Fremd-DNA entstanden in einigen Fällen (siehe 3.2.2.4) unspezifische Produkte, die jedoch nicht im Bereich des für *M. bilis* spezifischen Produkts von ca. 110 bp lagen. Die Ursache für das Entstehen unspezifischer Banden kann damit begründet werden, dass Teile der Fremd-DNA partialkomplementäre Basenabfolgen für die spezifischen Primer von *M. bilis* aufweisen. Bei bestimmten Temperaturen können die verwendeten Primer dann im Sinne einer Fehlpaarung (engl.: mismatch) binden und amplifizieren. Letztendlich können auf diesem Wege mehrere unspezifische Produkte unterschiedlicher Länge entstehen. Eine solche Fehlpaarung von MB-Primern mit DNA von *O. felineus* ist in Abb. 16 dargestellt (z.B. Spur 6). Dennoch kann auch bei den MB-Primern von einer 100%-igen Spezifität ausgegangen werden, da die Länge der unspezifischen Produkte nicht im Bereich des für *M. bilis* spezifischen Amplifikats liegen. Die analytische Sensitivität der MB-Primer liegt bei einer Menge von 100 fg *M. bilis*-DNA um zwei Zehnerpotenzen höher als für OF-Primer bei *O. felineus*-DNA.

In einer weiterführenden Studie konnte durch Einsatz der konstruierten spezifischen Primer DNA opisthorchiider Leberegelier im Kot experimentell infizierter Silberfuchse

nachgewiesen werden, wobei die Ergebnisse mit den zuvor ermittelten EpG verglichen wurden. Dabei traten bei insgesamt 12 mit OF- und MB-Primern getesteten Kotproben 3 falsch negative Befunde auf. In keinem Fall jedoch wurden falsch positive Resultate erzielt. Bei Kotproben von Füchsen, die eine reine Infektion mit *O. felineus* mit EpG-Werten von 110, 30 bzw. 23 aufwiesen, zeigte nach Testung mit OF-Primern nur die Probe mit einer EpG von 30 ein positives Resultat. Hieraus kann abgeleitet werden, dass bei Einsatz von 200 mg Kot in einer DNA-Extraktion theoretisch der DNA-Gehalt von 6 Eiern in der OF-PCR nachgewiesen wurde. Für das falsch negative Ergebnis bei Testung der anderen beiden Proben lassen sich zwei Erklärungen finden: entweder konnte bei Durchführung der DNA-Extraktion aufgrund der im Kot vorhandenen Inhibitoren nicht genug DNA isoliert werden oder es waren zu wenig Eier in der eingesetzten Menge Kot enthalten. Es ist wahrscheinlich, dass letztere Annahme zutrifft, da von jeder Kotprobe nur ca. 400 mg zur Verfügung standen. Außerdem ist es bei einer EpG von lediglich 23 durchaus möglich, dass die Menge an DNA in der Kotprobe unterhalb der Nachweisgrenze lag. Die Testung von MB-Primern an *M. bilis*-DNA aus dem Kot von Füchsen mit reiner *M. bilis*-Infektion ergab lediglich ein falsch negatives Resultat in einer Kotprobe mit einer ermittelten EpG von 50. Die möglichen Ursachen sind die gleichen wie bereits für die *O. felineus*-Diagnostik diskutiert. Da sich opisthorchiide Eier lichtmikroskopisch nicht unterscheiden lassen, konnten die Trematodeneier aus dem Kot von Silberfüchsen, welche durch Verfütterung von Alanden und Güstern aus dem Teltow-Kanal blind infiziert waren, keiner Art eindeutig zugeordnet werden.

Die Testung zweier solcher Kotproben mit OF- und MB-Primern ergab lediglich einen positiven Nachweis für *M. bilis*-DNA. Für das negative Ergebnis bei Verwendung von OF-Primern kommen theoretisch zwei Gründe in Betracht: entweder der Gehalt an *O. felineus*-Eiern befand sich unterhalb der Nachweisgrenze in der PCR oder aber es lag bei den Füchsen keine Infektion mit *O. felineus* vor, da der Teltow-Kanal nachweislich kein Biotop für diese Art zu sein scheint. Letztere Annahme bestätigte sich in der Sektion der entsprechenden Füchse, da keine Exemplare von *O. felineus* nachgewiesen werden konnten (DELL 2001).

Die durchgeführte Studie zeigte, dass es mit spezifischen Primern möglich ist, nicht nur adulte Trematoden der Arten *O. felineus* und *M. bilis* zu differenzieren, sondern dass auch eine Unterscheidung der lichtmikroskopisch nicht differenzierbaren Eier dieser beiden Leberegelpezies vorgenommen werden kann. Zur Ausreifung der Methode und zur Verhinderung falsch negativer Ergebnisse sollten aber weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Eine höhere Ausbeute an Ziel-DNA könnte möglicherweise dadurch erzielt werden, dass die gesamte Menge einer Kotprobe zunächst im Sedimentationsverfahren aufgereinigt wird. Die sedimentierten Eier könnten dann in toto in der Extraktion eingesetzt werden. Dieses Vorgehen war bei den eigenen Untersuchungen aufgrund der zu geringen verfügbaren Kotmengen jedoch nicht möglich. Außerdem sollte durch das Einbringen (engl.:spiking) definierter Eizahlen in Kot von parasitenfreien Versuchstieren die Nachweisgrenze für die genannten spezifischen Primer ausgetestet werden.

Aus den durchgeführten Versuchen lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

1) Adulte Exemplare von *O. felineus* und *O. viverrini*, die sich morphologisch nicht unterscheiden, können durch den Einsatz von spezifischen COI-Primern in der PCR eindeutig differenziert werden.

2) Adulte Trematoden der Spezies *O. felineus*, *C. sinensis*, *M. bilis* und *P. truncatum* sind durch RFLP-Analyse ihrer COI-Amplifikate mit der Restriktionsendonuklease *Alu I* eindeutig charakterisierbar.

3) Die konstruierten Primer zum Nachweis von *O. felineus*- und *M. bilis*-DNA zeichnen sich durch eine hohe Spezifität und eine gute analytische Sensitivität aus.

4) Durch Einsatz von OF- und MB-Primern ist es möglich, opisthorchiide Leberegel-Eier im Kot experimentell infizierter Endwirte nachzuweisen und sie den Arten *O. felineus* und *M. bilis* zuzuordnen. Letzteres ist lichtmikroskopisch nicht erreichbar.

5) Die vorgelegten Ergebnisse können als Grundlage für weiterführende Versuchsvorhaben dienen, z.B. dem Nachweis opisthorchiider Metazerkarien im Fischgewebe, einschließlich der Differenzierung der morphologisch nicht unterscheidbaren Metazerkarien von *O. felineus* und *M. bilis*, oder dem Nachweis opisthorchiider Sporozysten und Redien in den Zwischenwirtsschnecken.