

**Entwicklung von Verfahren zur spezifischen PCR-Diagnostik von
opisthorchiiden Trematoden
(Gatt. *Opisthorchis*, *Clonorchis* u. a.)**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
Der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Boris Müller

aus Solingen

November 2006

Aus dem Institut für Zoomorphologie, Zellbiologie und Parasitologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. H. Mehlhorn

Koreferent: Prof. Dr. J. D'Haese

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2006

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs-/Tabellenverzeichnis	III
Untersuchte Arten	V
1. Einleitung	1
2. Ziel der Arbeit	8
3. Material und Methoden	9
3.1. Probenmaterial	9
3.2. Etablierung der PCR-Systeme	11
3.2.1. DNA-Extraktion	11
3.2.2. Amplifikation	12
3.2.2.1. Design der Primer	12
3.2.2.2. Sequenzierung der ITS2-Regionen von <i>Opisthorchis felineus</i> , <i>Pseudamphistomum truncatum</i> und <i>Metorchis xanthosomus</i>	15
3.2.2.3. PCR-Parameter	16
3.2.2.4. Agarose-Gelelektrophorese	18
3.2.2.5. Sensitivität und Spezifität der PCR-Systeme	18
3.2.2.6. Negativkontrollen	19
3.3. Entwicklung von Protokollen zur Gewinnung von Parasiten-DNA aus den verschiedenen Entwicklungsstadien der Opisthorchiidae	19
3.3.1. Aufarbeitung von Metazerkarien aus Fischgewebe	20
3.3.2. Aufarbeitung von Schnecken	20
3.3.3. Aufarbeitung von Opisthorchiiden-Eiern in Stuhlproben	21
4. Ergebnisse	23
4.1. Analyse der Sequenzen der ITS2-Region	23
4.2. Primer OP1/OP2 und CS1/CS2	26
4.2.1. Amplifikation mit den für Opisthorchiiden spezifischen Primern OP1/OP2	26
4.2.1.1. Spezifität des Primer-Systems OP1/OP2	26
4.2.1.2. Sensitivität des Primer-Systems OP1/OP2	29

4.2.2.	Amplifikation mit den für <i>Clonorchis sinensis</i> spezifischen Primern CS1/CS2	30
4.2.2.1.	Spezifität des Primer-Systems CS1/CS2	30
4.2.2.2.	Sensitivität des Primer-Systems CS1/CS2	32
4.3.	Protokolle zur Aufarbeitung von Parasiten-DNA aus den Verschiedenen Wirten zum Einsatz in die PCR	33
4.3.1.	Aufarbeitung von Metazerkarien aus Fischgewebe mit anschließender PCR	33
4.3.2.	Aufarbeitung von infizierten Schnecken mit anschließender PCR	38
4.3.3.	Aufarbeitung von Eiern in Stuhlproben mit anschließender PCR	41
5.	Diskussion	46
6.	Zusammenfassung	56
7.	Abstract	58
8.	Literaturverzeichnis	60
9.	Anhang	69
9.1.	Abkürzungen	69
9.2.	Physikalische Eigenschaften der Primer	71
Danksagung		73
Lebenslauf		74
Publikationen		75
Erklärung		76

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Entwicklungskreislauf der opisthorchiiden Leberegel am Beispiel von <i>Clonorchis sinensis</i> und <i>Opisthorchis felineus</i>	4
Abb. 2: Nukleotid-Sequenzen der ITS2-Region von opisthorchiiden Leberegeln.....	24
Abb. 3: Nukleotid-Sequenzen der ITS2-Region von <i>C. sinensis</i> (AF217094) und von den in den Datenbanken DDBJ, GenBank und EMBL eingetragenen Sequenzen heterophyider Trematoden-Arten <i>Haplorchis pumilio</i> (AY245706), <i>Haplorchis taichui</i> (AY245705), <i>Pygidiopsis geneta</i> (AY245710), <i>Centrocestus sp.</i> (AY245699) und <i>Phagicola longa</i> (AY245703)	25
Abb. 4: Amplifikationsprodukte der für Opisthorchiiden spezifischen Primer OP1/OP2 mit DNA von <i>C. sinensis</i> und <i>P. truncatum</i>	27
Abb. 5: Amplifikationsprodukte der für Opisthorchiiden spezifischen Primer OP1/OP2 mit DNA von <i>O. felineus</i> , <i>O. viverrini</i> und <i>M. xanthosomus</i>	28
Abb. 6: Testung der Primer OP1/OP2 mit DNA verschiedener Trematoden-Arten	28
Abb. 7: Testung der Primer OP1/OP2 mit DNA verschiedener Zwischenwirte der Opisthorchiidae	29
Abb. 8: Sensitivität des Primer-Systems OP1/OP2 mit genomischer DNA von <i>C. sinensis</i>	30
Abb. 9: Amplifikationsprodukte des für <i>C. sinensis</i> spezifischen Primer-Systems CS1/CS2 mit DNA von <i>C. sinensis</i>	31
Abb. 10: Testung der Primer CS1/CS2 mit DNA von verschiedenen Trematoden-Arten	31
Abb. 11: Testung der Primer CS1/CS2 mit DNA von verschiedenen Zwischenwirten der Opisthorchiidae.....	32
Abb. 12: Sensitivität des Primer-Systems CS1/CS2 für genomische DNA von <i>C. sinensis</i>	33
Abb. 13: PCR zur Detektion von Metazerkarien von <i>C. sinensis</i> aus Fischproben mit dem Primer-System OP1/OP2	37

Abb. 14: PCR zur Detektion von Metazerkarien von <i>C. sinensis</i> aus Fischproben Mit dem Primer-System CS1/CS2.....	37
Abb. 15: PCR zur Detektion von Parasiten-DNA aus Schneckengewebe	40
Abb. 16: Testung des Einflusses von Schnecken-Lysat auf das Amplifikationsergebnisses des Primer-Systems CS1/CS2	41
Abb. 17: Aufreinigung und PCR Detektion von Eiern von <i>C. sinensis</i> in Stuhlproben	45
Abb.18: Aufreinigung und PCR Detektion von Eiern von <i>C. sinensis</i> in Stuhlproben	45
Abb. 19: Interne Stabilität der Primer OP1 und CS1 (OP1 und CS1 sind identisch)	71
Abb. 20: Interne Stabilität des Primers OP2	71
Abb. 21: Interne Stabilität des Primers CS2.....	72

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Herkunft der untersuchten Opisthorchiiden	9
Tab. 2: Untersuchte Trematodenarten.....	10
Tab. 3: Untersuchte Zwischenwirte der Opisthorchiiden.....	11
Tab. 4: Länge der amplifizierten PCR-Produkte der untersuchten Opisthorchiiden.....	27
Tab. 5: Physikalische Eigenschaften der designten Primer	72

Untersuchte Arten

Schnecken:

<i>B. fuchsiana</i>	<i>Bithynia fuchsiana</i>
<i>B. funiculata</i>	<i>Bithynia funiculata</i>
<i>B. leachi</i>	<i>Bithynia leachi</i>
<i>B. tentaculata</i>	<i>Bithynia tentaculata</i>
<i>M. tuberculata</i>	<i>Melanoides tuberculata</i>

Fische:

<i>C. auratus auratus</i>	<i>Carassius auratus auratus</i>
<i>P. parva</i>	<i>Pseudorasbora parva</i>
<i>R. rutilus</i>	<i>Rutilus Rutilus</i>

Trematoden:

<i>C. sinensis</i>	<i>Clonorchis sinensis</i>
<i>E. caproni</i>	<i>Echinostoma caproni</i>
<i>F. hepatica</i>	<i>Fasciola hepatica</i>
<i>H. dubenini</i>	<i>Holostephanus dubenini</i>
<i>M. xanthosomus</i>	<i>Metorchis xanthosomus</i>
<i>O. felineus</i>	<i>Opisthorchis felineus</i>
<i>O. viverrini</i>	<i>Opisthorchis viverrini</i>
<i>P. ovatus</i>	<i>Paracoenogonimus ovatus</i>
<i>P. truncatum</i>	<i>Pseudamphistomum truncatum</i>
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>

1. Einleitung

Infektionen mit Leberegel der Familie Opisthorchiidae stellen in weiten Gebieten Ost-Asiens, Südost-Asiens und Ost-Europas ein ernstzunehmendes gesundheitliches Problem dar. Weltweit sind schätzungsweise etwa 20 Millionen Menschen infiziert (WHO 1995), davon 7 Millionen mit *Clonorchis sinensis*, 9 Millionen mit *Opisthorchis viverrini* und 1,6 Millionen mit *Opisthorchis felineus* (Yossepowitch et al. 2004). Außerdem müssen weitere Arten der Opisthorchiidae als potentielle Zoonoseerreger angesehen werden (Yamaguti 1971), insbesondere Arten der Gattungen *Pseudamphistomum*- und *Metorchis* (Fedorov et al. 2002, McLean et al. 1996). Die Entwicklung der opisthorchiiden Leberegel ist komplex und schließt neben dem Endwirt, in dem die Würmer geschlechtsreif werden, zwei Zwischenwirte ein (siehe Exkurs). Die adulten Würmer parasitieren in den Gallengängen, der Gallenblase und in den Gängen der Bauchspeicheldrüse des Menschen und Fisch fressender Säugetiere wie Katzen oder Hunden und sind somit ebenfalls von veterinärmedizinischem Interesse. Die von den Würmern produzierten Eier gelangen mit dem Kot des Endwirts ins Freie und werden dort von bestimmten Süßwasserschnecken aufgenommen. Die sich in den Schnecken entwickelnden Zerkarien verlassen die Schnecken und befallen Fische, vor allem Vertreter der Karpfenartigen (Cyprinidae) und wandeln sich dort in Metazerkarien um, die infektiös sind. Die Infektion der Endwirte erfolgt oral mit der Aufnahme dieser Metazerkarien mit rohem oder ungenügend erhitztem Fischfleisch. Alle opisthorchiiden Leberegel rufen die gleichen klinischen Symptome hervor. Bei geringem Befall verläuft die Erkrankung (Opisthorchiasis, Opisthorchiose) weitgehend symptomlos (Mehlhorn 1988). Unter einem geringen Befall ist eine Wurmbürde von bis zu 50-60 *Opisthorchis felineus* zu verstehen ist (Beaver et al. 1984). Mehrere hundert - und in Ausnahmefällen bis zu tausend Würmer - führen hingegen zu Fieber, Schmerzen im rechten Oberbauch, Durchfällen, Blähungen, Ikterus und Eosinophilie (Jelinek et al. 1995). Starke Infektionen führen infolge von Entzündungen der Gallenwege zu Veränderungen und Funktionsstörungen der Leber bis hin zu Leberabszessen und Leberzirrhosen. Eine permanente mechanische und toxische Reizung durch die Parasiten kann schließlich zu Proliferationen (Hyperplasien) der Gallengänge führen, aus denen sich oftmals

Karzinome entwickeln, hauptsächlich Cholangiokarzinome (Schwartz 1980, Mehlhorn 2001). Bei chronischem Verlauf kann es zu wiederkehrender Cholangitis kommen und bei Befall der Bauchspeicheldrüse zu chronischen katharrhalischen Entzündungen der Drüsenkanälchen.

Eine zuverlässige Detektion und Behandlung der Opisthorchiasis/Opisthorchiose kann die gesundheitlichen Folgen dieser Erkrankung mindern und die Häufigkeit der Entstehung von Karzinomen senken. Das Hauptverbreitungsgebiet dieser Krankheit liegt in Südost-Asien und den östlichen Staaten der ehemaligen Sowjetunion, aber mit der Zunahme des internationalen Reiseverkehrs und der zunehmenden Migration von Bevölkerungen aus Endemiegebieten, werden Infektionen in steigendem Maße auch in Regionen beobachtet, in denen die Krankheit nicht endemisch ist, z. B. in Nordamerika und West-Europa. Aus diesem Grund kann eine erweiterte Diagnose bei unspezifischen Symptomen wie hohem Fieber, Unwohlsein, Appetitlosigkeit, Durchfall und Schmerzen im rechten Oberbauch ratsam sein, da diese neben anderen Krankheiten auch bei Infektionen mit Opisthorchiiden hervorgerufen werden können. Infektionen müssen aber nicht notwendigerweise in Endemiegebieten stattgefunden haben, denn unter Umständen können sich Menschen auch in nicht-endemischen Gebieten infizieren. Der weltweite Handel mit Fischen aus Aquakulturen aus Asien ist in den vergangenen Jahren aufgrund der Überfischung der Weltmeere stetig gewachsen. Da auch Süßwasserfische zunehmend in die EU importiert werden, besteht beim Verzehr von metazerkarienhaltigem Fischfleisch die Gefahr der Infektion mit opisthorchiiden Trematoden. Daher sind Kontrollen dieser Importe sinnvoll.

Eine zuverlässige Detektion würde es weiterhin erlauben, umfassende Untersuchungen zur Epidemiologie und Biologie der Parasiten durchzuführen. In Endemiegebieten könnten dann auf Grundlage der gewonnenen Daten Strategien für die Prävention und Kontrolle der Opisthorchiasis/Opisthorchiose entwickelt werden und die Wirksamkeit solcher Maßnahmen besser abgeschätzt werden. Für solche Studien ist eine verlässliche Differentialdiagnose zwischen den Arten erforderlich. Mit den herkömmlichen Nachweisverfahren, d.h. mit Hilfe der Lichtmikroskopie, lassen sich die Opisthorchiiden, wie beispielsweise die humanpathogenen Arten *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini* und *O. felineus* nicht immer sicher voneinander unterscheiden. Insbesondere die

Entwicklungsstadien Eier, Redien und Metazerkarien dieser Leberegel, aber auch die Adulten von *O. viverrini* und *O. felineus* sind so ähnlich, dass eine einfachere Unterscheidung mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden (PCR) möglich scheint.

Eine Differentialdiagnose ist hingegen für die Behandlung der Opisthorchiose nicht erforderlich, da die Therapie für alle in Frage kommenden Opisthorchiiden dieselbe ist. Mittel der Wahl sind Medikamente mit dem Wirkstoff Praziquantel. Praziquantel erhöht die Permeabilität des Teguments für Ca^{2+} -Ionen und führt so zur Paralyse des Parasiten (Tawatsin et al. 1984). Die im Elektronenmikroskop sichtbaren Schäden durch Praziquantel wurden von Mehlhorn und Mitarbeitern (1983) für *C. sinensis* und *O. viverrini* beschrieben. Zur Therapie vom Patienten hat sich eine Dosis von 3 x 25 mg/kg Körpergewicht (KG) im Abstand von 4-6 Stunden bewährt (Mehlhorn et al. 1995, Dönges 1988), wohingegen in der Veterinärmedizin bei Hund und Katze an 3 aufeinander folgenden Tagen mit 25 mg/kg KG behandelt wird (Mehlhorn et al. 1993).

Bei Infekten kommt es vor allem auf eine möglichst sensitive Diagnostik am Patienten an. Mehrere Autoren betonen, dass konventionelle Methoden zur Diagnostik bei geringen Wurmlasten oft zu falsch negativen Ergebnissen führen (Sithithaworn et al. 1991, Wongratanacheewin et al. 2001). Eine von Sithithaworn und Mitarbeitern (1991) durchgeführte Studie an Autopsie-Fällen, die den Zusammenhang von der Stärke des Wurmbefalls mit *O. viverrini* mit der Anzahl der im Stuhl befindlichen Eier untersuchten, kamen unter anderem zu dem Ergebnis, dass Infektionen mit 1-19 Würmern nur in 39,5-47,4% der Fälle mit Hilfe konventioneller Techniken nachzuweisen waren. Infektionen mit 1-19 Würmern machten laut der genannten Studie 33,6% der Gesamtfälle aus.

Aufgrund der Tatsache, dass molekularbiologische Methoden wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) im Allgemeinen eine sehr hohe Sensitivität zeigen (Linz und Degenhardt 1990), könnten solche Techniken ermöglichen, auch Personen mit geringgradigem Befall zu diagnostizieren.

Exkurs: Entwicklungszyklus der opisthorchiiden Leberegel

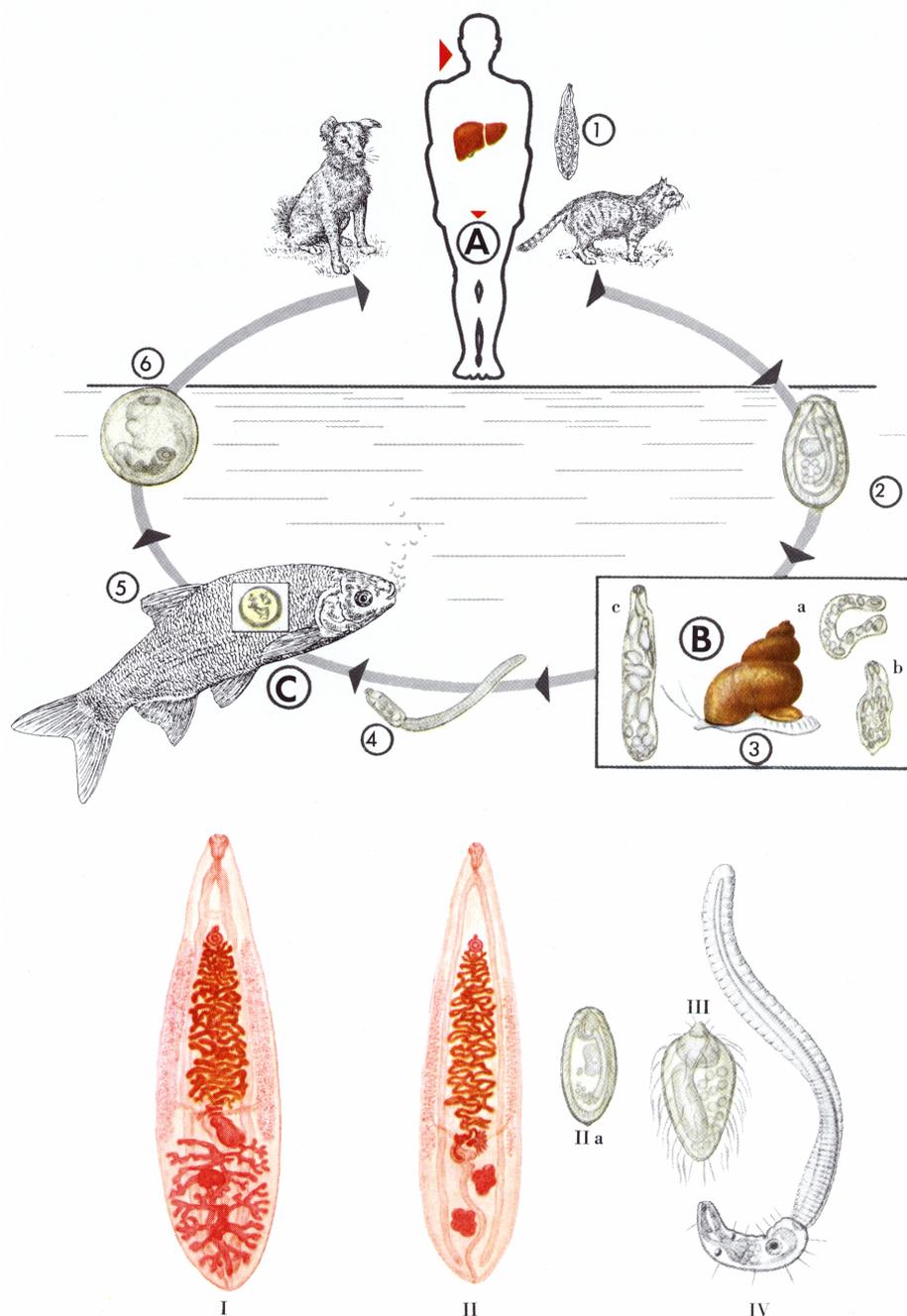


Abb. 1: Entwicklungskreislauf der opisthorchiiden Leberegel am Beispiel von *Clonorchis sinensis* und *Opisthorchis felineus*.

A = Endwirt (1 Geschlechtsreifer Leberegel, 2 Ei mit Mirazidium), B = 1. Zwischenwirt (3a Junge Sporozyste, b Mutter-Redie, c Tochter-Redie mit Zerkarienanlagen, 4 Freie Zerkarie), 2. Zwischenwirt (5 Fisch mit Metazerkarie, 6 Metazerkarie [Vergr. etwa 100:1]), I = *C. sinensis* (Vergr. etwa 5:1), II = *O. felineus* (Vergr. etwa 7:1), IIa = Ei mit Mirazidium von *O. felineus* (etwa 28 µm), III = Freies Mirazidium aus der Schnecke, IV = Zerkarie in typischer Schwimmhaltung (aus Piekarski 1987)

Die Leberegel der Familie der Opisthorchiidae zeigen einen Entwicklungszyklus, der sowohl verschiedene Larvalformen in drei unterschiedlichen Wirten (in zwei Zwischenwirten und in einem Endwirt) als auch sexuelle und asexuelle Stadien umfasst. Es können fünf Stadien vor dem sechsten, dem Adultstadium, unterschieden werden, die alle morphologisch differieren und jeweils spezifisch an ihre Umgebung angepasst sind.

Die embryonierten Eier der opisthorchiiden Würmer stellen das Produkt sexueller Fortpflanzung im Entwicklungszyklus dar. Opisthorchiide Trematoden sind Hermaphroditen, wobei Fremdbefruchtung zwar eher die Regel, aber Selbstbefruchtung generell möglich ist. Die von den adulten Würmern produzierten Eier gelangen mit den Fäzes des Wirtes ins Freie. Die Eier der Vertreter der Opisthorchiidae messen je nach Art 21-100 µm in der Länge und 10-120 µm in der Breite. Sie sind immer gedeckelt und gelb/braun gefärbt (King and Scholz 2001).

Die Eier, die mit den Fäzes den Endwirt verlassen, enthalten bereits vollständig ausdifferenzierte Mirazidien. Die Mirazidien schlüpfen jedoch erst, wenn sie vom ersten Zwischenwirt oral aufgenommen werden. Nach Aufnahme der Eier - die Nahrung der Schnecken besteht zu einem großen Teil aus Vertebraten-Fäzes bzw. der in ihnen enthaltenen Bakterien - wird deren Schale durch die Radula der Schnecken vorgeschädigt und durch organische Säuren weiter aufgelöst (Beer et al. 1991). Im Darm befreien sich die Mirazidien aus ihrer Eischale.

Die ersten Zwischenwirte sind Süßwasserschnecken (Prosobranchia) der Familien Bithyniidae, Hydrobiidae oder Thiaridae. Die Hauptzwischenwirtsschnecken von *Clonorchis sinensis* sind *Parafossarulus manchouricus*, *Bulimus fuchsianus* (= *Bithynia fuchsiana*), *Alocima longicornis* (= *B. longicornis*), *Assimineea lutea* und *Melanoides tuberculata* (Rim 1986), von *Opisthorchis viverrini* *Bithynia funiculata*, *Bithynia siamensis siamensis* und *Bithynia siamensis goniomphalus*, wobei die beiden erstgenannten eine 4-7 fach höhere Empfänglichkeit aufweisen (Chanawong und Waikagul 1991) und von *Opisthorchis felinus* *Bithynia leachi*, *Bithynia inflata* und *Bithynia troscheli* (Beer et al. 1987), *Metorchis bilis*, *M. xanthosomus* und *Pseudamphistomum truncatum* haben *Bithynia tentaculata* als Wirtsschnecke (Heinemann 1937, Zablockij 1967).

Das zweite Stadium innerhalb des ersten Zwischenwirts ist die Sporozyste, die sich durch Umstrukturierung und Differenzierung direkt aus dem Mirazidium entwickelt. Innerhalb der Sporozysten entstehen aus undifferenzierten

Stammzellen Redien. Nach Aufplatzen der Sporozysten wandern sie zur Mitteldarmdrüse der Wirtsschnecke. Nach La Rue (1951) sind aufeinander folgende Generationen von Tochterredien untereinander morphologisch nicht zu unterscheiden. Es ist daher schwierig festzustellen, wieviele Generationen sich in der Schnecke entwickelt haben.

In den Redien reifen schließlich Zerkarien heran, verlassen diese in unreifem Zustand und entwickeln sich in der Mitteldarmdrüse der Schnecke weiter (Hiepe et al. 1985). Die Zerkarien befallen den zweiten Zwischenwirt. Reife Zerkarien haben eine Körperlänge von 130-250 µm (abhängig von der Kontraktion) und einen bis zu 500 µm langen Schwanz vom pleurolophozerkarialem Typ, sind also dorsal und ventral mit einem Flossensaum versehen (Brooks et al. 1985). Nachdem die Zerkarien die Schnecke auf eine noch nicht beschriebene Weise verlassen haben, müssen sie aktiv ihren zweiten Zwischenwirt finden. Dazu halten sie sich zunächst am Gewässergrund auf, um dann bei Wasserbewegungen, die z. B. von vorbei schwimmenden Fischen verursacht werden, nach oben schwimmen. Anschließend lassen sie sich in einer charakteristischen Haltung (Tabakspfeifenform) mit dem Schwanz nach oben wieder absinken (Odening 1969). Bei Kontakt mit einem Fisch, vor allem Cypriniden, werfen sie ihren Schwanz ab und penetrieren mit Hilfe ihres Bohrapparats in die Oberfläche der Fische. So gelangen sie in die Haut oder über die Kiemen in das Körpergewebe der Fische. Die Zerkarien siedeln sich bevorzugt in der Rumpfmuskulatur und an den Ansatzstellen der Flossen an (Vogel 1934). Nach der Invasion enzystieren sich die Zerkarien zu Metazerkarien. Hierbei wird vom Parasiten ein von Zystogenzellen sezerniertes Sekret abgeschieden, zu einer Hülle geformt und zudem nachträglich eine feste bindegewebige Hülle gebildet. Die Metazerkarien der Arten *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini* und *Opisthorchis felineus* bilden dünnwandige, ellipsoide Zysten aus (Schuster et al. 1998).

Als zweite Zwischenwirte für den asiatischen Leberegel *C. sinensis* nennt Yoshimura (1965) über 80 Fischarten aus 9 Familien, von denen allein 71 Arten zur Familie der Cypriniden gehören. Außerdem können dekapode Krebse wie *Cardinia nilotica gracilipes*, *Macrobrachium superbum* und *Palemontes sinensis* als Wirte dienen (Tang et al. 1963). Zweite Zwischenwirte für *O. viverrini* sind 9 Fischarten, vor allem *Puntius orphoides*, *Hampala dispar* und *Cyclocheilichthys siaja* (Wykoff et al. 1965). Für die auch in Europa vorkommenden Opisthorchiiden

O. felineus, *M. bilis*, *M. xanthosomus* und *P. truncatum* konnten insgesamt 23 Fischarten wie Rotaugen (*Rutilus rutilus*), Rotfeder (*Scardinius erythrophthalmus*), Blicke (*Blicca bjoerkna*), Brachse (*Abramis brama*) und Aland (*Leuciscus idus*) als zweite Zwischenwirte nachgewiesen werden (Beer et al. 1987).

Nach Aufnahme eines mit Metazerkarien befallenen Fisches durch einen Endwirt werden die Zysten durch peptischen Verdauung aus dem Fischfleisch freigesetzt. Im Dünndarm wird dann durch tryptischen Verdauung die äußere Zystenwand aufgelöst, während die innere Hülle durch die durch Gallenflüssigkeit induzierte aktive Bewegung der Metazerkarien aufgerissen wird (Rim 1986). Über den Ductus choledochus wandern die juvenilen Würmer in das Gallengangssystem der Leber ein, wo sie zu geschlechtsreifen Würmern heranwachsen. Die Präpatenz beträgt meist etwa 2-3 Wochen (Mehlhorn und Piekarski 1995). Die gesamte Entwicklung der opisthorchiiden Leberegel dauert etwa 4-4,5 Monate (Hiepe et al. 1985).

2. Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war der molekularbiologische Nachweis von Arten der Opisthorchiidae auf Grundlage der PCR-Technik. Der Nachweis sollte für alle Entwicklungsstadien dieser Parasiten durchführbar sein, d.h. es sollten Sporozysten und Redien in Schnecken, Metazerkarien in Fischen sowie Eier der Würmer in den Fäzes infizierter Säugetiere detektiert werden können. Eine wesentliche Voraussetzung hierfür ist die Reinigung/Isolierung der DNA der Parasiten aus den verschiedenen Wirtsgeweben bzw. Fäkalmaterial, da die Gewebe/Fäzes Substanzen enthalten, die den Ablauf der PCR stark inhibieren können. In der vorliegenden Arbeit sollten daher neue Aufreinigungs- und Präparationsverfahren entwickelt werden, die es erlauben, die Parasiten-DNA aus den entsprechenden Zwischenwirten bzw. den Eiern im Fäkalmaterial der Endwirte mit Hilfe der PCR-Technik sicher nachzuweisen. Für den Einsatz in der Routine-Diagnostik müssen diese Verfahren möglichst schnell und einfach durchführbar sein. Die PCR ist zwar als Diagnoseverfahren in den Industrienationen etabliert - für die parasitologische Routine-Diagnostik in den Tropen spielt sie zur Zeit fast keine Rolle, weil die verwendeten Chemikalien/Kits zu teuer sind. Die neuen Verfahren müssen daher auf kostengünstigeren Reagenzien beruhen.

Der Nachweis der Parasiten mit Hilfe der PCR-Technik erfordert den Einsatz von spezifischen Primern. Bis zum Zeitpunkt, zu dem die vorliegende Arbeit angefertigt wurde, waren Primer für den Nachweis von *Opisthorchis viverrini* bzw. *O. felinus*, nicht aber für *Clonorchis sinensis* beschrieben worden. In dieser Arbeit sollten daher Primer entwickelt werden, die einen spezifischen Nachweis von *C. sinensis* ermöglichen.

Für Diagnosen von Patienten als auch den Nachweis infizierter Fische sollte weiterhin ein sensitives PCR-System entwickelt werden, das es ermöglicht in einem Testansatz und mit nur einem Primer-Paar alle opisthorchiiden Trematoden sicher nachzuweisen und hierbei von den vielen anderen Trematoden zu unterscheiden.

3. Material und Methoden

3.1. Probenmaterial

Zur Entwicklung der verschiedenen Aufreinigungsverfahren zur Gewinnung opisthorchiider DNA aus den verschiedenen Medien (Fäzes, Schnecke, Fisch) und zur Etablierung der PCR-Systeme zum molekularbiologischen Nachweis der gereinigten DNA diente das in Tabelle 1 aufgelistete Parasitenmaterial.

Tab. 1: Herkunft der untersuchten Opisthorchiiden

Spezies	Entwicklungsstadium	Herkunft
<i>Clonorchis sinensis</i> ¹	Eier	TVA*
<i>Clonorchis sinensis</i> ¹	Metzerkarien	Korea
<i>Clonorchis sinensis</i> ¹	Adult	Korea
<i>Opisthorchis viverrini</i> ²	Adult	Thailand
<i>Opisthorchis felineus</i> ^{3,4}	Adult	Voronezh, Russland Berlin, Deutschland
<i>Pseudamphistomum truncatum</i> ³	Adult	Voronezh, Russland
<i>Metorchis xanthosomus</i>	Metazerkarien	Brandenburg, Deutschland

Das Parasitenmaterial wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von:

¹ Herrn Prof. Dr. Han-Jong Rim und Prof. Dr. IC Song, Department of Parasitology, Institute for Tropical Endemic Diseases, College of Medicine, Korea University, Seoul 110, Korea

² Herrn Prof. Dr. Paiboon Sithithaworn, Faculty of Medicine, University Khon Kaen, Thailand

³ Herrn Dr. Boris Romashov, Voronezh Biosphere Natural Reserve, Grafskay Station, Voronezh, 394047 Russia

⁴ Herrn Dr. Rolf Schuster, Central Veterinary Research Laboratory, Dubai, United Arab Emirates

*Für die Etablierung des Standardverfahrens zur Aufreinigung von Fäkalmaterial wurde eine Katze (*Felis silvestris catus*) experimentell mit Metazerkarien von *C. sinensis* (Korea) infiziert. Die Infektion und Haltung des Tieres erfolgte in der Tierversuchsanlage (TVA) des Universitätsklinikums Düsseldorf.

Zur Testung der entwickelten PCR-Systeme auf eventuelle Kreuzreaktionen wurde DNA von verschiedenen Trematodenspezies extrahiert (Tab. 2).

Tab. 2: Untersuchte Trematodenarten

Spezies	Entwicklungsstadium
<i>Echinostoma caproni</i>	Adult
<i>Fasciola hepatica</i>	Adult
<i>Holostephanus dubenini</i>	Metazerkarien
<i>Paracoenogonimus ovatus</i>	Metazerkarien
<i>Schistosoma mansoni</i>	Adult

Eine weitere Testung der entwickelten PCR-Systeme auf eventuelle Kreuzreaktionen mit Wirts-DNA erfolgte mit DNA-Extrakten aus Gewebeproben. Diese Gewebeproben stammten aus der Muskulatur von in parasitenfreier Umgebung aufgewachsenen Blaubandbärblingen (*Pseudorasbora parva*), Goldfischen (*Carassius auratus auratus*) und Rotaugen (*Rutilus rutilus*) sowie aus Gewebe verschiedener Zwischenwirtsschnecken (Tab. 3). Die zur DNA-Extraktionen eingesetzte Gewebemenge betrug bei Fischproben 20 mg, bei Schneckenproben 10 mg.

Tab. 3: Untersuchte Zwischenwirte der Opisthorchiiden

Spezies	Herkunft
<i>Bithynia fuchsiana</i> ¹ , Schnecke	China
<i>Bithynia funiculata</i> ¹ , Schnecke	Vietnam
<i>Bithynia leachi</i> , Schnecke	Deutschland
<i>Bithynia tentaculata</i> , Schnecke	Deutschland
<i>Melanoides tuberculata</i> , Schnecke	Deutschland
<i>Carassius auratus auratus</i> , Fisch	Deutschland
<i>Pseudorasbora parva</i> , Fisch	Deutschland (institutseigene Zucht)
<i>Rutilus rutilus</i> , Fisch	Deutschland

Für die Überlassung von Schnecken danke ich:

¹Herrn Prof. Dr. Han-Jong Rim und Prof. Dr. IC Song, Department of Parasitology, Institute for Tropical Endemic Diseases, College of Medicine, Korea University, Seoul 110, Korea

3.2. Etablierung der PCR-Systeme

3.2.1. DNA-Extraktion

Als Ausgangsmaterial für die Etablierung der für Opisthorchiiden bzw. für *Clonorchis sinensis*-spezifischen PCR diente DNA von adulten *C. sinensis*-Leberegel, die mit dem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gereinigt wurde. Die Extraktion erfolgte nach dem Protokoll von Qiagen für Gewebeprobe. Dabei wird das Gewebe zunächst mittels Proteinase K und Lysepuffer vollständig aufgelöst. Das Prinzip von QIAamp besteht darin, dass das Zell-Lysat vor dem Aufbringen auf eine QIAamp Spinsäule auf die Bedingungen (Salzkonzentration und pH-Wert) eingestellt wird, die eine optimale Adsorption der DNA an die QIAamp Membran ermöglicht. Während der Zentrifugation in einer Eppendorf-Zentrifuge erfolgt die Bindung an die Silicagel-Membran. Die verbliebenen Proteine und anderen Kontaminationen werden in zwei Waschschritten mit verschiedenen Puffern entfernt, bevor die so gereinigte DNA in

konzentrierter Form entweder mit einem Elutionspuffer (Puffer AE) oder mit Wasser von der Silicagel-Membran eluiert werden kann. Die mit dem QIAamp Kit gereinigte genomische DNA ist überwiegend 20-30 kb lang. DNA dieser Größe denaturiert während der PCR vollständig und weist die höchste Amplifikationseffizienz auf (Handbuch für QIAamp DNA Mini Kits und QIAamp DNA Blood Mini Kits 10/2002) und kann direkt in eine PCR eingesetzt werden.

In gleicher Weise wurde DNA von verschiedenen Zwischenwirten zur Testung der zu etablierenden PCR-Systeme auf Kreuzreaktionen gewonnen. Dazu dienten Gewebeproben von Wirtsschnecken und aus der Muskulatur von Süßwasserfischen. Außerdem wurde DNA aus verschiedenen Trematoden-Arten extrahiert.

Die gereinigte DNA der verschiedenen Proben wurde mit Puffer AE (10 mM Tris-HCl; 0,5 mM EDTA; pH 9,0) eluiert und bei -20°C aufbewahrt. Die Bestimmung der Konzentration der extrahierten DNA erfolgte über eine Absorptionsmessung bei 260 nm mit dem Gene Quant RNA/DNA calculator[®] (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland). Die Bestimmung der Reinheit der Nukleinsäurelösung erfolgte durch die Verhältnisbildung der Absorptionswerte bei 280 nm und 260 nm. Unter neutralen bis leicht alkalischen pH-Bedingungen sollte dieser Quotient für reine DNA ca. 1,8 betragen. Tatsächlich lag dieser bei den einzelnen Proben zwischen 1,5 und 1,8.

3.2.2. Amplifikation

3.2.2.1. Design der Primer

Das Verfahren der PCR ist relativ einfach durchzuführen (Linz u. Degenhardt 1990). Trotzdem ist es häufig problematisch, ein DNA-Fragment spezifisch, d.h. ohne Entstehung von zusätzlichen, unspezifischen Banden zu amplifizieren. Die Spezifität und Effizienz hängen von zahlreichen Parametern ab, insbesondere der Konzentration an Ionen, pH-Wert, Temperatur, Anzahl der Zyklen, Reaktionsdauer und der verwendeten Polymerase. Die entscheidenden Parameter sind jedoch die Primer und deren Hybridisierungs-Temperatur. Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche PCR ist daher ein Design optimaler Primer (Scheinert 1997).

Beim Primerdesign ist zunächst auf die geeignete Länge zu achten. Optimale Primer haben Längen zwischen 18 und 30 Basenpaaren (bp). Kürzere Primer sind u.U. nicht sequenzspezifisch, längere Primer erhöhen dagegen die Spezifität nicht weiter. Weiterhin ist beim Primerdesign auf die interne Stabilität (engl.: internal stability) zu achten. Die interne Stabilität charakterisiert das Energieprofil der Hybridisierung der Primer an ihre Zielsequenz. Idealerweise sollte die Bindungsenergie vom 5'-Ende zum 3'-Ende hin kontinuierlich abnehmen (Rychlik 1993). G/C-Paare sind im Unterschied zu A/T-Paaren mit drei anstatt mit zwei Wasserstoffbrücken verbunden, wodurch eine höhere Bindungsenergie resultiert (Linz und Degenhardt 1990). Aufgrund dessen binden G/C-reiche Sequenzen bei der Erniedrigung der Temperatur zwischen Denaturierung und Hybridisierung vor A/T-reichen Sequenzen. Die Primer werden aus diesem Grund so gewählt, dass das 5'-Ende G/C-reich und das 3'-Ende A/T-reich ist. Auf diese Weise wird das 5'-Ende zuerst an die Zielsequenz angelagert. Würde das 3'-Ende zuerst hybridisieren, könnte es zu unspezifischen Bindungen des Primers und weiter zu unspezifischen Amplifikationsprodukten kommen, denn sobald das 3'-Ende gebunden hat, beginnt die Taq DNA Polymerase zu amplifizieren (Eine Polymerisation ist nur in 5' → 3'-Richtung möglich).

Bei der Wahl der Primer ist auch darauf zu achten, dass die Bildung von Primerdimeren vermieden wird, das bedeutet komplementäre Hybridisierung zweier Primer miteinander. Die Primer sollten auch vergleichbare physikalische Eigenschaften besitzen, um eine stringente PCR zu ermöglichen, die die Amplifikation unspezifischer Nebenprodukte auf ein Minimum reduzieren. Hierzu gehört neben der schon erwähnten internen Stabilität und der Schmelztemperatur (T_m) auch die optimale Hybridisierungs-Temperatur. T_m ist der Schmelzpunkt, bei dem 50% der Moleküle als Einzelstrang vorliegen; er ist abhängig von der Konzentration der Primer, der Sequenz- und Pufferzusammensetzung. Die optimale Hybridisierungs-Temperatur sollte möglichst hoch sein, damit nur die korrekt zueinandergehörige Sequenzen miteinander paaren, und niedrig genug, um die Paarungen stabil zu halten.

Bei der Auswahl der vorliegenden opisthorchiiden- und *C. sinensis*-spezifischen Primer-Paare wurde darauf geachtet, dass die oben erwähnten Primer-Eigenschaften soweit wie möglich verwirklicht wurden. Aufgrund der hohen Übereinstimmungen in den Sequenzen der untersuchten Opisthorchiiden, wurden

die Primer manuell ausgewählt und auf die Unterstützung spezieller Primer-Design-Programme verzichtet. Die interne Stabilität wurde nach der Methode von Rychlik (1993) berechnet, die eine vereinfachte Methode von Breslauer und Mitarbeitern (1986) darstellt. Abb. 19 bis Abb. 21 (Anhang) zeigt die interne Stabilität der designten Primer. Die physikalischen Eigenschaften sind in Tab. 5 (Anhang) aufgeführt.

Als generell für Opisthorchiiden spezifische Primer wurden folgende gewählt:

Primer OP1: 5'- CGAGGGTCGGCTTATAAAC -3'
Primer OP2: 5'- AGCCTCAACCAAAGACAAAG -3'

Für *Clonorchis sinensis* wurden die folgenden spezifischen Primersequenzen gewählt:

Primer CS1: 5'- CGAGGGTCGGCTTATAAAC -3'
Primer CS2: 5'- GGAAAGTTAAGCACCGACC -3'

Die Primer OP1 und CS1 sind identisch, wurden aber aus Gründen der Übersichtlichkeit verschieden benannt: Primer-Paare, die spezifisch für die Opisthorchiiden sind heißen OP, Primer-Paare, die spezifisch für *C. sinensis* sind, heißen CS.

Verwendete DNA-Sequenz:

Die Primer wurden aus der Sequenz der ITS2-Region (engl.: internal transcribed spacer 2) entwickelt. Die ITS2-Region ist Teil einer Transkriptions-Einheit der ribosomalen DNA (rDNA), die sich aus 18S, 5,8S und 28S rRNA mit den dazwischen liegenden ITS-Regionen 1 und 2 zusammensetzt. ITS2 liegt dabei zwischen der 5,8S und der 28S Untereinheit. Diese Region wurde unter anderem deshalb ausgewählt, weil Daten für zahlreiche Trematoden in den entsprechenden Gen-Datenbanken verfügbar waren.

Ando und Mitarbeiter (2001) zeigten, dass die Sequenzen der ITS2-Region von verschiedenen Individuen von *Opisthorchis viverrini* aus fünf Provinzen in Thailand identisch waren. Auch die ITS2-Sequenzen von Isolaten von *Clonorchis sinensis* aus verschiedenen geographischen Gebieten (EMBL Accession-No.: AF217094, AF217097, AF217099) sind identisch. Auch wurde gefunden, dass die Sequenzen von *O. viverrini* mit denen von *C. sinensis* weitgehend übereinstimmten, sich aber von anderen Trematoden-Arten deutlich unterscheiden. Die fehlende intraspezifische Variabilität und die große Übereinstimmung innerhalb der opisthorchiiden Leberegel bei gleichzeitig großer Verschiedenheit zu den Trematoden anderer Gruppen sollte es ermöglichen, die Vertreter der Opisthorchiiden, zumindest *C. sinensis* und *O. viverrini* mit einem einzigen Primer-System detektieren zu können. Ein anderer Grund, die ITS2-Region für die Primer-Entwicklung zu wählen, ist die Tatsache, dass die Transkriptions-Einheiten der rDNA und damit auch der ITS2-Abschnitt, im Genom der Zellen repetitiv, d.h. in mehreren hundert Kopien vorliegen. Die Hohe Kopienzahl erhöht die Sensitivität einer PCR - verglichen mit nur einmal im Genom vorhandenen Nukleotid-Abschnitten - erheblich.

3.2.2.2. Sequenzierung der ITS2-Region von *Opisthorchis felineus*, *Pseudamphistomum truncatum* und *Metorchis xanthosomus*

Die Sequenzen der ITS2-Region der beiden opisthorchiiden Leberegel *C. sinensis* (AF217094, AF217097, AF217099) und *O. viverrini* (AF408147) waren bekannt, zu den Sequenzen von *O. felineus*, *P. truncatum* und *M. xanthosomus* lagen

diesbezüglich jedoch keine Daten vor und wurden in der vorliegenden Arbeit bestimmt (Firma SEQLAB Sequence Laboratories Göttingen GmbH, Deutschland). Dazu wurden die ITS2-Regionen der Leberegel mit Hilfe der für Trematoden universalen Primer LC1: 5'-CGAGTATCGATGAAGAACGCAGC-3' und HC2: 5'-ATATGCTTAAGTTCAGCG GG-3' (Després et al. 1992) vervielfältigt, um die für die Sequenzierung erforderliche Menge Amplifikat zu erhalten. Die Amplifikate überspannten die ITS2-Regionen, wobei der Primer LC1 in der 5,8 S Region bindet und der Primer HC2 in der 28S Region der ribosomalen DNA (rDNA). Die PCR-Produkte wurden mit OIAGEN-Kit aufgereinigt und die gereinigte DNA in 30 µl 10 mM Tris/Cl, pH 8,5 gelöst. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte mit dem Gene Quant RNA/DNA calculator[®] (Pharmacia Biotech). Bei der Prüfung des Amplifikationserfolgs mittels Gel-Elektrophorese zeigte sich für *P. truncatum* im Gegensatz zu den beiden anderen Arten, dass neben der gewünschten Bande von etwa 400 bp auch mehrere andere auftraten. Für die Sequenzierung bei SeqLab wurde daher die entsprechende Bande aus dem Gel geschnitten und mit QIAGEN-Kit aufgereinigt. Mit den von Sequence Laboratories Göttingen GmbH vorgegebenen Primer- und Template-Konzentrationen erfolgte die Sequenzierung dann nach Art des Advantage-Read, der einen eventuellen Zweitversuch mit optimierter DNA/Primer-Relation beinhaltet. Die ermittelten Sequenzen sind in Abb. 4 dargestellt. Das Alignment der Sequenzen erfolgte mit Hilfe von CLUSTAL W (www.ebi.ac.uk/embl/).

3.2.2.3. PCR-Parameter

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein Standardverfahren in vielen Forschungslabors, dennoch gibt es nicht ein generell anwendbares Standardprotokoll für jede PCR Reaktion. In der Regel werden mehr oder weniger modifizierte Formen der Originalprotokolle (Saiki et al. 1988) angewendet. Um die Effizienz einer bestimmten PCR-Reaktion zu verbessern, ist es erforderlich, die einzelnen Parameter des Ansatzes zu optimieren. In der vorliegenden Arbeit wurden die effektivsten Amplifikationsbedingungen in zahlreichen Versuchen durch Variieren der Parameter Annealing-Temperatur und Primer-Konzentration,

Konzentration der Magnesium-Ionen, Anzahl der Zyklen und der Reaktionsdauer ermittelt und optimiert.

Die Amplifikationen der partiellen ITS2-Sequenzen, spezifisch für die opisthorchiiden Leberegel, wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Puffer (Qiagen): Tris-HCl, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,5 mM MgCl_2 ; pH 8,3 (20°C)
Primer-Konzentrationen: 0,4 μM Primer OP1 und 0,4 μM OP2
Polymerase: 1,25 U Taq DNA Polymerase (Qiagen)
dNTP's: 200 μM je dNTP
Cycling Conditions: initiale Denaturierung 94°C, 3 min
Denaturierung 94°C, 1 min
Annealing 63°C, 1 min
Extension 72°C, 1 min
Final extension 72°C, 10 min, Kühlung 4°C
Zyklenzahl: 40 Zyklen

Für die Durchführung der für *C. sinensis* spezifischen PCRs wurde folgendes Protokoll verwendet:

Puffer (Qiagen): Tris-HCl, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,5 mM MgCl_2 ; pH 8,3 (20°C)
Primer-Konzentrationen: 0,4 μM Primer CS1 und 0,4 μM Primer CS2
Polymerase: 1,25 U Taq DNA Polymerase (Qiagen)
dNTP's: 200 μM je dNTP
Cycling Conditions: initiale Denaturierung 94°C, 3 min
Denaturierung 94°C, 1 min
Annealing 62°C, 1 min
Extension 72°C, 1 min
Final extension 72°C, 10 min, Kühlung 4°C
Zyklenzahl: 40 Zyklen

Die PCR-Reaktionen beider Systeme wurden in 50 μl -Ansätzen mit einem PTC-0150 Minicycler (MJ Research Inc., USA) durchgeführt.

3.2.2.4. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde in Anlehnung an die Methode von Sambrook und Mitarbeitern (2001) durchgeführt.

Zur Identifizierung der amplifizierten PCR-Produkte wurden Gel-Elektrophoresen in 2,5%igen Agarose-Gelen durchgeführt, die zur Anfärbung der DNA Ethidiumbromid enthielten. Zur Herstellung der 2,5%igen Gele wurden 2 g Agarose-Pulver in 80ml 1xTBE-Puffer (100 mM Tris, 90 mM Borsäure, 10 mM EDTA; pH 8,3) in der Mikrowelle kurz aufgekocht und mit 3µl 1%iger Ethidiumbromidlösung (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) versetzt. Nach Verfestigung und Überschichtung der Gele mit 1xTBE-Puffer wurden pro Geltasche 5-10 µl PCR-Produkt, dem zuvor 2,0 µl Schwerelösung (0,2% Bromphenolblau, 0,2% Xylencyanol, 60% Glycerin und 60 mM EDTA) zugesetzt worden war, aufgetragen. Als DNA-Marker diente eine 50 bp DNA-Leiter (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland). Die Elektrophoresen wurden mit einer Spannung von 110 V durchgeführt, wobei die Laufzeit je nach gewünschter Laufweite 1-1,5 h betrug. Die Sichtbarmachung der Banden erfolgte unter einem UV-Transilluminator, der das Ethidiumbromid bei $\lambda = 254$ nm zur Fluoreszenz anregt. Die erzeugten Bandenmuster wurden mit einer Digitalkamera dokumentiert.

3.2.2.5. Sensitivität und Spezifität der PCR-Systeme

Zur Bestimmung der Sensitivität der entwickelten PCR-Systeme OP1/OP2 und CS1/CS2 wurde eine Stammlösung aus einer DNA-Extraktionslösung von *Clonorchis sinensis* (siehe 3.2.1.) hergestellt, die $1,0 \times 10^{-8}$ +/- $0,06 \times 10^{-8}$ g genomischer DNA enthielt. Ausgehend von dieser Stammlösung wurde stufenweise im Verhältnis 1/10 verdünnt, indem je 10 µl der vorausgegangenen Verdünnung mit 90 µl Puffer AE (Qiagen) vermischt wurden. Die Testung auf Sensitivität erfolgte mit Verdünnungsstufen von 1×10^{-10} bis 1×10^{-17} g DNA.

Die Testung der Spezifität der Primer OP1/OP2 und CS1/CS2 erfolgte mit DNA von *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini*, *O. felineus*, *Metorchis*

xanthosomus, *Pseudamphistomum truncatum*, *Echinostoma caproni*, *Fasciola hepatica*, *Schistosoma mansoni*, *Paracoenogonimus ovatus* und *Holostephanus dubenini*. Dabei wurde jeweils 10 ng (10^{-8} g) genomische DNA in die PCR eingesetzt. Zudem wurden die Gen-Datenbanken DDBJ, EMBL und GenBank nach Sequenzen durchsucht, die eventuell Übereinstimmungen mit den Sequenzen im Bereich der entwickelten Primer aufweisen und somit unter Umständen kreuzreagieren könnten. Auf mögliche Kreuzreaktionen wurde zudem Wirtsgewebe der opisthorchiiden Leberegel untersucht, dies waren Gewebe der Zwischenwirtsschnecken *Bithynia leachi*, *B. tentaculata*, *B. fuchsiana*, *B. funiculata* und *Melanoides tuberculata*, sowie der Süßwasserfische Blaubandbärbling (*Pseudorasbora parva*), Goldfisch (*Carassius auratus auratus*) und Rotaugen (*Rutilus rutilus*).

3.2.2.6. Negativkontrollen

Bei jedem PCR-Experiment wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Diese Kontrollen enthielten PCR-Puffer, beide Primer, Taq-DNA-Polymerase und sämtliche dNTP's aber keine Ziel-DNA.

3.3. Entwicklung von Protokollen zur Gewinnung von Parasiten-DNA aus den verschiedenen Entwicklungsstadien der Opisthorchiidae

Ziel bei der Gewinnung von Parasiten-DNA aus den verschiedenen Entwicklungsstadien war es, schnell und einfach durchzuführende Methoden zu entwickeln, die ohne aufwendige Aufreinigungs- und Anreicherungs-schritte von DNA wie beispielsweise die bekannten Extraktionen mit Phenol/Chloroform und Präzipitationen mit Alkohol auskommen. Zudem sollten die Methoden kostengünstig sein und sich für routinemäßige Anwendungen eignen.

3.3.1. Aufarbeitung von Metazerkarien aus Fischgewebe

Im ersten Schritt der entwickelten Methode zur Gewinnung von Parasiten-DNA wurden die intakten Metazerkarien-Zysten aus dem Fischgewebe mittels lytischer Reagenzien herausgelöst, um die Metazerkarien besser von den im Lysat enthaltenen Substanzen reinigen zu können, die eine Amplifikation beeinträchtigen können. Im abschließenden Schritt wurden die Zystenwände der Metazerkarien aufgebrochen, die DNA der Parasiten freigesetzt und direkt in die PCR-Analyse eingesetzt.

Zur Freisetzung der Zysten aus dem Wirtsgewebe wurden verschiedene Methoden durchgeführt. So wurden alkalische Lysen, wie sie bereits für andere Gewebetypen erfolgreich eingesetzt wurden (Truett et al. 2000) mit verschiedenen Techniken, die auf einem peptischem Verdau basierten, verglichen. Nach der Isolierung der Metazerkarienzysten und der Reinigung der Lösung mussten die Zysten aufgebrochen werden, um die Parasiten-DNA freizusetzen. Dazu wurden Versuche mit verschiedenen Chemikalien und Enzymen sowie mit physikalischen Techniken durchgeführt. Die Lysate wurden neutralisiert und in die PCR eingesetzt.

Die Methode zur Isolierung von Metazerkarien-DNA aus infiziertem Fisch wurde mit Gewebe nicht infizierter Fische durchgeführt, die in Aquarienhaltung ohne Parasiten aufwuchsen und experimentell mit Metazerkarien versetzt wurden.

Um zu zeigen, dass die entwickelte Technik reproduzierbar und sensitiv arbeitet, wurden Proben von 10 Blaubandbärblingen (*Pseudorasbora parva*) bearbeitet, denen experimentell je eine Metazerkarie von *C. sinensis* zugesetzt wurde. Die Detektion der Parasiten-DNA erfolgte mit dem opisthorchiiden-spezifischen Primer-Systemen OP1/OP2 und dem *C. sinensis*-spezifischen Primer-System CS1/CS2.

3.3.2. Aufarbeitung von Schnecken

Die Aufarbeitung der Schnecken erfolgte mit alkalischer Lyse der entsprechenden Entwicklungsstadien der Opisthorchiiden. Ohne weitere Aufreinigung der Lysate wurden diese nach Neutralisation in die PCR-Analysen eingesetzt.

Um zu demonstrieren, dass mit der entwickelten Methode tatsächlich amplifizierbare Parasiten-DNA freigesetzt werden kann, wurden *Bithynia tentaculata*-Schnecken, die Wildinfektionen mit verschiedenen einheimischen Trematoden-Arten aufwiesen, behandelt. Bei den Wildinfektionen handelte es sich nicht um opisthorchiide Trematoden. Der molekularbiologische Nachweis erfolgte mit den für Trematoden universalen Primern LC1: 5'-CGA GTA TCG ATG AAG AAC GCA GC -3' und HC2: 5'-ATA TGC TTA AGT TCA GCG GG -3' (Després et al. 1992). Die Auflösung des Rediengewebes unter alkalischen Bedingungen wurde zudem lichtmikroskopisch überprüft.

Um den Einfluss der Schnecken-Lysate auf den Amplifikationserfolg ermitteln zu können, wurde je 1 µl der Lysate von nicht infizierten Schnecken mit definierten DNA-Mengen einer Verdünnungsreihe von *C. sinensis* versetzt (siehe 3.2.2.5.). D.h., den einzelnen PCR Ansätzen wurden neben 1 µl Schnecken-Lysat 10^{-10} g, 10^{-11} g, 10^{-12} g, 10^{-13} g, 10^{-14} g und 10^{-15} g genomische *C. sinensis*-DNA zugesetzt. Eine Abschätzung erfolgte dann über den Amplifikationserfolg mit den Primer-Systemen CS1/CS2 im Vergleich mit den entsprechenden Amplifikationserfolgen ohne Zusatz von Schnecken-Lysat.

3.3.3. Aufarbeitung von Opisthorchiiden-Eiern in Stuhlproben

Es ist bekannt, dass Fäkalmaterial eine ganze Reihe von Substanzen enthält, die eine Amplifikation stark inhibieren können (Wilde et al. 1990). Zu diesen Substanzen zählen die Gallensalze Glykochol- und Taurocholsäure, wobei der inhibierende Mechanismus nicht genau bekannt ist. Es wird aber eine Hemmung der DNA-Polymerase angenommen (Lantz et al. 2000). Ebenfalls inhibierend wirken die Gallenfarbstoffe (Bilirubine), die Abbauprodukte des Hämoglobins darstellen. Um die störenden Substanzen aus den Stuhlproben zu entfernen, wurden Versuche mit verschiedenen Lösungsmitteln durchgeführt.

Um die Eier anzureichern und von großen Teilen des Fäkalmaterials zu trennen, wurde versucht die Eier mit Hilfe einer dichten Zucker/Salz-Lösung zu isolieren.

Zur Freisetzung der Parasiten-DNA aus den Eiern wurden verschiedene Versuche unternommen die Ei-Deckel abzusprennen bzw. die Ei-Schalen aufzubrechen. Dazu wurden chemische und physikalische Methoden angewandt. Um die

Reproduzierbarkeit der vorgestellten Methode zur Aufarbeitung von Stuhlproben für anschließende PCR Analysen zu bestimmen, wurde sie an 10 getrennt aufgearbeiteten Proben durchgeführt. 10 menschliche Stuhlproben von nicht infizierten Individuen wurden hierzu experimentell jeweils mit nur einem *C. sinensis*-Ei versehen, um die extrem hohe Sensitivität der beschriebenen Technik zu bestätigen. Die Analysen wurden mit den Primer-Systemen OP1/OP2 und CS1/CS2 durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Analyse der Sequenzen der ITS2-Region

Die Nukleotid-Sequenzen der untersuchten Vertreter der Opisthorchiidae *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini*, *O. felineus*, *Metorchis xanthosomus* und *Pseudamphistomum truncatum* zeigen in der ITS2-Region sehr große Übereinstimmungen. Dies ist auch in dem Bereich der Fall, in dem die Primer OP1 und OP2 hybridisieren (Abb. 2). Im Bereich von OP1 sind die Arten identisch, im Bereich OP2 ebenfalls, mit der Ausnahme der Position 277, in der bei *M. xanthosomus* ein G (Guanin) durch ein A (Adenin) ersetzt ist. Diese eine Basensubstitution beeinträchtigt aber nicht die erfolgreiche Amplifikation des entsprechenden PCR-Produkts (Abb. 5). Die ITS2-Sequenzen der untersuchten Opisthorchiiden unterscheiden sich hingegen deutlich von denen anderer Trematoden-Arten, wobei die Nukleotid-Unterschiede im Bereich, in dem der Primer OP2 bei den untersuchten Opisthorchiiden hybridisiert, hier so viele Differenzen aufweist, dass ein Hybridisieren, insbesondere unter den gewählten stringenten PCR-Bedingungen, ausgeschlossen ist. Die Sequenzen der ITS2-Region für einige Vertreter der den Opisthorchiidae am nächsten verwandten Gruppe der Heterophyidae sind in den Gendatenbanken DDBJ, EMBL und GenBank zu finden (Abb. 3). Differenzen in der Nukleotidabfolge sind insbesondere im Bereich von OP2 schon bei diesen nahe verwandten Heterophyiden so zahlreich sind, dass ein Hybridisieren ausgeschlossen ist. Dass die Nukleotid-Unterschiede mit abnehmender evolutionärer Nähe zunehmen, folgt daraus, dass das Primer-Paar OP1/OP2 ebenfalls gegen sämtliche weiter entfernt verwandten Trematoden-Gruppen diskriminiert und somit spezifisch für die Vertreter der Opisthorchidae ist.

Der Sequenzvergleich der ITS2-Region zeigt im Fall vom Primer-Paar CS1/CS2, dass die Nukleotid-Differenzen im Bereich für Primer CS2 selbst innerhalb der untersuchten opisthorchiiden Leberegel ausreichend groß sind, um gegen diese zu diskriminieren (Abb. 2 und Abb. 10). Das gilt auch für den Vergleich mit den entsprechenden Sequenzen von den nahe verwandten heterophyiden Trematoden (Abb. 3). Das Primer Paar CS1/CS2 ist somit spezifisch für *C. sinensis*.

4. Ergebnisse

		→ITS2	
<i>C. sinensis</i>	TTGCGGCCATGGGTTTGCCCTGTGGCCACGCCTGTCC CGAGGGTCGGCTTATAAAC TATCAC	60	
<i>O. viverrini</i>	TTGCGGCCATGGGTTTGCCCTGTGGCCACGCCTGTCC CGAGGGTCGGCTTATAAAC TATCAC	60	
<i>O. felineus</i>	TTGCGGCCATGGGTTTGCCCTGTGGCCACGCCTGTCC CGAGGGTCGGCTTATAAAC TATCAC	60	
<i>P. truncatum</i>	TTGCGGCCATGGGTTTGCCCTGTGGCCACGCCTGTCC CGAGGGTCGGCTTATAAAC TATCAC	60	
<i>M. xanthosomus</i>	TTGCGGCCATGGGTTTGCCCTGTGGCCACGCCTGTCC CGAGGGTCGGCTTATAAAC TATCAC	60	

<i>C. sinensis</i>	GACGCCAAAAAGTCGTGGCTTGGGTCTTGCCAGCTGGCATGATTTCCCCACACAATTGT	120	
<i>O. viverrini</i>	GACGCCAAAAAGTCGTGGCTTGGGTCTTGCCAGCTGGCATGATTTCCCCCGCAATTGT	120	
<i>O. felineus</i>	GACGCCAAAAAGTCGTGGCTTGGGTCTTGCCAGCTGGCATGATTTCCCCACGATTTGT	120	
<i>P. truncatum</i>	GACGCCAAAAAGTCGTGGCTTGGGTCTTGCCAGCCGGCATGATTTCCCCGCACGTTTGT	120	
<i>M. xanthosomus</i>	GACGCCAAAAAGTCGTGGCTTGGGTCTTGCCAGCTGGCATGATTTCCCCGCACGTTTGT	120	
	***** * * *		
<i>C. sinensis</i>	GTGTATGTGTGTGGGGTGC CGGATCTATGGCTTTTCCCAATGTGCCGGACGCAACCATG	180	
<i>O. viverrini</i>	GTG-----GGGTGCCGGATCTATGGCTTTTCCCAATGTGCCGGACGCAACCATG	170	
<i>O. felineus</i>	GTG-----GGGTGCCGGATCTATGGCTTTTCCCAATGTGCCGGACGCAACCATG	170	
<i>P. truncatum</i>	GTG-----GGGTGCCGGATCTATGGCTTTTCCCAATGTGCCGGACGCAACCATG	170	
<i>M. xanthosomus</i>	GTG-----GGGTGCCGGATCTATGGCTTTTCCCAATGTGCCGGACGCAACCATG	170	
	*** *****		
<i>C. sinensis</i>	TCTGGGCTGACTGCCTAGATGAGGGGGTGGCGGCGGAGTCGTGGCTCAATTGTTGTT---	237	
<i>O. viverrini</i>	TCTGGGCTGACTGCCTAGATGAGGGGGTGGCGGCGGAGTCGTGGCTCAATTGTTGTTATT	230	
<i>O. felineus</i>	TCTGGGCTGACTGCCTAGATGAGGGGGTGGCGGCGGAGTCGTGGCTCAATTGTTGTTGTT	230	
<i>P. truncatum</i>	TCTGGGCTGACTGCCTAGATGAGGGGGTGGCGGCGGAGTCGTGGCTCAATTGTT-----	224	
<i>M. xanthosomus</i>	TCTGGGCTGACTGCCTAGATGAGGGGGTGGCGGCGGAGTCGTGGCTCAATTGTTCTT---	227	

<i>C. sinensis</i>	ATTGTTGTGAATGTGCGCGCTCCGTTGTTGGTCC TTTTGTCTTTGGTTGAGGCT CCAGTAG	297	
<i>O. viverrini</i>	GTTGTTGTGAATGTGCGCGCTCCGTTGTTGGTCC TTTTGTCTTTGGTTGAGGCT CCAGTAG	290	
<i>O. felineus</i>	ATTGTTGTGAATGTGCGCGCTCCGTTGTTGGTCC TTTTGTCTTTGGTTGAGGCT CCAGTAG	290	
<i>P. truncatum</i>	ATTGTTGTGGATGTGCGCGCTCCGTTGTTGGTCC TTTTGTCTTTGGTTGAGGCT CCAGTAG	284	
<i>M. xanthosomus</i>	ATTGTTGTGTATGTGCGCGCTCCGTTGTTGGTCC TTTTGTCTTTGGTTGAGGCT CCAGTAG	287	
	***** * * *		
			ITS2←
<i>C. sinensis</i>	TGGCAATGCATTTCGATGCAAATCTGTTTTCACCG GGTCGGTGCTTAA ---CTTTCC TGAC	354	
<i>O. viverrini</i>	TGGCAATGCATTTCGATGCAAATCGGTTTTGCACT--TTGGTGCTTAACA ACTTTCC TGAC	348	
<i>O. felineus</i>	TGGCAATGCATTTCGATGCAAATCTGTTTTCACCT--TCGGTGCTTAA---CTTTCC TGAC	345	
<i>P. truncatum</i>	TGGCAATGCATTTCGATGCAAATCTGTTTTCACCT--TCCGTGCTTA---CTTTCC T-AC	337	
<i>M. xanthosomus</i>	TGGCAATGCATTTCGATGCAAATCTGTTTTCACCT--TCCGTGCTTAA---CTTTCC TGAC	342	
	***** * * *		
<i>C. sinensis</i>	CTCGGATCAGA	365	
<i>O. viverrini</i>	CTCGGATCAGA	359	
<i>O. felineus</i>	CTCGGATCAGA	356	
<i>P. truncatum</i>	CATGGATCAGA	348	
<i>M. xanthosomus</i>	CTCGGATCAGA	353	
	* * * * * *		

Abb. 2: Nukleotid-Sequenzen der ITS2-Region von opisthorchiiden Leberegel. Die Nukleotid-Sequenzen von *O. felineus*, *P. truncatum* und *M. xanthosomus* wurden für die vorliegende Arbeit bestimmt. Die Sequenzen von *C. sinensis* (AF 17094/AF17097/AF217099) und *O. viverrini* (AF408147) wurden aus GenBank entnommen. Die Primer OP1(=CS1) und OP2 sind blau, Primer CS2 rot dargestellt. Sterne unterhalb der Sequenzen zeigen übereinstimmende Nukleotide bei allen fünf Arten.

4. Ergebnisse

		→ITS2	
<i>C. sinensis</i>	TTGCGGCCATGGGTTTGCTGTGGCCACGCCTGTCC CGAGGGTCGGCTTATAAACT TATCAC		60
<i>H. pumilio</i>	TTGCGGCCATGGGTTTGCTGTGGCCACGCCTGTCCGAGGGTCGGCTTATAAACTATCAC		60
<i>H. taichui</i>	TTGCGGCCATGGGTTTGCTGTGGCCACGCCTGTCCGAGGGTCGGCTTATAAACTATCAC		60
<i>P. genata</i>	TTGCGGCCATGGGTTTGCTGTGGCCACGCCTGTCCGAGGGTCGGCTTATAAACTATCAC		60
<i>Centrocestus</i>	TTGCGGCCATGGGTTTGCTGTGGCCACGCCTGTCCGAGGGTCGGCTTATAAACTATCAC		60
<i>P. longa</i>	TTGCGGCCATGGGTTTACCTGTGGCCACGCCTGTCCGAGGGTCGGCTTATAAACTATCGC		60

<i>C. sinensis</i>	GACGCCCAAAAAGTCGTGGCTTGGGTCTTGCCAGCTGGCATGATTTCCCCACAC-AATTG		119
<i>H. pumilio</i>	GGCGCCCAAAAAGTCGTGGCTTGGGTCTTGCCAGCTGGCGTGATTTCCCTGTGC-TATTG		119
<i>H. taichui</i>	GACGCCCAAAAAGTCGTGGCTTGGGTCTTGCCAGCTGGCGTGATTTCCCTGTAG-GTTTC		119
<i>P. genata</i>	GACGCCCAAAAAGTCGTGGTTTGGGTCTTGCCAGCTGGCGTGATTACCTGTGCTATTTG		120
<i>Centrocestus</i>	GACGCCCAAAAAGTCGTGGCTTGGGTCTTGCCAGCCGCGTGATTTCCCTGTGC-TTT-G		118
<i>P. longa</i>	GACGCCCAAAAAGTCGTGGTTTGGGTCTTGCCAGCTGGCGTGATTACCTGTGC-TGAAG		119
* *****			
<i>C. sinensis</i>	TGTGTATGTGTGTGGGGTGCCGGATCTATGGCTTTTCCCAATGTGCCGGACGCAACCAT		179
<i>H. pumilio</i>	CATG-----GGGTGCCAGATCAATGGCTTCTCCCTAATGTGCCGAACGCAACCAT		169
<i>H. taichui</i>	TATG-----AGGTGCCAGATCTGTGGCTTTCCCTAATGTGCCGGACGCAACCAT		169
<i>P. genata</i>	TGTG-----GGGTGCCAGATCTATGGCTTTTCCCTAAGGTGCCGGACGCAACCAT		170
<i>Centrocestus</i>	CATG-----GGGTGCCGGATCTATGGCTTTTCCCTAATGTGCCGGACGCAACCAT		168
<i>P. longa</i>	TGCA-----GGGTGCCGGATCTATGGCTTTTCCCTAAGGTGCCGGATGCAACCAT		169
***** * * * * *			
<i>C. sinensis</i>	GTCTGGGCTGA---CTGCCTAGATGAGGGGGTGGCGGCGGAGTCGTGGCTCAATTGTTG		235
<i>H. pumilio</i>	GTCTGGGTTGA---ATGCCTGGATGAGGGGGTGGCGGCGGAGTCGTGGCTCAATTTATG		225
<i>H. taichui</i>	TACTGGGCTGATGGAAGCCCTGGATGAATCTATGGTGGCGGAGTCGTGGCTCAAT-----		224
<i>P. genata</i>	GTCTGGGCTGA---CGGCCTGGATGAGGAGGTGGCGGCGGAGTCGTGGCTCAGT-----		221
<i>Centrocestus</i>	CTCCAGGCTGG---CGTCTGGATGAGGAAGTGGCGGCGGAGTCGTGGCTCAATGATAC		224
<i>P. longa</i>	GTCTAGGCAGA---TGACCTGGATGAGGATGTGACGGCAGAGTCGTGGCTCAATGGAAA		225
* * * * * * * * * * * * * * * * *			
<i>C. sinensis</i>	TTA--TTGTTGTGAAT-GTGC GCGCTCCGTTGTTG--GTC CTTTGTCTTTGGTTGAGGC		289
<i>H. pumilio</i>	TAT--TTTTATTTCATTTGTGCGCGCTCCGCTGA-A---AACCTTCGTCTGTGGCTGTGAT		279
<i>H. taichui</i>	-AA--TTAGTGGCTAACGCACGCGCTCCGTTATCATTATTCATCATTATTTGGTTTCAGGC		281
<i>P. genata</i>	-----TGAATAAAGTTAATGCGCGCTCCGTTGTCT---AATCCTTGTCAATTTGGCTACAGC		273
<i>Centrocestus</i>	ATATATATATATATATAATGCGCGCTCCGTTGTCT---ATTCCTTGTCTGTGATCTCGGC		281
<i>P. longa</i>	ATA-----ATTATGCGCGCTCTGCTGTCT---TTTCTTCGTCCGGGTGTTTGAC		271
***** * * * * * * * * * *			
<i>C. sinensis</i>	TT CAG--TATTGGCAATGCATTCGATGCAAATCTGTTTTCACCGGT CGGTGCTTA ACT-		346
<i>H. pumilio</i>	GCTAGGATGTGGTCAATGCAT-CGATGCAAATA-ATTGTGACTAT---GTCCATATT-		333
<i>H. taichui</i>	TTTA---TAATGGCAATGCATCCGAAGCCAGTT-AATGGGTACCTA---TCCCATTTTG		333
<i>P. genata</i>	TTTGG-ATCATGGCGCTGCATCCGATGCAATTCTGTGTGCGACAAGT-GGTGCGTCCAT-		330
<i>Centrocestus</i>	-ATTG-GGTTTGGCAATGCATCCGATGCAAACATTGCACGCGTTTCTAATGTGTGCTATT		339
<i>P. longa</i>	CATTG-ACTATGGCGCTGCATCCGATGCGAACGTAAGGCACGCTTTTA--GTGTGTCGTA		328
* * * * * * * * * * *			
		←ITS2	
<i>C. sinensis</i>	TTCC TGACCTCGGATCAGA-----		365
<i>H. pumilio</i>	TACCTGACCTCGGATCAGA-----		352
<i>H. taichui</i>	TCCCTGACCTCGGCTCAGA-----		352
<i>P. genata</i>	TTCC TG ACCTCGGATCAGACGTGAATACCC		360
<i>Centrocestus</i>	TTCC TG ACCTCGGATCAGA-----		358
<i>P. longa</i>	TTCCCGACCTCG-----		340
* * * * * * * * * * *			

Abb. 3: Nukleotid-Sequenzen der ITS2-Region von *C. sinensis* (AF217094) und von den in den Datenbanken DDBJ, GenBank und EMBL eingetragenen Sequenzen heterophyider Trematoden-Arten *Haplorchis pumilio* (AY245706), *Haplorchis taichui* (AY245705), *Pygidiopsis genata* (AY245710), *Centrocestus* sp. (AY245699) und *Phagicola longa* (AY245703). Die Primer OP1(=CS1) und OP2 sind blau, Primer CS2 rot dargestellt. Die vielen Differenzen im Bereich der Primer OP2 und CS2 von opisthorchiiden und heterophyiden Arten verhindert ein erfolgreiches Hybridisieren und schließt somit Kreuzreaktionen aus. Sterne unterhalb der Sequenzen zeigen übereinstimmende Nukleotide bei den sechs Arten.

4.2. Primer OP1/OP2 und CS1/CS2

4.2.1. Amplifikation mit den für Opisthorchiiden spezifischen Primern OP1/OP2

4.2.1.1. Spezifität der Primer OP1/OP2

Auf Grundlage der ITS2-Sequenzen der Opisthorchiiden *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini*, *O. felineus*, *Pseudamphistomum truncatum* und *Metorchis xanthosomus* konnte ein einzelnes Primer-Paar entwickelt werden, mit dem jeder der vorgenannten Leberegel nachgewiesen werden kann und gleichzeitig gegen Trematoden diskriminiert, die nicht zu den Opisthorchiiden zählen. Die Amplifikation von rDNA mit Hilfe des Primer-Paares OP1/OP2 ergab für *C. sinensis* ein Produkt von 255 bp Länge, für *O. viverrini* und *O. felineus* eins von 248 bp, für *P. truncatum* eins von 242 bp und für *M. xanthosomus* eins von 245 bp Länge (siehe Tab. 4). Die Spezifität des Primer-Systems wurde anhand fünf adulter Individuen jeder Spezies demonstriert (siehe Abb. 4 und 5). Von *M. xanthosomus* standen drei Metazerkarien zur Verfügung (siehe Abb. 5). Die DNA-Proben, die jeweils von einem Leberegel stammten, wurde wie unter 3.2.1. beschrieben extrahiert. In die einzelnen PCR-Ansätze wurde dann jeweils 1 µl eingesetzt.

Die Testung des PCR-Systems mit DNA von verschiedenen Trematoden-Arten (*Echinostoma caproni*, *Holostephanus dubenini*, *Paracoenogonimus ovatus*, *Schistosoma mansoni*) ergab kein Signal. Die DNA von *Fasciola hepatica* zeigte mit OP1/OP2 Kreuzreaktionen, wobei die amplifizierten Produkte jedoch nicht in dem Bereich der für die getesteten Opisthorchiiden spezifischen Produkte lagen (siehe Abb. 6). Die zusätzlich durchgeführten Tests auf Kreuzreaktionen mit DNA von verschiedenen Zwischenwirts-Schnecken (*Bithynia leachi*, *B. tentaculata*, *B. fuchsiana*, *B. funiculata* und *Melanoides tuberculata*) und Fischen (*Carassius auratus auratus*, *Pseudorasbora parva* und *Rutilus rutilus*) ergaben alle negative Resultate (siehe Abb. 7).

Tab. 4: Länge der amplifizierten PCR-Produkte der untersuchten Opisthorchiiden

Spezies	Länge des amplifizierten PCR-Produkts in bp
<i>Clonorchis sinensis</i>	255
<i>Opisthorchis viverrini</i>	248
<i>Opisthorchis felineus</i>	248
<i>Pseudamphistomum truncatum</i>	242
<i>Metorchis xanthosomus</i>	245

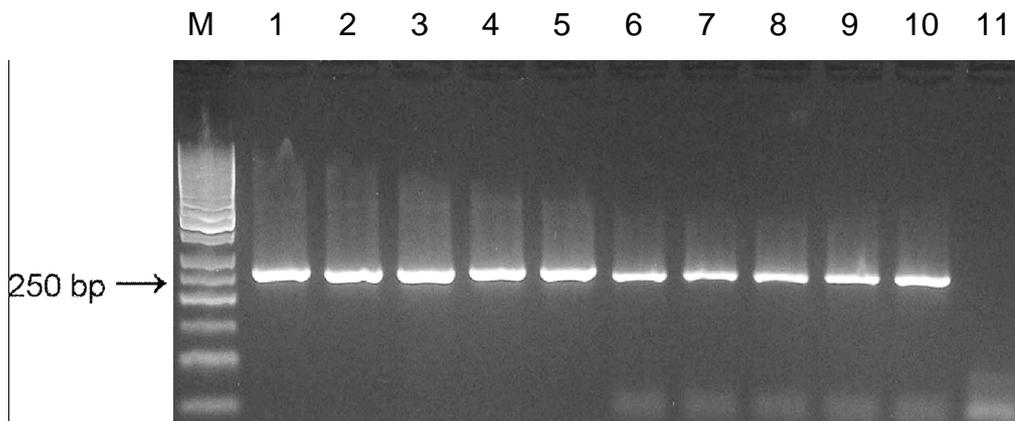


Abb. 4: Amplifikationsprodukte der für Opisthorchiiden spezifischen Primer OP1/OP2 mit DNA von *C. sinensis* und *P. truncatum* (adult)

Spur M: 50 bp DNA-Marker, Spuren 1-5: *C. sinensis*-DNA aus verschiedenen Präparationen, Spuren 6-10: *P. truncatum*-DNA aus verschiedenen Präparationen, Spur 11: Negativkontrolle

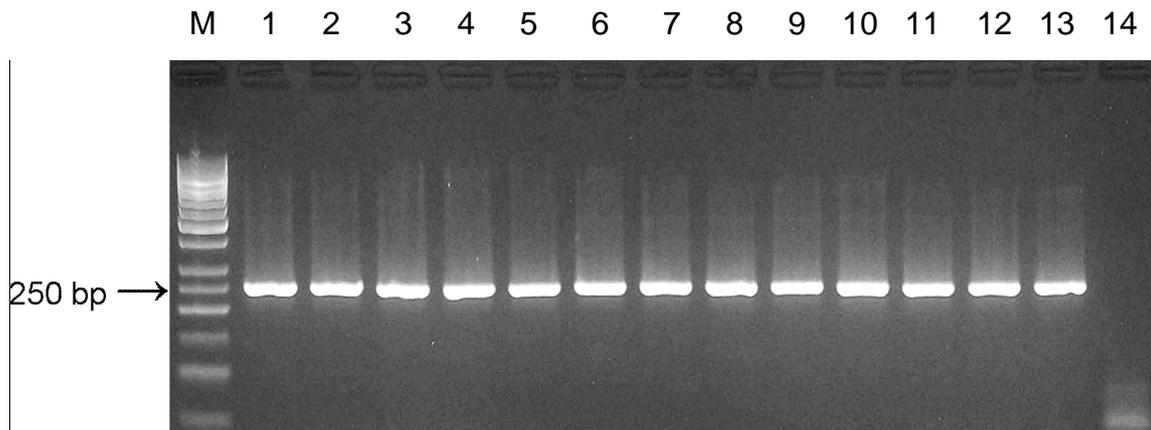


Abb. 5: Amplifikationsprodukte der für Opisthorchiiden spezifischen Primer OP1/OP2 mit DNA von *O. felineus*, *O. viverrini* und *M. xanthosomus*

Spur M: 50 bp DNA-Marker, Spuren 1-5: *O. felineus*-DNA aus verschiedenen Präparationen, Spuren 6-10: *O. viverrini*-DNA aus verschiedenen Präparationen, Spuren 11-13: *M. xanthosomus*-DNA aus verschiedenen Präparationen, Spur 14: Negativkontrolle

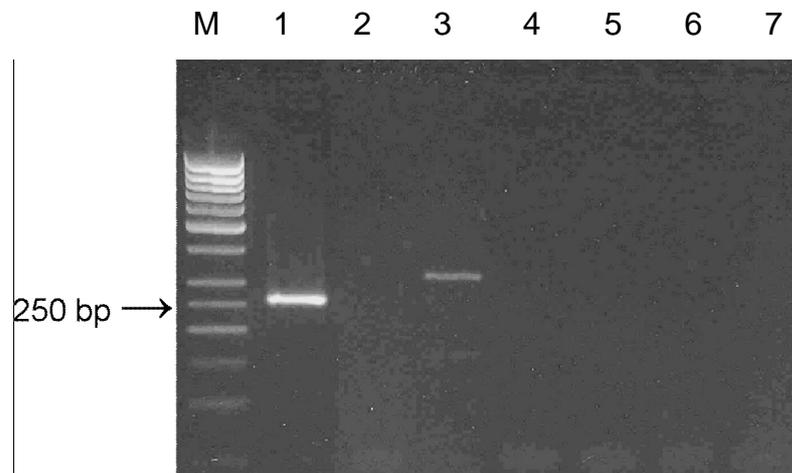


Abb. 6: Testung der Primer OP1/OP2 mit DNA verschiedener Trematoden-Arten

Spur M: 50 bp DNA-Marker, Spur 1: *C. sinensis* (Positivkontrolle), 2: *E. caproni*, 3: *F. hepatica*, 4: *H. dubenini*, 5: *P. ovatus*, 6: *S. mansoni*, 7: Negativkontrolle

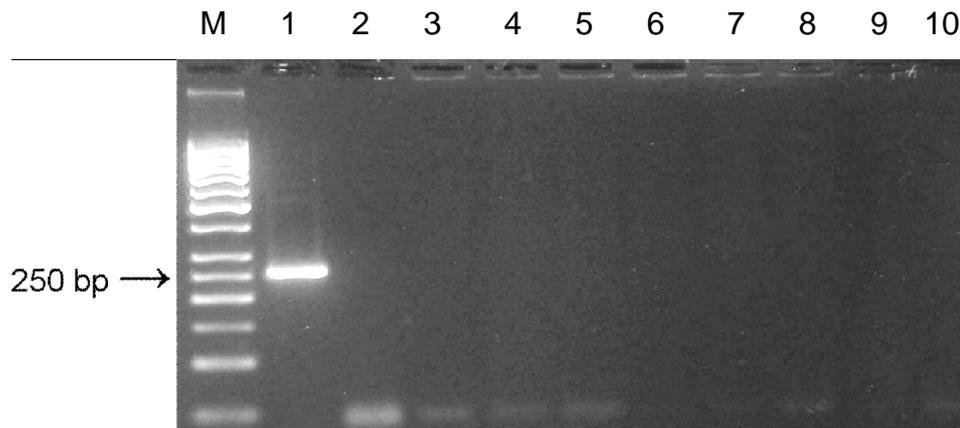


Abb. 7: Testung der Primer OP1/OP2 mit DNA verschiedener Zwischenwirte der Opisthorchiidae

Spur M: 50 bp DNA-Marker, Spur 1: *C. sinensis* (Positivkontrolle), 2: Negativkontrolle, 3: *B. leachi*, 4: *B. tentaculata*, 5: *B. funiculata*, 6: *M. tuberculata*, 7: *P. manchouricus*, 8: *C. auratus auratus*, 9: *P. parva*, 10: *R. rutilus*

4.2.1.2. Sensitivität des Primer-Systems OP1/OP2

Zur Bestimmung der Sensitivität des Primer-Systems OP1/OP2 wurde eine Verdünnungsreihe mit der DNA von *C. sinensis* hergestellt und in den Verdünnungsstufen 1×10^{-12} g, 1×10^{-13} g, 1×10^{-14} g, 1×10^{-15} g und 1×10^{-16} g genomischer DNA getestet. Dabei konnte bei einem Einsatz von 1×10^{-15} g DNA je PCR-Ansatz noch ein Amplifikationsprodukt nachgewiesen werden (siehe Abb. 8).

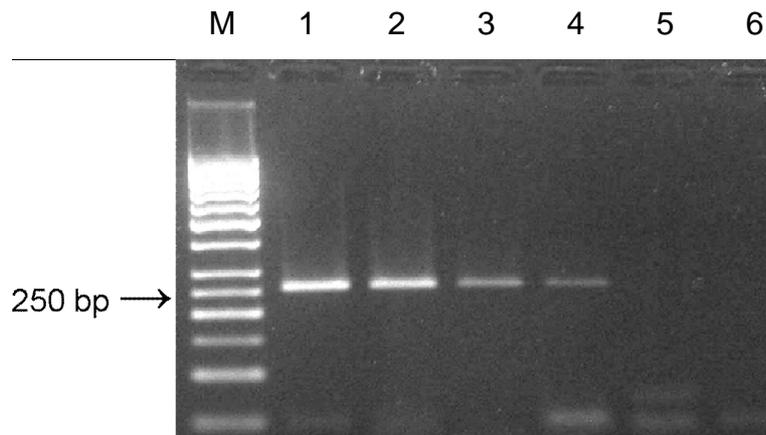


Abb. 8: Sensitivität des Primer-Systems OP1/OP2 mit genomischer DNA von *C. sinensis*

Spur M: 50 bp DNA-Marker, Spur 1: 1×10^{-12} g, 2: 1×10^{-13} g, 3: 1×10^{-14} g, Spur 4: 1×10^{-15} g, 5: 1×10^{-16} g, 6: Negativkontrolle

4.2.2. Amplifikation mit den für *Clonorchis sinensis* spezifischen Primern CS1/CS2

4.2.2.1. Spezifität des Primer-Systems CS1/CS2

Das Primer-System CS1/CS2 wurde ebenfalls auf Grundlage der ITS2-Sequenz entwickelt und lieferte für *Clonorchis sinensis* ein Amplifikationsprodukt von 315 bp Länge. Dieses spezifische Produkt wurde anhand von zehn adulten Würmern, die aus verschiedenen Endwirten isoliert worden waren, nachgewiesen (Abb. 9). Die Testung mit DNA von *Pseudamphistomum truncatum* und *Metorchis xanthosomus* sowie von verschiedenen Trematoden-Arten ergab keine Kreuzreaktionen (Abb. 10). Auch die sehr nahe verwandten *Opisthorchis*-Arten *O. viverrini* und *O. felineus* zeigten mit dem Primer-System CS1/CS2 keine Amplifikate (Abb. 10). Ebenfalls negativ reagierten DNA-Extrakte der getesteten Wirtsschnecken *Bithynia fuchsiana* und *Melanoides tuberculata* und der Süßwasserfische *Pseudorasbora parva* und *Carassius auratus auratus* (Abb. 11).

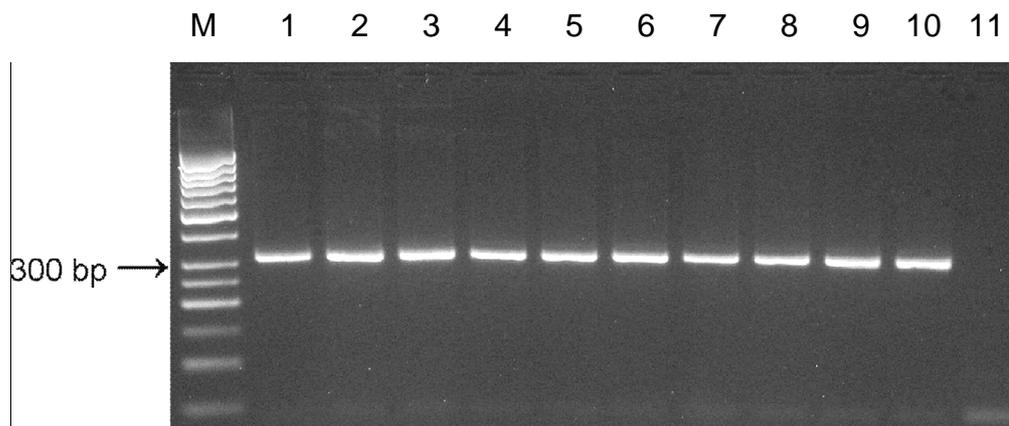


Abb. 9: Amplifikationsprodukte des für *C. sinensis* spezifischen Primer-Systems CS1/CS2 mit DNA von *C. sinensis*

Spur M: 50 bp DNA-Marker, Spuren 1-10: *C. sinensis* DNA verschiedener Individuen, Spur 11: Negativkontrolle

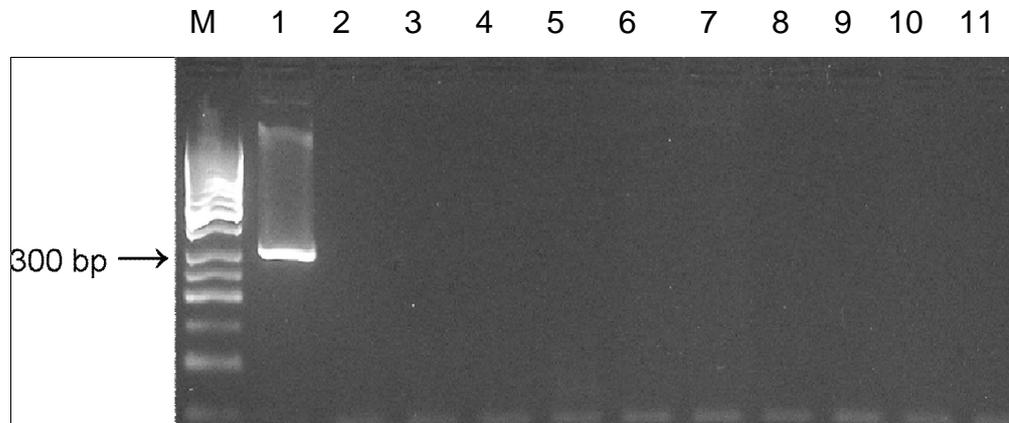


Abb. 10: Testung der Primer CS1/CS2 mit DNA von verschiedenen Trematoden-Arten

Spur M: 50 bp DNA-Marker, Spur 1: *C. sinensis* (Positivkontrolle), 2: *O. viverrini*, 3: *O. felinus*, 4: *P. truncatum*, 5: *M. xanthosomus*, 6: *E. caproni*, 7: *F. hepatica*, 8: *H. dubenini*, 9: *P. ovatus*, 10: *S. mansoni*, 11: Negativkontrolle

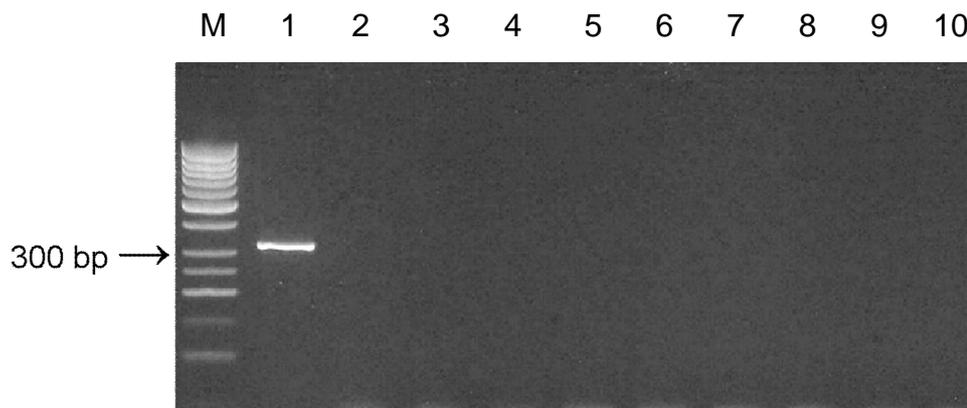


Abb. 11: Testung der Primer CS1/CS2 mit DNA von verschiedenen Zwischenwirten der Opisthorchiidae

Spur M: 50 bp DNA-Marker, Spur 1: *C. sinensis* (Positivkontrolle), 2: *B. leachi*, 3: *B. tentaculata*, 4: *B. funiculata*, 5: *M. tuberculata*, 6: *P. manchouricus*, 7: *C. auratus auratus*, 8: *P. parva*, 9: *R. rutilus*, 10: Negativkontrolle

4.2.2.2. Sensitivität des Primer-Systems CS1/CS2

Zur Bestimmung der Sensitivität des Primer-Systems CS1/CS2 wurde eine Verdünnungsreihe mit der DNA von *C. sinensis* hergestellt und in den Verdünnungsstufen 10^{-10} g, 10^{-11} g, 10^{-12} g, 10^{-13} g, 10^{-14} g, 10^{-15} g, 10^{-16} g und 10^{-17} g genomischer DNA getestet. Dabei konnte bei einem Einsatz von 10^{-13} g DNA je PCR-Ansatz noch ein Amplifikationsprodukt nachgewiesen werden (siehe Abb. 12).

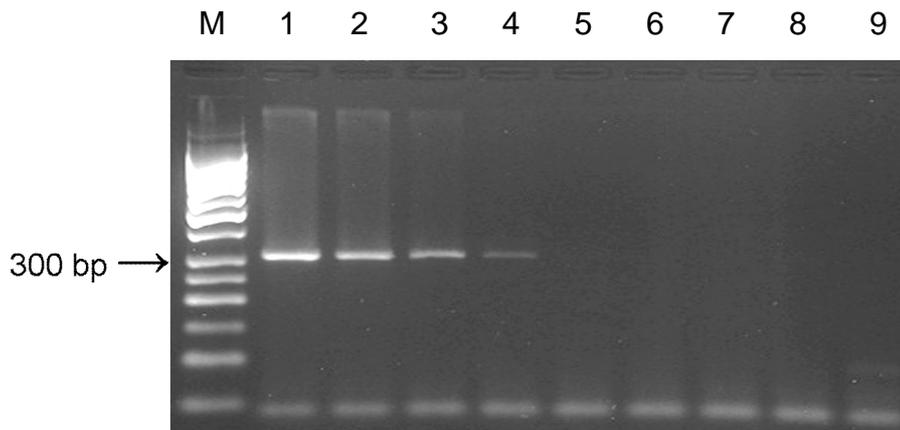


Abb. 12: Sensitivität des Primer-Systems CS1/CS2 für genomische DNA von *C. sinensis*

Spur M: 50 bp DNA-Marker, Spur 1: 10^{-10} g, Spur 2: 10^{-11} g, Spur 3: 10^{-12} g, Spur 4: 10^{-13} g, Spur 5: 10^{-14} g, Spur 6: 10^{-15} g, Spur 7: 10^{-16} g, Spur 8: 10^{-17} g, Spur 9: Negativkontrolle

4.3. Protokolle zur Aufarbeitung von Parasiten-DNA aus den verschiedenen Wirten zum Einsatz in die PCR

4.3.1. Aufarbeitung von Metazerkarien aus Fischgewebe mit anschließender PCR

Zur Freisetzung der Zysten aus dem Wirtsgewebe wurden verschiedene Versuche durchgeführt, von denen die Zersetzung der Fischmuskulatur mit einer alkalischen Lösung (25 mM KOH-Lösung mit 0,2 mM EDTA; pH 12) zunächst am besten schien. Das Fischgewebe wurde vollständig aufgelöst, während die Metazerkarien-Zysten intakt blieben. Ein Problem bestand darin, dass in den Lysaten der Fischschleim nicht aufgelöst wurde und die Metazerkarien in flockigem Schleim eingeschlossen wurden und nicht sedimentiert werden konnten. Verschiedene Versuche den Schleim mit Mercaptoethanol, Polyethylenglykol, Natriumdithionit oder den nichtionischen Detergentien Triton X-100, Nonidet P40 oder Tween 20 aufzulösen blieben erfolglos. Auch der Einsatz des proteolytischen

Enzyms Papain führte nicht zum erwünschten Ergebnis. Durch Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS) könnte der Schleim aufgelöst werden, aber das anionische Detergenz inhibierte die PCR. Bereits Konzentrationen von weniger als 0,06% im Versuchsansatz inhibieren die PCR vollständig (Weyant et al. 1990). Versuche, die Schleimstoffe der Fischproben bereits vor der Lyse durch Behandlung der Fische mit 70%igem Ethanol zu entfernen waren nur teilweise erfolgreich und ließen sich nicht zuverlässig mit verschiedenen Fischarten wiederholen.

Im Gegensatz zur alkalischen Gewebsauflösung blieben bei einer sauren Lyse mit Hilfe des Enzyms Pepsin (Schuster et al. 1998) keine störenden Schleimstoffe zurück, und ein Sedimentieren der im Fischgewebe enthaltenen Metazerkarien war ohne Probleme möglich. Das Auflösungsverfahren mit Pepsin wurde daher modifiziert und in die eigene Methode integriert.

Die Auflösung der metazerkarienhaltigen Fischmuskulatur erfolgte wie zuvor erwähnt mit dem herkömmlichen Digestionsverfahren (Schuster et al. 1998), jedoch wurde dem künstlichen Magensaft (0,9% Pepsin in 0,7% Salzsäure) zusätzlich 1% Triton X-100 zugesetzt. Beim Verdau des Fischgewebes mit künstlichem Magensaft ohne Detergenz (0,9% Pepsin in 0,7% Salzsäure) zeigte sich, dass nach dem Verdau oftmals noch Rückstände von Muskeln vorhanden waren. Diese Rückstände konnten eine Konzentration der Metazerkarien erheblich einschränken. Wurde dem künstlichen Magensaft aber Triton X-100 zugegeben, lief die Verdauung schneller und vollständiger ab (45-60 min mit Zusatz von Triton X-100 im Vergleich zu 90-120 min ohne Zusatz). Triton X-100 ist ein nicht-ionisches Detergenz, das weder die enzymatische Aktivität des Pepsins verminderte, noch die PCR inhibierte. Triton X-100 beschädigte zudem nicht die Zystenwand der Metazerkarienzysten, und daher war es möglich mit dem veränderten Digestionsverfahren, intakte Zysten aus Fischgewebe zu isolieren.

Je 3 g Fischgewebe wurden zerkleinert und in 50 ml Falcon-Röhrchen in künstlichem Magensaft (0,9% Pepsin und 1% Triton X-100 in 0,7% Salzsäure) bei 38-40°C inkubiert und gelegentlich von Hand geschüttelt. Nach 45-60 min war der Verdau des Fischgewebes abgeschlossen. Die Proben wurden dann kurz zentrifugiert, damit die Metazerkarien sedimentieren konnten. Anschließend erfolgten zwei Waschschriffe, d.h. der Überstand wurde mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgezogen, die Proben mit Wasser aufgefüllt und

zentrifugiert. Dieser Schritt erfolgte zweimal, wobei beim zweiten Mal der Überstand nur bis auf ein restliches Volumen von 1,5 ml entfernt wurde. Durch diese einfachen Waschschriffe wurden die im Fischgewebe enthaltenen Substanzen, die in hoher Konzentration stark inhibierend wirkten, so weit verdünnt, dass eine ungehinderte PCR möglich wurde. Auf diese Weise wurden aufwendige DNA-Aufreinigungsverfahren wie beispielsweise eine Phenol/Chloroform-Extraktion, unnötig. Nach der Freisetzung der Metazerkarien-Zysten aus dem Wirtsgewebe, mussten diese Zysten nun aufgelöst werden, um die Parasiten-DNA zu befreien. Versuche zeigten, dass die Zysten gegenüber chemischen Substanzen sehr widerstandsfähig waren, ein Aufschluss mit dem Enzym Proteinase K unter Zusatz von Dithiothreitol (DTT) war aber prinzipiell möglich. Der Einsatz von Proteinase K führte aber im beschriebenen Verfahren zur Herauslösung von inhibitorischen Substanzen aus dem unverdauten Fischmaterial und stellte somit keine Lösung dar. Als praktikable Möglichkeit die Zysten aufzuschließen erwies sich eine mechanische Zerkleinerung der Metazerkarien. Die Zerstörung der Zysten und Freisetzung der DNA aus den Parasiten wurde mit einem Omni Tip Gewebe Homogenisator (Omni TH220, Omni International Inc., USA) für 1 min bei 10.000 Upm durchgeführt. Das Homogenisier-System besteht aus dem Antrieb TH220 (125 W, 30.000 Upm) und Dispergier-Einsätzen aus Kunststoff. Das Homogenisieren fand in dem zuvor erwähnten 1,5 ml Restvolumen statt. Im Anschluss daran wurde kurz zentrifugiert, der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und zur Inaktivierung von Enzymen wie DNAsen aus Metazerkariengewebe und Pepsin aus dem künstlichen Magensaft, im Wasserbad für 5 min auf 100°C erhitzt. Anschließend erfolgte die Neutralisation der sauren Proben mit 1 N Kaliumhydroxid (KOH)-Lösung. Dabei erfolgte die pH-Einstellung mit Hilfe des pH-Indikators Kresolrot. Dieser erscheint bei einem pH \leq 7,5 gelb und schlägt bei einem pH \geq 7,5 ins Violette um. 2 μ l der so neutralisierten Lösungen wurden dann ohne weitere Aufarbeitung in die PCR-Ansätze gegeben.

Die aufgearbeiteten Proben von 10 Blaubandbärblingen (*P. parva*), denen zuvor experimentell je eine einzelne Metazerkarie von *C. sinensis* zugesetzt wurde, zeigten bei der PCR Analyse sowohl mit dem opisthorchiiden-spezifischen Primer-

Systemen OP1/OP2 (Abb. 13), als auch mit dem *C. sinensis*-spezifischen Primer-System CS1/CS2 (Abb. 14) in allen Fällen deutliche Signale.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die entwickelte Technik zuverlässig und sensitiv arbeitet. Eine einzelne Metazerkarie pro 3 g Fischprobe wird hierdurch mittels PCR Analyse detektierbar.

Protokoll zur Aufarbeitung von Fischen mit Metazerkarien:

1. Mechanische Zerkleinerung von 3 g Fischmuskulatur und Überführung in 50 ml Falcon-Tubes
2. Zusatz von 50 ml 0,9% Pepsin, 0,7% HCl, 1% TritonX-100
3. Inkubation auf beheizbarem Magnetrührer (38-40°C und 50 U/min) mit gelgentlichem Schütteln der Proben bis zur vollständigen Lyse
4. kurze Zentrifugation und Absaugen (Wasserstrahlpumpe) des Überstandes
5. Auffüllen mit Wasser und kurze Zentrifugation
6. Wiederholung der Schritte 4. und 5.
7. Absaugen des Überstandes bis auf ein Restvolumen von 1,5 ml
8. Aufschluss der Metazerkarienhüllen mittels Gewebe-Homogenisator für 1 min bei 10.000 Upm
9. kurze Zentrifugation
10. Erhitzen auf 100°C für 5 Minuten (Wasserbad)
11. Zusatz von 10 µl Kresolrot und Neutralisation mit 1N KOH (Farbumschlag von gelb nach violett bei pH 7,5)
12. Einsatz von 2 µl dieser Lösung in PCR-Ansatz

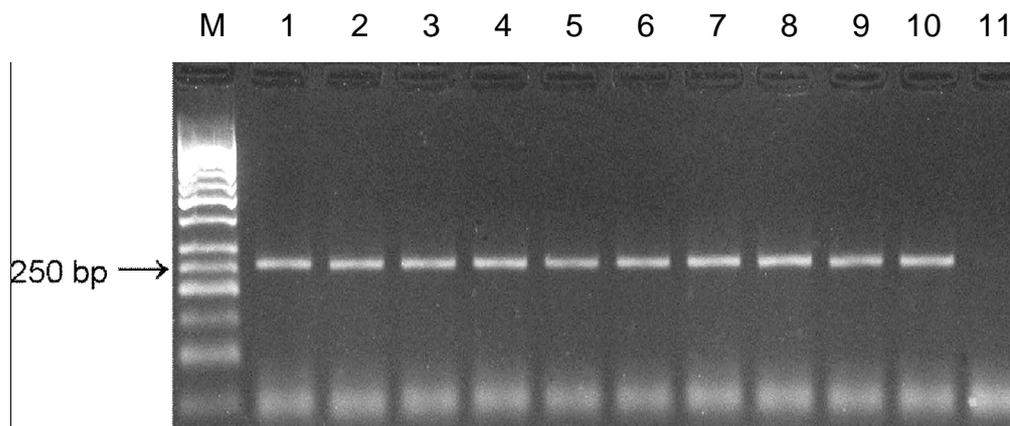


Abb. 13: PCR zur Detektion von Metazerkarien von *C. sinensis* aus Fischproben mit dem Primer-System OP1/OP2. Vor der Probenaufarbeitung wurde eine Metazerkarie experimentell zu jeder 3 g Fischprobe gegeben. Spur M: 50 bp DNA-Marker, Spuren 1-10: Fischproben mit je einer Metazerkarie von *C. sinensis*, Spur 11: Negativkontrolle

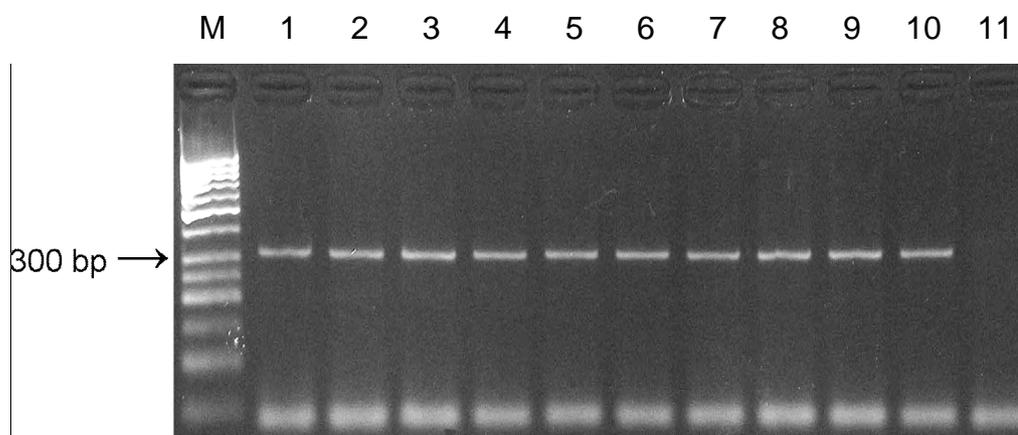


Abb. 14: PCR zur Detektion von Metazerkarien von *C. sinensis* aus Fischproben mit dem Primer-System CS1/CS2. Vor der Probenaufarbeitung wurde eine Metazerkarie experimentell zu jeder 3 g Fischprobe gegeben. Spur M: 50 bp DNA-Marker, Spuren 1-10: Fischproben mit je einer Metazerkarie von *C. sinensis*, Spur 11: Negativkontrolle

4.3.2. Aufarbeitung von infizierten Schnecken mit anschließender PCR Analyse

Das erarbeitete Protokoll zur Aufarbeitung von amplifizierbarer Parasiten-DNA aus Schneckengewebe stellt eine Technik dar, bei der nur wenige Arbeitsschritte auszuführen sind und die ohne den Einsatz von teuren Chemikalien auskommt. Eine weiterführende Aufreinigung der DNA, z.B. mit Hilfe von kommerziellen Kits, ist nicht notwendig.

Die Aufarbeitung begann mit dem Zerdrücken der Schneckengehäuse in einem 2 ml Eppendorf-Gefäß mittels einer umgedrehten Pipettenspitze. Durch das Zerdrücken der Gehäuse wurden die Weichkörper der Schnecken teilweise zerstört, wobei die Zerstörung ausreichte, die in der Mitteldarmdrüse (= Hepatopankreas) sitzenden Redien aus dem Schneckengewebe zu befreien. Durch die Behandlung mit 25 mM Kaliumhydroxid-Lösung (pH 12) gelang es dann, die Redien vollständig aufzulösen und die gesamte Parasiten-DNA freizusetzen. Die kurze Dauer der Lyse reichte aus, die Redien aufzulösen, wobei jedoch die vollständige Lyse des Schneckengewebes unterblieb. Aufgrund dessen wurden vom Schneckengewebe nur geringe Konzentrationen an inhibitorischen Substanzen abgegeben werden, die den Ablauf einer PCR behindern oder verhindern könnten. Bei der anschließenden Neutralisation der Versuchsansätze mit 1 N HCl dienten 10 µl einer gesättigten Lösung von Kresolrot als pH-Indikator. Kresolrot ist bei einem pH-Wert $\geq 7,5$ violett und schlägt bei $\leq 7,5$ ins Gelbliche um. Nach kurzer Zentrifugation wurden die Extrakte dann ohne weitere Aufarbeitung in die PCR eingesetzt (1 µl Extrakt/Ansatz).

PCR Analysen, die mit den gewonnenen Extrakten aus mit verschiedenen einheimischen Trematodenarten infizierten *B. tentaculata*-Schnecken (Wildinfektionen) durchgeführt wurden, zeigten dass die DNA der Parasiten-Stadien durch die Behandlung mit 25 mM KOH-Lösung tatsächlich freigesetzt wurden und in einem amplifizierbarem Zustand vorlagen. Es entstanden Produkte von etwa 400 bp Länge. Die Positivkontrolle, bei der zu einem µl Extrakt aus einer nicht infizierten Schnecke 10^{-9} g genomischer DNA von *C. sinensis* hinzu gegeben wurde, zeigte ein Amplifikat von etwa 320 bp Länge (Abb. 15).

Durch den Zusatz von definierten DNA-Mengen aus einer Verdünnungsreihe von *C. sinensis*-DNA zu den Lysaten der Schnecken sollte deren Einfluss auf den PCR Ablauf bestimmt werden. Die Ergebnisse zeigten, dass die Detektionsgrenze für das Primer-System CS1/CS2 mit und ohne Zusatz von Schnecken-Lysat nahezu gleich ist. Mit CS1/CS2 konnten noch bei Einsatz von 10^{-13} g genomische DNA Produkte nachgewiesen werden (Abb. 16). Die Nachweisgrenze ohne Zusatz von Schneckenlysat lag ebenfalls bei Einsatz von 10^{-13} g genomischer DNA (Abb. 12). Die im Schneckengewebe enthaltenen inhibitorischen Substanzen wurden demnach bei der beschriebenen Aufarbeitungsmethode nur in geringem Maße freigesetzt und zudem soweit verdünnt, dass eine PCR weitgehend ungestört ablaufen kann. Die Nachweisgrenze von 10^{-13} g genomischer DNA bedeutet, dass mit dem Primer-Paar CS1/CS2 eine Menge von $1,5 \times 10^{-10}$ g Parasiten-DNA je infizierter Schnecke nachweisbar ist (aufgrund des Präparationsvolumens von 1,5 ml). Die hohe analytische Sensitivität der vorgelegten Methode bedeutet, dass jede infizierte Schnecke als positiv erkannt werden kann.

Protokoll für die Aufarbeitung von Schnecken:

1. Überführung der Schnecken in je ein 2 ml Eppendorf-Gefäß und Zerstörung der Gehäuse
2. Inkubation der Schneckenweichkörper in 1,5 ml 25 mM KOH bei 95 °C für 15 min
3. Zugabe von 30 µl gesättigter Kresolrot-Lösung und Neutralisation mit 1 N Salzsäure (HCl)
4. kurze Zentrifugation
5. Zugabe von 1 µl der Lysate in die PCR-Ansätze

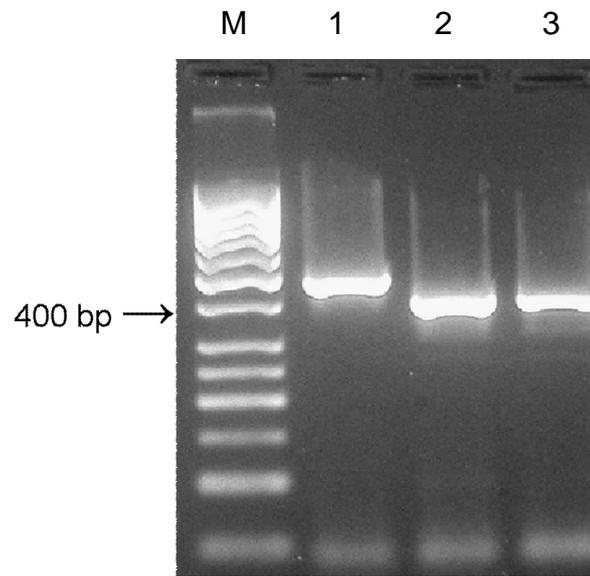


Abb. 15: PCR zur Detektion von Parasiten-DNA aus Schneckengewebe.

B. tentaculata-Schnecken mit Wildinfektionen mit verschiedenen einheimischen Trematodenarten wurden mit der beschriebenen Methode aufgearbeitet. Die PCR Detektion erfolgte mit dem für Trematoden universalen Primer-Paar LC1/HC2.

Spur M: 50 bp DNA-Marker, Spur 1: Positivkontrolle mit 1 μ l Schnecken-Lysat von nicht infizierter Schnecke und 10^{-9} g genomischer DNA von *C. sinensis*, Spur 2: Schnecken-Lysat 1, Spur 3: Schnecken-Lysat 2, Negativkontrolle nicht dargestellt

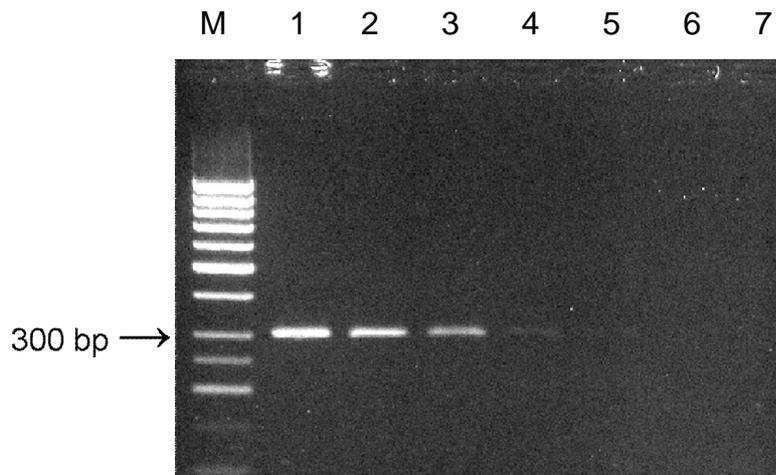


Abb. 16: Testung des Einflusses von Schnecken-Lysat auf das Amplifikationsergebnisses des Primer-Systems CS1/CS2. 1 μ l Lysat wurde mit definierten Mengen von *C. sinensis*-DNA versetzt.

Spur M: 50 bp DNA-Marker, Spur 1: 10^{-10} g, Spur 2: 10^{-11} g, Spur 3: 10^{-12} g, Spur 4: 10^{-13} g, Spur 5: 10^{-14} g, Spur 6: 10^{-15} g, Spur 7: Negativkontrolle

4.3.3. Aufarbeitung von Eiern in Stuhlproben mit anschließender PCR

Um einen ungestörten Ablauf der PCR zu gewährleisten, mussten die inhibierenden Substanzen aus den Stuhlproben entfernt werden. Dazu wurden Versuche mit verschiedenen Lösungsmitteln durchgeführt. Dabei diente die Intensität, mit der sich die Lösungen färbten als Maßstab dafür, wie effektiv sich die gelblichen bis orangefarbenen Inhibitoren darin lösten. Propylencarbonat (40%) und Polyethylencarbonat (40%) färbten sich nicht stärker als die Vergleichsprobe mit reinem Wasser. 0,5-2% Triton X-100 mit und ohne 3 M Kaliumchlorid-Lösung und Kaliumhydroxyd-Lösung (25 mM; pH 12) waren deutlich effektiver als die Kontrollprobe. Mit Abstand die am intensivsten gefärbte Lösung verursachte aber die Kombination aus Kaliumhydroxyd und Triton X-100 (2% Triton X-100 in 25 mM KOH). Anschließend durchgeführte PCR-Reaktionen bestätigten, dass je intensiver gelblich die Lösungen erschienen, desto größer die inhibitorische Wirkung war. Im nächsten Schritt sollten die Eier aus den Fäzes

angereichert werden, damit sie sensitiver detektiert werden konnten. Dazu wurde das spezifische Gewicht der Parasiten-Eier ausgenutzt, indem sie aufgrund ihrer niedrigeren Dichte in einer Zucker/Salz-Lösung mit höherem spezifischem Gewicht flotierten. Der überwiegende Anteil der Partikel der Fäkalien flotierte hingegen nicht. Die Eier flotierten allerdings nicht bis an die Oberfläche, sondern verteilten sich unregelmäßig in der schweren Lösung. Zur Aufkonzentration wurden die Eier deshalb durch Verdünnung der Schwerelösung mit anschließendem Absaugen des Überstands in einem kleinen Volumen gesammelt. Ein gravierendes Problem stellte die Abspaltung der Ei-Deckel und die Freisetzung der Parasiten-DNA dar. Zunächst wurde versucht, die Eier mit chemischen Substanzen zu öffnen, die gewöhnlich in der Gentechnologie zum Aufschluss von Zellmembranen oder Bakterienzellwänden verwendet werden. Zum Einsatz kamen Natriumdodecylsulfat (SDS), Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Triton X-100, Natriumdithionit und Kaliumhydroxid (KOH) sowie das Enzym Proteinase K. Weiterhin wurde versucht, die Deckel mit physikalischen Methoden zu entfernen. So wurden die Eier mit einem Ultraschallgerät (UP 200s Ultraschallprozessor, Dr. Hielscher GmbH) behandelt oder sie wurden mehrfach in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut. Keines dieser Verfahren führte zum Erfolg. In der Literatur wird das Autoklavieren der Eier als Methode zum Öffnen der Eier beschrieben (Wongratanacheewin et al. 2002). Versuche, dieses Verfahren anzuwenden, ergaben aber keine zufriedenstellenden Ergebnisse, denn es zeigte sich, dass durchschnittlich lediglich die Hälfte der Eier ihren Deckel verloren hatte.

Mit Hilfe eines Gewebe Homogenisator-Systems (Omni TH220, Omni International) war es möglich, die Ei-Schalen aufzubrechen und die Parasiten-DNA freizusetzen. Der Aufschluss der Eier gelang dabei vollständig, d.h. zu 100%.

Das entwickelte Verfahren zum Aufarbeiten von Stuhlproben für den anschließenden PCR-Nachweis ist im Folgenden näher erläutert:

2 ml Eppendorf-Gefäße wurden mit 100 mg Stuhlprobe beschickt und mit einer Lösung aus 2% TritonX-100 und 25 mM Kaliumhydroxid, überschichtet. Die Proben wurden dann in einem Thermomixer bei 1.400 Upm für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um wasserlösliche Substanzen aus dem Fäkalmaterial

zu entfernen, die anschließende PCR Anwendungen inhibiert hätten. Die Inkubation bewirkte außerdem die Lyse und Entfernung von Bakterien und im Fäkalmaterial abgegebene, verbrauchte Enterozyten des Wirts. Im Anschluss an die Inkubation und Zentrifugation der Proben bei 10.000 Upm für 2 min wurde dann der Überstand dekantiert. Die Schritte Überschichtung mit 2% Triton X-100 in 25 mM KOH-Lösung (Sediment gut aufschütteln) und Zentrifugieren wurde zwei bis dreimal wiederholt, bis der Überstand keine gelbliche Färbung mehr aufwies und kein denaturiertes Zellmaterial auf der Oberfläche zurückblieb. Dem verbliebenen Sediment wurden 0,8 ml einer gesättigten Sucrose/Kaliumchlorid-Lösung zugesetzt. Die Sucrose/KCl-Lösung bestand aus 82,5 g Sucrose, 20 g KCl und destilliertem Wasser, mit dem auf 100 ml aufgefüllt wurde. Diese Lösung hatte eine Dichte von 1,39 g/ml. In der anschließenden Zentrifugation bei 14.000 Upm für 5 min verteilten sich die in der Stuhlprobe enthaltenen Eier aufgrund ihrer geringeren Dichte in der Lösung hoher Dichte. Die Dichte der Eier von *Opisthorchis viverrini* beträgt etwa 1,28 g/ml (Harnnoi et al. 1998). Der Überstand, der die Eier verteilt enthielt, wurde in ein neues 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt und mit destilliertem Wasser auf 2 ml aufgefüllt. Die Zugabe von Wasser bewirkte eine Verdünnung der Schwerelösung und damit eine Abnahme des spezifischen Gewichts, so dass die Eier wieder sedimentiert werden konnten. Es folgte dazu eine Zentrifugation bei 14.000 Upm für 5 min. Der Überstand wurde entfernt und zweimal gewaschen. Nach dem zweiten Waschschrift wurde der Überstand nicht vollständig entfernt, sondern nur bis auf ein Restvolumen von 0,4 ml.

Um die DNA aus den Eiern freizusetzen, wurden die Eischalen mit dem Gewebe Homogenisator (Omni TH220, Omni International) aufgebrochen (2 min bei 10.000 Upm). Anschließend wurde die Suspension auf 100°C für 5 min erhitzt, um hydrolytische Enzyme, insbesondere DNAsen aus den Eiern bzw. dem Wirtsmaterial zu inaktivieren. 5 µl des Überstands wurde dann in die PCR-Ansätze eingesetzt.

Protokoll für die Aufarbeitung von Stuhlproben:

1. 100 mg Stuhlproben werden in 2 ml Eppendorf-Gefäßen eingewogen und mit 2% Triton X-100 in 25 mM KOH-Lösung überschichtet
2. Inkubation der Proben in einem Thermomixer bei für 10 min bei RT
3. Zentrifugation bei 14.000 Upm für 5 min und Dekantieren des Überstands; Überschichtung mit der Lösung aus 2% Triton X-100 und 25 mM KOH und Dekantieren 2-3 x wiederholen, bis der Überstand klar und farblos ist
4. Zusatz von 0,8 ml Sucrose/KCl-Lösung, Zentrifugation bei 14.000 Upm für 5 min
5. Transfer des Überstands in ein neues 2 ml Eppendorf-Gefäß und mit destilliertem Wasser auf 2 ml auffüllen
6. Zentrifugation bei 14000 Upm für 5 min, dann den Überstand entfernen
7. mit destillierten Wasser auffüllen und zentrifugieren, dann den Überstand bis auf ein restliches Volumen von 0,4 ml absaugen
8. Homogenisierung mit dem Gewebehomogenisator bei 10.000 Upm für 2 min
9. Erhitzung im Wasserbad auf 100°C für 5 min
10. 5 µl Überstand in die PCR-Ansätze einsetzen

Die beschriebene Technik für die Aufarbeitung von mit Eiern infizierten Stuhlproben mit anschließender PCR Diagnostik arbeitet zuverlässig und erlaubt das Erkennen von opisthorchiiden Leberegelern auch bei geringen Infektionsraten. Da die Methode ursprünglich mit Fäkalmaterial von einer mit *C. sinensis* infizierten Katze etabliert wurde, lassen sich neben Infektionen von Menschen auch entsprechende Infektionen von Katzen erkennen. Die 10 menschlichen Stuhlproben von nicht infizierten Individuen, die vor der Aufarbeitung experimentell mit jeweils einem *C. sinensis*-Ei versehen wurden, ergaben in den PCR Analysen stets ein positives Signal. Dies zeigte sich bei der Diagnostik mit dem Primer-System OP1/OP2 (Abb. 17) als auch mit dem Primer-System CS1/CS2 (Abb. 18).

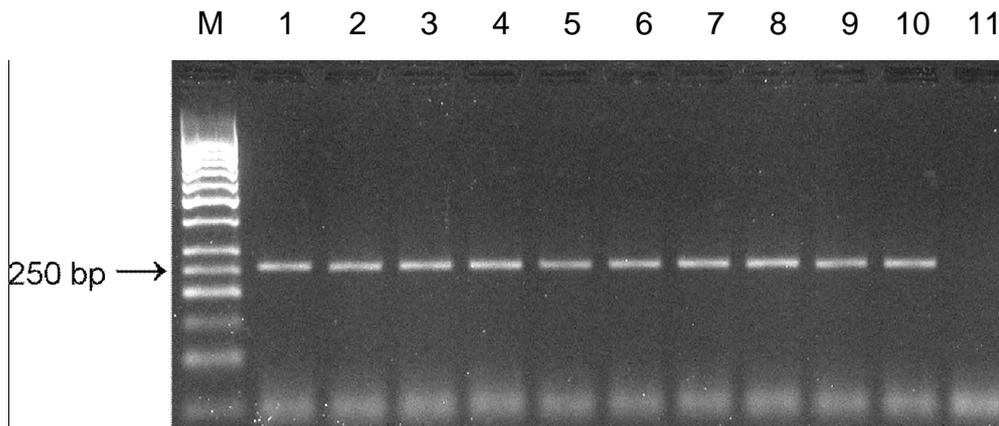


Abb. 17: Aufreinigung und PCR Detektion von Eiern von *C. sinensis* in Stuhlproben. Vor der Aufreinigung wurde experimentell ein Ei in jede 0,1 g Stuhlprobe gegeben. Die PCR erfolgte mit dem Primer-System OP1/OP2. Spur M: 50 bp DNA-Marker, Spuren 1-10: Stuhlproben mit je einem *C. sinensis* Ei, Spur 11: Negativkontrolle

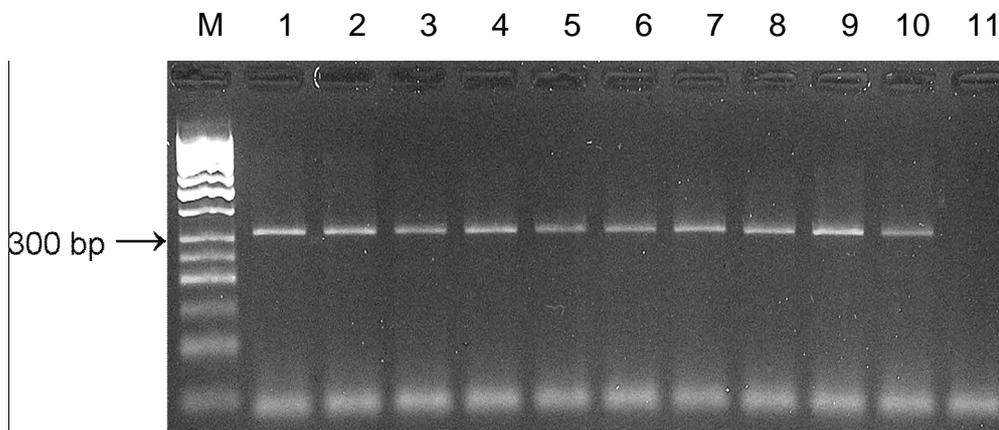


Abb. 18: Aufreinigung und PCR Detektion von Eiern von *C. sinensis* in Stuhlproben. Vor der Aufreinigung wurde experimentell ein Ei in jede 0,1 g Stuhlprobe gegeben. Die PCR erfolgte mit dem Primer-System CS1/CS2. Spur M: 50 bp DNA-Marker, Spuren 1-10: Stuhlproben mit je einem *C. sinensis* Ei, Spur 11: Negativkontrolle

5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung von sensitiven Diagnostikverfahren zum sicheren Nachweis von opisthorchiiden Leberegeln im Kot/Stuhl der Endwirte bzw. in den Zwischenwirten auf molekularbiologischer Grundlage. Dazu wurden zunächst entsprechende PCR- bzw. Primer-Systeme etabliert. Als Ausgangspunkt dienten dabei die Nukleotid-Sequenzen der internal transcribed spacer 2 (ITS2)-Region der ribosomalen DNA. Diese Sequenzen ermöglichten es, ein Primer-Paar zu entwickeln, das spezifisch alle untersuchten Mitglieder der Opisthorchiidae mit nur einem Test-Ansatz detektieren konnte und gleichzeitig gegen Arten anderer Digenea diskriminierte. Da nur von *Clonorchis sinensis* und *Opisthorchis viverrini* die Nukleoidsequenzen der ITS2-Region bekannt waren, wurden in der vorliegenden Arbeit diejenigen von *Opisthorchis felineus*, *Pseudamphistomum truncatum* und *Metorchis xanthosomus* erstmalig bestimmt. Bei der Sequenzanalyse zeigte sich dann, dass die Basenabfolgen gerade in dem Bereich, in dem die OP Primer hybridisieren, identisch waren. Einzige Ausnahme bildete die Sequenz von *M. xanthosomus*, die sich in einem Basenpaar unterscheidet. Da diese Abweichung aber nahe dem 5'-Ende des Primers OP2 liegt, ist eine erfolgreiche Amplifikation ohne Einschränkungen möglich. Problematisch wäre es, wenn der Primer am 3'-Ende durch eine Basensubstitution am Hybridisieren gehindert würde, da die Taq DNA Polymerase nur in Richtung 5' → 3' polymerisieren kann. Das Primer-System OP1/OP2 detektiert demnach alle untersuchten opisthorchiiden Trematoden. Gleichzeitig diskriminiert es gegen Vertreter anderer Trematoden, wie die Testungen auf mögliche Kreuzreaktionen zeigten. Weiterhin wurden die entsprechenden Sequenzen mit in Gen-Datenbanken verfügbaren Sequenzen von Vertretern der Familie Heterophyidae verglichen. Die Vertreter der Heterophyidae sind mit den Opisthorchiidae am nächsten verwandt und sie kommen in den gleichen Wirten vor, d.h. bei dieser Gruppe sollten die Unterschiede in den Sequenzen im Vergleich zu anderen Gruppen am geringsten sein. Tatsächlich zeigte sich, dass die Unterschiede im Bereich des Primers OP2 bei den Mitgliedern der Heterophyidae so groß waren, dass eine erfolgreiche Amplifikation ausgeschlossen werden konnte. Die Basensubstitutionen verteilten sich mehr oder

weniger gleichmäßig über den gesamten fraglichen Bereich, wobei auch im 3'-Bereich Unterschiede auftraten. Durch die Anzahl der Basenunterschiede ist es unter stringenten PCR-Bedingungen nicht möglich, dass der Primer hier binden kann. Durch die hohe Annealingtemperatur kann ein Hybridisieren nur bei exakter Komplementarität von Primer und Zielsequenz stattfinden. Weiterhin zeigte sich, dass die Basenunterschiede im Bereich des Primers bei Arten aus Gruppen, die weiter entfernt verwandt mit den Opisthorchiidae waren, noch größer waren als bei den Heterophyidae.

Die Amplifikationsprodukte der Opisthorchiiden-DNA wiesen Längen von etwa 250 bp auf. Die Amplifikation der partiellen ITS2-Region mit Hilfe des Primer-Paares OP1/OP2 ergab für *C. sinensis* ein Produkt von 255 bp Länge, für *O. viverrini* und *O. felineus* eins von 248 bp, für *P. truncatum* eins von 242 bp und für *M. xanthosomus* eins von 245 bp Länge. Auch wenn sich die Längen der PCR-Produkte mit Ausnahme von *O. viverrini* und *O. felineus* unterscheiden, so reicht das Auflösungsvermögen der verwendeten Agarose-Gelelektrophorese für eine zuverlässige Art-Differenzierung nicht aus. Am ehesten ließe sich noch *C. sinensis* von den anderen Arten abgrenzen. Mit dem Primer-System OP1/OP2 ist zwar keine Art-Differenzierung möglich, wohl aber eine Diskriminierung opisthorchiider DNA von DNA anderer Trematoden. Die erwähnte Spezifität wurde mit Austestung des PCR-Systems mit Fremd-DNA von verschiedenen Vertretern der Digenea sowie von unterschiedlichen Zwischenwirten bestätigt. Dabei fiel auf, dass im Fall von *Fasciola hepatica*-DNA unspezifische Produkte entstanden, die jedoch nicht in den Bereichen der für die verwendeten opisthorchiiden Leberegel spezifischen Produkte von ca. 250 bp lagen. Ursache für die Entstehung solcher unspezifischer Banden ist das Vorhandensein von Nukleotidabfolgen im Genom der Fremd-DNA, die teilweise zu den Primer-Sequenzen komplementär sind. Unter bestimmten Bedingungen, vor allem wenn diese komplementären Abschnitte im 3'-Bereich der Primer liegen, kann es zu Fehlpaarungen kommen und in deren Folge zur Amplifikation unspezifischer Produkte. Auf diese Weise können auch mehrere Produkte unterschiedlicher Länge entstehen. Trotz dieser Fehlpaarungen im Fall von *F. hepatica*-DNA kann weiterhin von einer uneingeschränkten Spezifität des Primer-Systems OP1/OP2 ausgegangen werden.

Bis zum Zeitpunkt, zu dem die vorliegende Arbeit angefertigt wurde, war eine molekulare Differenzierung opisthorchiider Leberegel nur für wenige Arten beschrieben worden. Sermswan und Mitarbeiter (1991) entwickelten eine spezifische Sonde (pOV-A6), mit deren Hilfe in einer Dot-blot-Hybridisierung *O. viverrini*-DNA mit hoher Sensitivität nachgewiesen werden konnte. Die pOV-A6-Sequenz nutzten Wongratanacheewin und Mitarbeiter (2001) zur Entwicklung eines Primerpaares, das in einer PCR spezifische Produkte von 330 bp und 660 bp amplifizierte. Ando und Mitarbeiter (2001) beschrieben ein anderes für *O. viverrini* spezifisches Primer-Paar, welches auf der Sequenz der ribosomalen ITS2-Region basierte. Auf Grundlage der Sequenzen der Cytochrom Oxidase I (CO I) gelang Pauly und Mitarbeitern (2003), die molekulare Differenzierung von *O. felineus* und *Metorchis bilis* mittels PCR. Desweiteren gelang ihnen, die eindeutige Unterscheidung der opisthorchiiden Arten *C. sinensis*, *O. viverrini*, *O. felineus*, *M. bilis* und *P. truncatum* durch RFLP-Analyse der entsprechenden CO I-Amplifikate. PCR-Systeme, die spezifisch DNA von *C. sinensis* nachweisen konnten, existierten nicht. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein solches entwickelt. Auf Basis der Sequenzen der ITS2-Region entstand das Primerpaar CS1/CS2. Die Testungen auf mögliche Kreuzreaktionen fielen in allen Fällen negativ aus, selbst mit DNA der am nächsten verwandten Arten wie *O. viverrini*, *O. felineus*, *P. truncatum* und *M. xanthosomus*, mit denen *C. sinensis* sehr große Übereinstimmungen in der Nukleotidsequenz zeigte, reagierten die Primer nicht. Die Unterschiede am 3'-Ende des Primers CS2 reichten unter den gewählten Reaktionsbedingungen aus, um ausschließlich mit der Sequenz von *C. sinensis* zu hybridisieren. Im Verlauf der Arbeiten an diesem Primer-System, wurde eine mitochondriale Duplex-PCR für die Detektion von *C. sinensis* und *O. viverrini* veröffentlicht (Le et al. 2006). Die analytische Sensitivität betrug dabei aber $7,8 \times 10^{-10}$ g genomischer DNA. Das in der vorliegenden Arbeit für *C. sinensis* entwickelte Primer-Paar CS1/CS2 ermöglicht hingegen noch den Nachweis von 1×10^{-13} g DNA und ist damit bedeutend sensitiver.

Der Nachweis von Entwicklungsstadien der Opisthorchiiden in den Zwischenwirten erfolgt im Allgemeinen mit Hilfe der Lichtmikroskopie. Zur Isolierung von Metazerkarien aus Fischmuskulatur dienen Verfahren zur Verdauung des umgebenen Fischgewebes mit Pepsin, um so die Metazerkarien freizusetzen. Diese werden dann aus dem entstehenden Sediment isoliert und mikroskopisch

untersucht. Die Herstellung von Quetschpräparaten von Geweben stellt eine andere Möglichkeit dar. Beide Methoden werden von der WHO empfohlen. Die auf der Lichtmikroskopie beruhenden Verfahren, haben den Nachteil, dass wegen der starken Ähnlichkeit der Metazerkarien keine Differenzierung der opisthorchiiden Arten *C. sinensis*, *O. viverrini*, *O. felinus*, *M. bilis* und *P. truncatum* möglich ist (Schuster et al. 1998). Auch eine Abgrenzung dieser Arten zu den nahe verwandten Arten der heterophyiden Gattungen *Heterophyes*, *Metagonimus* und *Apophallus*, die ebenfalls Süßwasserfische befallen und dann den Menschen infizieren können, ist schwierig bis unmöglich. Alle genannten Digenea bilden ellipsoide, dünnwandige Metazerkarienzysten aus, wobei die darin befindlichen Larven dunkle, ovale dickwandige Exkretionsblasen aufweisen. Um die Arten eindeutig voneinander abgrenzen zu können, wäre es notwendig, geeignete Experimentalwirte mit den fraglichen Metazerkarien zu infizieren, um die adulten Würmer zu erhalten. Der Nachweis der Entwicklungsstadien der opisthorchiiden Leberegel in den Zwischenwirts-Schnecken erfolgt ebenfalls mit Hilfe der Lichtmikroskopie. Dazu werden die Schnecken entsprechenden Temperatur- und Lichtbedingungen ausgesetzt, die dann die Zerkarien dazu veranlassen, ihren Wirt zu verlassen. Die Zerkarien sind innerhalb der genannten Opisthorchiiden-Arten morphologisch nicht zu unterscheiden. Eine zweifelsfreie Art-Bestimmung ist aber mit Hilfe molekularbiologischer Detektionsverfahren, wie sie oben erwähnt wurden, grundsätzlich möglich. Epidemiologische Studien, deren Durchführung auf eine verlässliche Differentialdiagnose zwischen den Arten angewiesen ist, werden somit mit Hilfe der Molekularbiologie vereinfacht.

Epidemiologischen Studien können unterstützt werden durch die in der vorliegenden Arbeit entwickelten Verfahren zur Isolierung von amplifizierbarer Parasiten-DNA aus den verschiedenen Zwischenwirten.

Das Verfahren zur Aufarbeitung von Metazerkarien aus Fischmuskulatur erlaubt eine schnelle Aufbereitung von Parasiten-DNA zum Einsatz in PCR-Analysen. Die gesamte Technik unter Einsatz des spezifischen Primer-Paares CS1/CS2 ermöglichte es, eine einzelne Metazerkarie von *C. sinensis* pro Fischprobe sicher nachzuweisen. Im hier erarbeiteten Verfahren wurden 3 g Fischmuskulatur eingesetzt. Bei *Pseudorasbora parva*, in China die am stärksten befallene Fischart, wurden pro Gramm Fischmuskulatur durchschnittlich 50,4 Metazerkarien gezählt, bei den moderat infizierten *Puntungia herzi*, *Gnathopogon species*,

Pseudogobio esocinus, *Sarcocheilichthys sinensis* und *Hemibarbus labeo* 10,4-19,5, wogegen bei den am geringsten infizierten Fischen *Acheilognathus rhombea*, *Acheilognathus limbata* und *Acanthorhodeus taenialis* nur 1,5-3,3 Metazerkarien pro Gramm Fischmuskulatur nachgewiesen wurden (Choi et al. 1976). Diese Zahlen, die hier von Fischen aus dem Kumho River stammen, vermitteln einen Eindruck von den Befallsintensitäten mit *C. sinensis* und zeigen, dass eine Proben-Einwage von 3 g ausreichend scheint, um die Infektion eines Fisches zu erkennen. Zudem erreicht *P. parva*, die am stärksten für *C. sinensis*-Infektionen empfängliche Fischart, eine Menge, die 4-5 g kaum überschreitet. Somit bleibt für den Einsatz in das Aufreinigungsverfahren nach Abzug des Gewichts für Innereien und Gräten eine Fischproben-Menge, die nahezu einem ganzen Fisch entspricht. Eine einzelne Metazerkarie wäre dann pro Fisch nachweisbar.

Die entwickelte Aufreinigungsmethode hat gegenüber anderen Verfahren den Vorteil, dass die Metazerkarien nach dem Herauslösen aus der Fischmuskulatur nicht mit lichtmikroskopischer Hilfe durch langwieriges Durchmustern des Fischlysates herausgesucht werden müssen. Von Vorteil ist auch, dass mit 3 g Gewebe eine größere Menge an Probe bearbeitet werden kann, als dies mit kommerziellen DNA-Extraktionskits möglich ist. Bei Extraktionen mit Hilfe von QIAamp DNA Mini Kit können beispielsweise nur bis zu 0,025 g Gewebe eingesetzt werden. Eine von Zengh (2006, persönliche Mitteilung) entwickelte Technik zur DNA-Gewinnung von Metazerkarien aus Fischproben lässt einen Einsatz von 0,1 g zu, liegt damit aber ebenfalls weit unter der Menge von 3 g, die bei der in der vorliegenden Arbeit entwickelten Methode eingesetzt werden kann.

Der weltweite Lebensmittelhandel mit Fischen aus Aquakulturen - vor allem aus Asien - ist in den vergangenen Jahren aufgrund der Voranschreitung der Überfischung der Weltmeere stetig gewachsen. Da auch Süßwasserfisch zunehmend in die Staaten der EU importiert wird, besteht beim Verzehr von rohem metazerkarienhaltigem Fisch die Gefahr der Infektion mit opisthorchiiden Trematoden, wie beispielsweise mit *C. sinensis*. Die Metazerkarien von *C. sinensis* sind sehr widerstandsfähig und bleiben auch bei -12°C für 10-18 Tage und bei -20°C noch für 3-7 Tage infektiös. Behandlung mit Salz (Fisch/Salz = 10g/3g) überleben sie 5-15 Tage bei 26°C (Fan 1998). Daher ist es nicht auszuschließen, dass sie einen Transport unbeschadet überstehen. Kontrollen

dieser Importe somit sinnvoll. Mit der entwickelten Detektions-Methode unter Verwendung des opisthorchiiden-spezifischen Primer-Paares OP1/OP2 könnten Fisch-Chargen erkannt werden, von denen die Gefahr einer Erkrankung in Folge einer Opisthorchiose ausgeht. Das Primer-Paar OP1/OP2 detektiert dabei nicht nur Metazerkarien der weit verbreiteten Arten *C. sinensis*, *O. viverrini* und *O. felineus*, sondern auch die weniger bekannten Arten. Da über viele Vertreter der Opisthorchidae noch wenig bekannt ist, was ihre möglichen Endwirte angeht, sollte im Hinblick auf die menschliche Gesundheit eine Lebensmittelkontrolle diese ebenfalls mit einschließen.

Epidemiologische Studien können auch durch das erarbeitete Verfahren zur Gewinnung von amplifizierbarer Parasiten-DNA aus Schnecken mit anschließender PCR-Analyse vereinfacht werden. Unter Verwendung des Primer-Paars CS1/CS2 konnte *C. sinensis* spezifisch nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze von Parasiten-DNA pro Schnecke lag dabei bei $1,5 \times 10^{-10}$ g. Diese Sensitivität scheint ausreichend, faktisch jede infizierte Schnecke als positiv erkennen zu können. Das entwickelte Verfahren ist in seiner Handhabung einfach und benötigt nur wenige Arbeitsschritte sowie wenige Chemikalien, wodurch es zeitsparend und kostengünstig durchgeführt werden kann. Bisher wurden DNA-Extraktionen mit kostenintensiven kommerziellen Kits durchgeführt (Maleewong et al. 2003).

Auf konventionelle Art erfolgt der Nachweis einer Infektion von Zwischenwirts-Schnecken über die Zerkarien, die diese verlassen. Die Infektionsraten die auf diese Weise für *C. sinensis* in verschiedenen Endemiegebieten in Korea bei der Zwischenwirts-Schnecke *Parafossarulus manchouricus* ermittelt wurden, lagen zwischen 0,08% und 3,1% (Choi et al. 1975, Kim 1974). Es ist aber anzunehmen, dass weitaus mehr Schnecken infiziert sind, als diese Zahlen nahelegen (Adams et al. 1993, Haas et al. 1990). Denn bei Schnecken, die zwar befallen sind, in denen sich aber noch keine reifen Zerkarien entwickelt haben, bleibt eine Infektion unerkannt. Mit der entwickelten Methode könnten jedoch auch diese als positiv erkannt werden und somit realistischere Daten für die Infektionsraten der Wirts-Schnecken gewonnen werden.

Die angeführten Verfahren zum Nachweis von opisthorchiiden Trematoden können der Klärung von epidemiologischen Fragestellungen dienen oder in der Lebensmittelkontrolle Verwendung finden. Ein weiterer wichtiger Bereich für den

Einsatz zuverlässiger Nachweismethoden liegt in der medizinischen Diagnostik am Menschen. Diagnosen die auf konventioneller Lichtmikroskopie basieren können bei Patienten mit geringen Infektionsraten zu negativen Ergebnissen führen. Mit Routine-Methoden wie der Stoll's egg count- oder der Formalin-Ether-Technik können leichte Infektionen schnell übersehen werden (Sithithaworn et al. 1991, Wongratanacheewin et al. 2001). Die Sensitivität lichtmikroskopischer Verfahren wurde für *O. viverrini*-Eier untersucht, wobei die Anzahl der Eier in Stuhlproben mit der Anzahl der Würmer, die in den Lebern von Patienten (Autopsie-Fälle) parasitierten, verglichen wurden (Sithithaworn et al. 1991). Dabei stellte sich heraus, dass die Untersuchungen der Stuhlproben von Patienten, die 1-9 Würmer aufwiesen (22% der Infizierten), nur in etwa 30% der Fälle ein positives Resultat erbrachten. In Fällen, in denen die Patienten 10-19 Würmer enthielten (11% der Infizierten), waren mit der Stoll's egg count-Methode nur in 77% und mit der Formalin-Ether-Technik in 61,5% Eier nachzuweisen.

Harnnoi et al. (1998) verglichen die Ergebnisse der Flotation von *O. viverrini*-Eiern in gesättigter Natrium-Nitrat Lösung (spezifisches Gewicht 1,4 g/ml) mit den Ergebnissen bei Durchführung der Formalin-Ether-Sedimentations Technik. Versuche, die Eier quantitativ zu flotieren, schlugen dabei fehl. Die Autoren stellten fest, dass die Flotations-Technik weniger effizient war als die Sedimentation. Das spezifische Gewicht von *O. viverrini*-Eiern liegt zwischen 1,27 g/ml und 1,30 g/ml (Harnnoi et al. 1998). Obwohl ihr spezifisches Gewicht geringer war als das der Salz Lösung (spezifisches Gewicht 1,4 g/ml), flotierten die Eier nicht vollständig. Eine weitere Flotations-Technik ist die Zinkchlorid/Natriumchlorid Methode (Mehlhorn et al. 1995). Das spezifische Gewicht dieser Lösung ist 1,3 g/ml und Versuche, mit ihrer Hilfe hier die geringe Anzahl von Eiern quantitativ zu flotieren, schlugen ebenso fehl wie die Flotationsversuche mit der gesättigten Natriumnitrat Lösung.

Aus dem Gesagten geht hervor, dass Flotations-Techniken ebenso wie Sedimentations-Methoden nicht besonders geeignet scheinen, wenn es darum geht, opisthorchiide Eier aus Stuhlproben in Fällen mit geringer Befallsintensität nachzuweisen.

Ein einzelner *C. sinensis* Wurm gibt 100 Eier pro Gramm (EpG) Fäkalmaterial ab (Wykoff 1959). Song und Mitarbeiter (1983) (zitiert aus Rim 1986) gaben in ihrer Studie über den durchschnittlichen EpG-Wert von *C. sinensis*-Patienten aus

unterschiedlichen Regionen Korea's an, dass der geringste Durchschnitts-Wert für eine Teilgruppe 100 EpG betrug. Haswell-Elkins und Mitarbeiter (1991) und Sithithaworn und Mitarbeiter (1991) fanden, dass ein *O. viverrini* Wurm 50 bis 200 EpG pro Tag ausscheidet. Mit der in dieser Arbeit entwickelten Aufreinigung- und Detektionsmethode ergab ein einzelnes Ei pro 100 mg Probe ein deutliches Signal, und kalkuliert für ein Gramm Probe, liegt das Detektionslimit bei 10 EpG. Somit ist es mit der vorliegenden Methode möglich, eine Infektion mit nur einem Wurm zuverlässig nachzuweisen. Damit ist die neue Aufreinigungs-Technik mit PCR basiertem Nachweis sensitiver und zuverlässiger als konventionelle lichtmikroskopische Methoden.

Die neue Technik ist wie die anderen erarbeiteten Aufreinigungs-Verfahren schnell und einfach durchführbar und eignet sich wie diese zur parasitologischen Routine-Diagnostik. Die bekannten Methoden zur Extraktion von parasitischer DNA aus Wurmeiern in Fäkalmaterial sind sehr komplex oder benötigen teure kommerzielle Kits, um inhibitorische Substanzen zu entfernen. Trotzdem liefern anschließende PCR-Analysen keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Aufreinigungen von 64 Stuhlproben mit dem Stool kit (Qiagen), die mit der Formalin-Ether-Technik positiv getestet wurden, und nachfolgender PCR-Analyse ergaben nur in 43,7 % ein Signal (pers. Mitteilung Sithithaworn). Umesha entwickelte eine Methode zur Reinigung von amplifizierbarer DNA aus *O. viverrini*-Eiern. Diese Methode ist zwar sehr sensitiv, beinhaltet aber zahlreiche und aufwendige Arbeitsschritte wie z.B. Inkubationen der Stuhlprobe in Proteinase K/SDS und NaCl/CTAB-Lösung, Extraktionen mit Chloroform/Isoamylalcohol und Phenol/Chloroform/Isoamylalcohol mit anschließender Isopropanol Präzipitation und Waschung mit 70 % Ethanol, Vakuumtrocknung und Resuspension der DNA (pers. Mitteilung). Diese Methoden nutzen nicht den Vorteil, dass die Parasiten-DNA in der Eischale eingeschlossen ist, welche von begleitendem, die inhibitorischen Stoffe enthaltenden Fäkalmaterial getrennt werden kann. Die in der vorliegenden Arbeit etablierte Methode erfordert daher vor der Freisetzung der Parasiten-DNA nur eine Waschung der Proben mit KOH und die Isolierung der Eier mit Hilfe einer Sucrose/KCl-Lösung. Zur Freisetzung von Parasiten-DNA aus opisthorchiiden Eiern wurde bisher nur das Verfahren des Autoklavierens beschrieben (Wongratanacheewin et al. 2002). Eigene Anwendung dieses Verfahrens ergab jedoch, dass dabei nur durchschnittlich 50% der Eier ihren Deckel absprengten.

Außerdem ist das Autoklavieren ein verbreitetes Verfahren zur DNA-Dekontamination und zerstört somit DNA. Es wurde zwar nachgewiesen, dass einzelne größere DNA-Fragmente erhalten bleiben (Elhafi et al. 2004). Die weitgehende Zerstörung könnte aber eine sensitive Detektion von Parasiten-DNA aus Eiern einschränken. Dagegen werden die Eischalen mit einem Gewebe-Homogenisierer, wie er in der neu erarbeiteten Methode verwendet wird, zu 100% zerstört und die freigesetzte DNA nicht geschädigt. Daher ist der Einsatz des Homogenisierungs-Systems dem Autoklavieren vorzuziehen.

Der an das Aufreinigungsverfahren anschließende PCR Nachweis basierte auf dem für opisthorchiide Trematoden spezifischen Primer System OP1/OP2. Opisthorchiide Leberegel parasitieren in den Gallengängen bzw. in der Gallenblase ihrer Wirte. Alle Arten verursachen dabei ähnliche Symptome wie Hyperplasien des Gallengangsepithels oder Obstruktionen der Gallenwege. Chronische Infektionen können zudem Leberzirrhose, Cholangiokarzinome bzw. Leberkarzinome auslösen. Es scheint, dass Arten der Gattung *Metorchis* und *Pseudamphistomum* gelegentlich auch Menschen infizieren können und dieselben gesundheitlichen Probleme wie die besser bekannten Leberegel *C. sinensis*, *O. viverrini* und *O. felineus* verursachen (Schuster 2001, persönliche Mitteilung). Auch der lange Zeit für vogelspezifisch gehaltene *M. xanthosomus* kann - entgegen der Lehrmeinung - Säugetiere befallen und sollte daher in den Kreis der potentiellen Zoonoseerreger aufgenommen werden (Filimonova 1997; zitiert in Schuster et al. 1998). Da alle Mitglieder der Opisthorchiidae die gleichen Gesundheitsprobleme verursachen, macht es Sinn, ein PCR System zu verwenden, das in der Lage ist, diese in nur einem Test-Ansatz zu detektieren. Die Behandlung von mit opisthorchiiden Leberegeln infizierten Patienten, beispielsweise mit Medikamenten die auf dem Wirkstoff Praziquantel (Mehlhorn et al. 1983) beruhen, ist in allen Fällen die gleiche und damit ist eine exakte Artbestimmung nicht notwendig.

Wenn für die PCR-Analyse ein artspezifisches Primer-Paar, wie beispielsweise das *C. sinensis* spezifische Primer-Paar CS1/CS2, im Anschluss an die beschriebene Aufreinigungsmethode für Fäkalmaterial verwendet wird, dann ermöglicht dies die Durchführung von epidemiologische Studien, die auf eine verlässliche Artdifferenzierung angewiesen sind. Eine molekularbiologische Artbestimmung erscheint hilfreich, da die Eier der einzelnen opisthorchiiden

Leberegel untereinander und von denen nahe verwandten heterophyider Trematodenarten lichtmikroskopisch, wenn überhaupt, nur schwer zu unterscheiden sind (Lee et al. 1984). Die Eier dieser Arten sind oval, zeigen ähnliche Abmessungen und besitzen ein Operculum mit prominenter Schulter. Eine sichere Differenzierung der Eier ist nur mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops möglich (Ditrich et al. 1990, Ditrich et al. 1992).

Die neue Technik zur Aufarbeitung von Stuhlproben für anschließende PCR-Analysen muss sich nicht auf die Detektion von opisthorchiiden Eiern beschränken. Mit entsprechenden Primer-Systemen könnte diese Methode auch für spezies- oder stammspezifische Nachweise von anderen Parasiten dienen. Beispielsweise könnten Eier von Nematoden, Oozysten von Apicomplexa, Zysten von Amöben, von *Giardia*-Arten bzw. von anderen protozoischen Zysten, die im Stuhl vorkommen, erkannt werden.

6. Zusammenfassung

Entwicklung von Verfahren zur spezifischen PCR-Diagnostik von opisthorchiiden Trematoden (Gatt. *Opisthorchis*, *Clonorchis* u. a.)

Infektionen mit Leberegeln der Familie Opisthorchiidae, insbesondere der humanpathogenen Arten *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini* und *Opisthorchis felineus* stellen in weiten Teilen Südost-Asiens und in den Staaten der ehemaligen UdSSR ein ernstzunehmendes gesundheitliches Problem dar. Infektionen erfolgen durch orale Aufnahme von Metazerkarien mit rohem Süßwasserfisch. Die Würmer parasitieren in den Gallengängen und verursachen Gewebeschäden, die zu Cholangiokarzinomen führen können. Der Entwicklungszyklus der Opisthorchiiden schließt bestimmte Süßwasserschnecken als erste und Fische als zweite Zwischenwirte ein. Endwirte sind fischfressende Säugetiere einschließlich des Menschen. Eine Bestimmung der einzelnen Entwicklungsstadien bis zur Art ist aufgrund ihrer großen morphologischen Ähnlichkeit der Opisthorchiiden untereinander und mit den anderen Digenea schwierig. Eine eindeutige Artbestimmung ist mit molekularer Technik möglich. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit waren lediglich PCR-Nachweise für *O. viverrini* bzw. *O. felineus* beschrieben worden. Daher wurde ein Primer-Paar für die artspezifische Identifikation von *C. sinensis* entwickelt.

Für die Diagnose am Patienten ist es unerheblich, welche Art die Erkrankung verursacht, da gegen alle Opisthorchiiden dieselbe Therapie durchgeführt wird. Daher kommt es bei Inspektionen im Sinne von Lebensmittelkontrollen ebenfalls nicht darauf an, mit welcher opisthorchiiden Art die Fische infiziert sind. Aus diesem Grund wurde ein sensitives PCR-System entwickelt, das es ermöglicht in einem Testansatz und mit nur einem Primer-Paar alle opisthorchiiden Trematoden sicher nachzuweisen und hierbei von anderen Trematoden zu unterscheiden.

Um ein solches Primer-Paar zu entwickeln, waren Sequenzen notwendig, die bei sämtlichen Opisthorchiiden identisch sind, sich aber zugleich von allen anderen Trematoden unterscheiden. Solche Sequenzen schienen in der ITS2-Region der ribosomalen DNA zu existieren. Von zahlreichen Trematodenarten war die ITS2-Region bekannt, aber nur von zwei Opisthorchiiden (*C. sinensis* und *O. viverrini*).

Daher wurde die ITS2-Region von weiteren Opisthorchiiden sequenziert. Für *O. felineus* und die beiden ebenfalls humanpathogenen Arten *Metorchis xanthosomus* und *Pseudamphistomum truncatum* wurde dies erfolgreich durchgeführt. Es bestätigte sich, dass alle diese Opisthorchiiden Sequenzbereiche enthielten, die unter ihnen identisch und gleichzeitig verschieden von den anderen Trematoden waren. Somit war es möglich, einen spezifischen PCR-Nachweis für Opisthorchiiden zu führen.

PCR-Reaktionen benötigen DNA in ausreichender Reinheit. Die Wirtsgewebe bzw. Fäkalien, in denen sich die einzelnen Entwicklungsstadien der opisthorchiiden Leberegel befinden, enthalten aber Substanzen, die den Ablauf der PCR stark inhibieren können. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Aufreinigungs- und Präparationsverfahren erarbeitet, die es ermöglichen, amplifizierbare Parasiten-DNA aus den entsprechenden Zwischenwirten bzw. aus den Eiern in den Fäzes der Endwirte zu isolieren. Die entwickelten Verfahren beruhen auf kostengünstigen Reagenzien, sind schnell und einfach durchführbar und eignen sich für die parasitologische Routine-Diagnostik.

7. Abstract

Development of procedures for specific PCR-diagnostic of opisthorchiid liver flukes

Liver flukes of the family Opisthorchiidae with the human pathogenic species *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis. viverrini* and *O. felineus* cause severe fish-borne diseases in South East Asia and Eastern parts of the countries of the former Soviet Union. The human infections occur by eating raw or undercooked cyprinoid fishes harbouring infectious metacercariae. The worms inhabit the bile ducts and provoke hepatobiliary damages like cholangitis which may lead to cholangiocarcinomas. The opisthorchiid flukes have an aquatic life cycle using freshwater snails as first and cyprinid fishes as second intermediate hosts, and final hosts are fish eating mammals including humans.

To date it remained difficult to determine the parasite stages of the opisthorchiid liver flukes to the species level since they appear morphologically very similar among one another and to other digenea. In contrast a differentiation on species level is possible by molecular techniques. At the point of this study there existed PCRs for the species-specific detection of *O. viverrini* and *O. felineus*. Thus, primers have been developed that enable a highly sensitive and species-specific detection of *C. sinensis*.

Since all species of the opisthorchiids cause the same health problems it makes sense to use a single test-system for their diagnosis. However, for appropriate treatment of patients, e.g. with praziquantel it is not needed to determine the exact species. Thus, a primer pair for the specific detection of all opisthorchiid liver flukes has been developed. The study revealed that the examined species of the family Opisthorchiidae share extreme homologies of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) sequence. The ITS2 sequences of other digenea are clearly different, especially at the loci where the designed primer pair anneals. The primer pair appears to be specific for members of the Opisthorchiidae. The nucleotide sequences we used to develop the primers for the opisthorchiid species *C. sinensis*, *O. viverrini*, *O. felineus*, *Pseudamphistomum truncatum* and *Metorchis xanthosomus*. Sequences from *C. sinensis* and *O. viverrini* sequences were

registered in GenBank. Nucleotide sequences of the ITS2 region of *O. felineus*, *Metorchis xanthosomus* and *Pseudamphistomum truncatum* have not been reported before and have been determined in the present study.

PCRs are dependent on sufficient clean template DNA. Thus, in this study procedures for rapid and easy preparation of DNA of parasite stages from intermediated hosts and from the eggs in stool samples of the definitive hosts have been established.

8. Literaturverzeichnis

Adams R, Arnold H, Pipitgool V, Sithithaworn P, Hinz E, Storch V (1993) Studies on lophocercariae from *Bithynia siamensis goniumphalus* (Prosobranchia: Bithyniidae). Southeast Asia J Trop Med Public Health 24: 697-700

Ando K, Sithithaworn P, Nuchjungreed C, Tesana S, Srisawangwong T, Limviroj W, Chinzei Y (2001) Nucleotide sequence of mitochondrial CO I and ribosomal ITS II genes of *Opisthorchis viverrini* in northeast Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health 32, Suppl 2: 17-22

Beaver PC, Rockney CJ, Cupp EW (1984) Clinical Parasitology. 9th Edition. Lea & Febiger, Philadelphia, p. 473

Beer SA, Belyakova YU, Sidorov EG (1987) Methods of studying the intermediate hosts of *Opisthorchis* (in russisch) Nauka Kazakhskoj SSR, Alma ata, USSR, pp. 85

Beer SA, Bisarieva SS, German S, Ditrikh O, Giboda M (1991) Functional aspects of the ultrastructure of the outer shell of opisthorchiid eggs. Communication 2. Mechanisms supporting ova on substrates (in russisch). Med Parazit (Moskva) 6: 32-36

Breslauer KJ, Frank R, Blocker H, Markey LA (1986) Predicting DNA duplex stability from the base sequence. Proc Natl Acad Sci USA 83: 3746-3750

Brooks DR, O'Grady RT, Glen DR (1985) Phylogenetic analysis of the Digenea (Plathelminthes: Cercomeria) with comments on their adaptive radiation. Can J Zool 63: 411-443

Chanawong A, Waikagul J (1991) Laboratory studies on host-parasite relationship of *Bithynia* snails and the liver fluke *Opisthorchis viverrini*. Southeast Asian J Trop Med Public Health 22: 235-239

Choi DW, Choi JJ (1976) Epidemiological studies of *Clonorchis sinensis* in the vicinity of Chinju, the downstream of river Nakdong in Kyungnam Province, Korea. Korean J Parasit 14: 168-169

Choi DW, Chung BJ, Ahn DH, Lee DM (1975) *Clonorchis sinensis* in Kyungpook Province, Korea. Distribution and demonstration of the cercaria of *Clonorchis sinensis* for snail, *Parafossarulus manchouricus* Bbourigant. Korean J Parasit 13:133-138

Després L, Imbert-Establet D, Combes C, Bonhomme F (1992) Molecular evidence linking hominoid evolution to recent radiation of schistosomes (Plathelminthes: Trematoda). Mol Phylogenet Evol 1: 295-304

Ditrich O, Giboda M, Štraba J (1990) Species determinations of eggs of opisthorchid and heterophyid flukes using scanning electron microscopy. Angew Parasitol 31: 3-9

Ditrich O, Giboda M, Scholz T, Beer SA (1992) Comparative morphology of eggs of the Haplorchiinae (Trematode: Heterophyidae) and some other medically important heterophyid and opisthorchiid flukes. Folia Parasitol 39:123-132

Dönges J (1988) Parasitologie. Mit besonderer Berücksichtigung humanpathogener Formen. 2. Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, p. 217

Elhafi G, Naylor CJ, Savage CE, Jones RC (2004) Microwave or autoclave treatments destroy the infectivity of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus but allow detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Avian Pathol 33: 303-306

Elkins DB, Mairiang E, Sithithaworn P, Mairiang P, Chaiyakum J, Chamadol N, Loapaiboon V, Haswell-Elkins MR (1996) Cross-sectional patterns of hepatobiliary abnormalities and possible precursor conditions of cholangiocarcinoma associated with *Opisthorchis viverrini* infection in humans. Am J Trop Med Hyg 5: 295-301

Fan PC (1998) Viability of metacercariae of *Clonorchis sinensis* in frozen or salted freshwater fish. *Int J Parasitol* 28: 603-605

Fedorov KP, Naumov VA, Kuznetsova VG, Belov GF (2002): Some real problems of human opisthorchiasis. *Med Parazitol (Moskva)* 3: 7-9

Filimonova LV (1997) Vlijanie nekotorych ekologiceskich faktorov na morfologiju marit *Metorchis xanthosomus* (Creplin, 1846). *Trudy Instituta Parazitologii Rossiskoj Akademii Nauk* 41: 183-192

Haas W, Granzer M, Brockelman CR (1990) *Opisthorchis viverrini*: finding and recognition of the fish host by the cercariae. *Exp Parasitol* 71: 422-31

Harnnoi T, Wijit A, Morakote N, Pipitgool V, Maleewong W (1998) Specific gravity of *Opisthorchis viverrini*. *J Helminth* 72: 359-61

Haswell-Elkins MR Elkins P, Sithithaworn P, Treesarawat P, Kaewkes S (1991) Distribution patterns of *Opisthorchis viverrini* within a human community. *Parasitology* 103: 97-101

Heinemann E (1937) Über den Entwicklungskreislauf der Trematodengattung *Metorchis* sowie Bemerkungen zur Systematik dieser Gattung. *Z Parasitenkd (Parasitol Res)* 9: 237-260

Hiepe T, Buchwalder R, Nickel S (1985) In: Hiepe T (ed) *Lehrbuch der Parasitologie. Band 3. Veterinärmedizinische Helminthologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, pp. 176-182

Jelinek T, Sauer FJ, Steinhardt HJ, Löscher T (1995) Rechtsseitige Oberbauchschmerzen bei einem Ehepaar aus Kasachstan. *Internist* 36: 721-725

Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM (1998) *Medizinische Mikrobiologie*. 9. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, p. 732

Kim DC (1974) Ecological studies of *Clonorchis sinensis*. Yonsei Repts Trop Med 5: 3-44

King S, Scholz T (2001) Trematodes of the family Opisthorchiidae: a minireview. Korean J Parasitol 39: 209-221

Lantz PG, Al-Soud WA, Knutsson R, Hahn-Hägerdal B, Rådström P: Biotechnical use of polymerase chain reaction for microbiological analysis of biological samples. From: Biotechnology Annual Review, Vol 5. Edited by El-Gewely MR Copyright © 2000 Elsevier Science BV, pp.106-107

La Rue GR (1951) Host-parasite relations among the digenetic trematodes. J Parasitol 37: 333-342

Le TH, Van De N, Blair D, Sithithaworn P, McManus DP (2006) *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini*: Development of a mitochondrial-based multiplex PCR for their identification and discrimination. Exp Parasitol 112: 109-114

Lee SH, Hwang SW, Chai JY, Seo BS (1984) Comparative morphology of Heterophyids and *Clonorchis sinensis* causing human infections in Korea. Korean J Parasit 22: 171-180

Linz U, Degenhardt H (1990) Die Polymerase Kettenreaktion. Naturwiss 77: 515-530

Lygo JE, Johnson PE, Holdaway DJ, Woodroffe S, Whitaker JP, Clayton TM, Kimpton CP, Gill P (1994) The validation of short tandem repeat (STR) loci for use in forensic casework. Int J Leg Med 107: 77-89

Maleewong W, Intapan PM, Wongkham C, Wongsaroj T, Kowsuwan T, Pumidonming W, Pongsaskulchoti P, Kitikoon V (2003) Detection of *Opisthorchis viverrini* in experimentally infected bithynid snails and cyprinoid fishes by a PCR-based method. Parasitology 126: 63-67

McLean JD, Arthur JR, Ward BJ, Gyorkos TW, Curtis MA, Kokoskin E (1996): Common-source outbreak of acute infection due to the North American liver fluke *Metorchis conjunctus*. Lancet 347: 154-158

Mehlhorn H, Koma S, Rim HR, Ruenwangsa P, Andrwes P, Thomas H, Bunnag D (1983) Ultrastructural investigations on the effects of Praziquantel on human trematodes from Asia (*Clonorchis sinensis*, *Metagonimus yokogawai*, *Opisthorchis viverrini*, *Paragonimus westermani*, *Schistosoma japonicum*) Drug Res 33: 91-98

Mehlhorn H (1988) Parasitology in focus. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, p. 565

Mehlhorn H, Düwel D, Raether W (1993) Diagnose und Therapie der Parasitosen von Haus-, Nutz- und Heimtieren. 2. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, p. 24

Mehlhorn H, Eichenlaub D, Löscher T, Peters W (1995) Diagnostik und Therapie der Parasitosen des Menschen. 2. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, pp. 6-7

Mehlhorn H, Piekarski G (1995) Grundriß der Parasitenkunde. 4. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, p. 199

Mehlhorn H (2001) Encyclopedic references of parasitology. Springer, Heidelberg, New York; Vol 1,2

Odening K (1969) Entwicklungswege der Schmarotzerwürmer oder Helminthen. Akademische Verlagsgesellschaft Geest & Porting KG, Leipzig, p. 102

Pauly A, Schuster R, Steuber S (2003) Molecular characterization and differentiation of opisthorchiid trematodes of the species *Opisthorchis felinus* (Rivolta, 1884) and *Metorchis bilis* (Braun, 1790) using polymerase chain reaction. Parasitol Res 90: 409-414

Piekarski G (1987) Medizinische Parasitologie, 3. Auflage. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, pp.136-137

Rychlik W: Selection of Primers for Polymerase Chain Reaktion. From: Methods in Molecular Biology, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications. Edited by: White BA Copyright © 1993 humana Press Inc., Totowa, New York, pp. 31-40

Rim HJ (1986) The current pathology and chemotherapy of clonorchiasis. Korean J Parasitol 24 (Suppl, Monographic Series No 3), pp. 7-20, pp. 26-39, pp. 40-59

Rim HJ, Farag HF, Sornmani S, Cross JH (1994) Food-borne Trematodes: Ignored or emerging ? Parasitol Today 10: 207-209

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostabile DNA polymerase. Science 239: 487-491

Sambrook J, Russel DW (2001) Molecular cloning – Alaboratory Manual. 3rd edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York

Scheinert P (1997) Primerdesign und Wahl stringenter Reaktionsbedingungen. BioTechniques 4: 52-54

Schuster R, Wanjek C, Hering-Hagenbeck S (1998) Untersuchung von Karpfenfischen (Cyprinidae) auf Metazerkarien der Familie Opisthorchiidae. Mitt Österr Ges Tropenmed Parasitol 20: 123-130

Schuster R, Bonin J, Staubach C, Heidrich R (1999) Liver fluke (Opisthorchiidae) findings in red foxes (*Vulpes vulpes*) in the eastern part of the Federal State Brandenburg, Germany – a contribution to the epidemiology of opisthorchiidosis. Parasitol Res 85: 142-146

Schuurmans-Stekhoven JH (1931) Der zweite Zwischenwirt von *Pseudamphistomum truncatum* (Rud.) nebst Beobachtungen über andere Trematodenlarven. Z Parasitenkd (Parasitol Res) 3: 747-764

Schwartz DA (1980) Review: Helminths in the induction of cancer. *Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis* and cholangiocarcinoma. Trop Geogr Med 32: 95-100

Serm Swan R , Mongkolsuk S, Panyim S, Sirisinha S (1991) Isolation and characterization of *Opisthorchis viverrini* specific DNA probe. Mol Cell Probes 5: 399-407

Shimalov u. Shimalov (2001) Helminth fauna of the American mink (*Mustela vison* Schreber, 1777) in Belorussian Polesie. Parasitol Res 87: 886-887

Sithithaworn P, Tesansa S, Pipitgool V, Kaewkes S, Pairojkul C, Sripa B, Paupairoj A, Thaiklar K (1991) Relationship between faecal egg count and worm burden of *Opisthorchis viverrini* in human autopsy cases. Parasitology 102: 277-281

Song IC, Lee JS, Rim HJ (1983) Epidemiological studies on the distribution of *Clonorchis sinensis* infection in Korea (in Korean). Korea Univ Med J 20: 165-190

Stoll NR (1923) Investigations on the control of hookworm disease. XV. An effective method of counting hookworm eggs in feces. Am J Hyg 3: 59-70

Tang CC, Lin YK, Wang PC, Chen PH (1963) Clonorchiasis in South Fukien with special reference to the discovery of crayfishes as second intermediate hosts. Chinese Med J 82: 545-562

Tawatsin A, Sirisinha S, Vajrasthira S, Bunnag D, Harinasuta T (1984) Evaluation of selected anthelmintic compounds for activity against *Opisthorchis viverrini*. Tropenmed Parasit 35: 85-90

Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, Truett AA, Walker JA, Warmann ML (2000) Preparation of PCR-Quality Mouse Genomic DNA with Hot Sodium Hydroxide and Tris (HotSHOT). *BioTechniques* 29: 52-54

Vogel H (1934) Der Entwicklungszyklus von *Opisthorchis felineus* (Riv.) nebst Bemerkungen über die Systematik und Biologie. *Zoologica* 33: 1-103

Weyant RS, Edmonds P, Swaminathan B (1990) Effect of ionic and nonionic detergents on the Taq polymerase. *BioTechniques* 9: 308-309

WHO (1995) Control of foodborne trematode infections. WHO Technical Report Series 849, Geneva

Wilde J, Eiden J, Yolken R (1990) Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by transcriptase and polymerase chain reactions. *J Clin Microbiol* 28: 1300-1307

Wongratanacheewin S, Pumidonming W, Sermswan RW, Maleewong W (2001) Development of a PCR-based method for the detection of *Opisthorchis viverrini* in experimentally infected hamsters. *Parasitology* 122: 175-180

Wongratanacheewin S, Pumidonming W, Sermswan RW, Maleewong W (2002) Detection of *Opisthorchis viverrini* in Human Stool Specimens by PCR. *J Clin Microbiol* 40: 3879-3880

Wykoff DE (1959) Studies on *Clonorchis sinensis* IV. Production of eggs in experimentally infected rabbits. *J Parasitol* 45: 91-94

Wykoff DE, Harinasuta C, Juttijudata P, Winn MM (1965) *Opisthorchis viverrini* in Thailand-The life cycle and comparison with *O. felinus*. *J Parasitol* 51: 207-214

Yamaguti S (1971) Synopsis of Digenetic Trematodes of Vertebrates. Keigaku Pub Co Tokyo, Japan; Vol 1,2

Yoshimura H (1965) The life cycle of *Clonorchis sinensis*: a comment on the presentation in the seventh edition of Craig and Faust's clinical parasitology. J Parasitol 51: 961-966

Yossepowitch O, Gotesman T, Assous M, Marva E, Zimlichman R, Dan M (2004) Opisthorchiasis from imported raw fish. EID 10: 2122-2126. www.cdc.gov/eid

Zablockij VI (1967) Pseudamphistomosis in the river Volga and new details on the biology of its agent (in Russia). Materials of the scientific conference of the All-Union Society of Helminthologists, pp. 101-107

9. Anhang

9.1 Abkürzungen

<i>B. fuchsiana</i>	<i>Bithynia fuchsiana</i>
<i>B. funiculata</i>	<i>Bithynia funiculata</i>
<i>B. leachi</i>	<i>Bithynia leachi</i>
<i>B. tentaculata</i>	<i>Bithynia tentaculata</i>
bp	Basenpaare
<i>C. auratus auratus</i>	<i>Carassius auratus auratus</i>
<i>C. sinensis</i>	<i>Clonorchis sinensis</i>
COI	Cytochrom c Oxidase I
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. caproni</i>	<i>Echinostoma caproni</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EpG	Eier pro Gramm Kot
<i>F. hepatica</i>	<i>Fasciola hepatica</i>
<i>H. dubenini</i>	<i>Holostephanus dubenini</i>
ITS2	internal transcribed spacer 2
Kb	Kilobasenpaare
<i>M. bilis</i>	<i>Metorchis bilis</i>
<i>M. tuberculata</i>	<i>Melanoides tuberculata</i>
<i>M. xanthosomus</i>	<i>Metorchis xanthosomus</i>
M	molar
MIFC	Merthiolate-Iodine-Formaldehyde-Concentration
min	Minute(n)
ml	Milliliter
N	normal (bei Lösungen)
ng	Nanogramm

nm	Nanometer
<i>O. felineus</i>	<i>Opisthorchis felineus</i>
<i>O. viverrini</i>	<i>Opisthorchis viverrini</i>
<i>P. ovatus</i>	<i>Paracoenogonimus ovatus</i>
<i>P. parva</i>	<i>Pseudorasbora parva</i>
<i>P. truncatum</i>	<i>Pseudamphistomum truncatum</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	pondus Hydrogeni, Protonenaktivitätsexponent
pmol	Picomol
<i>R. rutilus</i>	<i>Rutilus Rutilus</i>
®	rechtlich geschützt
rDNA	ribosomale DNA
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RT	Raumtemperatur
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> -DNA Polymerase
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tris	Tri[hydroxymethyl]aminomethan
U	Unit, Einheit für Enzymaktivität
UV	Ultraviolett
Upm	Umdrehung pro Minute
V	Volt
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
=	ist gleich
λ	Wellenlänge

9.2 Physikalische Eigenschaften der Primer

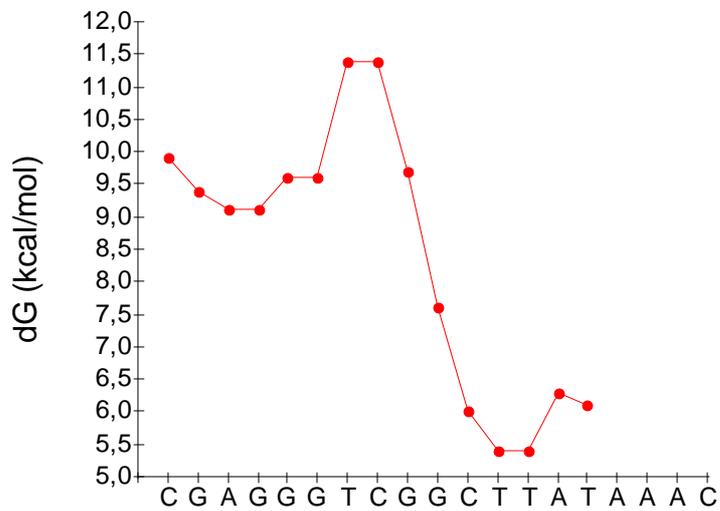


Abb. 19: Interne Stabilität der Primer OP1 und CS1 (OP1 und CS1 sind identisch). Die dG Werte wurden für alle Pentamere innerhalb des Primers berechnet.

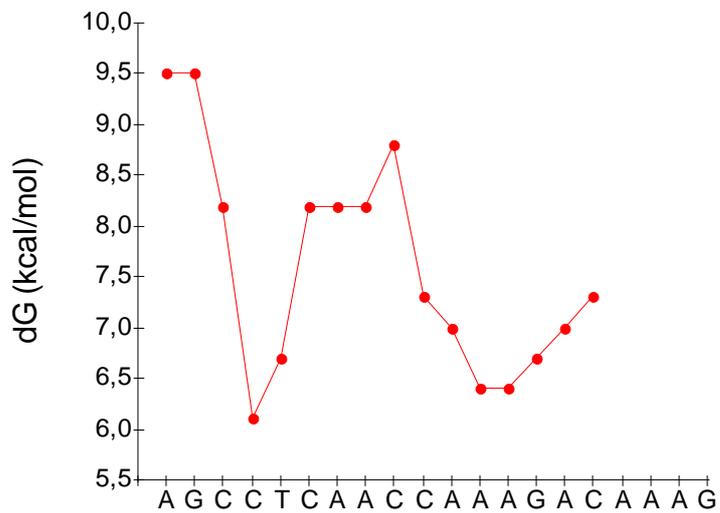


Abb. 20: Interne Stabilität des Primers OP2. Die dG Werte wurden für alle Pentamere innerhalb des Primers berechnet.

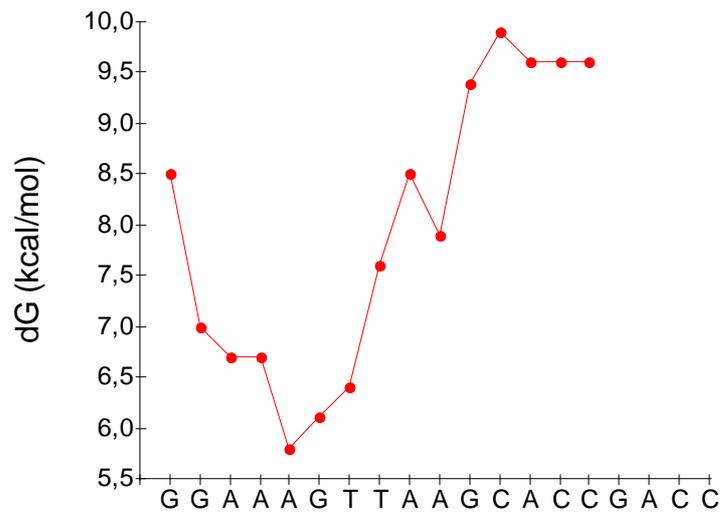


Abb. 21: Interne Stabilität des Primers CS2. Die dG Werte wurden für alle Pentamere innerhalb des Primers berechnet.

Tab. 5: Physikalische Eigenschaften der designten Primer

Primer	Schmelztemperatur	Länge	GC-Anteil
OP1	56,7 °C	19 bp	52,6 %
OP2	55,3 °C	20 bp	45,0 %
CS1	56,7 °C	19 bp	52,6 %
CS2	56,7 °C	19 bp	52,6 %

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Heinz Mehlhorn für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes und seine stete Hilfsbereitschaft danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Jürgen Schmidt für seine außerordentliche Unterstützung über den gesamten Verlauf meiner Arbeit. Er stand mir bei Auftreten von Problemen stets sofort hilfreich und tatkräftig zur Seite.

Herrn Prof. Dr. Rolf Schuster (Central Veterinary Research Laboratory, Dubai, United Arab Emirates) möchte ich für seine Hilfe in der Probenbeschaffung und für seine wertvollen Mitteilungen danken.

Ferner möchte ich mich an dieser Stelle auch nochmals bei den im Text genannten Personen bedanken, die mir freundlicherweise Material für meine Untersuchungen zur Verfügung gestellt haben. Herrn Prof. Dr. Han-Jong Rim und Prof. Dr. IC Song (Department of Parasitology, Institute for Tropical Endemic Diseases, College of Medicine, Korea University, Seoul 110, Korea), Herrn Prof. Dr. Paiboon Sithithaworn (Faculty of Medicine, University Khon Kaen, Thailand), Herrn Dr. Boris Romashov (Voronezh Biosphere Natural Reserve, Grafskay Station, Voronezh, 394047 Russia), Herrn Dr. Rolf Schuster (Central Veterinary Research Laboratory, Dubai, United Arab Emirates).

Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen Angehörigen des Instituts für Zoomorphologie, Zellbiologie und Parasitologie für die gute Zusammenarbeit, die stete Hilfsbereitschaft sowie für das sehr angenehme Arbeitsklima.

Mein ausdrücklicher Dank gilt meinen Eltern für ihre emotionale und finanzielle Unterstützung während der gesamten Studien- und Promotionszeit.

Die vorliegende Arbeit wurde gefördert von der Europäischen Kommission (TREMKIT ICA4-CT-2001-10080).

Lebenslauf

Name: Boris Müller
Wohnort: Gernotweg 30, 42653 Solingen
Geburtsdatum: 15.09.1972
Geburtsort: Solingen

1979 - 1983 Grundschole Yorckstraße in Solingen
1983 - 1989 Realschole Vogelsang in Solingen
1989 - 1992 Gymnasium Schwertstraße in Solingen
Schulabschluss: allgemeine Hochschulreife

07/1992 - 06/1993 Wehrdienst

WS1993/94 - SS1994 Studium der Geologie/Paläontologie an der Universität zu Köln

08/1994 - 04/1995 Beschäftigung bei:
Zahntechnik Torsten Schinz, 42653 Solingen

WS1995/96 - WS1997/98 Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Diplom-Vorprüfung am 17.02.98 bestanden

SS1998 - SS2002 Hauptstudium an der Georg-August-Universität Göttingen, Diplomprüfung in Biologie am 22.05.2002 bestanden

11/2002 - 11/2006 Doktorand am Institut für Zoomorphologie, Zellbiologie und Parasitologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (11/2002 - 10/2005 wissenschaftliche Hilfskraft)

Publikationen

Müller B, Schmidt J, Mehlhorn H (2006) Sensitive and species-specific detection of *Clonorchis sinensis* by PCR in infected snails and fishes. Parasitol Res (2006, in press)

Müller B, Schmidt J, Mehlhorn H (2006) PCR diagnosis of infections with different species of Opisthorchiidae using a rapid clean-up procedure for stool samples and specific primers. Parasitol Res (2006, in press)

Boris Müller
Gernotweg 30
42653 Solingen

Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den