

6. Zusammenfassung

Infektionen mit gastro-intestinalen Nematoden sind bei Wiederkäuern auf Grund ihrer Einflüsse auf die Tiergesundheit von erheblicher wirtschaftlicher Bedeutung. Die Identifikation der Parasiten und ihrer Entwicklungsstadien ist unerlässlich für ihre Kontrolle und zum Verständnis ihrer Epidemiologie und Biologie. Mit Ausnahme der Eier von *Nematodirus*-Spezies ist es nicht möglich, die Eier der einzelnen Spezies zu unterscheiden. Die Differenzierung der dritten Larvenstadien, welche aus den Eiern kultiviert werden können, ist zeitaufwendig und auch für geübte Betrachter sehr schwierig.

Die Differenzierung einzelner Spezies auf molekularer Ebene durch Unterschiede in ihrer DNA-Sequenz ist eine alternative Methode zur Differenzierung von Parasiten. In der vorliegenden Arbeit wurden die ITS-2 Sequenzen von neun verschiedenen gastro-intestinalen Nematoden beschrieben, ihre Sequenz analysiert, mit bereits veröffentlichten Sequenzen verglichen und ihre genetischen Unterschiede beschrieben. Die ITS-2 Sequenzen der neun Spezies besitzen eine Größe zwischen 230 bp und 242 bp. Die Sequenzähnlichkeit zwischen den Gattungen lag bei 60 % - 80 %, und die Identitäten der Sequenzen von unterschiedlichen Spezies einer Gattung zwischen 89 % für *Nematodirus helveticus* und *Nematodirus filicollis* und 99 % für *Cooperia oncophora* und *Cooperia punctata*. Die Gattung *Nematodirus*, die im Vergleich zu den anderen untersuchten Spezies taxonomisch einer anderen Familie zugeordnet wird, zeigte auch im Vergleich der Sequenzen des zweiten internen transkribierten Spacers Sequenzunterschiede von 33 % - 40 % zu den anderen Spezies, welche sich aber untereinander nur um 20 % - 25 % unterschieden.

Der Vergleich mit bereits veröffentlichten ITS-2 Sequenzen identischer Spezies zeigte, sowohl intraspezifische als auch intraindividuelle Variationen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß es trotz dieser Sequenzvariationen möglich ist, Primer für eine gattungsspezifische Polymerasekettenreaktion aus den interspezifischen Variationen

herzustellen und diese in einer gattungsspezifischen PCR erfolgreich einzusetzen. Die Polymerasekettenreaktion konnte mit allen externen Entwicklungsstadien der Nematoden durchgeführt werden. Der Vorteil in der direkten Amplifikation von aus der Kotprobe gewonnenen Eiern liegt einmal in der Zeitersparnis und zum anderen darin, daß auf die unsichere Differenzierung der dritten Larven verzichtet werden kann.

Es konnte gezeigt werden, daß das auf dem Agarosegel nach PCR erzeugte Signal mit der Anzahl der ausgeschiedenen Eier einer Kotprobe korrelierte und einen Rückschluß auf die Intensität der Infektion erlaubt. Es ist jedoch festzuhalten, daß eine direkte Quantifizierung durch die hier vorgestellte Methode an den unterschiedlichen DNA-Gehalten der Eier in verschiedenen Stadien ihrer Entwicklung scheiterte. Die Methode erlaubte die Detektion von 2 Eiern pro Gramm Kot und ist so 25fach empfindlicher, als das traditionelle Detektionsverfahren mit der McMaster-Zählkammer.

Die in dieser Dissertation verwendete Methode, Sequenzunterschiede einer definierten Region für das Design spezifischer Primer zu nutzen und diese als diagnostisches Mittel zu verwenden, ist sinnvoll und bietet nicht zuletzt Möglichkeiten bei der Bestimmung von Resistenzen und der Überprüfung neuer Anthelminthika.

Summary

Miriam Heise (1999)

Differentiation from gastro-intestinal parasites of ruminants with PCR

Infection of ruminants with gastro-intestinal nematodes are of major economic significance because of their impact on animal health. Accurate identification of these parasites, irrespective of the developmental stage, is critical for their control and for studying their epidemiology and population biology. It is not possible to differentiate with certainty individual eggs of different species, except the eggs from *Nematodirus*. The identification of third stage larvae is time consuming and extremely difficult even for experienced, trained technician.

The differentiation among species on a molecular level, on the basis of differences among their DNA sequence, is an alternative method to distinguish between various parasites. In this work genetic differences in the nucleotide sequence of the second internal transcribed spacer among nine species of gastro-intestinal nematodes were described, analyzed, compared with other known ITS-2-sequences of these species, and the detected differences are discussed. The ITS-2 sequence of the nine species ranged between 230 bp and 242 bp. Identities between the different genera varied between 60 % and 80 % , and similarities between the different species varied between 89 % for *Nematodirus helvetianus* and *Nematodirus filicollis* and 99 % for *Cooperia oncophora* und *Cooperia punctata*. The *Nematodirus* genera are taxonomical different from the other seven species, this is also shown by the sequence of the second internal transcribed spacer. The ITS-2 sequence of the genus *Nematodirus* shows differences between 33 % - 40 % compared to the sequence from the other species, which have only differences from 20 %- 25 %.

The comparison of published ITS-2 sequences from the same species showed a number of differences in the ITS2 region. This variation was intraspecific as well as intraindividual. This study showed that in spite of the sequence variation it is possible to design primers for the PCR which are specific for the different genera. It was also possible to perform the PCR with all external stages of the nematodes. The advantage in the direct amplification from eggs collected from faeces are the saving of time and a renunciation of the uncertainty differentiation of the third stage larvae.

It could be shown that there was a correlation between the signal intensity of the agarose-gel from the PCR-product and the number of the eggs in the faeces. But a direct quantification was impossible, because of the differences in the DNA-content of differently developed eggs. It was possible to detect two eggs/gram faeces and this was 25X higher as the usual faecal egg count method.

The use of the interspecific sequence differences for the design of specific primers and their use for diagnostic is meaningful and allows a rapid determination of drug resistance and the efficacy of new anthelmintics.