

Barcoding parasitischer Würmer – eine Sammlung ungeliebter Tiere? Das Fallbeispiel *Onchocerca jakutensis*

Hans-Peter FUEHRER, Katja SILBERMAYR, Walter GLAWISCHNIG & Anja JOACHIM

Der Begriff Helminthen bzw. parasitische Würmer umfasst eine Vielzahl phylogenetisch nicht näher verwandter Gruppen von mehrzelligen Parasiten – Nematoda, Plathelminthes (Trematoda und Cestoda), sowie Acanthocephala. Die meisten Helminthen sind zumindest in einigen Stadien merkmalsarm und schwer bestimmbar. Obwohl viele dieser Parasiten von veterinär- und/oder humanmedizinischer Relevanz sind, gibt es von vielen von ihnen noch keine DNA-Barcode-Sequenzen. DNA-Barcodes von Parasiten ermöglichen die Identifizierung insbesondere merkmalsarmer Stadien und unvollständiger Exemplare. Aufgrund der phylogenetischen Distanz der Taxa sind jedoch unterschiedliche, gruppenspezifische Primerpaare für Barcode-Analysen notwendig, um korrekte Ergebnisse für diese „zusammengewürfelte“ Gruppe von Tieren zu erhalten, was eine technische Herausforderung darstellt. Um diese Probleme, mit der Parasitologen beim Barcoding konfrontiert sind, zu beschreiben, wird das Fallbeispiel einer Hautfilarie angeführt. Filarien aus Hautknoten eines Rothirsches (*Cervus elaphus*) aus Tirol sollten mit DNA-Barcode-Methoden analysiert werden. Weil DNA-Barcodes bis dato fehlten waren Sequenzanalysen einiger weiterer Gene notwendig, um den Parasiten als *Onchocerca jakutensis* zu bestätigen. Der nunmehr vorliegende Barcode kann als Vergleichssequenz für diese Filarien dienen, was insbesondere zur Abklärung von Infektionen aberranter Wirte und Lokalisationen von Vorteil ist.

FUEHRER H.-P., SILBERMAYR K., GLAWISCHNIG W. & JOACHIM A., 2015: Barcoding of parasitic helminths – a collection of unpopular animals? The case of *Onchocerca jakutensis*.

The term helminth summarizes numerous groups of metazoan parasites which are phylogenetically unrelated – Nematoda, Plathelminthes (Trematoda, Cestoda) and Acanthocephala. Most helminths lack discriminating features at least in some stages and are therefore difficult to determine to species level. Although many of these parasites are of veterinary and/or medical importance, DNA barcode sequences are still missing for most of them. Parasite DNA-barcodes enable the identification especially of specimens for diagnostic purposes that cannot be determined otherwise. Due to the phylogenetic distance between the taxa, however, group-specific primers are required for barcoding within this mixed group of animals, which can pose a technical challenge. To highlight the problems parasitologists are faced with, the case of a filarioid helminth in the skin is described. Filarioid specimens were found in subcutaneous nodules in a red deer (*Cervus elaphus*) from Tyrol and barcoded. However, sequence analysis of several additional genes was necessary to confirm the worm as *Onchocerca jakutensis*, due to the lack of available DNA-barcodes. In the meantime, barcodes for this species are available and can be used to detect infections especially in aberrant hosts or locations.

Keywords: DNA-Barcoding, filarioid helminths, Nematoda.

Einleitung

Als parasitische „Würmer“ (Helminthen) bezeichnet man phylogenetisch nicht näher verwandte Arten der Nematoda, Plathelminthes (Trematoda, Cestoda) und Acanthocephala, die einen parasitischen Lebensstil pflegen, d.h. auf oder in einem Wirt anderer Spezies leben und diesen mehr oder weniger schädigen (HIEPE 2005). Viele Vertreter sind als Krankheitserreger bei Mensch, Tier und Pflanzen bekannt. Weniger gut untersucht ist die Parasitenfauna von Wildtieren und deren möglicher Einfluss auf die Fitness von Indivi-

duen und konsequenterweise die Entwicklung von Populationen (CAMEJO & LOUGHLIN 2015), sowie die Rolle von Wildtieren als Parasitenreservoirs für die Infektion von Menschen und Haustieren (DUSCHER et al. 2015; KAPEL u. FREDENSBORG 2015). Klimatische, aber auch anthropogene Einflüsse können dazu führen, dass Parasiten durch Import oder Zuwanderung ihr Verbreitungsgebiet erweitern; Selektion und Anpassung können danach Diversifizierung nach sich ziehen, was zum Auftreten neuer Erkrankungen führen kann (HOBERG u. BROOKS 2015). Das Monitoring von Parasiten – daher auch von Helminthen – ist von human- und veterinärmedizinischer, landwirtschaftlicher und biologischer Bedeutung und wird auch für bereits bekannte Erreger regelmäßig durchgeführt. Die Bestimmung von Arten oder gar Genotypen ist jedoch aufgrund einiger Charakteristika der Helminthen oftmals schwierig. Nematoden sind auch im vollständig differenzierten Adultstadium häufig sehr merkmalsarm, und Plathelminthen durchlaufen komplexe Lebenszyklen mit mehreren Formwechseln, so dass die Larvalstadien des Adultstadiums morphologisch völlig unähnlich sind. Oftmals gelangen auch nur Teile eines Parasiten zur Untersuchung, wie zum Beispiel Gewebebiopsien in der Human- oder Tiermedizin, anhand derer sich eine Art morphologisch nicht bestimmen lässt. Hier ist die molekularbiologische Typisierung für die genaue Artbestimmung unerlässlich. Obwohl einige solcher Tests bereits etabliert sind, ist die Referenzierung sowohl der morphologischen wie auch der genetischen Typisierung oft nicht möglich, weil nachvollziehbare Beschreibungen der Arten oder Referenzen in Datenbanken fehlen. Gerade bei den Parasiten von Wildtieren besteht hier eine Lücke, so dass die gelegentliche Übertragung auf Haustiere oder den Menschen mit diagnostischen Schwierigkeiten einhergeht, ein Problem, das durch den Wandel von Ökosystemen durch verschiedene äußere Einflüsse verstärkt wird (POLLEY & THOMPSON 2015).

DNA-Barcoding von Parasiten einschließlich Helminthen hat also einen grundlegenden und einen angewandten Aspekt: Einerseits dient es der Inventarisierung der Fauna eines bestimmten Gebietes, wobei Parasiten in einem zweifachen Habitat leben, dem Wirt und dessen Umgebung. Dies bedingt ein besonderes Vorgehen bei der Analyse von populationsgenetischen Analysen bei Parasiten. In der angewandten Forschung wiederum ermöglichen Barcodes die Zuordnung, auch wenn morphologische Bestimmung nicht möglich wäre. Ein möglichst vollständiges Inventar verringert dabei die Fehlerrate. Eine korrekte Taxonomie ist die Grundlage für Ökologie und Diagnostik und bildet die Voraussetzung für die Untersuchung ökologischer Netzwerke (HOBERG et al. 2015). Eine rezente Analyse der Daten in der weltweit größten Barcoding-Datenbank BOLD (<http://www.boldsystems.org/>) hat ergeben, dass weniger als die Hälfte der ca. 1400 als relevant eingestuftten Erreger und Vektoren bisher mit Barcodes versehen sind (ONDREJICKA et al. 2014). Für Parasiten von Tieren oder Pflanzen dürften die Prozentzahlen weitaus niedriger sein. Die *Fauna Europaea*, eine Internet-basierte Liste wissenschaftlicher Namen aller bekannten europäischen Land- und Süßwassertiere, listet mehr als 200 Familien mit annähernd 4000 Arten von Helminthen in Europa (GIBSON et al. 2014).

In dem 2014 begonnenen Projekt ABOL (Austrian Barcode of Life; www.abol.ac.at) werden verschiedene Taxa, unter anderen auch Helminthen, systematisch besammelt, bestimmt, fotografiert, genetisch untersucht und mitsamt des Fundortes und der Wirtsbeschreibung archiviert. Für die Darstellung eines einheitlichen genetischen Barcodes am Genlocus der Cytochromoxidase-Untereinheit I (*COI*) sind für die verschiedenen Taxa unterschiedliche Primer nötig (vgl. für Nematoden PROSSER et al. 2013).



Abb. 1: Deckeninnenseite eines von *Onchocerca jakutensis* parasitierten Rothirsches (*Cervus elaphus*).
– Fig. 1: Cover of red deer (*Cervus elaphus*) who is parasited of *Onchocerca jakutensis*.

Die Problematik und Komplexität von DNA-Barcoding bei Helminthen wird nun an einem Fallbeispiel (welches jedoch keinen Einzelfall darstellt) beschrieben.

Fallbeispiel – *Onchocerca jakutensis*

Anfang November 2014 wurde von einem Jäger ein ungefähr dreijähriger, 80 kg schwerer, männlicher Rothirsch (*Cervus elaphus*) in Rietz (Bezirk Imst/Tirol) geschossen. Dieser wies an der Deckeninnenseite verschieden große, geschlossene Umfangsvermehrungen mit dickflüssigem Inhalt auf (Abb. 1). Um eine etwaige Gesundheitsgefährdung für den Menschen abzuklären wurde die Hirschdecke vom Jäger an die AGES (Institut für Veterinärmedizinische Untersuchungen Innsbruck) geschickt. Dort wurde die Verdachtsdiagnose Onchocercose durch Isolierung von filarioiden Nematoden aus den Granulomen bestätigt. Einige dieser Würmer wurden dem ABOL-Projekt zur Verfügung gestellt.

Die Würmer wurden bis zur Bearbeitung bei -20°C in 70%igen Ethanol gelagert. Von den 27 bekannten *Onchocerca*-Arten, wurden bisher drei (*O. flexuosa*, *O. jakutensis* und *O. tarsicola*) bei Cerviden in Europa beschrieben. Vor der genetischen Analyse wurde versucht, die Parasiten anhand von morphologischen Merkmalen zu bestimmen und demnach *Onchocerca jakutensis* vermutet. Dies konnte aber leider nicht eindeutig bestätigt werden, da es im Rotwild und anderen Cerviden andere Filarienarten gibt, die zystenartige Strukturen in der Haut bilden können. Die exakte morphologische Bestimmung war aufgrund der geringfügigen Degradation der Würmer nicht möglich.

Daraufhin wurde versucht, die Wurmart mittels DNA-Barcoding zu verifizieren. Insgesamt wurden Teilstücke von drei Würmern für die genetische Analyse vorbereitet. Die DNA wurde mit einem Qiagen Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Da, wie oben bereits erwähnt, Helminthen aus einem Sammelsurium diverser Gruppen bestehen, wurden im Vorfeld bereits unterschiedliche Primer für die jeweiligen Gruppen konzipiert und in dem vorliegenden Fall wurden die Primer für jene spezifische Gruppe der filarioiden Helminthen verwendet: H14FilaCOIFw: 5'- GCCTATTTTGATTGGTGGTTTGG -3'; H14FilaCOIRv: 5'- AGCAATAATCATAGTAGCAGCACTAA -3' (ZITTRA et al. 2015). Die PCR wurde in einem Eppendorf Mastercycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Initiale Denaturierung – 2 min, 35 Zyklen a 1 min Denaturierung bei 95°C, Annealing bei 53°C und Extension bei 72°C und finaler Extension bei 72°C für 5 Minuten. Bei der anschließenden Gelelektrophorese waren für jede Wurmprobe Banden bei 724 bp zu sehen. Die PCR-Produkte wurden an LGC Genomics (Berlin, Deutschland) zur Sequenzierung geschickt (GenBank ID: KT001213). Die so erhaltenen Barcode-Sequenzen wurden mit Vergleichssequenzen in BLAST und BOLD verglichen. Es stellte sich heraus, dass es für diese Wurmart keine Vergleichssequenzen in der Barcode-Region (COI) gab.

Da sowohl die morphologische Bestimmung als auch die Barcode-Analyse keine eindeutige Artbestimmung der Würmer erlaubte wurde nun versucht die Artbestimmung durch den Vergleich mit bereits publizierten Gensequenzen (ITS-5.8S rRNA Gene; mitochondrial NADH Dehydrogenase Untereinheit; 16S mitochondriales rRNA-Gen) zu erbringen (KÖHSLER et al. 2007). Hierbei konnte nun bestätigt werden, dass es sich bei diesem Fallbeispiel um die Filarien-Art *Onchocerca jakutensis* handelt (GenBank: KT001214). Dies ist somit der erste beschriebene Fall von *O. jakutensis* in einem österreichischen Rothirsch.

Zur Problematik des DNA-Barcodings parasitischer Helminthen

Dieses Fallbeispiel soll veranschaulichen, dass die Barcode-Analyse von Helminthen unter voller Berücksichtigung der empfohlenen Regeln (z. B. Bestätigung mit Bildern und Belegexemplaren) oft mit enormen Herausforderungen konfrontiert ist. Für jede Helminthengruppe sind unterschiedliche Primer von Nöten und oftmals ist es unklar, ob negative PCR-Ergebnisse durch mangelnde Qualität des Materials (z. B. aufgrund der Lagerbedingungen) oder der Nicht-Anbindung von Primern an die DNA der Parasiten verursacht sind.

Barcoding von Helminthen ist nicht nur unter dem Aspekt der Bereitstellung vollständiger und akkurater Daten für ein Projekt zur Artenvielfalt attraktiv, sondern ist ein zunehmend wichtiges Werkzeug der Diagnostik für grundlegende und angewandte Aspekte. Das Artenspektrum der Wirte vieler Helminthen und ihr Verbreitungsgebiet sind vor allem bei Wildtierparasiten oft nicht hinreichend bekannt, und viele Parasitenarten können neben ihren Hauptwirten auch Haustiere oder gar den Menschen als Zufalls- oder Fehlwirte befallen (DUSCHER et al. 2015) und sind daher von veterinär- und humanmedizinischer Bedeutung. Die Verwendung von Barcode-Primern ermöglicht die molekulare Identifizierung mittels Sequenzvergleich ohne die Notwendigkeit artspezifischer PCR-Tests und ist daher für die Identifikation und weitere Charakterisierung von nicht morphologisch bestimmbar Proben gut geeignet. Es ist daher höchst wünschenswert, die Sammlung an bestätigten Barcode-Sequenzen für Helminthen stetig zu vergrößern.

Abschließend kann man festhalten, dass der Teilbereich des ABOL-Projekts „Parasitische Würmer“ aus den angeführten Gründen von großer Wichtigkeit ist, da Grunddaten (PCR-Protokolle, BOLD-Sequenzen) für weitere Untersuchungen dieser Helminthen und verwandter Gruppen gesammelt werden, die eine schnellere Lösung diverser Fragestellungen – wie z. B. dem vorgestellten Fallbeispiel – ermöglichen werden.

Bisherige genetische Daten wie Informationen aus Genbank^{*} sind zwar hilfreich für den Vergleich der DNA-Sequenzen, jedoch bezüglich der Referenzdaten zu den entsprechenden Organismen unvollständig. Das hier angeführte Beispiel zeigt, wie eine vollständige Barcode-Bank mit morphologischen, geographischen und weiteren Daten (bei Parasiten z. B. Angaben zu Wirten) die genaue Bestimmung und Differenzierung von Helminthen verbessern könnte. Eine solche Datensammlung ist einer Sequenzdatenbank insofern überlegen, als dass sie sowohl genetische wie auch andere Daten vereinigt und somit Unsicherheiten bezüglich der korrekten Bestimmung reduziert.

Dank

Der Artikel entstand im Rahmen des Austrian Barcode of Life-Projektes (ABOL). Wir möchten uns außerdem herzlichst bei Mag. Josef HARL für die Unterstützung bedanken.

Literatur

- DUSCHER G.G., LESCHNIK M., FUEHRER H.P. & JOACHIM A., 2015: Wildlife reservoirs for vector-borne canine, feline and zoonotic infections in Austria. *International Journal for Parasitology- Wildlife Diseases* 1, 88–96.
- GIBSON D.I., BRAY R.A., HUNT D., GEORGIEV B.B., SCHOLZ T., HARRIS P.D., BAKKE T.A., POJMANSKA T., NIEWIADOMSKA K., KOSTADINOVA A., TKACH V., BAIN O., DURETTE-DESSET M.C., GIBBONS

- L., MORAVEC F., PETTER A., DIMITROVA Z.M., BUCHMANN K., VALTONEN E.T. & DE JONG Y., 2014: Fauna Europaea: Helminths (Animal Parasitic). Biodiversity Data Journal 2, e1060.
- HIEPE T., 2005: Parasitismus als Lebensform – eine Einführung. In HIEPE T., LUCIUS R., GOTTSTEIN B. (Hrsg.): Allgemeine Parasitologie mit den Grundzügen der Immunologie, Diagnostik und Bekämpfung. Paul Parey Verlag, Berlin.
- HOBERG E.P. & BROOKS D.R., 2015: Evolution in action: climate change, biodiversity dynamics and emerging infectious disease. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences 370 (im Druck). doi: 10.1098/rstb.2013.0553.
- HOBERG E.P., AGOSTA S.J., BOEGER W.A. & BROOKS D.R., 2015: An integrated parasitology: revealing the elephant through tradition and invention. Trends in Parasitology 31, 128–133.
- KAPEL C. & FREDENSBORG B.L., 2015: Foodborne parasites from wildlife: how wild are they? Trends in Parasitology 31, 125–127.
- KOEHLER M., SOLEIMAN A., ASPÖCK H., AUER H. & WALOCHNIK J., 2007: *Onchocerca jakutensis* filariasis in humans. Emerg Infect Dis. 13(11), 1749–1752. doi: 10.3201/eid1311.070017.
- ONDREJICKA D.A., LOCKE S.A., MOREY K., BORISENKO A.V., & HANNER R.H., 2014: Status and prospects of DNA barcoding in medically important parasites and vectors. Trends in Parasitology 30, 582–591.
- POLLEY L. & THOMPSON A., 2015: Parasites and wildlife in a changing world. Trends in Parasitology 31, 123–124.
- PROSSER S.W.J., VELARDE-AGUILAR M.G., LEÓN-RÉGAGNON V. & HEBERT P.D.N., 2013: Advancing nematode barcoding: A primer cocktail for the cytochrome c oxidase subunit I gene from vertebrate parasitic nematodes. Molecular Ecology Resources 13, 1108–1115.
- ZITTRA C., KOCZIHA Z., PINNYEI S., HARL J., KIESER K., LACINY A., EIGNER B., SILBERMAYR K., DUSCHER G.G., FOK É & FUEHRER H.P., 2015: Screening blood-fed mosquitoes for the diagnosis of filarioid helminths and avian malaria. Parasites & Vectors 8(1), 16. doi: 10.1186/s13071-015-0637-4.

Anschriften:

Mag. Dr. Hans-Peter FUEHRER, Institut für Parasitologie, Department für Pathobiologie, Veterinärmedizinische Universität Wien, Veterinärplatz 1, A-1210 Wien.

E-Mail: hans-peter.fuehrer@vetmeduni.ac.at

Dr. Katja SILBERMAYR, Institut für Parasitologie, Department für Pathobiologie, Veterinärmedizinische Universität Wien, Veterinärplatz 1, A-1210 Wien.

E-Mail: katja.silbermayr@vetmeduni.ac.at

Dr. Walter GLAWISCHNIG, Institut für Veterinärmedizinische Untersuchungen Innsbruck, Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, Technikerstrasse 70, A-6020 Innsbruck, E-Mail: walter.glawischnig@ages.at

Univ.-Prof. Dr. Anja JOACHIM, Institut für Parasitologie, Department für Pathobiologie, Veterinärmedizinische Universität Wien, Veterinärplatz 1, A-1210 Wien.

E-Mail: anja.joachim@vetmeduni.ac.at

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Verhandlungen der Zoologisch-Botanischen Gesellschaft in Wien. Frueher: Verh.des Zoologisch-Botanischen Vereins in Wien. seit 2014 "Acta ZooBot Austria"](#)

Jahr/Year: 2015

Band/Volume: [152](#)

Autor(en)/Author(s): Fuehrer Hans-Peter, Silbermayr Katja, Glawischnig Walter, Joachim Anja

Artikel/Article: [Barcoding parasitischer Würmer - eine Sammlung ungeliebter Tiere? Das Fallbeispiel Onchocerca jakutensis 173-178](#)