



Parasitologie - Praktikum

Versuchsdurchführende

Huyen Anh Nguyen (572309)

Versuchsort

Haus 14, Kursraum
Gruppe 4

Versuchsleiter

Prof. Dr. Kai Matuschewski

Versuchsbetreuer

Dr. Alexander Maier (ANU)
Linnea Polito
Grit Meusel
Dr. Richard Lucius
Peer Martin
Manuel Rauch
Dr. Katja Müller

Abgabe 15. August 2024

Contents

1 Note from the Author	3
2 Hirudinea	4
2.1 Arten Bestimmung mittels dichotomischen Bestimmungs- schlüssel	4
2.1.1 Einleitung	4
2.1.2 Methode	4
2.1.3 Ergebnis	5
2.1.4 Diskussion	5
2.2 Arten Bestimmung mittels DNA-Barcoding	5
2.2.1 Einleitung	5
2.2.2 Methode	6
2.2.3 Ergebnis	6
2.2.4 Diskussion	8
2.3 Vergleich Hirudinea und Regenwurm	8
2.3.1 Einleitung	8
2.3.2 Methode	9
2.3.3 Ergebnis	9
2.3.4 Diskussion	10
3 Trematoden	11
3.1 Einleitung	11
3.2 Methode	11
3.2.1 Malzacherfärbung	11
3.2.2 Trematodenlarvenisolation aus einer Wasserschneckenleber	12
3.3 Ergebnis	12
3.3.1 Portrait des adultes <i>Dicrocoelium dendriticum</i>	12
3.3.2 Trematodenlarven	12
4 Apicomplexa	14
4.1 Giemsa-Färbung von Plasmodium in Humanblut	14
4.1.1 Einleitung	14
4.1.2 Methode	14
4.1.3 Ergebnis	14
4.1.4 Diskussion	15
4.2 Gregarinensparasiten im Totenkopfschabe <i>Blaberus craniifer</i>	15
4.2.1 Einleitung	15
4.2.2 Methode	16
4.2.3 Ergebnis	16
4.2.4 Diskussion	17

5 Anhang	18
5.1 PCR	18
5.2 Anatomische Zeichnung Regenwurm und Medizinischer Egel	20
5.3 Plasmodium in Erythrozyten	22
Bibliography	22

Note from the Author

Das Protokoll ist eine Collection von Einzelprotokolle der Versuchen, die in den Parasitologiepraktikum durchgeführt wurde.

Es wurden Methoden gezeigt, wie eine Spezies identifiziert, untersucht und dessen Verhalten analysiert werden kann.

Aufgrund dieser Diversitäten an Versuchen, wird das Protokoll in drei Großkapiteln unterteilt. Ich fand es nach den Tierklassen zu unterteilen sinnvoll, auch wenn einige Versuche einen eigenen Kapitel verdient haben.

Hirudinea

Hirudinea sind Egel die zu der Klasse Clitellata (Gürtelwürmer) gehören, wo auch die Regenwürmer dazuzählen. Die Arten die zu den Clitellata gehören, besitzen ein sogenanntes Clitellum (verdicktes mit Epidermis, Drüsengürtel), welches das Befruchtungsort für Eizelle und Spermazellen sind. Clitellaten sind Hermaphroditen. Um Selbstbefruchtung auszuschließen, befinden sich die Spermazellen in Spermatheken und die Gameten wandern erst bei der Kokonbildung zu den Clitellum. Unter den Hirudinea gibt es räuberische (*Haemopis sanguisuga*), parasitische (*Hirudo verbana*) und aasfressende Arten, die aquatisch, amphibisch oder auch terrestrisch leben können. Die räuberischen Arten ernähren sich von Wirbellosen und die parasitischen Arten von den Wirbellosen und Wirbeltieren, wobei letzteres nicht wirtsspezifisch sind. Sie befallen jedoch Wirbeltiere in der selben Klassen.¹⁵ Aufgrund der fehlenden Glidern bewegen sich die Hirudinea durch kriechend, schwimmend und raupenartig fort und nutzen dabei ihre Saugnapfen als Haftwerkzeug an Oberflächen.

Mit mehr als 700 Arten unter den Hirudinea und mehr als 7400 Arten unter den Clitellaten ist es wichtig die Arten richtig zu bestimmen. Dafür stehen mehrere Methoden zur Verfügung, dies zu tun. Eine davon ist die Dichotomische Bestimmungsmethode, welches Morphologisch das untersuchende Individuum systematisch zuordnet und die genetische Analyse mittels Polymerase Chain Reaction (abgekürzt: PCR).

In den Kurs wird auch noch zusätzlich die Hirudinea mit den Oligochaeta (Wenigborster) verglichen.

2.1 Arten Bestimmung mittels dichotomischen Bestimmungsschlüssel

2.1.1 Einleitung

Dichotomische Bestimmung ist eine Methode ein Individuum morphologisch und systematisch einer Reich, Stamm, Klasse, Ordnung und Gattung zuzuordnen und dessen Art zu bestimmen.

Dichotomie kommt aus den altgriechisch und bedeutet grob übersetzt zweifacher Schnitt.⁴ Der Dichotome Bestimmungsschlüssel ist eine Tabelle oder Liste von Merkmalen, die ein Experte aufgelistet hatte, womit das zu untersuchte Individuum abgeglichen werden kann. Dafür stehen zwei Merkmalen pro Kategorie zu (Es gibt auch Submerkmale unter den Hauptmerkmalen, um auch kleine Abweichungen abzudecken), wo der Nutzer entscheidet welche Merkmale zu der Spezies zutrifft.⁸ Durch die Merkmalskomibantion kann somit das Taxa bestimmt werden.

2.1.2 Methode

Unter einem Stereomikroskop wurde ein in Ethanol fixiertes Egelprobe (Länge: 3 cm) untersucht. Die Merkmale wurden anhand des Dichotomischen Bestimmungsschlüssel der Egel Deutschlandsnach Clemens Grober auf Moodle systematisch zugeordnet.

Damit die Probe nicht austrocknet, wurde in regelmäßigen Abstand die das Tier mit Wasser befeuchtet.

2.1.3 Ergebnis

In Figure 2.1b ist zu sehen, dass diese Spezies vier Augen in der vordere Reihe besitzt. Hinter der vorderen vier Augen gibt es pro Seite noch in diagonalen Stellung zwei Augen.

Für die Artbestimmung wurde folgende Entscheidung getroffen:

Augenzahl: 8 → 4 Augen in 1 vorderen Reihe, je 2 hinter liegenden, schräg gestellten Reihen → Dina, Erpobdella, Trocheta → der gesamter Körper abgeplattet; alle Ringe gleichbreit → Erpobdella → abgebrochen, aufgrund der knappen Zeit.



(a) Alte Egelprobe.



(b) Frische Egelprobe

Figure 2.1: Mikroskopische Aufnahme von den Vorderkopf der Egelproben. In 2.1a handelt sich um die Egelprobe, die hier für den Versuch untersucht wurde. Aufgrund des Zustandes der Probe wurde die die Augenlage von der Komiliton*in Melissas Probe (2.1b) untersucht. Beide Spezies gehören zur selben Art.

2.1.4 Diskussion

Anhand des Dichotomischen Bestimmungsschlüssel wurde der vorliegende Egel zu der Gattung Erpobdella zugeordnet. Da der Versuch nachmittags durchgeführt wurde und die Exemplare schon vormittags verwendet wurde, war der Zustand des Egels nicht mehr optimal für eine ordentliche Bestimmung. Damit die richtige Art bestimmt werden kann, ist eine genetische Analyse von Vorteil. Die Verwendung des Dichotomischen Bestimmungsschlüssel muss geübt werden. Eine unerfahrende Person wird dabei oftmals eine falsche Entscheidung treffen, da viele Merkmale nicht so eindeutig sind wie in den Bestimmungsschlüssel beschrieben ist.

Diese morphologische Methode kann aber mit einer DNA-Barcoding unterstützt werden, welches im nächsten Abschnitt behandelt wird.

2.2 Arten Bestimmung mittels DNA-Barcoding

2.2.1 Einleitung

Die Art des Egels wird anhand seines Genoms bestimmt. Dabei werden Markergens in der Spezies molekular untersucht, die spezifisch für eine Art konserviert ist.

Da jede Art einen einzigartigen genetischen Sequenzabfolge besitzt, eignet sich diese Methode bestens um eine Spezies zu phylogenetisch zu analysieren^{13,14}.

Es setzt natürlich voraus, dass die Sequenzabfolge irgendwo auf einer Datenbank zu der Art hinterlegt ist, um mit der zu untersuchende Spezies abzugleichen.

Als Sequenzmarker wird die für das Cytochrome C Oxidase subunit 1 Enzym (abgekürzt: COI) codierte Gen in den Mitochondrien verwendet. Mitochondriale DNA besitzen keine Introns und wird haploid vererbt (COI wird maternal vererbt), so dass es nicht wie beim Kerngenom zwei verschiedene Varianten eines Gens existieren.

Damit für die Sequenzierung genug DNA-Material zur Verfügung stehen, wird hier die Polymerase Chain Reaction (abgekürzt: PCR) verwendet.

Das Verfahren ermöglicht eine schnelle und hohe Kopiezahldes gewünschten Genabschnittes zu bekommen. Für die PCR wird ein hitzestabiles DNA-Polymerase I-Enzym (Taq-Polymerase aus dem *Thermus aquaticus*-Bakterium) benötigt, da die Doppelsträngige DNA zu Einzelsträngige DNA denaturiert werden muss. Damit die Taq-Polymerase die Amplifikation (Vervielfältigung der Nukleinsäure) durchführen kann, benötigt diese neben den Nukleotiden auch Primer, die an beide DNA-Stränge (Codogener Strang und nicht codogener Strang) an den gewünschten Genbereich bindet. Hier wird der Forward-Primer LCO1490 und Reverse Primer HC02198 von Folmer (1994) verwendet (siehe Table 5.3), welches ermöglicht im GOI-Gen ein 659 bp langes Genfragmentes zu amplifizieren.

Im Anschluss wird mittels einer Agarosegelektrophorese die Fragmente nach der Größe aufgetrennt und sequenziert.

2.2.2 Methode

14. Juni 2024

Für die gDNA-Isolierung wurde das Genomic DNA tissue kit verwendet.

Ein grobes Stück Egelgewebe (grob 20 mg) wurde mit einem Skalpell homogenisiert und mit 400 μL Lysispuffer und 25 μL Proteinase K für 30 Minuten bei 56°C unter Schütteln inkubiert. Dann wurden 250 μL Bindingsolution SBS zugegeben und gemischt und auf einer Zentrifugenröhre überführt. Diese wurde für 2 Minuten bei 10000 x g zentrifugiert und das Filtrat verworfen.

Dann wurde 600 μL Waschpuffer auf die Säule pipettiert und für 1 Minute für 11000 x g zentrifugiert und dieser Schritt wurde mit 300 μL Waschpuffer wiederholt. Am Ende des wurde auf maximalen Speed für 30 Sekunden die Überreste an Lösungsmittel abzentrifugiert.

Das Zentrifugenröhre wurde auf einem 1.5 mL Eppendorf-Röhrchen überführt und auf dem Filter 50 μL RNase freies Wasser pipettiert und mit geöffneten Deckel bei 11000 x g für 2 Minuten zentrifugiert.

12. Juli 2024

Die Konzentration vom gDNA wurde photometrische bestimmt und beträgt 15.2 mg/mL (Wurde von Grit Meusel durchgeführt). Es wurden 2 μL gDNA und als negativ Kontrolle 2 μL Wasser mit 23 μL Mastermix (Pipettierschema für den Mastermix siehe Table 5.1). Die Proben werden dann für 34 Cyclen amplifiziert (PCR-Cyclen siehe Table 5.2).

14. Juni 2024

5 μL amplifizierte PCR-Proben wird mit 1 μL 6x Gel-Puffer vermischt und auf einem 1%igen Agarosegel aufgetragen. Zusätzlich wird ein DNA Marker mitaufpipettiert für die Größenbestimmung. Der Gellauf lief bei 100V für 1 Stunde und wurde unter ultraviolettes Licht analysiert. Die Sequencebestimmung wird von den Versuchsbetreuer durchgeführt.

Die Sequenzabfolge wird mit der National Library of Medicine-Datenbank abgeglichen und ein Alignment-Tree in MegaX erstellt.

2.2.3 Ergebnis

In Figure 2.2 ist zu erkennen, dass es bei der Probe eine Bande existiert. Die Amplifikation hat DNA-Fragmente produziert, die bei circa 600 bp liegt. Die Negativ Kontrolle zeigt keine Bande.

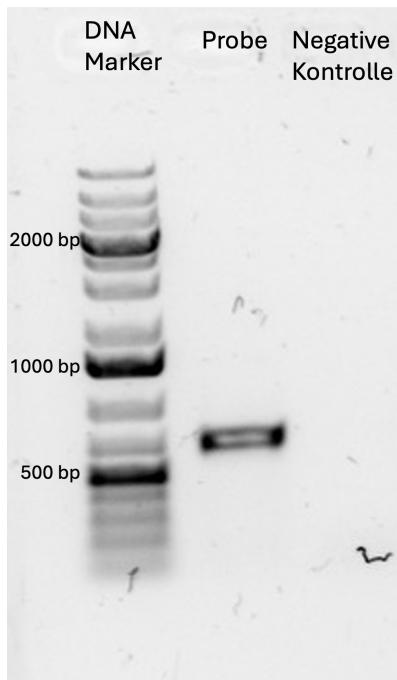


Figure 2.2: Größenauf trennung der gDNA PCR-Probe von der unbekannte Egelgewebestücks und der Negativkontrolle (Wasser) aufgetrennt auf einer 1%-Agarosegel mit einem DNA-Marker als Größenvergleich.

Die Sequenz von der Isolierte Bande aus Figure 2.2 ist in Table 5.4 dargestellt und glich mit 99.49 % mit der Art *Erpobdella octoculata* zusammen. Die Referenzsequenz stimmt mit der Art *Erpobdella testacea* mit der Datenbank zu 99.69 % überein.

Bei der MUSCLE Alignment Algorithmus zeigen das beide Sequenzen 266 gemeinsame Basenpaare besitzen.

In Figure 2.3 wurden die beiden Arten mit 9 weiteren Arten in Relation aufgestellt und mit der Maximum Parsimony Algorithmus den Verwandschaftsgrad bestimmt.

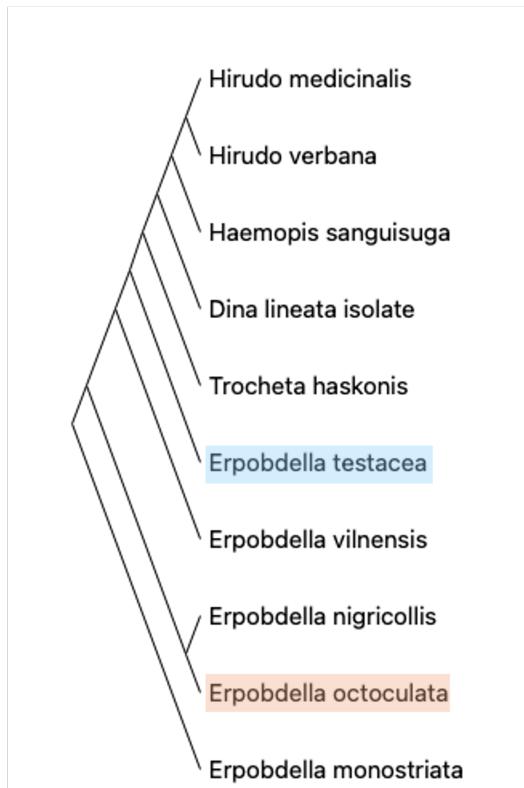


Figure 2.3: Alignenttree mit 10 Arten. Es wurde nach dem MUSCLE-Algorithmus alignt und ein Baum nach dem Maximum Parsimony Methode erstellt. Die Spezies die in den Kurs untersucht wurde trifft mit 99.49 % dem Erpobdella octoculata zu. Die Verwandschaftsbeziehung zu Erpobdella testacea, welches die Referenzsequenz vom Betreuer zur Verfügung stand ist in diesen Figure dargestellt. Die Rohsequenzen von der DNA-Sequenzierung ist in Table 5.4

2.2.4 Diskussion

Es wurde ein Sequenz amplifiziert, dass 664 bp lang ist (siehe Table 5.4), welches in der Agarosegelektrophorese auch in den Bandenbereich von circa 600 bp aufgetrennt wurde.

Der Sequenzvergleich mit der Datenbank der National Library of Medicine wurde der im Versuch zu untersuchten Egel der Art Erpobdella octoculata mit einer Übereinstimmung von 99.49 %. In Abschnitt 2.1 wurde anhand des Dichotomischen Bestimmungsschlüssel morphologisch die Gattung Erpobdella von den Egel bestimmt und mit der DNA-Barcoding wurde diese Gattung bestätigt. Der bestimmte Egelart Erpobdella octoculata und Erpobdella testacea bilden keine monophyletische Gruppe, wenn andere Egelarten in Bezug genommen wird (siehe Figure 2.3) und mittels MUSCLE Alignment- und Maximum Parsimony-Algorithmus analysiert wird.

Die Artenbestimmung mit der DNA-Barcoding ist deutlich kostspieliger und zeitaufwendiger als die Methode mit dem dichotomischen Bestimmungsschlüssel. Mit beiden Methoden konnte die gleiche Gattung bestimmt werden. Die Sicherheit des Ergebnis ist bei beiden Methoden Abhängig von den gesammelten Daten beziehung der vorliegende Daten.

2.3 Vergleich Hirudinea und Regenwurm

2.3.1 Einleitung

In der Gruppe der Clitellata gehören die Oligochaeta (Wenigborster) und die Hirudinea (Egel), die zu der großen Gruppen der Anneliden (Ringelwürmer) gehören. Die Oligochaeta ist ein Sammelbegriff für Paraphyletische Gruppe die hier keine Monophyletische Gruppe bilden. Aus den

Oligochaeta wird hier der Regenwurm *Lumbrius terrestris* als Vertreter auserwählt. Der Regenwurm ist der bekannteste REgenwurmart in Europa und lebt in den Boden von Wiesen und Gärten.⁶ Sie gehören zu den Destruenten und sind für das Ökosystem ein wichtiger Bestandteil. Von den Hirudinea wird der medizinischer Egel *Hirudo verbana* als Vertreter genommen. Der Egel ist ein Ektoparasit, welches sich von Fischen, Amphibien und Wirbeltieren ernährt und in den Gewässern der Mittelmeerraum vorkommt.⁹ Sie haben in der Medzinin (weswegen auch dieser Umgangssname) eine besondere Bedeutung, da ihr Speichel gerinnungshemmend, blutsenken, entzündungshemmend und lokal betäubend wirkt.

In diesen Versuch werden von den beiden Arten die Körpersysteme morphologisch auf Unterschiede und Gemeinsamkeiten untersucht.

2.3.2 Methode

Der *Hirudo verbana* - Egel wurde unter einem Stereo-Mikroskop präpariert und auf einem mit Alufoliebedeckten Styroformplatte fixiert. Entlang der Mittelline der Bauchseite wurde die Bauchseite mit der stumpfen Seite der Schere aufgeschnitten und aufgefächert fixiert. Der Verdauungstrakt wurde betrachtet und vorsichtig abgenommen um den inneren Rückenbereich mit den Geschlechtsorganen und Harnsystem zu betrachten. Das Nervensystem konnte nicht erkannt werden. Die Morphologie wurde dann mit den Regenwurm aus MB5 (*Lumbricus terrestris*) verglichen.

2.3.3 Ergebnis

In Table 2.1 sind die Merkmale von den *Hirudo verbana* und *Lumbricus terrestris* für die Organsysteme Verdauungs-, Kreislauf-, Nerven-, Harnsystem und Fortpflanzungsorgane aufgelistet.

Table 2.1: Merkmale in den Organsysteme zwischen der *Hirudo verbana* (Egel) und *Lumbricus terrestris* (Regenwurm). Die Merkmale sind in Figure 5.1 (*Hirudo verbana*) und 5.2 (*Lumbricus terrestris*) zu sehen.

	Hirudo verbana	Limbricus terrestris
Verdauungssystem	Der Magen erstreckt sich über die Körperlänge und der Egel besitzt einen an den Magen 10 Zweipaarige Blindsäcke, wo das letzte Paar vergrößert ist. Am Vorderende befindet sich Kifern mit Zähnen aus Kalzit und daran der Pharynx	Der Mund geht zu den Pharynx über diese zu den Oesophagus mit den Kalksäckchen. Bevor es zu den Muskelmagen übergeht, ist da noch der Kropf. Der Magen ist nur zwei Segmente lang und geht dann zu den Darmtraktes über.
Kreislaufsystem	Lateralkanäle und Seitenkanäle durchziehen den Egel und in der Mitte des Körpers das Dorsalgefäß	Das Rückengefäß ist auf dem Darm und besitzt Gefäßschlingen die das Blut zu den Bauchgefäß pumpt. Die Gefäßschlingen wird auch Lateralherz genannt
Nervensystem	Besitzt ein Cerebralganglion unterhalb des Kiefers	Am Vorderen Ende befinden sich zwei Cerebralganglien
Fortpflanzungsorgane	Räumlich getrennte Geschlechtsorgane. Besitzt Vagina und eine Penistasche. Über den ganzen Körper sind die Hoden verteilt.	Weiblicher und Männliche Geschlechtsorgane sind räumlich voneinander getrennt. Besitzt keine Vagina oder Penis.
Harnsystem	Besitzen lateral paarige Harnblasen mit Nephridien die über das ganze Körper verteilt sind	Besitzen paarige Nephridienschlingen in jeden Segmenten, die lateral liegen

2.3.4 Diskussion

Hirudo verbana und Lumbricus terrestris zeigen viele gemeinsame Merkmale wie die kräftigen Ring und Längsmuskulatur unter der Haut und wiederholende Organe pro Segmente wie die Nephridien und Blutgefäße. Beide Besitzen weibliche und männliche Geschlechtsorgane, die räumlich durch Segmente getrennt sind, um Selbstbefruchtungen zu verhindern.

Durch die verschiedene Ernährungsweisen, ist bei den Verdauungssystem die größten Unterschiede zu sehen. So hat der Egel aufgrund seines Lebensform einen stark vergrößerten Magen, da diese Art für eine sehr lange Periode ohne Nahrung überleben kann und wenn es ein Wirt findet, sich vollsaugt, bis auch die Blindsäcke voll sind. Wenn diese vollgesaugt ist, pflanzen sich die Tiere sich fort. Zudem hat der Egel Kiefer mit Zähne um sich an den Wirt haften zu können und ins Fleisch reinbeißen zu können. Der Regenwurm hingegen ernährt sich von toten Pflanzenresten und benötigt ein starken muskulösen Magen, um zusammen mit den eingesaugten Sand diese zerkleinern zu können. Zudem hat der Regenwurm noch zusätzlich einen Kalksäckchen, dessen Funktion noch nicht ganz klar ist.¹⁵

Trematoden

Trematoden (Saugwürmer) gehören zu der Klasse der Plathelminthes (Plattwürmer) und bilden mit den Cestoda eine monophyletische Gruppe.

Die meisten Trematoden sind Endoparasitisch und nutzen Wirbellosen als Zwischenwirt und Wirbeltieren als Endwirt.

Die Entwicklungszyklen der Trematoden ist abhängig vom Wirts- und Generationswechsel. Bei der Generationswechsel wird von der sexuellen zu der asexuellen Phase gewechselt. Sie besitzen am Mund und Bauch Saugapparate, mit denen sie sich an dem Wirt haften können. Bis auf die Schistosoma sind die Trematoden zwittrig.

3.1 Einleitung

Als Vertreter der Trematoden wird der kleine Leberegel *Dicrocoelium dendriticum* genommen. Der Lebenszyklus des *Dicrocoelium dendriticum* beinhaltet zwei Zwischenwirte bis er beim Endwirt in die sexuelle Phase übergeht. Die Eier des Parasiten wird von den Endwirt (welches meistens große Weidetiere sind) mit den Kot ausgeschieden. Der erste Zwischenwirt, die Landschnecke nimmt die Eier auf, wo die Larven schlüpfen. Dieses Larvenstadium wird auch Sporozytenstadium genannt, wo die Sporozyten in der Schnecke zu Cercaria entwickelt, bevor diese den Wirt wechselt. Beim Wirtswechsel sekretiert die Schnecke die Mucöse Bälle mit den Cercaria, die die Ameise dann frisst. Da wandert ein Cercarie in den Gehirn und steuert die Motorik der Ameise, so dass dieser bei nacht zum Höchstpunkt der Landschaft klettert, um dort zu verharren bis der Endwirt die Ameise aufgenommen hat. In dieser Zeit bleiben die anderen Parasiten als Metacercariae im Magen der Ameise. Der Endwirt ist meist ein Herbivore und frisst die Gräser mit der Ameise drauf. Im Magen wird die Ameise mit den Cercarie im Hirn verdaut während die anderen Metacercariaen durch die abgesonderten Zystenhülle geschützt sind. Nach der Passage des Magens, wandern die Metacercariaen zu den Gallengängen und entwickeln sich zu den adulten Würmer.

Der adulte Wurm pflanzt sich hier fort und legt ihre Eiern in den Gallensäften ab, die dann in den Darm gelangen um ausgeschieden zu werden.

In diesen Versuch wird die Anatomie des kleinen Leberegels und die Larvenstadien in der Schnecke untersucht.

3.2 Methode

3.2.1 Malzacherfärbung

Die in 70% Ethanol fixierten adulten *Dicrocoelium dendriticum* wurden für 5 Minuten in Borax-carmine fixiert und danach für 1 Minute lang in Leitungswasser differenziert bis das Gewebe zu rosa verblasste.

Dann wurde für 5 Minuten in Strablaufösung (1% Astrablau, 3% Weinsäure in ddH₂O) gefärbt und anschließend für 2 Minuten in 3% Weinsäure solange entfärbt, bis das Gewebe rosa-lila wurde. Dann wurde das Objekt für 10 Minuten in 50% Ethanol, zwei Mal 10 Minuten 70%, 10 Minuten in absoluten Ethanol und dann 5 Minuten zwischen zwei Objekträgern in absoluten Ethanol entwässert. Als letzter Entwässerungsschritt wurde das Objekt für 5 Minuten in absoluten Ethanol

gelegt.

Vor dem Eindecken wurde das Objekt für 10 Minuten in Wintergrünöl inkubiert.

3.2.2 Trematodenlarvenisolation aus einer Wasserschneckenleber

Mit einer Pinzette wird ein Stück mit Trematoden infiziertes Wasserschneckenleber in Wasser zerrupft. Ein Tropfen des zerrupften Lebergewebes wird unterm Mikroskop nach den Larven untersucht.

3.3 Ergebnis

3.3.1 Portrait des adultes *Dicrocoelium dendriticum*

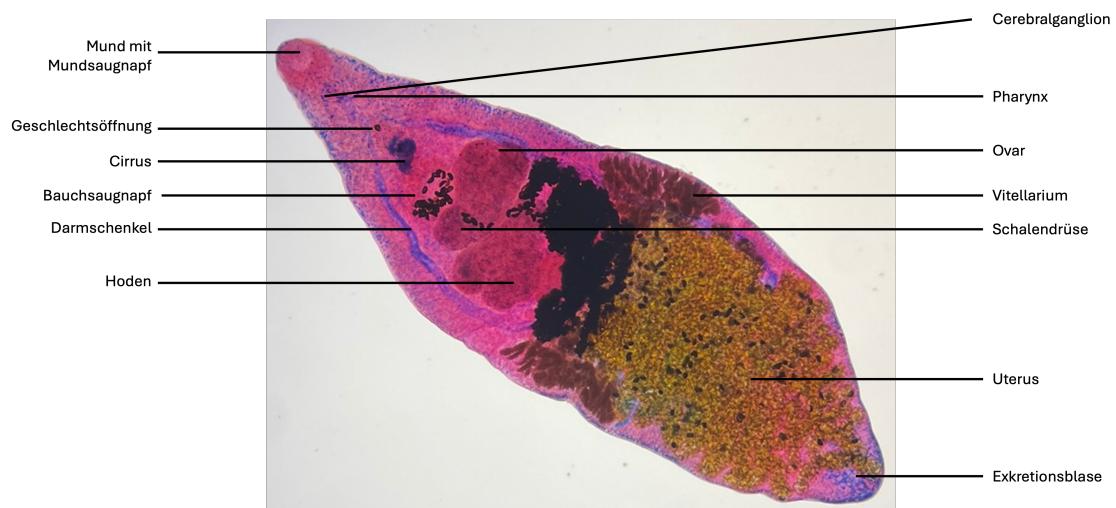


Figure 3.1: 40-fache Vergrößerung einer Malzacher-Färbung des adultes *Dicrocoelium dendriticum* (Leberegel) aus einer infizierten Wasserschneckenleber.

Die adulte *Dicrocoelium dendriticum* besitzt zwei Saugnäpfe. Eine am Mund und eine am Bauch. Nach dem Mund folgt das Pharynx, dass sich in den gegabelten Darm hinübergeht. Die GEschlechtsorgane des Plattwurmes nehmen mehr als die Hälfte des Tieren es. Der Uterus nimmt die Hälfte des Volumens ein. Da die Art zwittrig ist, besitzt diese das weibliche und männliche Geschlechtsorgane. Das Cerebralganglion befindet sich unterhalb des Mundsaugnapfes. Das Cirrus befindet sich an den Geschlechtsöffnung.

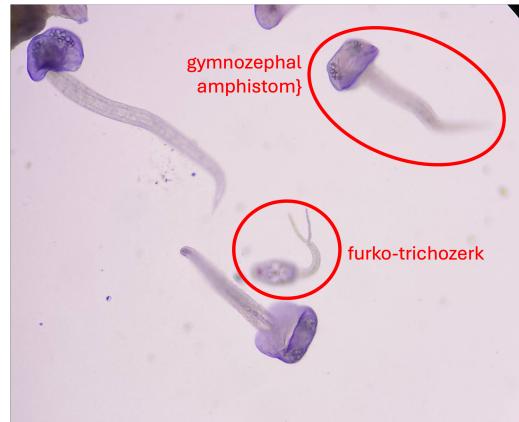
Die Exkretionsblase ist in den Präparat kaum zu erkennen, aber liegt am Hinteren Ende des Wurmes.

3.3.2 Trematodenlarven

In Figure 3.2 sind zwei Larvenstadien zu sehen, die sich in der Leber der Wasserschnecke befanden. Unterm Mikroskop fanden sich die Redie-Form (Figure 3.2a) und die Zerkarien in verschiedenen Formen (Figure 3.2b).



(a) Redie-Form



(b) Zerkarien

Figure 3.2: Mikroskopische Aufnahme von Kommilitonen der Larven des *Dicrocoelium dendriticum* aus einer infizierte Wasserschnecke. In 3.2a wurde die Larvenform Redie entdeckt und in 3.2b sind zwei Formen der Zerkrien zu sehen: gymnocephal amphistom und furko-trichozer

Die Aufnahmen in Figure 3.2 wurden von verschiedenen Komillitionen aufgenommen, da der vorliegende Präparat keine schönen Larvenstadien zeigen konnte (siehe Figure 3.3). Es wird vermutet, dass die Schnecken für den Zeitpunkt viel zu lange tot waren, so dass auch der Parasit gestorben ist. Der Larvenstadium konnte in den Präparat nicht identifiziert werden, da viele Tiere geplatzt sind.



Figure 3.3: Mikroskopische Aufnahme der Larven des *Dicrocoelium dendriticum* aus einer infizierte Wasserschnecke .

Apicomplexa

Apicomplexa sind einzellige eukaryotische Parasiten, die wie auch die Trematoden in ihren Lebenszyklus einen Generationswechsel und Wirtswechsel durchlaufen. Die asexuelle Vermehrung wird zuerst als Schizogonie begonnen, wo sich zuerst der Zellkern des Sporozoiten (sind haploid) in vielen Zellkernen teilen und dann in mehreren Zellen aufspalten, die als Merozoiten bezeichnet wird. In der sexuellen Phase wandeln sich die Merozoiten in Gametozyten, die dann sich zu Zygoten verschmelzen. Aus dieser Zygote entstehen wieder haploide Sporozoiten.

Die bekanntesten Apicomplexa sind die Malaria-Erreger (Gattung: Plasmodium) und Toxoplasma gondii (Katzen-Parasit).¹

4.1 Giemsa-Färbung von Plasmodium in Humanblut

4.1.1 Einleitung

Das hier vorliegende Humanblut gehört einem Patienten, welches mit den Plasmodium falciparum infiziert wurde.

Dieser Parasit ist der bekannteste Erreger der Familie Plasmodium und ist der Auslöser für die tödliche tropische Krankheit Malaria tropica.¹¹ Der Lebencyklus dieses Parasiten findet in der weiblichen Stechmücke Anopheles und Menschen ab.

In der Mücke befindet sich der Parasit in seiner Sporozoiten-stadium und kann durch einen Mückenstich in den Blutkreislauf der Menschen kommen. Dort erfolgt die Schizogonie (asexuelle Vermehrung). Hierbei wird die exoerythrozytär Schizogonie in den Leberzellen und erythrozytäre Schizogonie in den Erythrozyten unterschieden. In den Erythrhorzyten entwickelt sich das Parasit zu Merozoiten und verursachen hier die typischen Fieberschübe, die am Ende des Schizogonienzyklus ausgelöst werden.

Einige der Merozoiten teilen sich in männlichen und weiblichen Gametocyten und werden dann von der Anopheles Mücke bei einem erneuten Stich wieder aufgenommen.

In diesen Versuch wird die verschiedenen Stadien des Erregers untersucht und die Parasitämie bestimmt

4.1.2 Methode

Die vorgefertigten Blutaufstriche werden für 10 Minuten mit Giemsa-Lösung (1:10 mit Wasser) gefärbt. Dann wird diese in Wasser gewaschen und bei 100-Fache Vergrößerung (Immersionsöl) untersucht.

4.1.3 Ergebnis

Es wurden viele Plasmodien in den Erythrozyten gefunden. Diese wurde in Figure 4.1 dargestellt und der Schizontenstadium bestimmt.

In den meisten Erythrozyten befanden sich die Plasmodien in den Ringformen (Figure 4.1a). Als zweithäufigsten waren die Erythrozyten mit Plasmodien infiziert, die sich in den frühen Schizontenstadien befanden (Figure 4.1b). Es konnte in den Präparat nur ein weiblichen Gametocyten entdeckt werden (Figure 4.1c).

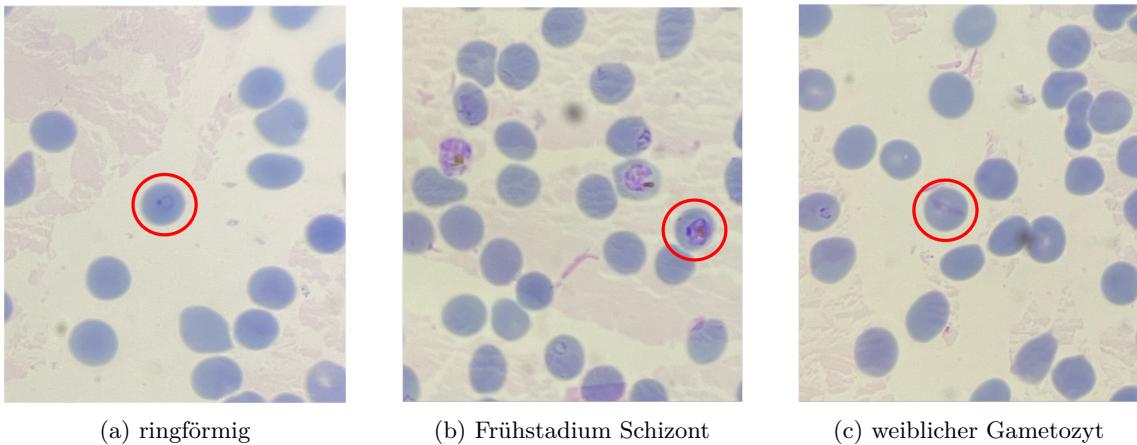


Figure 4.1: Giemsa-Färbung eines mit *Plasmodium falciparum* infiziertes Humanblutes. In 4.1a ein ringförmige Erreger entdeckt, in 4.1b befindet sich der Erreger in der frühen Schizontenstadium und in 4.1c hat sich der Erreger wohlmöglich in einem weiblichen Gametozyten entwickelt.

Die Parasitämie wird nach der Gleichung 4.1 bestimmt.

$$P\% = \frac{\sum P \cdot 100\%}{\bar{E} \cdot F} \quad (4.1)$$

Dabei steht P für die Anzahl der infizierte Erythrozyten, \bar{E} für die Anzahl der Erythrozyten in einem Feld (Als repräsentative Zahl) und F für die Anzahl der Feldern.

$$P\% = \frac{64 \cdot 100\%}{167 \cdot 10} = 3.8\%$$

Für das Präparat wurde eine Parasitämie von 3.8% bestimmt.

4.1.4 Diskussion

Parasitämie ist ein Parameter, dass aussagt, wie viele Parasiten im Blut vorhanden sind.¹⁰ In den vorliegende Blutprobe wurde eine Parasitämie von 3.8% bestimmt. Der Durchschnittswert vom allen Blutpräparaten der Gruppe 4 (nachmittags) lag bei 3.9%. Mittels diesen Parameter kann diagnostisch ausgewertet werden, wie ausgeprägt die Vermehrung ist. Der Wert kann vom wahren Wert etwas abweichen, da nicht alle Bereiche des Ausstriches homogen waren und nur von einem Feld die Erythrozyten gezählt wurden.

4.2 Gregarinensparasiten im Totenkopfschabe *Blaberus craniifer*

4.2.1 Einleitung

Die Totenkopfschabe *Blaberus craniifer* ist ein bekanntes Futtertier für Terrarientiere.

Der Totenkopfschabe ist ein Wirt des Parasiten Gregarnien, welches ebenfalls zu den Apicomplexa gehören.

Als Oocysten werden die Parasiten über die Nahrung vom Wirt aufgenommen, wo die Sporozoit freigesetzt werden und sich zu Trophozoit weiterentwickeln. Der Wechsel von der asexuellen Phase zu Sexuelle Phase kann nun stattfinden, wo die Trophozoit zu Gamonten weiterentwickeln.

In der sexuellen Fortpflanzung heften sich die weiblichen und männlichen Gregarien aneinander

und bilden eine Cyste, die Gamontencyste bezeichnet wird. Aus der Cysten gehen dann die Gameten hervor die sich zu einer Zygote verschmelzen.

Die Zygote bildet dann haploide Sporozoit, die den Wirt verlassen und auf ihr nächsten Wirt warten.⁷

Neben den Gregarine befallen auch andere Parasiten den Totenkopfschabe. Den Darminhaltes sollte hier in diesen Versuch untersucht werden. Zudem soll die Schwimmgeschwindigkeit der Gregarnien ermittelt werden und die Wirkung von Cytochalasin D auf die Motilität der Parasiten in den Totenkopfschabe.

Cytochalasin D ist ein Pilzgift welches als Inhibitor an Aktinfilamente bindet und somit die Polymerisation hemmt.³

4.2.2 Methode

Darminhaltes des Totenkopfschabe *Blaberus craniifer* wird unterm Mikroskop charakterisiert.

Motilität des Gregarinien

Die Schwimmgeschwindigkeit des Gregarinien wird unterm Mikroskop bestimmt.

Dann wird ein Tropfen 20 μM Cytochalasin D in Ringer-Lösung zu den Präparaten hinzugegeben und die Bewegung der Parasiten untersucht.

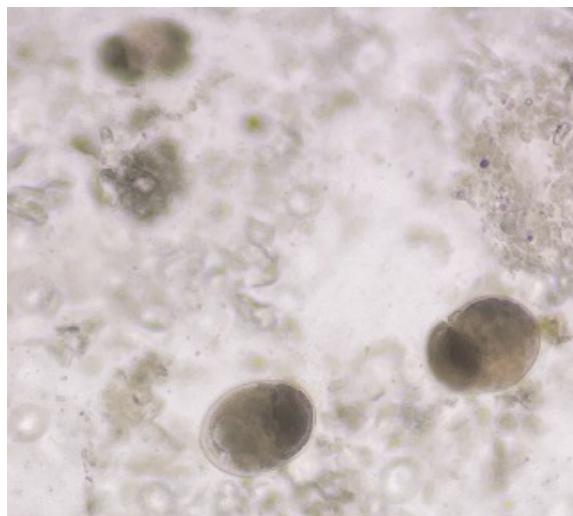
4.2.3 Ergebnis

Parasiten in dem Darm des *Blaberus craniifer*

In Figure 4.2 wurden zwei Parasitenarten gefunden, die Gregarinien (Figure 4.2a) und Ciliaten (Figure 4.2b). Die Gregarine bewegen sich, anders als die Ciliaten, langsam und linear.



(a) Gregarinien, Apicomplexa



(b) Ciliaten

Figure 4.2: Darminhaltes des Totenkopfschabe (*Blaberus craniifer*). Es wurden zwei Arten gefunden. Einmal eine Apikomplexa der Art Gregarinien 4.2a und Ciliaten 4.2b

Untersuchung der Wirkung von Cytochalasin D auf die Motilität von Gregarinien

Die Geschwindigkeit des Gregarine wurde nach Gleichung 4.2 bestimmt. Der Durchmesser des Sichtfeldes vom Okular beträgt 2mm. Auf dem Photo wurde ein Durchmesser von 7.5 cm gemessen und auf dem Photo wurde eine Strecke 7 mm bestimmt. Durch einen einfachen Dreisatz

in Gleichung 4.3 wurde eine Strecke, die der Parasit zurückgelegt hat, von 0.186 mm ermittelt. Damit beträgt die Geschwindigkeit $1.26\mu\text{m}/\text{s}$

$$v = \frac{\text{zurückgelegte Strecke}}{\text{Zeit}} \quad (4.2)$$

$$\begin{array}{rcl} 2\text{mm} & \hat{=} & s \\ 75\text{mm} & \hat{=} & 7\text{mm} \end{array} \quad (4.3)$$

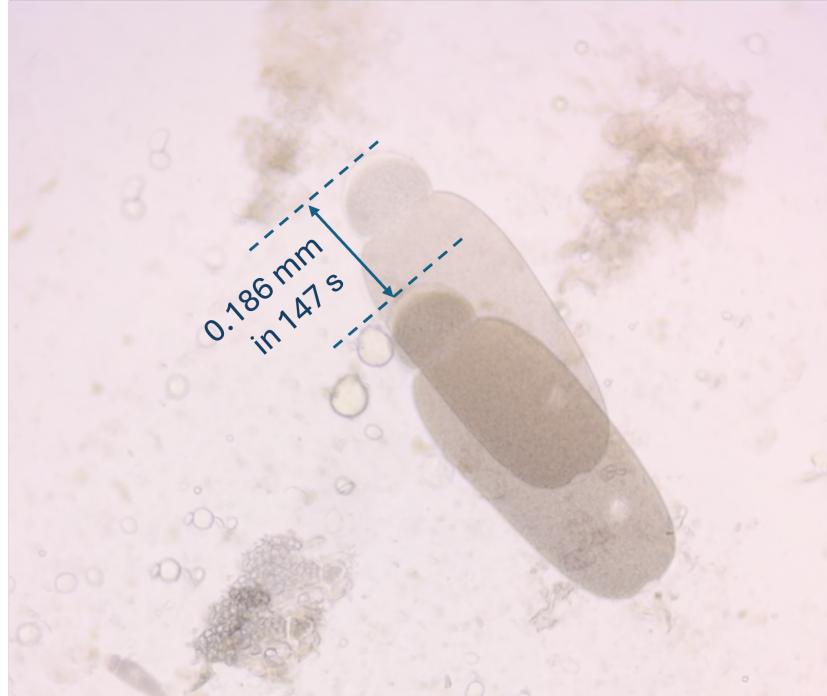


Figure 4.3: Hinterlegte Strecke des Gregarininen-Parasiten in einem Zeitraum von 147 Sekunden. Die Geschwindigkeit beträgt $1.26\mu\text{m}/\text{s}$. Isoliert wurde das Parasit aus dem Totenkopfschabe *Blaberus craniifer*.

Vor der Zugabe von Cytochalasin D haben alle Parasiten sich bewegt. Nach der Zugabe hatte sich nur die Parasiten der Art Ciliaten bewegt, während die Gregarininen immobil waren.

Table 4.1: Bewegung der Parasiten des Darminhaltes vor und nach der Zugabe von einem Tropfen Cytochalasin D.

	Gregarininen	Ciliaten
ohne Cytochalasin D	mobil	mobil
mit Cytochalasin D	immobil	mobil

4.2.4 Diskussion

Der *Blaberus craniifer* des vorliegenden Präparates war mit den Parasiten der Art Gregarininen und Ciliaten infiziert (siehe Figure 4.2).

Die Geschwindigkeit des Gregarininen beträgt $1.26\mu\text{m}/\text{s}$ vor der Zugabe von Cytochalasin D. Nach der Zugabe von Cytochalasin D wurde keine Bewegung von Gregarininen festgestellt, während die Ciliaten sich noch bewegt haben.

Damit sind die Geragrininen aktinabhängig und die Ciliaten nicht.

Anhang

5.1 PCR

Table 5.1: MasterMix Pipettierschema für 3 PCR-Raktionen. Der MasterMix ist 3-Fach konzentriert

Volumen in μL	
10x Reaktionspuffer	7.5
Oligo for	1.5
Oligo rev	1.5
dNTP Mix	1.5
Taq Polymerase	0.3
H_2O	57

Table 5.2: PCR-Cyclus Einstellungsprogramm. 34 Cyclen wurde durchgeführt.

94°C	3 Minute
94°C	45 Sekunde
48°C	45 Sekunde
72°C	1 Minute
72°C	5 Minute
4°C	unendlich

Table 5.3: Sequenz vom Forward- und Reverse-Primer für die PCR. Folmer (1994).

Forward 5' GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3'
Reverse 5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3'

Table 5.4: Consensus-Sequenz Gruppen 1-7. Die Bande im Bereich 600 bp wurde aus der Agarosegelektrophorese isoliert und sequenziert.

```
TTTATTCTAGGAAGCATGGGTCAGCTATAGCTGGCACAGGCATAAGGGTACTAATTCAA
TTGAGTTAGCCAACCTGGCACATTAGGAAACGATCAAATTATAACACTATTGTAA
CCGCTCACGGCTAGTAATAATTCTTAGTAATACCTATTAAATTGGAGGATTG
GAAATTGGTTGATTCCATTAATAATTGGTGACCAAGATATGCCTTCCTCGACTCAATA
ATCTAAGATTTGACTATTACCCCCATCAATAATTATATTAGTCTTCTGCATTGTAG
AAAATGGTGTGGTACTGGATGAACAGTACCCCTCCCTAGCATATAATATTGCCACT
CTGGCCCATCAGTAGATATGGCTATTCTCATTACATTAGCAGGAGCTTCATCTATT
TAGGATCATTAAACTTATTCCACTGTAGCAAATATACGATGAAAAGGTATATCATTAG
ATCGAATCCCTTATTGATCAGTAATTACTACAGTACTTCTACTTCTATCAT
TACCAAGTTTAGCAGCTGCCATTACTATATTACTGACTGATCGAAACTAAATACATCCT
TCTTGACCCTGCAGGAGGAGACCAATCCTATTCCAACATTATTGATTTGATTGGT
GTCACC
```

Table 5.5: Consensus-Referenzsequenz vom anderen morphologischen Tier vom Betreuer zur Verfügung gestellt.

```
TTTTAGGGCCTGATCAGCTATAGCTGGTACAGGCATAAGAGTACTAATTCAAATTGAAT
TAGCTCAACCCGGCACATTCTAGGAAATGATCAAATTATAACTATTGTAACCGCAC
ATGGATTAGTAATAATCTTCTTATAGTAATACCTATTAAATTGGAGGATTGTAATT
GGTTAATTCCATTAATAATTGGGGCCCCAGATATAGCATTCCGCGACTTAATAATCTAA
GATTCTGACTACTTCCACCATCCATAATTATACTAGTATTCTCTGCATTGTAGAAAATG
GAGTAGGTACTGGATGAACAGTACCCCTCTAGCATACAATATTGCACACTCTGGCC
CATCTGTAGATATAGCTATCTCATTACATTAGCGGGAGCATCATCTATCCTAGGGT
CCCTAAATTATTCAACTGTAGCTAATACGATGAAAAGGAATAACTATAGATCGAA
TTCCTTATTGATCAGTAATTACTACAGTCTTTACTACTCTCCTACCTG
TACTAGCAGCAGCAATTACAATATTAACTGATCGAAACCTAAATACATCATTCTTG
ACCCAGCAGGTGGAGGAGATCCTATTATTCCAACACTTATTGATTTGATTGGT
```

5.2 Anatomische Zeichnung Regenwurm und Medizinischer Egel

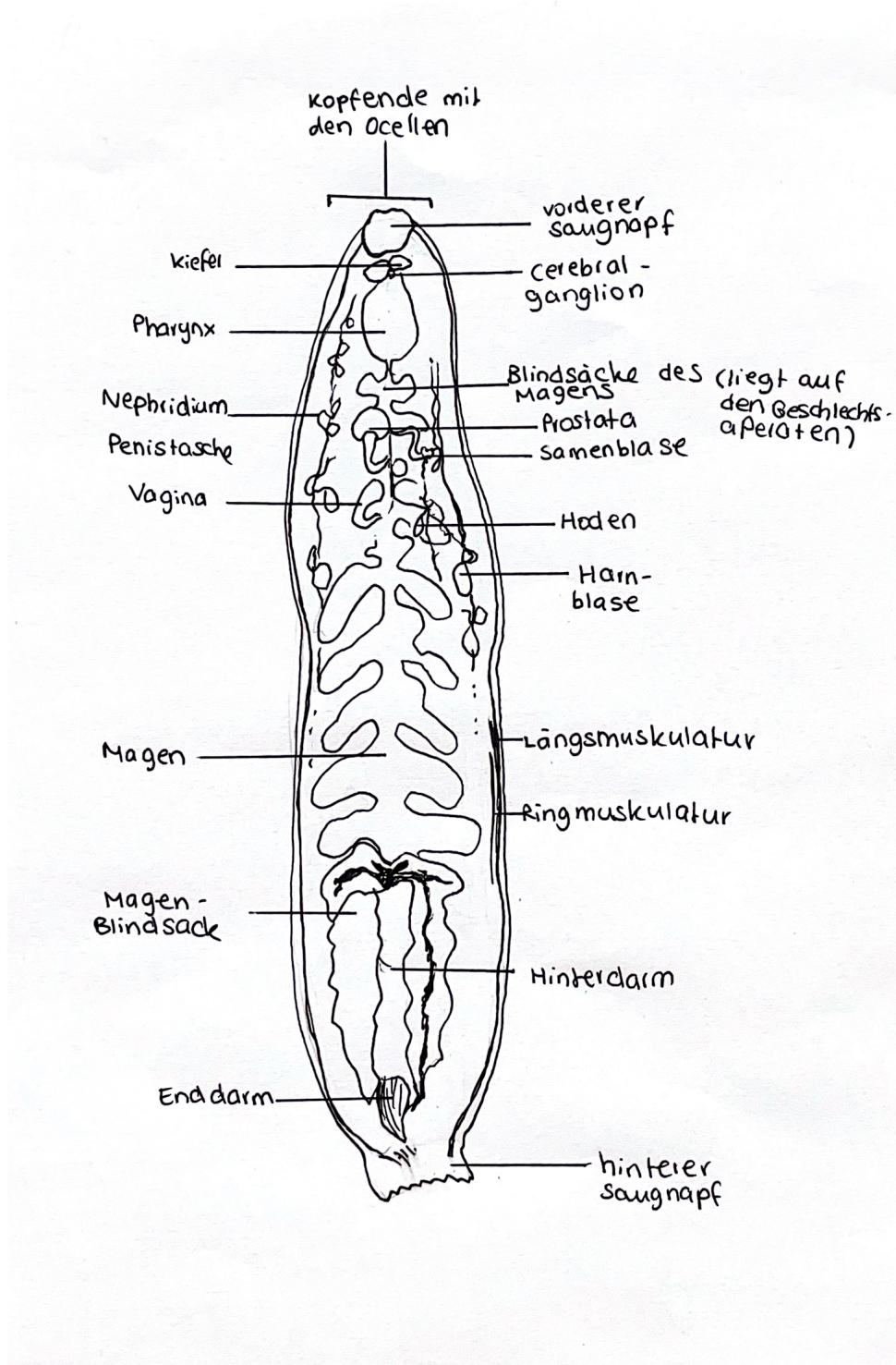


Figure 5.1: Anatomie eines Medizinischen Egels (*Hirudo verbana*)

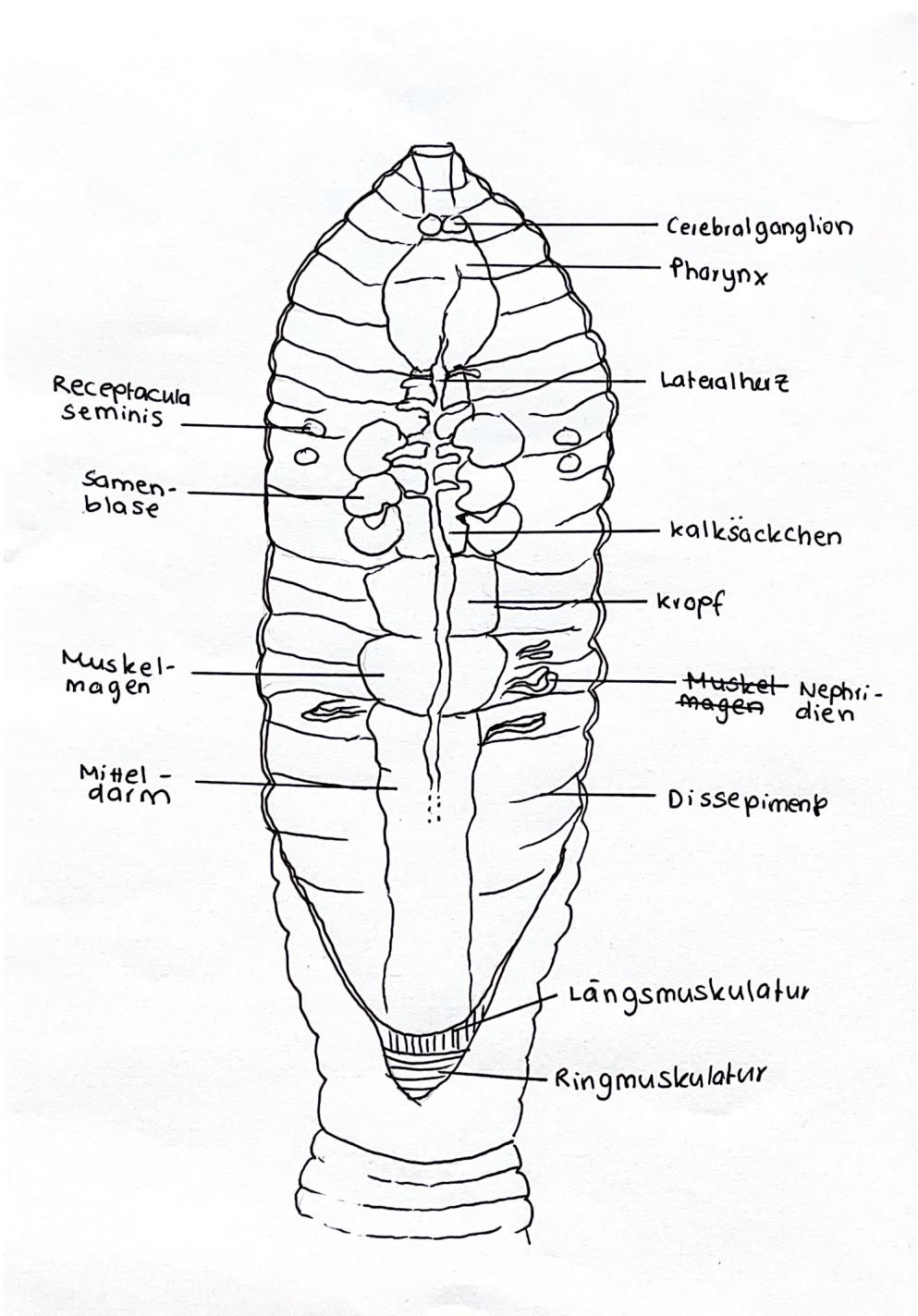


Figure 5.2: Anatomie eines Regenwurmes (*Limbricus terrestris*)

5.3 Plasmodium in Erythrozyten

Table 5.6: Anzahl von Parasiten in den Erythrozyten in 10 verschiedenen Feldern, um die Parasitämie zu bestimmen.

Feldernummer	Anzahl Plasmodium in den Erythrozyten
1	6
2	7
3	5
4	8
5	8
6	7
7	9
8	6
9	5
10	3

Bibliography

- ¹ Apicomplexa. Aufgerufen: 12. August 2024. URL: <https://de.wikipedia.org/wiki/Apicomplexa>.
- ² Blaberus craniifer. Aufgerufen: 12. August 2024. URL: <https://de.wikipedia.org/wiki/Totenkopfschabe>.
- ³ Cytochalasin d. Aufgerufen: 12. August 2024. URL: <https://www.biomol.com/de/produkte/chemikalien/biochemikalien/cytochalasin-d-cay11330-1>.
- ⁴ Dichotomie. Aufgerufen: 10. August 2024. URL: <https://de.wikipedia.org/wiki/Dichotomie>.
- ⁵ Dicrocoelium dendriticum. Aufgerufen: 11. August 2024. URL: <https://www.cdc.gov/dpdx/dicrocoeliasis/index.html>.
- ⁶ Gemeiner regenwurm. Aufgerufen: 11. August 2024. URL: https://de.wikipedia.org/wiki/Gemeiner_Regenwurm.
- ⁷ Gregarinen. Aufgerufen: 12. August 2024. URL: <https://de.wikipedia.org/wiki/Gregarinen>.
- ⁸ Hilfe:dichotomer schlüssel. Aufgerufen: 10. August 2024. URL: [https://wiki.arages.de/index.php?title=Hilfe:Dichotomer\\\$_Schlüssel](https://wiki.arages.de/index.php?title=Hilfe:Dichotomer\$_Schlüssel).
- ⁹ Mediterraner medizinischer blutegel. Aufgerufen: 11. August 2024. URL: https://de.wikipedia.org/wiki/Mediterraner_Medizinischer_Blutegel.
- ¹⁰ Parasitämie. Aufgerufen: 12. August 2024. URL: <https://de.wikipedia.org/wiki/Parasitaemie>.
- ¹¹ Plasmodium falciparum. Aufgerufen: 12. August 2024. URL: https://flexikon.doccheck.com/de/Plasmodium_falciparum.
- ¹² Wimperntierchen. Aufgerufen: 12. August 2024. URL: <https://de.wikipedia.org/wiki/Wimperfierchen>.
- ¹³ Folmer O et al. Dna primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit i from diverse metazoan invertebrates. 1994. PMID: 7881515.
- ¹⁴ Paul D N Herbert et al. Biological identifications through dna barcodes. 2003. PMID: 7881515. doi:10.1098/rspb.2002.2218.
- ¹⁵ Volker Storch und Ulrich Welsch. *Kükenthal Zoologisches Praktikum*. 2014. 27.Auflage, S.184 - 205, ISBN 978-3-642-41937-9.