

Untersuchung möglicher Zwischenwirte von
Calicophoron daubneyi und *Fasciola hepatica*
mittels Multiplex-PCR

von Andrea Monika Küchler

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Untersuchung möglicher Zwischenwirte von *Calicophoron*
daubneyi und *Fasciola hepatica* mittels Multiplex-PCR

von Andrea Monika Küchler
aus Sarnen (CH)

München 2021

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen
Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Innere Medizin und Chirurgie der Wiederkäuer

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer

Mitbetreuung durch:

Dr. Frank Weber

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Nicolai T. Siegel

Tag der Promotion: 17. Juli 2021

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG	1
II. LITERATURÜBERSICHT	3
1. Paramphistomidose beim Rind mit Fokus auf die Spezies	3
<i>Calicophoron daubneyi</i>.....	3
1.1. Zyklus.....	4
1.2. Epidemiologie.....	5
1.2.1. Prävalenzen in Europa	5
1.2.2. Einflussfaktoren auf die Epidemiologie	6
1.3. Klinische Aspekte der Paramphistomidose	7
1.3.1. Pathogenese und klinisches Bild	7
1.3.2. Diagnostik.....	8
1.3.3. Therapie und Bekämpfung	9
2. Zwischenwirte.....	10
2.1. Larvale Entwicklungsstadien von <i>C. daubneyi</i> und <i>F. hepatica</i> im Zwischenwirt.....	10
2.2. Zwischenwirt: <i>Galba truncatula</i> (Zwergschlammschnecke).....	11
2.2.1. Biologie und Habitate	12
2.2.2. Infektion von <i>G. truncatula</i> mit <i>C. daubneyi</i> und <i>F. hepatica</i>	13
2.3. Weitere (potenzielle) Zwischenwirte	15
2.3.1. Aus der Familie Lymnaeidae (Schlammschnecken)	15
2.3.1.1. <i>Radix balthica</i> (Gemeine Schlammschnecke) und <i>Radix labiata</i> (Alpen- Schlammschnecke)	16
2.3.1.2. <i>Omphiscola glabra</i> (Längliche Sumpfschnecke)	17
2.3.1.3. <i>Stagnicola palustris</i> (Gemeine Sumpfschnecke).....	17
2.3.2. Aus der Familie Planorbidae (Tellerschnecken).....	18
2.3.3. Aus der Familie Physidae (Blasenschnecken)	18
2.3.4. Invasive Schneckenarten.....	19
2.3.5. Landlungenschnecken.....	19
3. Methoden zur Untersuchung von Zwischenwirtsinfektionen.....	20
3.1. Schneckensektion und Mikroskopie.....	20
3.2. „Cercarial Shedding“ (Zerkarien-Austritt)	21
3.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	21
3.3.1. Konventionelle PCR	24
3.3.2. Multiplex-PCR	25

III. MATERIAL UND METHODEN	27
1. Untersuchungen zum Infektionsstatus der teilnehmenden Betriebe	27
1.1. Betriebe mit Trematodenbefall.....	27
1.2. Kotprobenuntersuchung	27
1.3. <i>Fasciola hepatica</i> -ELISA	28
2. Aufbereitung der Schneckenproben	28
2.1. Schneckensammlung	28
2.2. Konservierung der Schnecken.....	29
2.3. Schneckenartenbestimmung	29
2.4. Vermessung der Schneckengrößen.....	29
2.5. Mikroskopie der Schnecken.....	29
2.6. DNA-Extraktion.....	29
3. Labordiagnostische Vorversuche: Untersuchungen zur Methodenetablierung der Multiplex-PCR	30
3.1. Verwendete Proben.....	30
3.1.1. Adulte Pansen- und Leberegel	30
3.1.2. Gesammelte Schnecken.....	31
3.1.3. Gewinnung der Pansenegel-Mirazidien	31
3.2. Kompatibilität publizierter Primerpaare und Untersuchungen zur Spezifität	33
3.2.1. Sequenzierung	33
3.3. Untersuchungen zur Sensitivität	34
3.4. Schneckeninfektionsversuche mit Pansenegel-Mirazidien.....	34
4. Labordiagnostischer Hauptversuch: Prävalenzen der Zwischenwirtsinfektionen mit <i>C. daubneyi</i> und <i>F. hepatica</i>	35
4.1. Proben.....	35
4.2. DNA-Extraktion.....	36
4.3. Multiplex-PCR	36
4.3.1. Primer.....	36
4.3.2. Mastermix und Ansätze	36
4.3.3. Positiv- und Negativkontrolle	37
4.3.4. Temperatur-Protokoll.....	37
4.4. Elektrophorese	37
4.4.1. Prävalenzbestimmung	40
IV. ERGEBNISSE	41
1. Betriebe und Schneckenfunde	41

1.1.	Infektionsstatus der Betriebe mit Schneckenfunden	41
1.1.1.	Geografische Verteilung der Betriebe	42
1.1.2.	Saisonale Verteilung der Probensammlung	43
1.2.	Gefundene und bestimmte Schneckenarten	43
2.	Labordiagnostische Vorversuche: Untersuchungen zur Methodenetablierung der Multiplex-PCR	45
2.1.	Primer-Kompatibilität und -Spezifität	45
2.1.1.	Primerpaar 1: Cd-Cox (PE) und Fhr-II (LE)	45
2.1.2.	Primerpaar 2: Cd-Cox (PE) und Fh-Cox (LE)	45
2.1.3.	Primerpaar 3: Cd-Cox (PE) und Fh-Cox Neu (LE)	46
2.1.4.	Primerpaar 4: Cd-Cox Neu (PE) und Fh-Cox Neu (LE)	47
2.1.5.	Sequenzierungsergebnisse	49
2.2.	Untersuchungen zur Sensitivität	49
2.2.1.	Einfluss der Schnecken-DNA auf das PCR-Produkt	49
2.2.2.	Versuch eines Schnecken-Pools	50
2.3.	Schneckeninfektionsversuche mit Pansenegel-Mirazidien	51
3.	Labordiagnostischer Hauptversuch: Prävalenzen von <i>C. daubneyi</i> und <i>F. hepatica</i> im Zwischenwirt	52
3.1.	Prävalenzen von <i>C. daubneyi</i> und <i>F. hepatica</i> in <i>Galba truncatula</i>	52
3.1.1.	Sequenzierungsergebnisse	54
3.1.2.	Mikroskopie	54
3.2.	Andere Schneckenarten	55
V. DISKUSSION	57	
1.	Einleitung	57
2.	Prävalenzen von <i>C. daubneyi</i> und <i>F. hepatica</i> in Zwischenwirten	58
2.1.	Prävalenz in <i>G. truncatula</i>	58
2.2.	Andere Schneckenarten	61
2.3.	Mikroskopie und PCR zur Prävalenzbestimmung	63
3.	Methodische Aspekte	64
3.1.	Aufbereitung und DNA-Extraktion	64
3.2.	Primer-Kompatibilität und -Spezifität	66
3.3.	Sensitivität	67
4.	Ausblick	68
4.1.	Untersuchung einzelner Betriebe im Jahresverlauf	68
4.2.	Schneckeninfektionsversuche	69

VI. ZUSAMMENFASSUNG	71
VII.SUMMARY	73
VIII. LITERATURVERZEICHNIS	75
IX. ANHANG	87
1. Abbildungsverzeichnis	87
2. Tabellenverzeichnis.....	89
3. Tabellen des Anhangs.....	90
X. DANKSAGUNG	99

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Acc. No.	Accession number
bp	Base pair
BSA	Bovines Serumalbumin
Cd	<i>Calicophoron daubneyi</i>
Cox	Cytochrom-c-Oxidase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Nukleosidtriphosphate
dsDNA	Double-stranded deoxyribonucleic acid
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
epg	Eggs per gram
Fh	<i>Fasciola hepatica</i>
for.	Forward
ITS-2	Internal transcribed spacer 2
Konz.	Konzentration
LE	Leberegel
mtDNA	Mitochondrial deoxyribonucleic acid
n	Anzahl
NK	Negativkontrolle
NTC	No template control
p. i.	Post infectionem
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Pansenegel
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin

Ph. Eur.	Pharmacopoea Europaea
PK	Positivkontrolle
PTC	Positive template control
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
rDNA	Ribosomal deoxyribonucleic acid
rev.	Reverse
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
rpm	Rotations per minute
RPMI	Zellkulturmedium, steht für „Roswell Park Memorial Institute“
sp.	Species
spp.	Species (Plural)
ü. d. M	über dem Meer

I. EINLEITUNG

Die Paramphistomidose bezeichnet den klinischen Befall mit Pansenegelein beim Wiederkäuer. Sie ist eine weltweit verbreitete Parasitose, welche vor allem in tropischen Gebieten endemisch ist (DEPLAZES et al., 2020). Seit einigen Jahrzehnten hat sich der Parasit auch in klimatisch gemäßigten Zonen ausgebreitet. Besonders in Gebieten mit viel Niederschlag scheint sich der Parasit gut adaptiert und etabliert zu haben (SARGISON et al., 2016). Eine zentrale Rolle hierfür spielt der Zwischenwirt, die Wasserlungenschnecke.

In nordwest- und westeuropäischen Studien der letzten 20 Jahre wurde *Calicophoron daubneyi* als häufigste und meist einzige Pansenegelespezies bei Nutzzrindern nachgewiesen (GORDON et al., 2013; FERRERAS et al., 2014; MALRAIT et al., 2015; TOOLAN et al., 2015; PLOEGER et al., 2017; JONES et al., 2017a).

Als Endwirte sind domestizierte, weidende Wiederkäuer sowie Wildwiederkäuer betroffen. Über die klinische und ökonomische Relevanz dieser Parasitose gibt es bisher nur wenige Daten. Es liegen einzelne Fallbeschreibungen und Daten von Infektionsversuchen vor (ROLFE et al., 1991; FOSTER et al., 2008; MILLAR et al., 2012; O'SHAUGHNESSY et al., 2017). Beschrieben sind Symptome wie Durchfall, Schwäche, submandibuläre Ödeme und Anorexie in der akuten Phase der Infektion. In dieser Phase heften sich zuvor oral aufgenommene infektiöse Larven als Jungegel im Dünndarm an. Erst kurze Zeit später migrieren sie in die Vormägen, vor allem in Pansen und Netzmagen, und persistieren dort an der Schleimhaut. In dieser späteren, sogenannten ruminalen Phase, können gemäß aktuellem Wissensstand Anzeichen wie verringerte Gewichtszunahme, reduzierte Milchleistung und Durchfall auftreten oder die Wiederkäuer sind gänzlich unauffällig (MILLAR et al., 2012; MALRAIT et al., 2015). Adulte Pansenegele scheiden in dieser Phase Eier aus, welche mit dem Kot in die Umwelt gelangen.

Galba truncatula, die Zwergschlammschnecke, auch bekannt als Zwischenwirt von *Fasciola hepatica*, dem Großen Leberegel, ist in den Zyklus von *Calicophoron daubneyi* eingebunden (JONES et al., 2015). Über weitere potenzielle Zwischenwirte ist bisher wenig bekannt. Einige Wasserlungenschneckenarten, die in gemäßigten Klimazonen vorkommen, können als Alternativ-Zwischenwirte von *Fasciola hepatica* fungieren und kommen aufgrund der ähnlichen Epidemiologie als potenzielle Zwischenwirte von *Calicophoron daubneyi* infrage (ABROUS et al., 1999b; DREYFUSS et al., 2003; JONES et al., 2015). Alle Arten, insbesondere die Zwergschlammschnecke, sind in ihrem Lebensraum auf Feuchtigkeit angewiesen

und an spezifische Habitate gebunden (SCHWEIZER et al., 2007). Auch Doppelinfektionen des Zwischenwirts mit *Fasciola hepatica* und *Calicophoron daubneyi* wurden beschrieben, sind aber selten (ABROUS et al., 2000; JONES et al., 2015).

Ziele dieser Dissertation sind die Ermittlung möglicher Zwischenwirte von *Calicophoron daubneyi* auf süddeutschen Rinderbetrieben mit Weidehaltung und eine Beleuchtung der Dynamik zwischen den Parasiten *Fasciola hepatica* und *Calicophoron daubneyi* und ihrer Zwischenwirte mittels Multiplex-PCR.

Die Bekämpfung der Paramphistomidose könnte unter der derzeit fortschreitenden Situation in Europa an Bedeutung gewinnen. Dabei ist der Miteinbezug des Zwischenwirts in die Bekämpfungsmaßnahmen, wie bei der Fasciolosebekämpfung, zwingend notwendig. Eine medikamentöse Therapie des Endwirts allein ist in der Regel nicht zielführend und muss mit der Parasit-Zwischenwirt-Interaktion gekoppelt werden (KNUBBEN-SCHWEIZER et al., 2010).

II. LITERATURÜBERSICHT

1. **Paramphistomidose beim Rind mit Fokus auf die Spezies *Calicophoron daubneyi***

Panseneigel gehören zum Unterstamm der Saugwürmer (Trematoda) und kommen weltweit bei domestizierten Wiederkäuern und Wildwiederkäuern vor. Bis vor ca. 20 Jahren war die Paramphistomidose in Europa relativ unbekannt, da sie ihren Ursprung in den Tropen und Subtropen hat. Dort ist sie nach wie vor weitläufig verbreitet (DINNIK, 1962; DEPLAZES et al., 2020).

In einer Umfrage mit walisischen Landwirt/innen im Jahr 2015 war der Panseneigel knapp der Hälfte der Befragten bekannt und 10 % gaben an in der Vergangenheit oder derzeit Panseneigel im Bestand (gehabt) zu haben, obwohl die aktuelle Betriebs-Prävalenz 61 % betrug (JONES et al., 2017a). In den letzten drei Jahrzehnten wurden tierärztliche und parasitologische Institute in verschiedenen west- und nordwesteuropäischen Ländern auf diese Parasitose aufmerksam, da die Panseneigel-Prävalenz ohne direkt erkenntliche Ursache angestiegen ist (MAGE et al., 2002; GONZÁLEZ-WARLETA et al., 2013; ZINTL et al., 2014; PLOEGER et al., 2017; JONES et al., 2017a) und plötzlich vereinzelt Krankheitsfälle auftraten (FOSTER et al., 2008; MILLAR et al., 2012; O'SHAUGHNESSY et al., 2017). Für das Auftreten dieser „neuen“ Erkrankung wurden Erklärungen gesucht und Gründe diskutiert wie das spezifische Bekämpfungsprogramm gegen die Fasciolose und somit die Öffnung einer Nische für *Calicophoron* in Frankreich (MAGE et al., 2002), das Einschleppen der Parasitose durch die MKS-Krise im Jahr 2001 in Großbritannien mit vermehrten Rindimporten (MITCHELL et al., 2007; JONES et al., 2017a) und die Ausbreitung des Zwischenwirts bzw. die bessere Adaption zwischen Parasit und Zwischenwirt durch den Klimawandel (FOX et al., 2011; IGLESIAS-PIÑEIRO et al., 2016; JONES et al., 2017a). Ursächlich für schnelle Anpassungsvorgänge könnten im Falle von *C. daubneyi* die hohe genetische Diversität mit einem gewissen Mutationspotential des Parasiten sein (SARGISON et al., 2019).

Bisher sind in Europa vor allem die Spezies *Calicophoron daubneyi*, *Paramphistomum cervi* und *Calicophoron leydeni* bekannt (PLOEGER et al., 2017; DEPLAZES et al., 2020). Weitere auch außerhalb Europas verbreitete Spezies sind *Calicophoron microbothrium*, *Calicophoron calicophorum* und *Paramphistomum ichikawai* (ROLFE et al., 1991; DEPLAZES et al., 2020). Diverse

Studien, mehrheitlich aus dem west- und nordwesteuropäischen Raum, konnten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) belegen, dass *Calicophoron daubneyi* aktuell die vorherrschende Pansenegelspezies bei Nutztierarten ist (GONZÁLEZ-WARLETA et al., 2013; GORDON et al., 2013; FERRERAS et al., 2014; ZINTL et al., 2014; MALRAIT et al., 2015; TOOLAN et al., 2015; JONES et al., 2017a). In den Niederlanden wurden zwei der 14 untersuchten Pansenegele als *Paramphistomum leydeni* identifiziert, die anderen als *Calicophoron daubneyi* (PLOEGER et al., 2017). Somit wurde die lang geltende Annahme, dass *Paramphistomum cervi* die häufigste Pansenegelspezies in Europa ist, vorerst widerlegt. Die Unterscheidung und Bestimmung der vorkommenden Spezies ist notwendig, da unterschiedliche Zwischenwirtschnecken in deren Zyklen involviert sind. Die PCR ist hierfür heutzutage die Methode der Wahl (TAYLOR et al., 2016).

1.1. Zyklus

Analog zum großen Leberegel läuft der Zyklus von *Calicophoron daubneyi* zwischen Endwirt und Zwischenwirt mit Phasen in der Umwelt ab. Als Endwirte kommen beim Pansenegel domestizierte Wiederkäuer wie Rinder, Schafe, Ziegen sowie Wildwiederkäuer und Neuweltkameliden infrage (SILVESTRE et al., 2000; MILLAR et al., 2017; DEPLAZES et al., 2020). Der Haupt-Zwischenwirt der beiden Parasiten ist die Zwergschlammwurm (*Galba truncatula*) (DEGUEURCE et al., 1999; ABROUS et al., 2000; IGLESIAS-PIÑEIRO et al., 2016). Nachweise von anderen Schlammwurmarten aus der Familie der Lymnaeidae als potenzielle Zwischenwirte von *Fasciola hepatica* und *Calicophoron daubneyi* wurden in verschiedenen Ländern erbracht (DEGUEURCE et al., 1999; ABROUS et al., 1999b; ABROUS et al., 2000; RELF et al., 2009; DREYFUSS et al., 2014; JONES et al., 2015). *Paramphistomum cervi* entwickelt sich in Schnecken aus der Familie der Tellerschnecken (Planorbidae) (KRANEBURG, 1977; DEPLAZES et al., 2020).

Der Endwirt scheidet Eier des Pansenegeles mit dem Kot aus. Abhängig von Temperatur- und Lichtverhältnissen schlüpfen die sich darin entwickelten Mirazidien nach 18-50 Tagen bei Umgebungstemperaturen zwischen 15-20 °C. Sie bewegen sich im Wasser fort und suchen in feucht-nassen Schneckenhabitaten einen Zwischenwirt auf, in den sie eindringen (KRANEBURG, 1977). Gegenüber Trockenheit sind Eier und Mirazidien sehr empfindlich (ODENING et al., 1978). Im Zwischenwirt findet eine Entwicklung und eine ungeschlechtliche Vermehrung über die Stadien der Sporozysten, Redien und Zerkarien statt (ABROUS et al., 1997; IGLESIAS-PIÑEIRO et al., 2016). Zerkarien verlassen nach ca. 33-70 Tagen ihren Zwischenwirt und enkystieren an unter Wasser liegenden Pflanzenteilen. Dadurch entstehen Metazerkarien, die für den

Endwirt infektiöse Form (KRANEBURG, 1977). Durch das Abweiden dieser Gräser werden Metazerkarien vom Endwirt aufgenommen und gelangen in den Verdauungstrakt, wo sie exzystieren und sich zuerst an die Dünndarmschleimhaut heften. Jungewel reifen dort ca. vier bis fünf Wochen und wandern retrograd in die Vormägen, wo sie sich als Adulte geschlechtlich fortpflanzen und Eier ablegen, welche mit der Ingesta den Magendarmtrakt passieren und schlussendlich in die Umwelt gelangen. Die Präpatenzphase dauert ca. drei Monate (ODENING et al., 1978; ROLFE et al., 1991).

1.2. Epidemiologie

Calicophoron daubneyi wurde erstmals in den 1950er Jahren bei einem Kalb in Kenia nachgewiesen und als neue Spezies identifiziert (DINNIK, 1962). Wie sich der Parasit in Gebieten mit gemäßigttem Klima in diesem Ausmaß in den letzten drei Jahrzehnten ausbreiten konnte, wurde bisher nicht vollumfänglich aufgeklärt. Es wird vermutet, dass der Klimawandel und der betriebene Tierhandel nach und innerhalb Europas einen erheblichen Beitrag dazu leisteten (MAGE et al., 2002; MITCHELL et al., 2007; FOX et al., 2011), aber auch, dass genetische Anpassungsvorgänge an Zwischen- und Endwirt eine Rolle spielen könnten (SARGISON et al., 2019). Doppelinfektionen der Endwirte mit *F. hepatica* und *C. daubneyi* sind aufgrund der ähnlichen Epidemiologie relativ häufig (JONES et al., 2017a).

1.2.1. Prävalenzen in Europa

In einigen Ländern Europas wurde in den letzten 20 bis 30 Jahre bei Wiederkäuern im Nutztierbereich einerseits durch Auswertungen von Kotproben, andererseits durch die Inspektion von Schlachttierkörpern ein Neuauftreten und teilweise starker Anstieg des Pansenegelevorkommens verzeichnet. Die erste Langzeituntersuchung, die eine deutliche Steigerung der Prävalenz gezeigt hat, wurde in Zentralfrankreich durchgeführt (MAGE et al., 2002). Dabei wurde über den Zeitraum von 1990-1999 ein Prävalenzanstieg von 5,2 % auf 44,7 % bei Weiderindern festgestellt. Die gezielte Bekämpfung von *Fasciola hepatica* zu Beginn der 90er Jahre in diesem Gebiet, wurde als Ursache für diesen signifikanten Anstieg diskutiert. Ebenso ist in Irland die Pansenegeprävalenz innerhalb von 9 Jahren von 3-9 % auf 20 % angestiegen mit Peaks von 32 % und 28 % in den Jahren 2010 und 2013 (ZINTL et al., 2014).

Auf Herdenbasis wurde bei Rindern in Wales eine aktuelle Prävalenz von 59 % erhoben. Dabei zeigte sich ein deutliches West-Ost-Gefälle mit höheren Prävalenzen in den küstennahen, mild-feuchten Regionen. 46 % der Pansenege-

infizierten Herden (inkl. untersuchte Schafherden) waren mit dem großen Leberegel co-infiziert (JONES et al., 2017a). Eine spanische Studie zeigte eine Herden-Prävalenz von 36 % in einer nordwestlichen Region des Landes (DÍAZ et al., 2007b). In den Niederlanden ging aus Gebieten mit hohem *Fasciola*-Risiko aus Erhebungen über fünf Jahre eine durchschnittliche Betriebs-Prävalenz von 15,8 % hervor (PLOEGER et al., 2017). Diese Studien basierten auf Einachweisen aus dem Kot.

Einzeltieruntersuchungen wurden vorwiegend an Schlachttierkörpern vorgenommen durch die Adspektion der makroskopisch sichtbaren adulten Pansenegel in Pansen und Netzmagen. TOOLAN et al. (2015) ermittelten bei irischen Schlachtrindern eine Prävalenz von 52 %. In einer Schlachthofstudie aus Schottland wurden bei 29 % der untersuchten Rinder Pansenegel nachgewiesen (SARGISON et al., 2016). Von diesen Tieren waren 45 % mit *F. hepatica* co-infiziert. Die Autor/innen berechneten ein dreifach erhöhtes Risiko für eine Pansenegeleinfection, wenn das Tier bereits mit dem großen Leberegel infiziert war. Bereits in der Studie von SZMIDT-ADJIDÉ et al. (2000) war eine Korrelation der beiden Infektionen bei Schlachtrindern aus Zentralfrankreich erkennbar. Die *C. daubneyi*-Prävalenz lag bei 20 %, ähnlich einer anderen französischen Studie mit einer Durchschnittsprävalenz von 22,3 % über einen Zeitraum von neun Jahren (MAGE et al., 2002). In einer belgischen Studie (MALRAIT et al., 2015) waren 28 % der untersuchten Schlachtrinder mit Pansenegelein befallen. Bei Schlachtrindern in Nordwestspanien (Galizien) betrug die Prävalenz 18,8 % (GONZÁLEZ-WARLETA et al., 2013). In einer weiteren Studie aus Spanien wurde eine Prävalenz von 6,2 % erhoben. Es wurden Schlachttiere aus der Region Kastilien und León, einer milden und feuchten Region in Nordwestspanien, über einen Zeitraum von drei Jahren untersucht (FERRERAS et al., 2014). Die Einzeltierprävalenz in den Niederlanden betrug bei Schlachtrindern 23,3 % (PLOEGER et al., 2017).

1.2.2. Einflussfaktoren auf die Epidemiologie

Auf das Infektionsrisiko wirken verschiedene Faktoren in einem komplexen Zusammenspiel ein. Aussagen über Risikofaktoren basieren auf Daten aus einzelnen Gebieten und können nicht grundsätzlich pauschal angewendet werden. Vermutet wird, dass Niederschlag ein Hauptfaktor darstellt, der das Infektionsrisiko in gewissen Gebieten erhöht (ROLFE et al., 1991; SZMIDT-ADJIDÉ et al., 2000; DÍAZ et al., 2007b; ZINTL et al., 2014). In einer Studie war der Faktor Niederschlag negativ mit dem Infektionsrisiko assoziiert (DÍAZ et al., 2007a). Dabei könnte ein „Auswasch“-Effekt eine Rolle spielen. Ist ein gewisser Niederschlagswert überschritten, werden Zwischenwirte und Parasitenlarven weggeschwemmt und

das Risiko für Übertragungen sinkt (RAPSCH et al., 2008). Auch erhöhte Temperaturen waren negativ mit dem Infektionsrisiko assoziiert. Vermutlich aufgrund einer schnellen Austrocknung der Böden bei hohen Temperaturen, bedingt durch die hohe Bodenpermeabilität im untersuchten Gebiet (GONZÁLEZ-WARLETA et al., 2013).

Dauerhafte Wasseransammlungen auf den Weiden scheinen ausschlaggebend für die Erhöhung des Infektionsrisikos zu sein. Sie können auf Weiden mit Gefälleanteil und folglich Versumpfung der unteren Lagen in regenreichen Gebieten entstehen (CRINGOLI et al., 2004; GONZÁLEZ-WARLETA et al., 2013). Ein Ausbruchsfall in Irland (O'SHAUGHNESSY et al., 2017) zeigte, dass auch neu auftretende Wasseransammlungen z. B. durch eine defekte Bodendrainage dramatische Auswirkungen haben können. Auf der entsprechenden Weide wurde eine massiv hohe Metazerkarienbürde festgestellt und 19 von 31 Jungrinder sind an den Folgen von hohen Jungegelbürden im Darm akut gestorben oder mussten euthanasiert werden.

1.3. Klinische Aspekte der Paramphistomidose

1.3.1. Pathogenese und klinisches Bild

Die klinische Paramphistomidose manifestiert sich in Form einer Enteritis in der frühen Phase der Infektion. Juvenile Pansenegel verursachen durch das Ansaugen der duodenalen Mukosa lokale Entzündungsherde mit Knötchenbildung bis hin zu hämorrhagischen Enteritiden (DEVOS, 2013; FUERTES et al., 2015). Es treten Symptome wie Durchfall, Anorexie, Schwäche, starker Gewichtsverlust und submandibuläre Ödeme vor allem bei Jungrindern mit hohen Pansenegelbürden auf. Akute Todesfälle sind beschrieben (ROLFE et al., 1991; FOSTER et al., 2008; MILLAR et al., 2012; O'SHAUGHNESSY et al., 2017).

Wie sich die Parasitenbürde in der späteren, ruminalen Phase nach der Migration in die Vormägen auf den Organismus auswirkt, ist derzeit noch nicht genau bekannt. Phasen mit Durchfall sind beschrieben (MALRAIT et al., 2015) und Leistungseinbußen sind nicht auszuschließen (SPENCE et al., 1992; SARGISON et al., 2019).

Generell scheinen adulte Rinder relativ widerstandsfähig zu sein, obwohl postmortal makroskopische und histologische Veränderungen nachzuweisen sind (ROLFE et al., 1991; FUERTES et al., 2015). In der Studie von FUERTES et al. (2015) fiel keines der natürlich infizierten Tiere klinisch auf und es wurden keine Produktionseinbußen festgestellt, trotz lokalen, entzündlichen Läsionen in

ventralen Anteilen des Pansens, des Netzmagens und des Dünndarms, deren Schweregrad mit der Pansenegelebürde korrelierte. Im Pansen stellten sich die Gewebsveränderungen als fokale Nekrosen an den Pansenpapillen bis hin zu Papillenverlusten und Hyperkeratose dar.

1.3.2. Diagnostik

Das Sedimentationsverfahren mit einer koproskopischen Untersuchung ist die gängigste Methode zur Diagnostik von Pansenegelein aus dem Kot (DEPLAZES et al., 2020). Pansenegeleier sind oval, ca. 100-190 µm x 50-115 µm groß, farblos und sind bedeckt. Mit Eiern von *Fasciola hepatica* besteht eine potenzielle Verwechslungsgefahr, da diese gleich geformt, ähnlich groß aber braun-gold gefärbt und durchschnittlich etwas kleiner sind. Der epg-Wert (Eier pro Gramm Kot) korreliert beim Pansenegelebefall proportional zur Egelebürde, da die Eier direkt mit der Ingesta vermischt werden, im Gegensatz zum großen Leberegel, bei dem Eier durch Kontraktion der Gallenblase intermittierend ausgeschieden werden (GONZÁLEZ-WARLETA et al., 2013; MALRAIT et al., 2015; PLOEGER et al., 2017). Mit dieser Methode lassen sich nur adulte, bereits in den Vormägen befindliche Stadien nachweisen.

Bei der klinischen Paramphistomidose durch juvenile Pansenegele besteht die Problematik, dass es bisher noch keine sichere Methode zur Diagnostik in der Präpatenzphase am lebenden Tier gibt. Die Möglichkeit juvenile Egele mittels Sieb-Wasch-Verfahren aus dem Kot aufzufangen wird in DEPLAZES et al. (2020) beschrieben. Über die Sensitivität und die Praxisrelevanz dieser Methode, liegen zum jetzigen Zeitpunkt keine Daten vor. Die Eignung serologischer Tests auf *C. daubneyi* und *P. cervi*-Infektionen wurden untersucht, sind jedoch bisher nicht praxisrelevant und waren teilweise mit Kreuzreaktionen verbunden (DÍAZ et al., 2006; ANURACPREEDA et al., 2008; ANURACPREEDA et al., 2013). Eine Diagnose beim akuten Geschehen kann eine postmortale Sektion des Tieres mit dem makroskopischen Nachweis von juvenilen Pansenegelestadien im proximalen Duodenum und selten bis ins Jejunum, erbringen. Sie zeichnen sich als kleine braun-pinke Bläschen ab und sind bis zu 1 mm groß. Weitere makroskopische Befunde sind vergrößerte Mesenteriallymphknoten (FUERTES et al., 2015) und wässriger Dickdarminhalt (MILLAR et al., 2012). Adulte Pansenegele lassen sich zuverlässig postmortal adspektorisch diagnostizieren. Sie sind ca. 3-12 mm x 2-6,5 mm groß und rosa bis rötlich gefärbt (Abbildung 1) (DEPLAZES et al., 2020). Am häufigsten sind adulte Pansenegele an der Mukosa des kranialen Pansensacks, des ventralen Pansensacks und im Netzmagen lokalisiert; am seltensten an der Mukosa des dorsalen Pansensacks (GONZÁLEZ-WARLETA et al., 2013;

FERRERAS et al., 2014; FUERTES et al., 2015; SARGISON et al., 2016; PLOEGER et al., 2017).



Abbildung 1: Pansenegelebefall der Hauben- und Pansenschleimhaut (Foto: Andrea Küchler)

1.3.3. Therapie und Bekämpfung

Der Wirkstoff Oxyclozanid gilt derzeit als Antiparasitikum der Wahl für eine Behandlung der Paramphistomidose. In einer Studie erzielte Oxyclozanid durch die orale Verabreichung mit einer Dosierung von 15 mg/kg bei natürlich infizierten Milchkühen eine fäkale Eireduktion von 98-99 % eine Woche nach der Behandlung und 93 % der Kühe wurden nach der Behandlung negativ getestet (ARIAS et al., 2013). Auch ein Mischpräparat mit Oxyclozanid und Levamisol zeigte eine vorübergehend gute Wirkung gegen Pansenegele (DÍAZ et al., 2006).

Bei der Anwendung von Closantel scheint die Wirkung gegen Pansenegele abhängig von der Applikationsart zu sein. Durch die orale Verabreichung war eine deutliche Eireduktion zu erfassen (ARIAS et al., 2013). Keine Wirkung gegen Pansenegele zeigte Closantel bei der subkutanen Applikation (MALRAIT et al., 2015). Die Autor/innen vermuteten, dass eine systemische Verabreichung weniger effektiv ist als die orale Gabe, bei der das Medikament direkt in den Pansen gelangt.

Albendazol wirkte in einer Studie unzureichend gegen adulte Stadien (ARIAS et al., 2013).

Da der Zyklus und die Epidemiologie des Pansenegeles *C. daubneyi* demjenigen des großen Leberegels sehr ähneln, muss für die Bekämpfung, wie es von der Fasciolosebekämpfung bekannt ist, das Weidemanagement mitberücksichtigt

werden. Eine bewährte Strategie ist das Weiderotationssystem nach Boray (BORAY, 1972; KNUBBEN-SCHWEIZER et al., 2010). Es beruht darauf, dass sich ein empfängliches Tier höchstens acht Wochen auf Weiden mit Zwischenwirtsschneckenhabitaten aufhalten darf, wo es sich potenziell infiziert. Vor Abschluss der Präpatenzzeit muss das Rind auf eine „trockene“ Weide ohne Habitate verbracht werden, wo es dann Eier ausscheidet. Sind dort keine Zwischenwirtsschnecken vorhanden, wird so der Zyklus unterbrochen. Auch die Heutrocknung und Silierung von mit Zwischenwirtsschnecken besiedelten Weiden kann als Beitrag zur Bekämpfung wirksam sein (KNUBBEN-SCHWEIZER et al., 2010).

2. Zwischenwirte

Beide Trematoden, *Calicophoron daubneyi* und *Fasciola hepatica*, haben, bedingt durch den gemeinsamen Zwischenwirt *Galba truncatula* (Zwergschlamm-schnecke), eine sehr ähnliche epidemiologische Dynamik. In der aktuellen Literatur werden darüber hinaus weitere potenzielle Zwischenwirte angesprochen, welche in Anbetracht der Expansion von *C. daubneyi* in Europa an Bedeutung gewinnen könnten.

2.1. Larvale Entwicklungsstadien von *C. daubneyi* und *F. hepatica* im Zwischenwirt

Die in der Außenwelt aus dem Ei geschlüpften Mirazidien suchen in Gewässern ihren Zwischenwirt auf, den sie zur ungeschlechtlichen Fortpflanzung benötigen. Sind sie in die Schnecke eingedrungen, werden sie zu Sporozysten. Junge Sporozysten können sich auch im Fuß oder in der Kopfregion der Schnecke aufhalten, da die Mirazidien den Schneckenkörper in der Peripherie durchdringt und sich erst zur Vermehrung in die Mitteldarmdrüse zurückzieht (MAGALHAES et al., 2004). Im Falle einer Doppelinfektion mit zwei verschiedenen Trematoden nimmt der nicht dominante Trematode andere Organe, bevorzugt die Niere, oder Mantel und Fuß ein. Es ist bekannt, dass Entwicklungsprozesse des Parasiten der Wirts-Schnecke Schäden in Form von generalisierten Nekrosen zufügen (RONDELAUD et al., 2007a).

Die verschiedenen Stadien der larvalen Entwicklung in der Schnecke werden in der Literatur häufig leicht unterschiedlich dargestellt und kategorisiert (ABROUS et al., 1997; RONDELAUD et al., 2007a; IGLESIAS-PIÑEIRO et al., 2016). Generell werden die Stadien Sporozysten, Redien, Tochterredien, unreife Zerkarien oder Prozerkarien, reife Zerkarien und freie Zerkarien genannt.

BELFAIZA et al. (2004) und RONDELAUD et al. (2009) untersuchten die komplexen Entwicklungsvorgänge von *F. hepatica*-Redien in *Galba truncatula* unter Laborbedingungen sehr genau und beschrieben sie wie folgt: Aus einer Sporozyste gehen normalerweise zwei Mutterredien hervor. Die erste Mutterredie kann bis zu vier Generationen von Tochterredien in bestimmten zeitlichen Abständen bilden. Diese produziert nur Tochterredien und selbst keine Zerkarien. Die zweite Mutterredie, die etwas nach der Ersten aus der Sporozyste hervorgeht, kann ebenfalls bis zu drei Generationen Tochterredien bilden und produziert (im Gegensatz zur ersten Mutterredie) auch Zerkarien. Die Mutterredien bringen pro Generation zwischen zwei und 16 Tochterredien hervor. In den früheren Generationen werden mehr Tochterredien gebildet als in den späteren. Dieser Prozess des Generationenaufbaus dauert unter Laborbedingungen (20 °C) ca. 63 Tage bis zur vierten Generation (RONDELAUD et al., 2009). So entstehen bei *F. hepatica* 28-43 Tochterredien, die intraredial über die Stadien der germinalen Embryos (Morulae, prozerkariale Embryos und Prozerkarien) Zerkarien produzieren, die sie schlussendlich als freie Zerkarien ausscheiden und die den Zwischenwirt verlassen. Aus jeder Tochterredie können unterschiedlich viele Zerkarien hervorgehen. Die zweite Generation (erste Tochterredien der ersten Mutterredie) produzierte in den Versuchen den größten Anteil der ausgeschiedenen Zerkarien.

Eine *G. truncatula* produzierte bei einer Infektion mit einer *F. hepatica*-Sporozyste durchschnittlich 504,3 Zerkarien und jene, die mit zwei Sporozysten infiziert war produzierte durchschnittlich 876,2 Zerkarien (BELFAIZA et al., 2004). Die Präpatenzphase, also die Zeitdauer von der Infektion bis zur ersten Zerkarien-Ausscheidung, dauerte um die 42 Tage und die Ausscheidungsphase hielt ca. 21-25 Tage an bis zum Tod der Schnecke (BELFAIZA et al., 2004).

2.2. Zwischenwirt: *Galba truncatula* (Zwergschlammschnecke)

Galba truncatula O. F. MÜLLER 1774 gehört zu den Süßwasserschnecken und kann nach aktuellem Wissensstand als Haupt-Zwischenwirt von *Calicophoron daubneyi* und *Fasciola hepatica* bezeichnet werden. Eine experimentelle Studie konnte zeigen, dass *G. truncatula* empfänglicher für Infektionen mit *C. daubneyi* und *F. hepatica* als andere Schneckenarten ist und eine effektivere Vermehrung mit zuverlässiger Komplettierung des larvalen Zyklus zulässt, was für eine Adaption zwischen Zwischenwirt und Parasit spricht (ABROUS et al., 1998; CARON et al., 2007; SANABRIA et al., 2012).

2.2.1. Biologie und Habitate

Süßwasserschnecken können grob in zwei Gruppen eingeteilt werden: den Lungenschnecken (Pulmonata) und Vorderkiemer (Prosobranchia). Die Art *Galba truncatula* gehört zur Familie der Lymnaeidae (Schlammschnecken) und somit zu den Pulmonata. Sie sind Lungenatmer und kommen zum Luftaustausch an die Wasseroberfläche. Lungenschnecken sind Zwitter und sind zur Selbstbefruchtung fähig (GLÖER & MEIER-BROOK, 2003). *G. truncatula* sind in ganz Deutschland verbreitet. Zu ihren morphologischen Merkmalen gehören ihr türmchenähnliches, hornfarbenes Gehäuse mit den stufig abgesetzten Windungen, die tiefe Naht und der tiefe, offene Nabelritz. Ihr Gehäuse wird zwischen 5-8 mm lang und ist rechtsgewunden (Abbildung 2) (GLÖER & MEIER-BROOK, 2003).



Abbildung 2: *Galba truncatula* (Zwergschlammschnecke)
(Foto: Andrea Küchler)

G. truncatula kommen in typischen Lebensräumen, genannt Habitate, vor. Habitate von *G. truncatula* sind vorwiegend kleine, stehende oder langsam fließende Gewässer. Typische Habitate sind Quellen oder Hangwasseraustrittsstellen, Gräben, langsam fließende Bäche, Tümpel, Teiche, Moore oder Uferzonen von Seen und langsam fließenden Flüssen (Abbildung 3, Abbildung 4) (GLÖER & MEIER-BROOK, 2003; SCHWEIZER et al., 2007; CARON et al., 2014; RONDELAUD et al., 2015). Auch in Drainagegräben, Brunnen und Tränkebecken von Rindern auf Weiden können *G. truncatula* gefunden werden (SCHWEIZER et al., 2007; KNUBBEN-SCHWEIZER et al., 2011). *G. truncatula* kommen auch in temporär nassen Habitaten, die beispielsweise durch starke Regenfälle entstehen, vor (CARON et al., 2014).



Abbildung 3: Seichter Graben (Foto: Irene Schairer)



Abbildung 4: Typisches Habitat mit Binsengewächs (Foto: Irene Schairer)

Es sind Indikatorpflanzen bekannt, welche auf das Vorkommen von *Galba truncatula* hinweisen können. Dazu zählt vor allem das Binsengewächs *Juncus acutiflorus* EHRHART EX-HOFFMANN, 1791 (RONDELAUD et al., 2011).

2.2.2. Infektion von *G. truncatula* mit *C. daubneyi* und *F. hepatica*

Einige Studien, vorwiegend aus nordwestlichen Ländern Europas, beschäftigen sich mit den Prävalenzen von *C. daubneyi* und *F. hepatica* im Zwischenwirt *G. truncatula* (Tabelle 1). Langzeitstudien konnten einen Anstieg der *C. daubneyi*-Prävalenz Anfang der 90er Jahre nicht nur im Endwirt, sondern auch im Zwischenwirt nachweisen (MAGE et al., 2002; DREYFUSS et al., 2005). Das vermehrte Aufkommen von *C. daubneyi* im Zwischenwirt und die gleichzeitige Senkung der *F. hepatica*-Prävalenzen in Frankreich wird durch die starke Bekämpfung von *F. hepatica* begründet, wobei *G. truncatula* als Nische für *C. daubneyi* frei wurde. In gewissen Gebieten Frankreichs nahm *C. daubneyi* Überhand (DEGUEURCE et al., 1999; MAGE et al., 2002).

Häufig co-existieren beide Parasiten mit ähnlich hohen Prävalenzen in denselben Gebieten oder Habitaten (DREYFUSS et al., 2005; DREYFUSS et al., 2014; JONES et al., 2015; RONDELAUD et al., 2015; JONES et al., 2017b). Trotz der Co-Existenz sind Doppelinfektionen einer Schnecke selten mit Prävalenzen von 2 % und 0,2 % in Frankreich (DEGUEURCE et al., 1999; ABROUS et al., 2000), 0,05 % im Regional Naturpark Brenne in Frankreich (RONDELAUD et al., 2015), 0,7 % und 1,9 % in Wales (JONES et al., 2015; JONES et al., 2017b) oder werden nicht nachgewiesen (MARTÍNEZ-IBEAS et al., 2013; IGLESIAS-PIÑEIRO et al., 2016; O'SHAUGHNESSY et al., 2017). Die Konkurrenzsituation im Zwischenwirt und die Begrenzung der zur Verfügung stehenden Ressourcen für die larvale Entwicklung könnte eine Begründung für dieses seltene Vorkommen sein.

Tabelle 1: Prävalenzen natürlicher Infektionen von *G. truncatula* mit *F. hepatica* und *C. daubneyi*

Land (Region)	Untersuchungszeitraum	Prävalenz <i>F. hepatica</i>	Prävalenz <i>C. daubneyi</i>	Nachweismethoden	Literaturnachweis
Frankreich (Zentral)	1989-2000	Anstieg: 4,7 % (1998) auf 7,2 % (1993); Senkung: auf 3,3 % (2000)	Anstieg: 0 % (1989) auf 6,3 % (1996); ab 1997 zwischen 3,7 %-5,3 %	Mikroskopie, Sektion	MAGE et al. (2002)
Frankreich (Zentral)	1990-2004	1,7 %	1,7 %	Mikroskopie, Sektion	DREYFUSS et al. (2005)
Frankreich (Zentral)	1996-1997	3,6 %	0,8 %	Mikroskopie, Sektion	ABROUS et al. (2000)
Frankreich (Ost)	1997	0,2 %	13,3 %	Mikroskopie, Sektion	DEGUEURCE et al. (1999)
Schweiz	1999-2000	7 %	-	qPCR	SCHWEIZER et al. (2007)
Frankreich (Zentral)	2005-2008	2,4 %	1,6 %	Mikroskopie, Sektion	DREYFUSS et al. (2014)
Algerien (Nordost)	Juli 2007	6,25 %	-	Multiplex-PCR	CARON et al. (2011)
Spanien (Galizien, Nordwest)	2007-2009	8,2 %	4,4 %	Mikroskopie, Sektion	IGLESIAS-PIÑEIRO et al. (2016)
Belgien und Luxemburg	Sommer 2008	1,31 %	-	Multiplex-PCR	CARON et al. (2014)
Polen	Juni-August	26,6 %	-	PCR	(KOZAK & WĘDRYCHOWICZ, 2010)
Frankreich (Reg. Naturpark Brenne)	2012-2014	0,5 %	1,1 %	Mikroskopie, Sektion	RONDELAUD et al. (2015)
Spanien (Galizien, Nordwest)	-	40,4 %	19,1 %	Mikroskopie, Sektion, Multiplex-PCR	MARTÍNEZ-IBEAS et al. (2013)
Großbritannien (Wales)	Mai-September 2015	13,4 %	11,2 %	PCR	JONES et al. (2015)
Großbritannien (Wales)	Mai-Oktober 2016	5,6 %	4,0 %	Multiplex-PCR	JONES et al. (2017b)
Irland (Betrieb mit <i>C. daubneyi</i> -Ausbruch)	September 2016 (Ausbruch)	1,4 %	55,7 %	Multiplex-PCR	O'SHAUGHNESSY et al. (2017)

Bei experimentell durchgeführten Infektionsstudien hat sich gezeigt, dass beide Trematoden, trotz der ähnlichen Epidemiologie, bei Temperaturschwankungen unterschiedlich reagieren. Eine kurzfristige Absenkung der Temperatur hatte einen stimulierenden Effekt auf die Entwicklungsstadien von *C. daubneyi* und die Zerkarienemission. Hingegen war die Zerkarienemission bei *F. hepatica* bei einer konstanten Temperatur von 20 °C effektiver. Daraus entstand die Hypothese, dass sich bei niedrigeren Temperaturen eher *C. daubneyi* durchsetzt und im Frühling aus überwinterten *G. truncatula* bessere Überlebenschancen hat (ABROUS et al., 1999a, 1999c). Ein anderes Phänomen unter experimentellen Bedingungen beschreibt die Infektionswahrscheinlichkeit von *G. truncatula* bei verschiedenen Gehäusegrößen bzw. Altersstufen der Schnecken. Hierbei wurde beobachtet, dass eine Infektion der Schnecke mit *F. hepatica* mit steigender Schneckengröße wahrscheinlicher wurde, wohingegen eine *C. daubneyi*-Infektion mit steigender Größe unwahrscheinlicher wurde. Die Ursache könnte sein, dass *F. hepatica* sich bereits besser an den Zwischenwirt angepasst hat und dass *C. daubneyi* die befallenen Zwischenwirte in ihrer Entwicklung hemmen (IGLESIAS-PIÑEIRO et al., 2016). Grundsätzlich wurden im Versuch in allen Größenkategorien Infektionen festgestellt.

2.3. Weitere (potenzielle) Zwischenwirte

Galba truncatula gilt als Haupt-Zwischenwirt des großen Leberegels und der Panseneigelart *C. daubneyi*. Es gibt weitere Schneckenarten, größtenteils aus derselben Familie Lymnaeidae, die *C. daubneyi* und *F. hepatica* übertragen können, insbesondere bei Abwesenheit von *G. truncatula*. Im Folgenden werden verschiedene europäische Schneckenarten vorgestellt, die in der aktuellen Literatur als Zwischenwirte Erwähnung gefunden haben. Die hier verwendeten Artenbezeichnungen wurden gemäß Synonymverzeichnis („13 Synonyma“) in GLÖER and MEIER-BROOK (2003) vereinheitlicht.

2.3.1. Aus der Familie Lymnaeidae (Schlammschnecken)

Lymnaeidae sind Wasserlungenschnecken, die an Süßwasser angepasst sind. Sie kommen vorwiegend in seichten und verschlammten Gewässern vor. Schneckenarten dieser Familie sind rechtsgewunden und können in der Regel anhand morphologischer Unterschiede des Gehäuses mittels Bestimmungsschlüssel unterschieden werden (GLÖER & MEIER-BROOK, 2003). Eine genetische Unterscheidung mittels molekularbiologischer Verfahren anhand des ITS-2-Gens kann bei sehr ähnlicher Morphologie, z. B. bei *R. balthica* und *R. labiata*, sinnvoll sein (BARGUES et al., 2001; CARON et al., 2007).

2.3.1.1. *Radix balthica* (Gemeine Schlammschnecke) und *Radix labiata* (Alpen-Schlammschnecke)

R. balthica LINNAEUS 1758 und *R. labiata* ROSSMAESSLER 1835 sind in Deutschland weit verbreitet. *R. balthica* kann in Höhen bis 2'500 ü. d. M. vorkommen und *R. labiata* ist vorwiegend in südlichen Teilen Deutschlands endemisch (GLÖER & MEIER-BROOK, 2003). Die Gehäuse adulter *R. balthica* und *R. labiata* können bis 20 mm lang werden. *R. balthica* gilt als recht anpassungsfähig und kann sogar in tiefen Gewässern oder in Gewässern mit Salzgehalt überleben. Meist ist sie in Uferbereichen von pflanzenreichen, stehenden Gewässern anzutreffen. *R. labiata* kann in kleinen stehenden oder langsam fließenden Gewässern gefunden werden, auch im Gebirge.

Natürliche Infektionen von *R. balthica* mit *F. hepatica* wurden mit einer Prävalenz von 1,4 % in Frankreich ermittelt (DREYFUSS et al., 2002). In experimentellen Infektionsstudien fiel auf, dass die Infektionsrate negativ mit der Gehäusegröße korrelierte (DEGUEURCE et al., 1999; DREYFUSS et al., 2000; DREYFUSS et al., 2002). Juvenilen *R. balthica* könnte somit eine besondere Rolle im *F. hepatica*-Zyklus zufallen. *R. labiata* ließen sich experimentell erfolgreich mit *F. hepatica* infizieren. Sie schieden verglichen mit *G. truncatula* in sehr geringen Mengen Zerkarien aus, die jedoch im Rattenmodell gleichermaßen infektiös waren (CARON et al., 2007).

Es gibt noch keine Evidenzen, dass *R. balthica* oder *R. labiata* fähig sind den larvalen Zyklus von *C. daubneyi* zu schließen. Bisher konnten nur unreife Larvenstadien nachgewiesen werden (DEGUEURCE et al., 1999; DREYFUSS et al., 2002). Unter experimentellen Bedingungen konnte ein Phänomen gezeigt werden, dass *C. daubneyi* als „Wegbereiter“ für *F. hepatica* dienen könnte. Denn reife Larvenformen von *F. hepatica* wurden in dieser Studie nur gesehen bei juvenilen *R. balthica*, die vier Stunden vor der *F. hepatica*-Infektion mit *C. daubneyi* infiziert wurden (DEGUEURCE et al., 1999).

Besonders in Abwesenheit von *G. truncatula* könnten *Radix* sp. insbesondere bei der Übertragung von *F. hepatica* eine Rolle spielen. In einer irischen Studie konnten Prävalenzen zwischen 10,3-61,1 % festgestellt werden (RELF et al., 2009). Wohingegen aus einer anderen Studie die *F. hepatica*-Prävalenz von 25 % in *R. balthica* hervorging, aus einem Betrieb, wo auch *G. truncatula* gefunden wurden (JONES et al., 2015).

2.3.1.2. *Omphiscola glabra* (Längliche Sumpfschnecke)

Diese Schneckenart ist in Deutschland vorwiegend im Nordwesten verbreitet und kommt in pflanzenreichen Gräben und Tümpeln vor (GLÖER & MEIER-BROOK, 2003).

Die aktuellen Studien zur Rolle von *O. glabra* O. F. MÜLLER 1774 als potenzieller Zwischenwirt von *F. hepatica* und *C. daubneyi* stammen aus Frankreich. Dabei wurden umfangreiche Untersuchungen zum natürlichen Infektionsstatus dieser Schneckenart erhoben. Es wurden dabei jeweils Prävalenzen unter 2 % für beide Parasitenarten mittels Sektion und Mikroskopie ermittelt (ABROUS et al., 2000; DREYFUSS et al., 2003, 2005; DREYFUSS et al., 2014). Die natürliche Prävalenz von Co-Infektionen mit *C. daubneyi* und *F. hepatica* lag bei 0,7 % und war höher als bei *G. truncatula* mit 0,4 % (VIGNOLES et al., 2016).

O. glabra wurde bezüglich ihres Zwischenwirtspotenzials eine gewisse Anpassungsfähigkeit zugeschrieben, denn bei ihrer alleinigen Anwesenheit war die Prävalenz signifikant höher, als wenn sie sich das Habitat mit *G. truncatula* teilte (ABROUS et al., 1999b; DREYFUSS et al., 2014). Zusätzlich stellten DREYFUSS et al. (2005) in ihrer Langzeitstudie fest, dass die Anzahl Zerkarien enthaltenden Redien in *O. glabra* über die beobachteten 15 Jahre anstiegen.

ABROUS et al. (1996) beobachteten bei ihren experimentellen Infektionsstudien ein ungewöhnliches Phänomen. Sie infizierten junge *O. glabra* (4-6 mm) mit beiden Parasiten und beobachteten, dass sich eine Trematodenart jeweils gegen die andere durchzusetzen schien. Nur doppelinfizierte Schnecken bei denen sich *F. hepatica* durchgesetzt hat, schieden *F. hepatica*-Zerkarien aus. Setzte sich *C. daubneyi* durch, wurden keine Zerkarien ausgeschieden. Ebenso ließen sich keine larvalen Stadien nachweisen, wenn *O. glabra* nur mit einem Parasiten infiziert wurden. Gleiches wurde später auch bei Infektionen von juvenilen *R. balthica* beobachtet (DEGUEURCE et al., 1999).

2.3.1.3. *Stagnicola palustris* (Gemeine Sumpfschnecke)

Stagnicola palustris O. F. MÜLLER 1774 findet in Norddeutschland weite Verbreitung und kommt selten in südlichen Teilen vor. Mit einer Gehäusegröße von bis zu 17,5 mm gehört sie zur größten Art der Gattung *Stagnicola* (Sumpfschnecke). Ufergebiete von Teichen und stehenden Gewässern zählen zu ihrem Lebensraum (GLÖER & MEIER-BROOK, 2003).

S. palustris wurde ähnlich wie *Radix balthica* als potenzieller Zwischenwirt von *F. hepatica* und *C. daubneyi* in einer französischen Studie benannt (DEGUEURCE et

al., 1999). Hierbei konnten unter experimentellen Bedingungen reife Zerkarien in juvenilen Schnecken, die einer Doppelinfektion mit *C. daubneyi* und *F. hepatica* ausgesetzt wurden, gesehen werden. Jedoch setzte sich auch in dieser Schneckenart eine Parasitenart durch. Eine alleinige Infektion mit *C. daubneyi* führte nicht zur Entwicklung von reifen Larvenstadien. Die Infektionsprävalenz war bei juvenilen Schnecken höher als bei größeren Schnecken (4 mm). In dieser Studie enthielt eine im Feld gesammelte *S. palustris* reife Larvenstadien von *C. daubneyi* und *F. hepatica* als Doppelinfektion.

2.3.2. Aus der Familie Planorbidae (Tellerschnecken)

Planorbidae zählen ebenso wie Lymnaeidae zu den Süßwassermollusken und Lungenschnecken (Pulmonata). Ihre Artenvielfalt ist weitaus größer als die der Lymnaeidae und die morphologische Differenzierung ist komplexer. Merkmale der Planorbidae sind ihre flache tellerartige Form und die Linkswindung (GLÖER & MEIER-BROOK, 2003).

Im Zusammenhang mit *C. daubneyi* und *F. hepatica* findet vorwiegend die Art *Anisus leucostoma* MILLET 1813 in der aktuellen Literatur Erwähnung. Sie ist in ganz Deutschland verbreitet und kann in kleinen, stehenden Gewässern oder überschwemmten Gebieten gefunden werden. Gegen Austrocknung ist diese Art relativ robust (GLÖER & MEIER-BROOK, 2003).

Ähnlich wie bei *R. balthica* und *O. glabra* konnte bei experimentellen Infektionen eine Steigerung der Empfänglichkeit für *F. hepatica*-Infektionen bei einer vorhergehenden Infektion mit *C. daubneyi* gezeigt werden. Unter diesen Umständen erfolgte die komplette larvale Entwicklung von *F. hepatica* bis zur Ausscheidung von Zerkarien. Somit könnte *A. leucostoma* als ungewöhnlicher Zwischenwirt in Abwesenheit von *G. truncatula* fungieren (ABROUS et al., 1998; DREYFUSS et al., 2002). Unter natürlichen Bedingungen wurde eine *F. hepatica*-Prävalenz von 0,1 % (DREYFUSS et al., 2002) und 0,4 % (ABROUS et al., 2000) bestimmt. *C. daubneyi*-Infektionen wurden nicht gesehen (ABROUS et al., 2000) oder es zeigten sich nur unreife Larvenstadien ohne Komplettierung des larvalen Zyklus (DREYFUSS et al., 2002).

Planorbidae sind Zwischenwirte von anderen Pansenegearten wie *P. cervi* und *P. ichikawai* (DEPLAZES et al., 2020).

2.3.3. Aus der Familie Physidae (Blasenschnecken)

Physidae sind linksgewunden und gehören wie die Lymnaeidae und Planorbidae zu den Süßwassermollusken und Pulmonata (GLÖER & MEIER-BROOK, 2003).

Die Art *Physella acuta* DRAPARNAUD 1850 (Spitze Blasenschnecke) konnte zwar mit *F. hepatica* und *C. daubneyi* natürlich und experimentell infiziert werden, zeigte aber lediglich unreife Larvenstadien und abortive Infektionen (ABROUS et al., 1998; DEGUEURCE et al., 1999; DREYFUSS et al., 2002). Wie *Physella acuta* kommt auch *Physa fontinalis* LINNAEUS 1758 (Quellblasenschnecke) als Überträger aktuell eher nicht infrage (IGLESIAS-PIÑEIRO et al., 2016). Beide Arten sind in Deutschland endemisch und kommen in stehenden und langsam fließenden Gewässern vor (GLÖER & MEIER-BROOK, 2003).

2.3.4. Invasive Schneckenarten

Die aus Neuseeland eingeschleppte Schneckenart *Potamopyrgus antipodarum* GRAY 1843 (Neuseeländische Deckelschnecke) scheint zumindest für *F. hepatica* empfänglich zu sein. In einem Betrieb mit gemischten Infektionen mit *F. hepatica* und *C. daubneyi* wurde mittels PCR genetisches Material von *F. hepatica* in *P. antipodarum* gefunden. Ob sich der larvale Zyklus schließen kann, ist nicht bekannt (JONES et al., 2015). *P. antipodarum* wurde im 19. Jahrhundert eingeschleppt und hat sich seitdem in ganz Deutschland verbreitet. Sie lebt im Süßwasser in Gräben und Uferbereichen von Seen und fließenden Gewässern (GLÖER & MEIER-BROOK, 2003). Sie ist bedeckelt, ca. 4-6 mm lang, rechtsgewunden und gehört zur Familie der Hydrobiidae (Wasserdeckelschnecken).

Französische Exemplare der invasiven Schneckenart *Pseudosuccinea columella* SAY 1817 wurden in experimentellen Studien auf ihr Potenzial als Zwischenwirt überprüft. POINTIER et al. (2007) infizierten 3-4 mm große Schnecken mit *F. hepatica*. Alle getesteten Schnecken (n=26) nahmen Mirazidien auf. Der Infektionsstatus wurde zwei Wochen nach der Infektion bestimmt und der Versuch wurde nicht weitergeführt. Die Arbeitsgruppe DAR et al. (2015) infizierte die Nachzucht französischer *P. columella* mit *C. daubneyi*. Juvenile *P. columella* (< 2 mm) ließen sich infizieren, die dann auch Zerkarien ausschieden. Ältere Exemplare waren resistent und nahmen keine Mirazidien auf. Über die Verbreitung dieser Schneckenart im europäischen Raum ist bisher wenig bekannt.

2.3.5. Landlungenschnecken

Über die Infektion von Landschnecken mit Trematoden gibt es bisher kaum Informationen. Aus einer Studie aus einem Schafbetrieb in Irland ging eine *F. hepatica*-Prävalenz von 73,9 % in *Succinea* spp. (Bernsteinschnecke) hervor (RELF et al., 2009). Die Untersuchung wurde mittels PCR durchgeführt. Über die Vervollständigung des Zyklus in diesem ungewöhnlichen Zwischenwirt gibt es

bislang keine Erkenntnisse. Somit könnten Landlungenschnecken auch Fehlwirte sein.

3. Methoden zur Untersuchung von Zwischenwirtsinfektionen

Die Untersuchung von Larvenstadien in ihren Zwischenwirten beleuchtet einen wichtigen Teil des gesamten parasitären Zyklus. Durch die vorgestellten diagnostischen Methoden konnte das Zwischenwirtsspektrum genauer untersucht und natürliche Veränderungen in der Dynamik von *F. hepatica* und *C. daubneyi* und deren Interaktion mit ihren Zwischenwirten festgestellt werden (MAGE et al., 2002; CARON et al., 2008).

Traditionell wurden Schnecken seziiert und adspektorisch auf Larvenstadien mittels Mikroskopie untersucht (FRANSEN & CHRISTENSEN, 1984). In den 90er Jahren gelangen erste molekularbiologische Nachweise des großen Leberegels im Zwischenwirt (HEUSSLER et al., 1993; ROGNLIE et al., 1994; KAPLAN et al., 1995, 1997), woraufhin sich Wissenschaftler/innen mit modernen Nachweismethoden wie der konventionellen PCR (CUCHEER et al., 2006; CARON et al., 2007; JONES et al., 2015), der Multiplex-PCR (MARTÍNEZ-IBEAS et al., 2013) und der quantitativen Real-time PCR (SCHWEIZER et al., 2007) zum Nachweis von *F. hepatica* und *C. daubneyi* im Zwischenwirt beschäftigten.

3.1. Schneckensektion und Mikroskopie

Die Schneckensektion ist die älteste Methode zur Untersuchung von Zwischenwirtsinfektionen (CARON et al., 2008). Aktuell wird sie vorwiegend genutzt, um umfassende Prävalenzbestimmungen natürlich infizierter Schneckenarten durchzuführen (DEGUEURCE et al., 1999; ABROUS et al., 1999b; ABROUS et al., 2000; MAGE et al., 2002; DREYFUSS et al., 2003; DREYFUSS et al., 2014; RONDELAUD et al., 2015) oder um die Entwicklung der Larvenstadien in experimentellen Infektionsstudien in unterschiedlichen Zwischenwirten zu untersuchen (ABROUS et al., 1996, 1997; DEGUEURCE et al., 1999). Ein weiterer Nutzen der Mikroskopie ist die Selektion von adspektorisch nicht infizierten Schnecken für PCR-Pools zur Reduzierung von Proben (JONES et al., 2017b). Daneben wurden die Entwicklungsstadien von *C. daubneyi* mikroskopisch studiert und charakterisiert (ABROUS et al., 1997; IGLESIAS-PIÑEIRO et al., 2016).

Die technische Durchführung der Methode wird als relativ einfach und kostengünstig beschrieben. Unter einem Stereomikroskop wird die

Schneckenschale an der größten Windung mit einer Pinzette zerbrochen. Das herausgelöste Schneckengewebe wird am Epithelium der Mitteldarmdrüse eröffnet, um larvale Stadien erkennen zu können (FRANSEN & CHRISTENSEN, 1984; DREYFUSS et al., 2005; CARON et al., 2008).

Eine Differenzierung von Zerkarien enthaltenden Redien und freien Zerkarien unterschiedlicher Trematodenarten ist anhand morphologischer Merkmale (z. B. Pharynx und Gliedmaßen) möglich (FRANSEN & CHRISTENSEN, 1984; ABROUS et al., 1997, 2000). Unreife Redien und frühere Entwicklungsstadien sind jedoch schwer zu erkennen und zu differenzieren. CARON et al. (2007) beschreiben, dass die Sektion vor dem 21. Tag p. i. schwierig ist, da erst dann von Sporozysten ausgeschiedene Redien ins Gewebe migrieren. Auch MARTÍNEZ-IBEAS et al. (2013) gelang ein mikroskopischer Nachweis unreifer Redien erst ab dem 29. Tag p. i. Daher wird die Sensitivität der Methode als deutlich geringer gegenüber molekularbiologischen Nachweismethoden eingeschätzt (CUCHER et al., 2006; CARON et al., 2007; MARTÍNEZ-IBEAS et al., 2013).

3.2. „Cercarial Shedding“ (Zerkarien-Austritt)

Mit dem Freiwerden der Zerkarien schließt der larvale Zyklus im Zwischenwirt ab (RONDELAUD et al., 2009). Die Beobachtung der Zerkarienemission kann als diagnostisches Mittel dienen, um das Potenzial von verschiedenen Schneckenarten als Zwischenwirte zu überprüfen. CARON et al. (2007) konnten mit einer experimentellen Infektionsstudie zeigen, dass alle infizierten *G. truncatula* eine deutlich höhere Anzahl *F. hepatica*-Zerkarien ausschieden (mit bis zu 100 Zerkarien pro Schnecke) als *R. labiata*, von denen ein Drittel der Infizierten durchschnittlich vier Zerkarien ausschieden. Infizierte *R. balthica* schieden keine Zerkarien aus.

Der Zerkarienaustritt kann unter experimentellen Bedingungen durch einen starken Lichtreiz (FRANSEN & CHRISTENSEN, 1984) oder durch einen rapiden Temperaturabfall (CARON et al., 2007) herbeigeführt werden. Freie Zerkarien von *C. daubneyi* und *F. hepatica* lassen sich morphologisch und anhand ihres Schwimmverhaltens unterscheiden: *F. hepatica*-Zerkarien sind weiß und schnell, während *C. daubneyi*-Zerkarien dunkelbraun und eher träge sind (MAGE et al., 2002).

3.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das Ziel der molekularbiologischen Nachweismethoden ist eine frühe Erkennung der Zwischenwirtsinfektion (MARTÍNEZ-IBEAS et al., 2013). Tabelle 2 gibt einen Überblick über aktuelle Studien von verschiedenen Autor/innen zur Anwendung

der PCR, der genutzten Primerpaare und Amplikons. In der Aufstellung wurden die entsprechenden Sensitivitäten und Spezifitäten zusammengefasst.

Tabelle 2: Methode der PCR und Multiplex-PCR zur Untersuchung von Zwischenwirtsinfektionen mit *F. hepatica* und *C. daubneyi*

Methoden	Amplikon	Sensitivität	Spezifität	Literaturnachweis
Multiplex-PCR	<i>F. hepatica</i> : Tandem repeat DNA 85 bp-Intervall (mtDNA) Interne Kontrolle <i>F. hepatica</i> und Schnecke: 1200 bp (Schnecke) und 1300 bp (<i>F. hepatica</i>) (ITS, rDNA)	1 Mirazidie (0,8 ng/μl) in Schnecken-DNA (7 ng/μl) (2004)	Keine Kreuzreaktionen mit anderen Trematoden (<i>C. caratinguense</i> und <i>C. macrogranulosa</i>) (2008)	MAGALHAES et al. (2004) MAGALHAES et al. (2008)
PCR-RFLP	<i>C. daubneyi</i> : 428 bp (ITS-2+, rDNA)	-	97,2 % Homologie zu <i>C. calicophorum</i> ; 97,4 % Homologie zu <i>C. microbothrioides</i>	RINALDI et al. (2005)
PCR	<i>F. hepatica</i> : 405 bp (COX-1, mtDNA)	10 pg <i>F. hepatica</i> -DNA mit 10 % Schnecken-DNA; 100 pg mit 20 % Schnecken-DNA	Keine Kreuzreaktionen mit <i>Cotylurus</i> sp., <i>Echinoparyphium</i> sp., <i>Echinostoma</i> sp.; Keine Reaktionen mit DNA von nicht infizierten <i>L. columella</i> und <i>L. viatrix</i>	CUCHER et al. (2006)
PCR	<i>F. hepatica</i> : 124 bp (repetitive DNA-Sequenz)	1 ng DNA	Kreuzreaktion mit <i>F. gigantica</i>	CARON et al. (2007)
Real time TaqMan PCR	<i>F. hepatica</i> : 86 bp (Fhr-II)	-	-	SCHWEIZER et al. (2007)
PCR	<i>F. hepatica</i> : 124 bp (repetitive DNA-Sequenz, ITS-2)	Mit einer Mirazidie infizierte <i>G. truncatula</i> 12 h p. i. positiv getestet	keine Kreuzreaktionen mit <i>G. truncatula</i> , <i>P. cervi</i> und <i>D. dendriticum</i>	(KOZAK & WĘDRYCHOWICZ, 2010)
Multiplex-PCR	<i>F. hepatica</i> : 124 bp (repetitive DNA-Sequenz) Interne Kontrolle Schnecke: 500-600 bp (ITS-2)	1 pg <i>F. hepatica</i> -DNA in 100 ng/μl Schnecken-DNA (2011)	Keine Kreuzreaktionen mit <i>D. lanceolatum</i> , <i>F. magna</i> ; <i>C. daubneyi</i> Bande bei 400-500 bp (2011)	CARON et al. (2011) CARON et al. (2014)
Multiplex-PCR	<i>F. hepatica</i> : 425 bp (COX-1, mtDNA) <i>C. daubneyi</i> : 885 bp (COX-1, mtDNA)	<i>F. hepatica</i> : 0,001 ng DNA <i>C. daubneyi</i> : 0,1 ng DNA	Keine Kreuzreaktionen untereinander oder mit <i>C. cotylophorum</i> , <i>C. batycotyle</i> , <i>C. calicophorum</i> , <i>D. dendriticum</i>	MARTÍNEZ-IBEAS et al. (2013)
PCR (2015); Multiplex-PCR (2017b)	<i>F. hepatica</i> : 425 bp (COX-1, mtDNA) <i>C. daubneyi</i> : 167 bp (COX-1, mtDNA)	<i>F. hepatica</i> : 0,001 ng DNA <i>C. daubneyi</i> : 0,001 ng DNA (2017)	-	JONES et al. (2015) JONES et al. (2017b)
Multiplex-PCR	Gemäß MARTÍNEZ-IBEAS et al. (2013)	-	-	O'SHAUGHNESSY et al. (2017)

3.3.1. Konventionelle PCR

Die häufigsten Gene zur Amplifikation einer speziesspezifischen Sequenz aus dem *F. hepatica*- und *C. daubneyi*-Genom sind das *cytochrom-c-oxidase-subunit-1*-Gen (COX-1) der mitochondrialen DNA und das *internal-transcribed-spacer-2*-Gen (ITS-2) der ribosomalen DNA. Die bisher designten Primerpaare und Basenpaarlängen der Amplikons sind der Tabelle 2 und die Sequenzen der Primer der entsprechenden Literatur zu entnehmen.

Die PCR gilt als sehr sensitive Methode für den Nachweis von Zwischenwirtsinfektionen mit *F. hepatica* und *C. daubneyi* (CARON et al., 2008). Nachweisgrenzen bis zu 0,001 ng Parasiten-DNA konnten anhand Verdünnungsversuchen bestimmt werden (CUCHER et al., 2006; MARTÍNEZ-IBEAS et al., 2013; JONES et al., 2017b). Dass die PCR eine höhere Sensitivität hat als die Schneckensektion und Mikroskopie, konnten verschiedene Studien zeigen. MARTÍNEZ-IBEAS et al. (2013) konnten ab dem ersten Tag p. i. *F. hepatica*-DNA in Schnecken, die mit vier Mirazidien infiziert wurden, mittels PCR nachweisen. Bei infizierten Schnecken mit zwei Mirazidien von *F. hepatica* oder *C. daubneyi* gelang der Nachweis ab dem zweiten Tag p. i. Mikroskopisch waren die Parasiten erst ab dem 29. Tag und 33. Tag p. i. erkennbar. Auch bei der Untersuchung von experimentell infizierten *R. balthica* waren am 15. Tag und 30. Tag p. i. keine Larven mikroskopisch sichtbar, wogegen die mittels PCR ermittelten Prävalenzen 2,5 % respektive 6,25 % betragen (CARON et al., 2007). Auch CUCHER et al. (2006) konnten eine signifikante Diskrepanz zwischen mikroskopisch und PCR ermittelten Prävalenzen bei *F. hepatica*-infizierten Schnecken von 17,5 % versus 51,3 % bei *L. columella* SAY 1817 und 2,9 % versus 61,6 % bei *L. viatrix* ORBIGNY 1835 aufzeigen.

Der Anteil an Schnecken-DNA scheint einen Einfluss auf die Nachweisbarkeit der Parasiten zu haben. Ergebnisse von CUCHER et al. (2006) haben gezeigt, dass bei der Zugabe von 10 % Schnecken-DNA noch 0,01 ng Fasciola-DNA nachgewiesen werden können. Bei der Zugabe von 20 % Schnecken-DNA stieg die Nachweisgrenze auf 0,1 ng. Auch PCR-Inhibitoren können die Sensitivität herabsetzen (CUCHER et al., 2006). Ihre Wirkung fiel in Versuchen durch Proben auf, die bei der Mikroskopie als positiv erkannt und in der PCR negativ getestet wurden. Der PCR-Mix wurde im wiederholten Versuch bei allen negativ getesteten Schnecken mit 0,048 % BSA versetzt, woraufhin eine deutliche Prävalenzsteigerung von 32 % bei *L. columella* und 45,8 % bei *L. viatrix* gezeigt werden konnte. Zum Ausschluss von PCR-Inhibitoren wendeten CARON et al.

(2011) in ihren Versuchen eine interne Positivkontrolle mit dem Nachweis der Sequenz aus dem ITS-2 Gen der Schnecke an.

Die hohe Sensitivität der PCR könnte im epidemiologischen Sinne auch eine Schwachstelle darstellen. In der Arbeit von CUCHER et al. (2006) wurde diskutiert, dass durch die hohe Sensitivität auch DNA bereits toter oder nicht mehr im Zwischenwirt befindlicher *F. hepatica* nachgewiesen werden könnten und somit falsch positive Resultate generiert werden könnten. Zudem liefern die PCR wie auch die Mikroskopie nur eine Momentaufnahme des aktuellen Nachweises im Zwischenwirt und geben, ausgenommen es sind Bewegungen freier Zerkarien in der Mikroskopie sichtbar, keine Information über den Vitalitätsstatus der Larvenstadien und ob der Parasit fähig ist, seinen Zyklus im entsprechenden Zwischenwirt zu vervollständigen (CARON et al., 2007; CARON et al., 2008). Ein Beispiel liefert die Studie von CARON et al. (2007). Dabei wurden Infektionen von *R. balthica* mit *F. hepatica* mittels PCR festgestellt, jedoch schieden sie keine Zerkarien aus, was für ein abortives System spricht.

3.3.2. Multiplex-PCR

Die Multiplex-PCR kann angewendet werden, um Zielsequenzen von unterschiedlichen Erregern, hier von *C. daubneyi* und *F. hepatica* im Zwischenwirt, in einem PCR-Durchlauf nachzuweisen (MARTÍNEZ-IBEAS et al., 2013; JONES et al., 2017b). Auch Doppelinfektionen eines Zwischenwirts mit beiden Parasiten können durch die Zugabe zweier spezifischer Primerpaare erkannt werden (JONES et al., 2017b). Tabelle 2 gibt einen Überblick über Anwendungen dieser Methode.

MARTÍNEZ-IBEAS et al. (2013) haben als erste Arbeitsgruppe die Multiplex-PCR für den Nachweis von *F. hepatica* und *C. daubneyi* im Zwischenwirt validiert. In Verdünnungsversuchen ließ sich 0,1 ng DNA-Material eines adulten großen Leberegels und 0,001 ng DNA eines adulten Pansenegels jeweils gemischt mit DNA einer nicht infizierten Schnecke noch nachweisen. JONES et al. (2017b) wendeten die Methode in Feldversuchen an mit dem Primerpaar für *F. hepatica* aus der Studie von MARTÍNEZ-IBEAS et al. (2013) und einem selbst designten Primerpaar für *C. daubneyi*.

Die Multiplex-PCR wurde zusätzlich genutzt, um *F. hepatica*-DNA in Schnecken nachzuweisen mit zusätzlichen Primerpaaren zur internen Positivkontrolle (MAGALHAES et al., 2004; MAGALHAES et al., 2008). Ein Primerpaar flankiert dabei die hochrepetitive Sequenz der mitochondrialen DNA des Parasiten und zwei Primerpaare die ITS-2 Region der Schnecke und des Parasiten. Bei

negativen Schnecken wird nur die ITS-Region der Schnecke amplifiziert (1200 bp), es erscheint eine Bande. Bei positiven Schnecken werden mehrere Banden durch die spezifische repetitive Sequenz der mtDNA von *F. hepatica* (Banden im Abstand von 85 bp) sowie die amplifizierten ITS-Regionen der Schnecke (1200 bp) und *F. hepatica* (1300 bp) angezeigt. Zur Prüfung der Sensitivität wurde DNA von einer negativen Schnecke mit DNA von einer bekannten Anzahl *F. hepatica*-Mirazidien gemischt. Eine Mirazidie (0,8 ng/µl) war in 7 ng/µl Schnecken-DNA nachweisbar. Eine Ausführung der Multiplex-PCR mit einer internen Positivkontrolle wurde ebenfalls von CARON et al. (2011) mit dem Ziel des Ausschlusses von PCR-Inhibitoren beschrieben.

Die Multiplex-PCR findet auch in anderen Bereichen der Parasitologie Anwendung. Beispielsweise wurden in der Echinococcus-Forschung elf Primerpaare in die PCR eingespeist, um verschiedene Genotypen des *E. granulosus*-Komplex zu unterscheiden. Die Autor/innen BOUBAKER et al. (2013) erkannten einen negativen Einfluss von Fremd-DNA auf die Sensitivität dieser Methode. Mindestens 5 ng Parasiten-DNA für ein Nachweis in 1 µg Fremd-DNA waren notwendig.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Untersuchungen zum Infektionsstatus der teilnehmenden Betriebe

1.1. Betriebe mit Trematodenbefall

Bei den untersuchten Betrieben handelte es sich um rinderhaltende Betriebe, die im Rahmen von regulären Bestandsdiagnostikbesuchen der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung der LMU München beraten wurden. Zwischen Juli 2017 und Oktober 2019 wurden Bestandsbesuche bei 24 Betrieben im süddeutschen Raum durchgeführt. Es befanden sich vorberichtlich Rinder mit Pansenegel- und/oder Leberegelinfektion im Bestand, weshalb sich entweder die Betriebsleiter/innen, die Hoftierärzt/innen oder Berater/innen von Bio-Verbänden mit der Bitte um Beratung an die Klinik wandten. Am Tag des Bestandsbesuchs wurden Kotproben und in Milchviehbetrieben zusätzlich Serumproben genommen, die Weiden begangen und vor Ort Schnecken gesammelt. Im Anschluss daran erhielten die Landwirt/innen, die Tierärzt/innen und gegebenenfalls die Berater/innen einen schriftlichen Bericht, welcher die Ergebnisse der Laboruntersuchungen zusammenfasste und einen betriebsindividuellen Vorschlag zum Trematodenmanagement enthielt.

Die Kot- und Serumproben gaben Aufschluss über den Infektionsstatus von Pansen- und Leberegelinfektionen im Bestand. Ab einem koproskopisch positiven Befund bei mindestens einem Tier galt der Betrieb als Pansenegel- oder entsprechend Leberegel-infiziert. Für die Beurteilung einer Leberegelinfektion waren zusätzlich die Ergebnisse des *Fasciola hepatica*-ELISAs entscheidend. War der Kotbefund negativ und der ELISA bei mindestens einer Kuh positiv, wurde der Infektionsstatus für den gesamten Betrieb als positiv bewertet. Aufgrund dieser Kriterien musste ein Betrieb von der Studie ausgeschlossen werden. Zwei weitere Betriebe wurden ausgeschlossen, da keine Schnecken gefunden worden sind.

1.2. Kotprobenuntersuchung

Es wurden mindestens fünf Einzelkotproben von Rindern entweder direkt aus dem Rektum entnommen oder frisch vom Boden gesammelt.

Der Nachweis von Pansenegel- und Leberegeleiern erfolgte mittels Sedimentationsmethode (modifiziert nach DEPLAZES et al. (2020) mit 3x 15 min Sedimentation der Suspension). Anschließend wurde eine koproskopische Untersuchung des Sediments durch das Labor der Klinik für Wiederkäuer mit

Ambulanz und Bestandsbetreuung durchgeführt. Die Panseneigel- und Leberegeleier wurden anhand der Eiform, -farbe und -größe identifiziert.

1.3. *Fasciola hepatica*-ELISA

Zur serologischen Untersuchung auf *F. hepatica*-Antikörper in den Milchviehbetrieben wurden von allen Kühen Einzelblutproben an der Schwanzvene entnommen. Der Test wurde im Labor der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung mit dem *Fasciola hepatica* Antibody Test Kit (IDEXX Laboratories, Inc.) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Da die Ausscheidung von *F. hepatica*-Eiern intermittierend ist, eignete sich dieser Test zur zusätzlichen Untersuchung auf *Fasciola hepatica*, um den Infektionsstatus einer Herde zu bestimmen. Der Nachweis von Antikörpern ist hinweisend für eine aktuelle oder kürzlich durchgemachte Infektion. Spezifische Antikörper sind laut Testanleitung bis 12 Wochen nach einer erfolgreichen Behandlung nachweisbar.

2. Aufbereitung der Schneckenproben

2.1. Schneckensammlung

Am Besuchstag wurden die Weiden der Betriebe besichtigt und mögliche Habitate von *Galba truncatula* inspiziert. Als potenzielle Habitate wurden langsam fließende, seichte Gewässer, wie kleine Bachläufe oder (Drainage-)Gräben, dauerhaft nasse Flächen durch Quellwasser oder Hangwasseraustrittstellen, Uferzonen von fließenden Gewässern und Teichen, moorige Flächen und Brunnen nach Schnecken abgesucht (vgl. II.2.2.1). Auch Sekundärhabitate, also Habitate mit temporär nassen oder feuchten Stellen, die beispielsweise durch starken Regenfall entstehen, wurden inspiziert. Die Habitate wurden mit eingewiesenen Hilfskräften für 15-30 Minuten nach Schnecken abgesucht. Dabei lag der Fokus auf *Galba truncatula* und anderen Schneckenarten die zur Unterordnung der Wasserlungenschnecken (Basommatophora) gehören. Sind keine Wasserlungenschnecken gefunden worden, wurden auch Landlungenschnecken, die sich in dem Habitat aufhielten, gesammelt. Wenn massenhaft Schnecken vorhanden waren, wurden Stichproben gesammelt.

Pro Habitat wurden die Schnecken zusammen in Kotprobenbechern mit Wasser aus dem entsprechenden Habitat transportiert und im Labor bei 4 °C zwischengelagert bis zur Konservierung.

2.2. Konservierung der Schnecken

Alle im Jahr 2017 und 2018 gesammelten Schnecken wurden in Polypropylen-Röhrchen mit Ethanol ($\geq 99,5\%$, Ph. Eur., reinst) konserviert und bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die zur Durchleuchtungsmikroskopie vorgesehenen, im Jahr 2019 gesammelten Schnecken, wurden ohne Medium bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $1,5\text{ ml}$ Reaktionsröhrchen gelagert. Schnecken aus denselben Habitaten wurden bei beiden Konservierungsmethoden im selben Gefäß konserviert und gelagert.

2.3. Schneckenartenbestimmung

Die Bestimmung der Schneckenart wurde bei allen Schnecken, die in Ethanol ($\geq 99,5\%$) konserviert wurden, zusammen mit einer Mitarbeiterin der Zoologischen Staatssammlung München der Sektion „Mollusca“ anhand der morphologischen Merkmale der Schneckengehäuse durchgeführt. Als Hilfsmittel wurden die Bestimmungsbücher von GLÖER (2002), BOGON (1990) und WIESE (2014) verwendet. Die einzufrierenden Schnecken wurden von der Autorin mit Hilfe des Bestimmungsbuches von GLÖER and MEIER-BROOK (2003) vor der Konservierung morphologisch bestimmt.

2.4. Vermessung der Schneckengrößen

Bei allen Schnecken wurde vor der DNA-Extraktion die Gehäusehöhe, von der unteren Kante der Mündungsöffnung bis zur Gehäusespitze bzw. zur oberen Gehäusekante, mit einem Lineal auf $0,5\text{ mm}$ gerundet vermessen. Schnecken unter einer Gehäusehöhe von $3,0\text{ mm}$ wurden vom Versuch ausgeschlossen.

2.5. Mikroskopie der Schnecken

Alle tiefgefrorenen Schnecken wurden vor der Bearbeitung zur DNA-Extraktion mikroskopiert und auf Larvenstadien von Pansen- und Leberegeln untersucht. Die Schnecken wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Mit einer Pinzette wurde das Gehäuse zerbrochen und Gehäuseteile wurden bestmöglich entfernt. Der gesamte Schneckenkörper wurde zwischen einer gläsernen Petrischale und einem Objektträger gequetscht und unter dem Mikroskop in 40-facher Vergrößerung inspiziert. Als Vorlage zur Erkennung von Larvenstadien dienten die Abbildungen aus der Publikation von IGLESIAS-PIÑEIRO et al. (2016). Das gequetschte Schneckengewebe wurde zur DNA-Extraktion von der Petrischale und dem Objektträger bestmöglich mit der Pinzette entfernt und in das dafür vorgesehene Röhrchen zur Homogenisierung überführt.

2.6. DNA-Extraktion

Zur DNA-Extraktion wurde das DNeasy blood & tissue Kit von Qiagen genutzt. Der Schneckenkörper wurde in ein Röhrchen mit Keramik-Beads (innuSPEED Lysis

Tube P, Analytik Jena AG), welches mit dem Lysepuffer des Kits versetzt wurde, hinzugegeben. Zur Gewebszerkleinerung wurde das Röhrchen vier Minuten im Homogenisierungsgerät SpeedMill PLUS (Analytik Jena AG) geschüttelt. Anschließend wurde die Probe bei maximaler Drehzahl für eine Minute zentrifugiert (Biofuge® pico, Heraeus). Ca. 180 µl des Überstandes und der gebildete Schaum wurden abpipettiert und in ein 1,5 ml Reaktionsröhrchen überführt. Das Pellet wurde verworfen. Im Rahmen von Vorversuchen wurden zwei unterschiedliche Zerkleinerungsmethoden und Inkubationsdauern verwendet (Tabelle 3). Für die Hauptversuche wurde die maschinelle Zerkleinerung und eine über Nacht-Inkubation gewählt. Die Inkubation erfolgte auf einem Thermoschüttler (BioShake iQ, Analytik Jena AG) bei 56 °C und 250 rpm. Die weitere Verarbeitung verlief nach Herstellerangaben.

Tabelle 3: Anzahl Schnecken mit unterschiedlichen DNA-Extraktionsprotokollen

Anzahl Schnecken	Manuelle Zerkleinerung (Instrumentelle Zerteilung)	Maschinelle Zerkleinerung (SpeedMill PLUS)
1,5 h-Inkubation	95	50
über Nacht-Inkubation	0	544

Die DNA-Konzentration (ng/µl) und die Reinheit der dsDNA (A260/A280) wurde mit einem Nanophotometer (NanoPhotometer Pearl, Implen GmbH) bestimmt. Die DNA-Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -18 °C gelagert.

3. Labordiagnostische Vorversuche: Untersuchungen zur Methodenetablierung der Multiplex-PCR

3.1. Verwendete Proben

Für die Vorversuche wurden zunächst gesammelte Schnecken und adulte Pansen- und Leberegel verwendet. Später kamen im Rahmen von Schneckeninfektionsversuchen Pansenegel-Mirazidien dazu. Die Tabelle 18 gibt eine Übersicht über die verwendeten Proben, die als Positivkontrollen, sowie in Spike- und Kreuzversuchen verwendet wurden mit den gemessenen DNA-Konzentrationen (ng/µl) und Reinheitswerten (A260/280).

3.1.1. Adulte Pansen- und Leberegel

Die adulten Egel stammten aus einer Metzgerei, wo sie als Schlachtbefund eines Jungbullens entnommen und in Ethanol (≥ 99,5 %) konserviert wurden. Zur Gewebszerkleinerung wurde ein ganzer Pansenegel (12 mg) und ein Stück Leberegel (10 mg) separat in ein Röhrchen mit Keramik-Beads und Lysepuffer im SpeedMill PLUS (Analytik Jena AG) (2x 2 min mit 1 min Pause) homogenisiert. Die

DNA-Extraktion erfolgte mit dem DNeasy blood & tissue Kit von Qiagen mit der Abweichung der Verwendung von 250 µl Lysepuffer anstatt den angegebenen 180 µl, aufgrund von starker Schaumbildung in vorhergehenden Proben. Die Proben wurden auf einem Thermoschüttler (BioShake iQ, Analytik Jena AG) für 1,5 h bei 56 °C und 250 rpm inkubiert. Die weiteren Schritte wurden gemäß Herstellerangaben vorgenommen.

Diese Proben wurden in Vorversuchen zur Testung der Primer auf Kreuzreaktionen, Spike-Versuchen und als Positivkontrollen (PK-PE, PK-LE) in den Hauptversuchen genutzt.

3.1.2. Gesammelte Schnecken

Aus einem Studienbetrieb wurden zwei mit *F. hepatica* infizierte *Galba truncatula* (PK-S1 und PK-S2) als repräsentative Proben für das Zwischenwirtsstadium von *F. hepatica* für Kreuzreaktionen in den Vorversuchen verwendet. Die DNA-Extraktion erfolgte analog der adulten Egel (vgl. III.3.1.1). Es wurde jeweils das gesamte Schneckengewebe homogenisiert.

Daneben wurden in der Multiplex-PCR negativ getestete Schnecken als Fremd-DNA-Anteil in Spikeversuchen verwendet. Es handelte sich um eine *Galba truncatula* (NK-SGt) und eine *Radix labiata* (NK-SRI).

3.1.3. Gewinnung der Panseneigel-Mirazidien

Adulte Panseneigel wurden bei einer Hofschlachtung frisch und lebendig entnommen und im Medium PBS körperwarm transportiert. Auf einer beheizten Wärmeplatte (37 °C) wurden die Egel vier Mal in einer Petrischale mit erwärmten PBS und anschließend zwei Mal in erwärmten RPMI 1640 (mit Pen/Strep 250 U/0,25 mg/ml und Amphotericin B 0,625 µg/ml) geschwenkt. Dann wurden sie mit zwei Pinzetten vorsichtig voneinander getrennt und einzeln in eine 24-Well-Platte mit je 1,5 ml RPMI gesetzt. Sie wurden 20 Stunden bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Anschließend wurden die einzelnen Wells mikroskopisch begutachtet. Dabei wurde die Menge der abgelegten Eier, sowie die Motilität der Egel und der Verschmutzungsgrad des Mediums grob beurteilt. Die Egel wurden entfernt und das Medium wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen für 10 min bei 900 x g zentrifugiert. Anschließend wurden 1,4 ml des Überstandes abpipettiert und 100 µl mit dem Sediment wurde einzeln in eine 24-Well-Platte pipettiert. 500 µl destilliertes Wasser wurden dazu gegeben und die Platte wurde für 18 Tage bei 22 °C bei Dunkelheit inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurde der Schlüpfvorgang der entwickelten Mirazidien durch den Lichtreiz ausgelöst. Die Mirazidienaktivität wurde während ca. einer Stunde mikroskopisch beobachtet

(Abbildung 5, Abbildung 6). Anschließend wurden Mirazidien in neue Wells pipettiert. Zur Verhinderung der Motilität wurde 10 μ l Ethanol 70 % in die einzelnen Wells hinzupipettiert, damit eine Zählung vor der DNA-Extraktion möglich wurde. Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem DNeasy blood & tissue Kit von Qiagen nach Herstellerangaben (mit 250 μ l Lysepuffer und mit einer Inkubationsdauer von 1,5 h). Eine Probe diente als Positivkontrolle in Kreuzversuchen (PK-M).

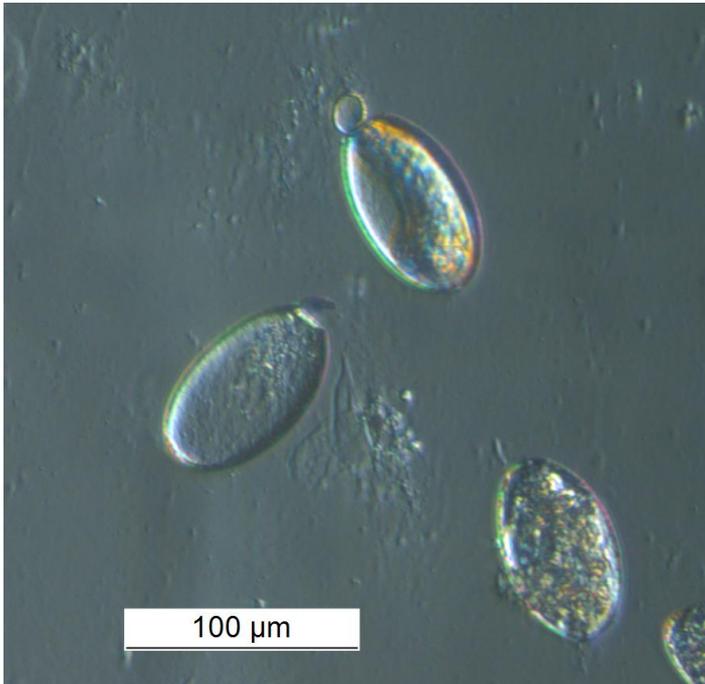


Abbildung 5: oben: Schlüpfende Mirazidie, links: Leere Eihülle (Foto: Andrea Küchler)

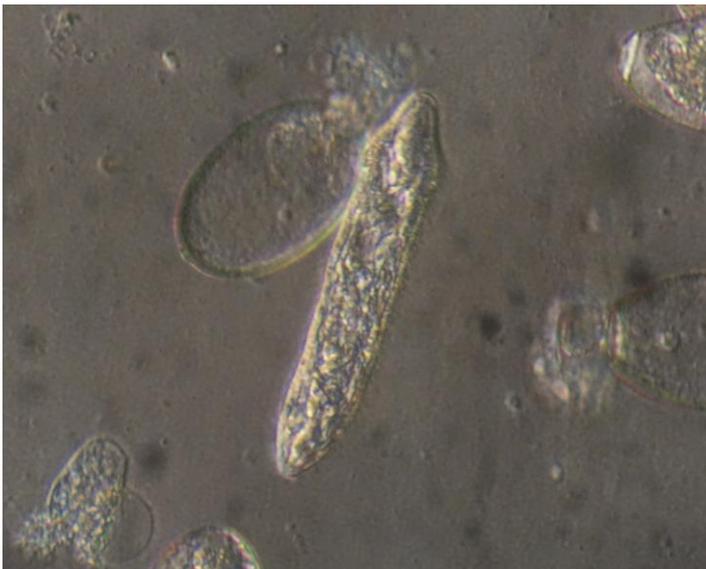


Abbildung 6: Frisch geschlüpfte Mirazidie (Länge ca. 160 μ m) (Foto: Andrea Küchler)

3.2. Kompatibilität publizierter Primerpaare und Untersuchungen zur Spezifität

Zur Eignung der Leberegel- und Pansenegel-Genamplifikation im Multiplex-Versuch wurden unterschiedliche, bereits publizierte Primerpaare getestet (Tabelle 4).

Tabelle 4: Primer-Sequenzen und Literaturnachweise

Name	Spezies und Gen	For.- und Rev.-Primer-Sequenz (5' → 3')	bp	Acc. No.	Literaturnachweis
Cd-Cox	<i>C. daubneyi</i> COX-1	for. TGGAGAGTTTGGCGTCTTTT rev. CCATCTCCACCTCATCTGG	885	JQ815200	MARTÍNEZ-IBEAS et al. (2013)
Cd-Cox Neu	<i>C. daubneyi</i> COX-1	for. GTTTGTGTGGTTTGCCACGG rev. CTACCCCAAGCAGCCACTAC	169	JQ815200	(JONES et al., 2015)
Fhr-II	<i>F. hepatica</i> Fhr-II	for. TGCAGGATGTCACCGTTGTAG rev. AAGTACCCAATGCGCCTCTG	86	-	SCHWEIZER et al. (2007)
Fh-Cox	<i>F. hepatica</i> COX-1	for. GCCGGTCTCAACATAATA rev. AGCACAAAATCCTGATCTTACCA	425	AF216697	MARTÍNEZ-IBEAS et al. (2013)
Fh-Cox Neu	<i>F. hepatica</i> COX-1	for. GCCAGGTCTCAACATAATA rev. AGCACAAAATCCTGATCTTACCA	424	AF216697	Modifizierte Sequenz aus MARTÍNEZ-IBEAS et al. (2011)

Bemerkung: Der Forward Primer Fh-Cox mit der beschriebenen Sequenz aus MARTÍNEZ-IBEAS et al. (2013) wurde aufgrund der Nichtübereinstimmung mit der *F. hepatica*-Sequenz unter der angegebenen Accession number verworfen. Der Forward-Primer wurde an vierter Stelle um eine Base modifiziert und Fh-Cox Neu genannt.

Folgende Kombinationen wurden in Multiplex-Versuchen getestet:

- Primerpaar 1: Cd-Cox und Fhr-II
- Primerpaar 2: Cd-Cox und Fh-Cox
- Primerpaar 3: Cd-Cox und Fh-Cox Neu
- Primerpaar 4: Cd-Cox Neu und Fh-Cox Neu

Dabei wurden die Primerpaare im 1:1-Verhältnis gemäß III.4.3.2 verwendet.

3.2.1. Sequenzierung

Die eingesetzten Positivkontrollen (adulte Pansen- und Leberegel), die verwendeten Proben mit Larvenstadien für die Kreuzversuche, sowie einige ausgewählte Proben aus den Hauptversuchen wurden im Verlauf der Studie mit verschiedenen Primern amplifiziert. Zur Sequenzierung wurden die entsprechenden PCR-Produkte mit dem QIAquick® PCR Purification Kit von Qiagen nach Anleitung aufgereinigt und nach Notwendigkeit verdünnt. Die Sequenzierung wurde bei Eurofins Scientific (Ebersberg) durchgeführt. Die forward-Sequenzen wurden mittels Web BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) des National Center for Biotechnology Information (NCBI) mit den in der Datenbank hinterlegten Sequenzen zur Speziesbestätigung und Beurteilung der Primer-Spezifität abgeglichen.

3.3. Untersuchungen zur Sensitivität

Zur Sensitivitätsprüfung wurden Vorversuche durchgeführt mit zwei Zielsetzungen:

1. Effekt der Schnecke als Fremd-DNA-Anteil
2. Versuch eines Schnecken-Pools

Die Versuche wurden mit den Primerpaaren und dem PCR-Protokoll durchgeführt wie in III.4.3 beschrieben.

Ziel 1: Effekt der Schnecke als Fremd-DNA-Anteil

In diesem Versuch wurde Pansen- und Leberegel-DNA zum einen mit reinem Wasser verdünnt und zum anderen mit Schnecken-DNA unterschiedlicher Konzentrationen gemischt. Dabei wurde untersucht, ob die Schnecken-DNA (als Fremd-DNA-Anteil) Einfluss auf das PCR-Produkt hat.

Hierzu wurde DNA adulter Pansen- und Leberegel auf jeweils dieselbe Konzentration von 0,8 ng/µl und 0,2 ng/µl verdünnt. Gemäß MAGALHAES et al. (2004) stellt eine Mirazidie von 0,8 ng/µl die kleinste biologische Einheit des Parasiten im Zwischenwirtsstadium dar.

Im ersten Durchgang wurden die Proben mit reinem Wasser verdünnt. Im zweiten Durchgang wurden die Proben mit 95,2 ng/µl Schnecken-DNA einer *Radix labiata* (NK-SRI) gemischt. Danach wurde der Effekt unterschiedlicher Schnecken-DNA-Konzentrationen durch den Einsatz von zwei unterschiedlichen Schneckenarten (23,76 ng/µl von NK-SGt vs. 95,2 ng/µl von NK-SRI) verglichen.

Anschließend wurden die Konzentrationen beider Schnecken angeglichen, um festzustellen, ob die DNA-Konzentration der Schnecke als Fremd-DNA grundsätzlich unspezifisch die Ausbeute des PCR-Produktes beeinflusst oder ob eine spezifische Artenunterschiedlichkeit der Schnecken bezüglich der Beeinflussung des PCR-Produktes vorliegen könnte.

Ziel 2: Versuch eines Schnecken-Pools

Aus einem Studienbetrieb des Hauptversuchs wurden fünf *G. truncatula*, bei der eine mikroskopisch nachgewiesene *F. hepatica*-Larven aufwies, zu je 1 µl gemischt und im Multiplex-Versuch getestet. In diesem Feldversuch sollte untersucht werden, ob eine natürlich infizierte Schnecke im 5er-Pool detektiert werden kann.

3.4. Schneckeninfektionsversuche mit Pansenegel-Mirazidien

Die Schneckeninfektionsversuche dienten dem Zweck eine interne Positivkontrolle herzustellen. Dies ist eine Kontrolle, von der bekannt ist, dass sie positiv ist und mit welcher Bürde die Schnecke infiziert wurde. Zudem widerspiegelt diese Probe

die natürliche Zusammensetzung von Panseneigel-DNA durch die enthaltenen Larvenstadien und die Schnecken-DNA als Fremdmaterial.

Die Prozedur bis zur Mirazidien-Gewinnung wird im Abschnitt III.3.1.3 beschrieben.

Das Wasser mit den Mirazidien wurde portionsweise (50 µl) in kleinere Wells aufgeteilt und die Anzahl der Mirazidien pro Well wurde aufgrund der hohen Motilität geschätzt. Eine Portion für die Infektion wurde ausgewählt, wenn sie mehr als 15 Mirazidien enthielt und die Portion mikroskopisch eine, subjektiv beurteilte, geringe Verschmutzung aufwies. Sechs *Galba truncatula* und sechs *Radix labiata* wurden einzeln in je eine Vertiefung einer 24-Well-Platte mit 2950 µl Leitungswasser gegeben. Dazu wurde 50 µl aus den Wells mit aktiven Mirazidien dazu pipettiert. Als Nahrung wurde den Schnecken Salat angeboten.

Zum Zeitpunkt des Zusammenführens lebten alle Schnecken und in allen Vertiefungen war Mirazidien-Aktivität sichtbar. Die abgedeckte 24-Well-Platte wurde bei Raumtemperatur und Tageslicht belassen. Wasser und Salat wurden regelmäßig ausgetauscht.

In 5-Tages-Abständen wurde je eine *Galba truncatula* und eine *Radix labiata* mit Ethanol (≥ 99,5 %) getötet. Anschließend wurden sie mikroskopiert und die DNA mit dem DNeasy blood & tissue Kit von Qiagen gemäß Herstellerangaben isoliert. Die Schnecken wurden mit Haus verarbeitet und in SpeedMill PLUS (Analytik Jena AG) zerkleinert und in 250 µl Lysepuffer und 20 µl Proteinase K für 1,5 h bei 250 rpm und 56 °C inkubiert. Die weitere Aufreinigung verlief nach Herstellerangaben. Die PCR wurde nach dem beschriebenen Protokoll in III.4.3 durchgeführt. Die sechs infizierten *Galba truncatula* wurden mit den Primerpaaren Cd-Cox und Fhr-II und die sechs *Radix labiata* mit den Primerpaaren Cd-Cox und Fh-Cox getestet.

4. Labordiagnostischer Hauptversuch: Prävalenzen der Zwischenwirtsinfektionen mit *C. daubneyi* und *F. hepatica*

4.1. Proben

Die auf den Weiden vorhandenen Habitate wurden wie in III.2.1 beschrieben, nach Schnecken abgesucht. Im Fokus stand der Hauptzwischenwirt *Galba truncatula*. Zusätzlich wurden andere Wasserlungenschnecken, welche als potenzielle Zwischenwirte fungieren könnten, untersucht. Wenn keine Wasserlungen-

schnecken gefunden wurden, sind allenfalls in den Habitaten gefundene Landschnecken untersucht worden.

Für den Hauptversuch wurden Schnecken berücksichtigt, welche dieselben Aufbereitungsprozesse durchliefen. Der einzige Unterschied bestand in der Konservierungsmethode.

4.2. DNA-Extraktion

Die Schnecken wurden ohne Gehäuse in einem Röhrchen mit Keramik-Beads und dem Lysepuffer maschinell über 4 min homogenisiert. Die DNA-Extraktion wurde mit dem DNeasy blood & tissue Kit von Qiagen gemäß Herstellerangaben mit einer Inkubationsdauer von 10-15 h (über Nacht-Inkubation) durchgeführt. Die genaue Aufbereitung der Schnecken ist III.2 zu entnehmen.

4.3. Multiplex-PCR

Alle Proben der Hauptversuche durchliefen dasselbe Protokoll der nachstehend beschriebenen Multiplex-PCR.

4.3.1. Primer

Die Sequenzen der verwendeten Primer Cd-Cox Neu (PE) und Fh-Cox Neu (LE) wurden der Literatur entnommen (Tabelle 4).

Die Primer wurden mit dem vom Hersteller angegebenen Volumen auf eine Konzentration von 100 pmol/µl gelöst. Aus der Stocklösung wurde eine Arbeitslösung mit einer Konzentration von 5 pmol/µl (1:20) erstellt.

4.3.2. Mastermix und Ansätze

Eingefrorene Primer (Arbeitslösungen) und DNA-Proben wurden auf dem Thermoschüttler (BioShake iQ, Analytik Jena AG) bei 60 °C für 5 min aufgetaut. Anschließend wurden sie auf Raumtemperatur ausgekühlt, 20 s gevortext und anzentrifugiert. Die Mastermix-Bestandteile Puffer, dNTP und Taq-Polymerase wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, gevortext und anzentrifugiert.

Folgende Zusammensetzung wurde für den Mastermix verwendet (Angaben pro Ansatz):

- 10 µl Puffer
- 1 µl dNTP
- Je 1,25 µl forw. und rev. Primer von *C. daubneyi* und *F. hepatica* (5 pmol/µl)
- 0,25 µl Taq-Polymerase
- 31,25 µl H₂O

Nach dem Pipettieren des Mastermixes in einem gesonderten Raum unter der Abzugshaube wurde dieser 20 s gevortext und anzentrifugiert. Die

Reaktionslösung setzte sich aus 45 µl Mastermix und 5 µl DNA-Probe zusammen und wurde in ein 0,2 ml Reagenzröhrchen pipettiert. Die Positiv- und Negativkontrolle wurde zum Schluss pipettiert. Die Referenzen zu den Mastermix-Reagenzien sind in Tabelle 17 im Anhang zu finden.

4.3.3. Positiv- und Negativkontrolle

Als Positivkontrolle diente die DNA adulter Pansen- und Leberegel (PK-PE und PK-LE). Die Verarbeitung und DNA-Extraktion der Egel wird in III.3.1.1 beschrieben.

Die Proben wurden in einer Verdünnung von 1:100 zu je 2,5 µl vermischt als Positivkontrolle eingesetzt.

Die Negativkontrolle bestand aus 5 µl Nuklease-freiem, autoklaviertem, DEPC-behandeltem Wasser.

4.3.4. Temperatur-Protokoll

Die Multiplex-PCR wurde im Professional Thermocycler von Biometra Analytik Jena AG und der Software qPCRsoft 3.4 (Analytik Jena AG) durchgeführt (Tabelle 5). Folgendes Temperaturprotokoll wurde angewendet:

Tabelle 5: Temperatur-Protokoll

Phase der PCR	Temperatur (°C)	Dauer (Minuten)	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	2	1
Denaturierung	95	1	30
Primerhybridisierung	59	1	
Elongation	73	1	
Finale Elongation	73	5	1

4.4. Elektrophorese

Die Elektrophorese wurde mit einem automatisierten Elektrophoresesystem von Bio-Rad Laboratories, Inc. durchgeführt. Für die PCR-Analyse wurde das Kit Experion DNA 1K sowie die dazu passenden Chips gewählt. Dieses System bietet eine Auswertung der PCR-Produkte mit Konzentrationen zwischen 0,1 ng/µl und 50 ng/µl, mit einer Auftrennung von 15 bp bis 1'500 bp und einer Sensitivität von 0,1 ng/µl. Diese Spanne wird vom Lower- (15 bp) und Upper-Marker (1'500 bp) begrenzt. Bei jedem PCR-Durchgang wird eine DNA-Leiter mitgeführt, die Sequenzen mit definierten Basenpaarlängen enthält (Abbildung 7 und Tabelle 6). Mit zunehmender Basenpaarlänge nimmt das Fluoreszenzsignal zu, da die fluoreszierenden Moleküle an die DNA binden. Das Fluoreszenzsignal dieser Sequenzen wird in Abhängigkeit der Zeit als Standardkurve dargestellt (Abbildung 8). Anhand dieser Standardkurve werden die Basenpaarlängen der PCR-

Produkte, durch die Messung der stärksten abgegebenen Fluoreszenz (Peak) in Abhängigkeit der Zeit (s), wiedergegeben und deren Konzentrationen aus der Fläche unter dem Peak berechnet. Die PCR-Produkte und Marker werden in Form von Elektropherogrammen und virtuellen Gelen abgebildet. Das Elektropherogramm enthält eine y-Achse mit der Fluoreszenz und eine x-Achse mit der Zeit (s). Das virtuelle Gel bildet eine Übersicht des gesamten Durchlaufes, ohne direkte numerische Angaben der entstandenen Produkte, ab (Abbildung 9). Dabei werden die gemessenen Floreszenzen als Banden dargestellt und lassen sich mit der Leiter vergleichen. Dies kommt der herkömmlichen Methode der Gelelektrophorese nahe.

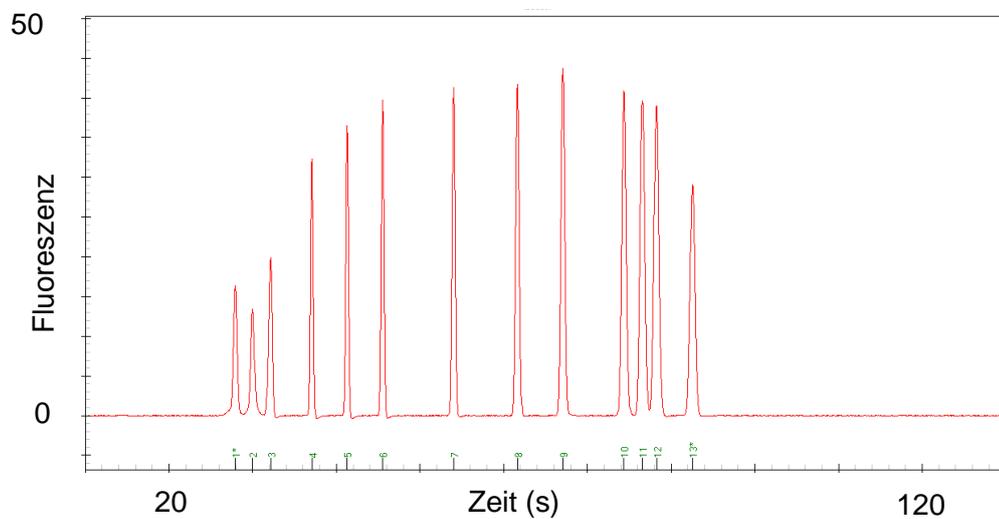


Abbildung 7: Elektropherogramm der Leiter (Sequenzen definierter Basenpaarlängen)

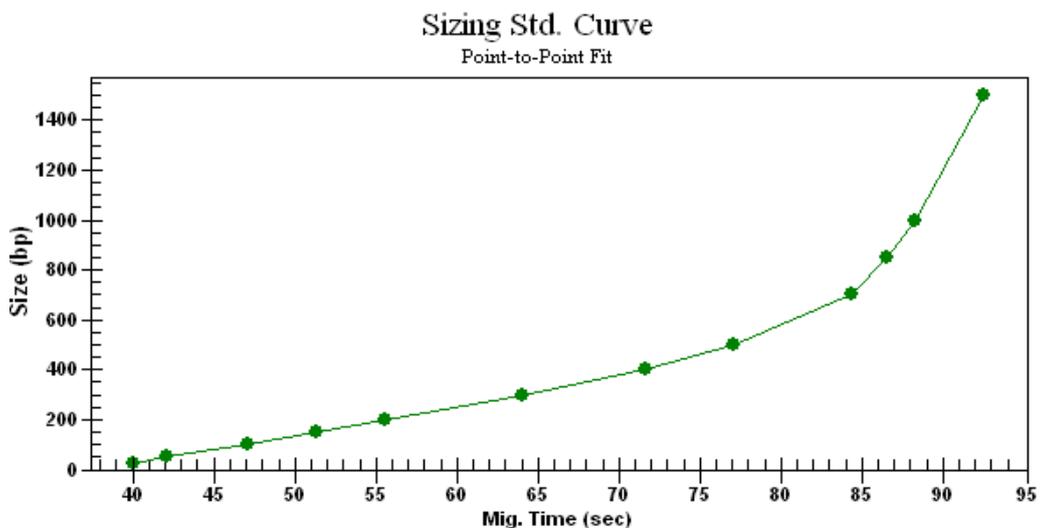
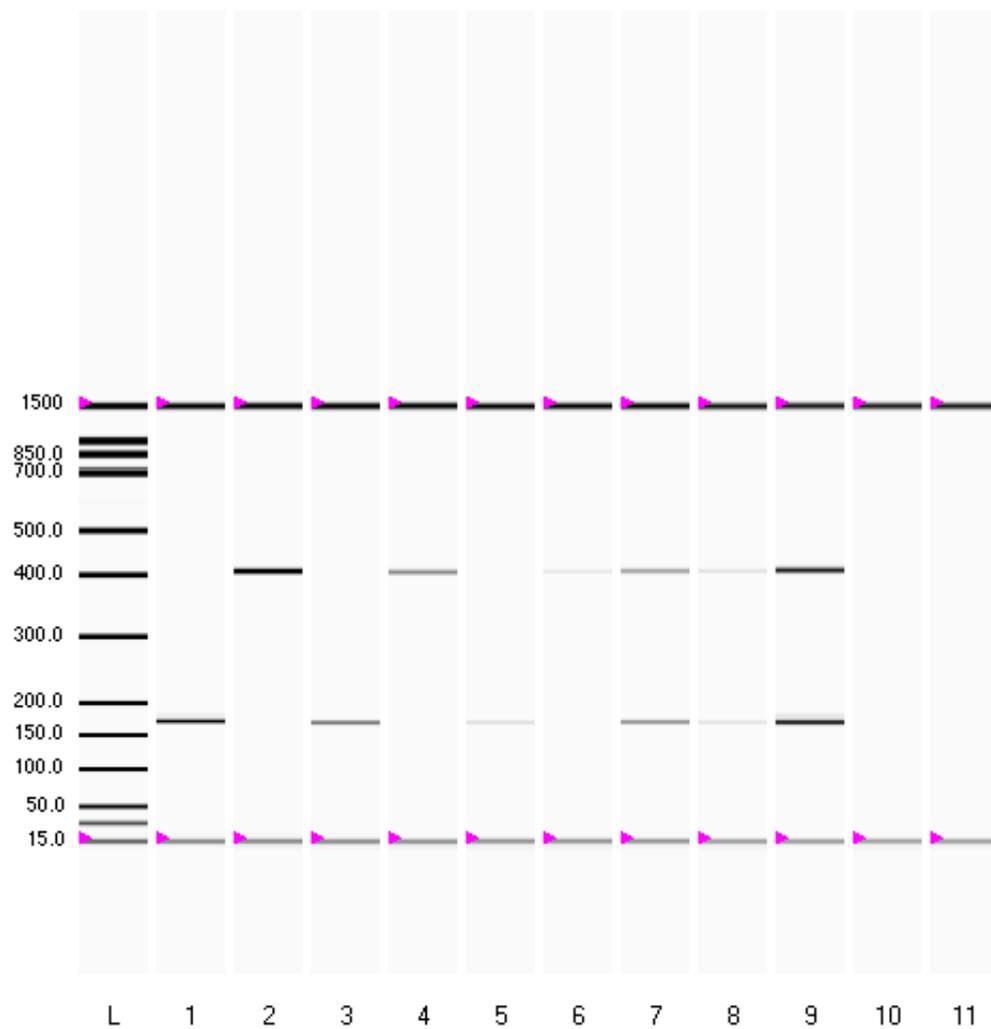


Abbildung 8: Standardkurve der Zeitpunkte der maximalen Fluoreszenzsignale bei definierten Basenpaarlängen (bp)

Tabelle 6: Zeitpunkte (s) der maximalen Fluoreszenz bei der entsprechenden Basenpaarlänge (bp)

Zeit (s)	Basenpaarlänge (bp)
40.00	25
42.15	50
47.10	100
51.30	150
55.55	200
64.00	300

Zeit (s)	Basenpaarlänge (bp)
71.65	400
77.05	500
84.35	700
86.55	850
88.25	1,000
92.55	1,500

**Abbildung 9: Beispiel eines virtuellen Gels einer Multiplex-PCR; L = Leiter; Bahnen 1-6 = 1 Target im Ansatz; Bahnen 7-8 = 2 Targets im Ansatz; Bahn 9 = Positivkontrolle; Bahnen 10-11 = Negativkontrollen**

Der gesamte Vorgang wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Hiervon abweichend wurden die Proben dem System unverdünnt zugeführt. Bei jedem Durchgang wurde eine Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt, welche auf Plausibilität überprüft wurde. Zur Interpretation wurde die bp-Länge eines ausgelesenen Peaks mit der Positivkontrolle verglichen. Vom System detektierte Peaks mit einer Abweichung von +/- 10 bp von der Positivkontrolle dieses Durchgangs wurden als positive Probe interpretiert. Hiervon abweichende detektierte Peaks wurden als unspezifische Reaktionen gewertet. Wurde im Elektropherogramm ein Signal angezeigt, welches in dieser Spanne kein Peak darstellte, sondern eine abgerundete Form zeigte, wurde die Probe wiederholt.

4.4.1. Prävalenzbestimmung

Eine Schneckeninfektion wurde in dieser Arbeit definiert als detektierter Peak im Elektropherogramm mit einer Abweichung von maximal +/- 10 bp von der entsprechenden Positivkontrolle. Ebenso wurde eine Schneckeninfektion festgestellt, wenn in der Mikroskopie Larvenstadien von Pansen- oder Leberegel gesehen wurden. Diese Resultate wurden zur Prävalenzbestimmung herangezogen.

IV. ERGEBNISSE

1. Betriebe und Schneckenfunde

1.1. Infektionsstatus der Betriebe mit Schneckenfunden

Von den 21 besuchten Betrieben waren 18 Milchviehbetriebe und drei Betriebe mit Mutterkuhhaltung vertreten. Die Bestandsgrößen lagen zwischen 12 und 140 adulten Rindern.

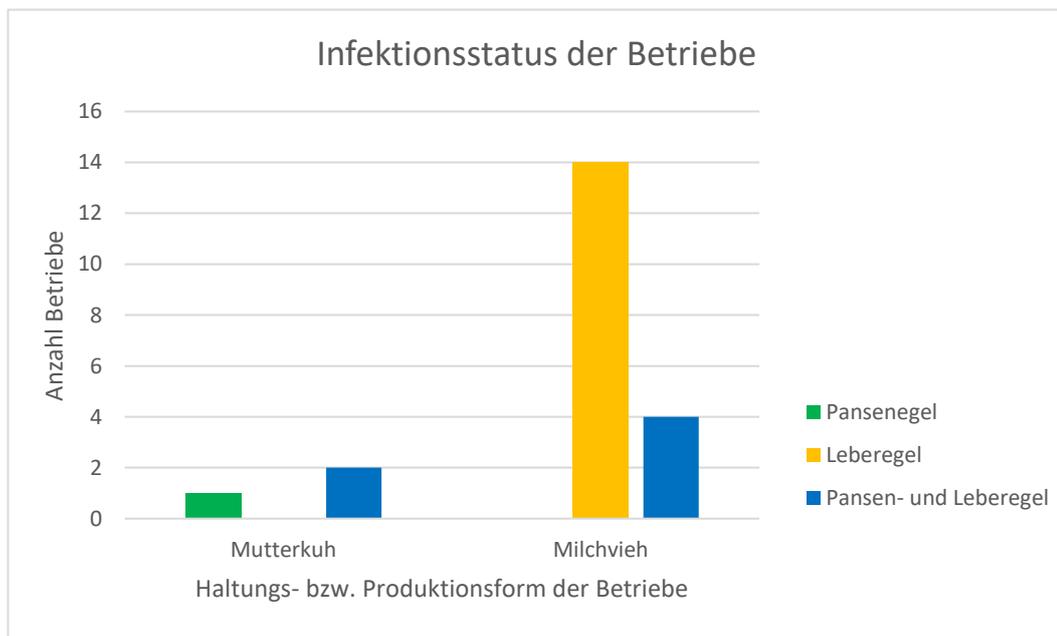


Abbildung 10: Balkendiagramm der Infektionsstatus der Betriebe

Der Großteil der beteiligten Betriebe (66,67 %) hatte gemäß den Untersuchungen nur Leberegel im Bestand (Abbildung 10). Fast ein Drittel (28,57 %) war von einer Mischinfektion mit Pansen- und Leberegeln betroffen. Bei einem Mutterkuhbetrieb ließen sich nur Pansenegel nachweisen.

Die Tabelle 7 zeigt einen Überblick über die möglichen Kombinationen der Befunde und den daraus resultierenden Infektionsstatus der Betriebe. Bei einem Betrieb mit gemischten Infektionen wurden in den Kotproben keine Leberegel-Eier nachgewiesen. Hierbei war der *F. hepatica*-ELISA für die Beurteilung des Infektionsstatus entscheidend. Ein Betrieb, der zwei Mal besucht wurde, wies jeweils gemischte Infektionen auf. Bei einem Besuch waren die Kotproben Leberegel-negativ und der ELISA positiv. Bei der Mehrheit der Leberegelbetriebe (n=8) war nur der serologische Befund positiv und bei den beprobten Tieren waren keine Eier nachweisbar. Beim Nachweis von Leberegel-Eiern war bei allen Betrieben die Serologie ebenfalls positiv.

Tabelle 7: Anzahl Betriebe mit Befunden und Infektionsstatus

Mögliche Kombinationen der Befunde			Anzahl Betriebe	Infektionsstatus
Koproskopie PE	Koproskopie LE	Serologie LE		
+	+	+	2 + 0,5*	PE und LE
+	+	-	0	
+	-	+	1 + 0,5*	PE
+	+	n. u.	2	
+	-	-	0	
+	-	n. u.	1	LE
-	+	+	6	
-	+	-	0	LE
-	-	+	8	
-	+	n. u.	0	
Total			21	

Symbol- und Begriffserklärung: * markiert Dezimalwerte (0,5), welche für die Befundkombination von jeweils einem Besuch bei einem Betrieb mit zwei Betriebsbesuchen stehen; n. u.=nicht untersucht; PE=Pansenegel; LE=Leberegel

1.1.1. Geografische Verteilung der Betriebe

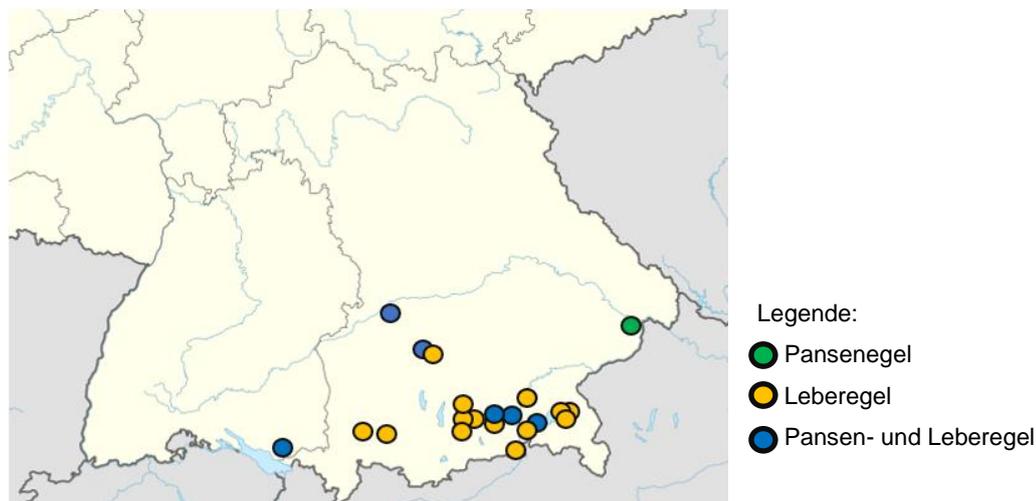


Abbildung 11: Kartenausschnitt von Baden-Württemberg und Bayern mit besuchten Betrieben mit den jeweiligen Infektionsstatus

Der Kartenausschnitt (Abbildung 11) zeigt die geografische Verteilung der besuchten Betriebe. Alle Betriebe befanden sich im süddeutschen Raum, größtenteils in Oberbayern. Ein Betrieb lag im bayerischen Bezirk Schwaben, einer in Niederbayern und einer im südlichen Baden-Württemberg.

1.1.2. Saisonale Verteilung der Probensammlung

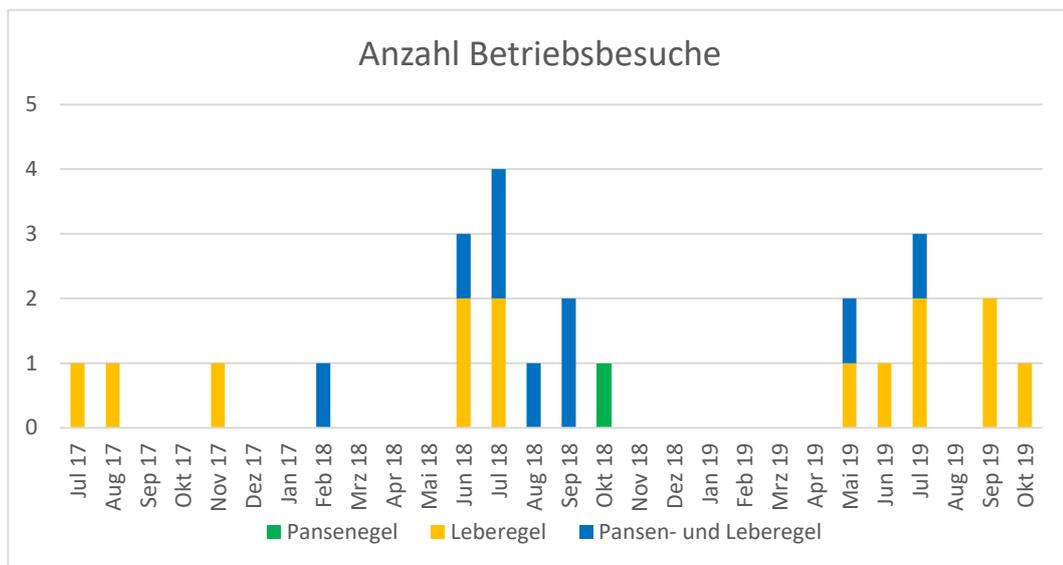


Abbildung 12: Balkendiagramm der saisonalen Verteilung der Betriebsbesuche mit Markierung des Infektionsstatus

Die Abbildung 12 zeigt die saisonale Verteilung der Betriebsbesuche. Die 24 Betriebsbesuche fanden zwischen Juli 2017 und Oktober 2019 statt. Im Juni 2018 sowie Juli 2018 und 2019 wurden die meisten Betriebsbesuche unternommen. Zwei Betriebe wurden zwischen den Weidesaisons im November und Februar besucht. Von den sechs Betrieben mit einer Mischinfektion wurden drei zweimal besucht, wobei sich der Status nicht geändert hat.

1.2. Gefundene und bestimmte Schneckenarten

Bei den 24 Bestandsbesuchen wurden 1'126 Schnecken gesammelt. Darunter waren 13 Arten von Wasserlungenschnecken aus fünf Familien vertreten und fünf Familien von Landlungenschnecken, wovon nicht alle Arten differenziert wurden. 544 Schnecken wurden in den Hauptversuchen zur Ermittlung der Prävalenz von *F. hepatica* und *C. daubneyi*-Infektionen in Zwischenwirten untersucht. Die Gründe für einen Ausschluss waren folgende:

- Schnecken mit einer Gehäusegröße < 3 mm
- Verlust in der Verarbeitung
- Eingrenzung des Untersuchungsumfanges durch Stichproben
- Ausschluss von Landlungenschnecken, wenn in dem Betrieb Wasserlungenschnecken gefunden wurden
- Ausschluss aus Hauptversuchen, wenn anderes Protokoll der Extraktionsmethode angewendet wurde

Die Tabelle 8 gibt eine Übersicht über die in der Sammlung vertretenen Schneckenarten.

Tabelle 8: Gefundene Schneckenarten

Basommatophora (Wasserlungenschnecken)	
Familie	Art
Lymnaeidae (Schlamm- schnecken)	<i>Galba truncatula</i> O. F. MÜLLER 1774 (Zwergschlammschnecke)
	<i>Radix balthica</i> LINNAEUS 1758 (Gemeine Schlammschnecke)
	<i>Radix labiata</i> ROSSMAESSLER 1835 (Alpen- Schlammschnecke)
	<i>Radix auricularia</i> LINNAEUS 1758 (Ohrschlammschnecke)
	<i>Stagnicola palustris</i> O. F. MÜLLER 1774 (Gemeine Sumpfschnecke)
Planorbidae (Teller- schnecken)	<i>Planorbis planorbis</i> LINNAEUS 1758 (Gemeine Tellerschnecke)
	<i>Planorbis carinatus</i> O. F. MÜLLER 1758 (Gekielte Tellerschnecke)
	<i>Gyraulus parvus</i> SAY 1817 (Amerikanisches Posthörnchen)
	<i>Bathyomphalus contortus</i> LINNAEUS 1758 (Riementellerschnecke)
Physidae (Blasen- schnecken)	<i>Physella acuta</i> DRAPARNAUD 1805 (Spitze Blasenschnecke)
	<i>Aplexa hypnorum</i> LINNAEUS 1758 (Moosblasenschnecke)
Hydrobiidae (Wasserdeckel- schnecken)	<i>Potamopyrgus antipodarum</i> GRAY 1843 (Neuseeländische Deckelschnecke)
Bithyniidae (Schnauzen- schnecken)	<i>Bithynia tentaculata</i> LINNAEUS 1758 (Gemeine Schnauzenschnecke)
Stylommatophora (Landlungenschnecken)	
Familie	Art
Succineidae (Bernstein- schnecken)	<i>Succinea putris</i> LINNAEUS 1758 (Gemeine Bernsteinschnecke)
	<i>Succinea</i> spp. (Bernsteinschnecke, nicht spezifiziert)
Cochlicopidae (Glatt- schnecken)	<i>Cochlicopa lubrica</i> O. F. MÜLLER 1774 (Gemeine Glattschnecke)
	<i>Cochlicopa nitens</i> GALLENSTEIN 1848 (Glänzende Glattschnecke)
Oxychilidae (Glanz- schnecken)	<i>Aegopinella pura</i> ALDER 1830 (Kleine Glanzschnecke)
	<i>Aegopinella</i> spp. (Glanzschnecke, nicht spezifiziert)
Gastrodontidae (Dolch- schnecken)	<i>Zonitoides</i> sp. (Dolchschncke, nicht spezifiziert)
Hygromiidae (Laub- schnecken)	<i>Petasina edentula</i> DRAPARNAUD 1805 (Zahnlose Haarschnecke)

Eine detaillierte Auflistung der gesammelten Schneckenarten, aufgeteilt nach Betrieben ist in Tabelle 19 im Anhang zu finden

2. Labordiagnostische Vorversuche: Untersuchungen zur Methodenetablierung der Multiplex-PCR

2.1. Primer-Kompatibilität und -Spezifität

2.1.1. Primerpaar 1: Cd-Cox (PE) und Fhr-II (LE)

Die Multiplex-Versuche mit den Primern Cd-Cox und Fhr-II ergaben Banden bei den erwarteten Basenpaarlängen. Die PCR-Produkte der mit *F. hepatica*-infizierten *G. truncatula* (PK-S1) lagen unabhängig vom Verdünnungsgrad der Ansatz-DNA (unverdünnt, 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10) stets unter 1 ng/μl. Die Positivkontrolle mit adulter Egel-DNA (PK-PE und PK-LE) zeigte eine deutliche Diskrepanz der Signalstärken (Abbildung 13).

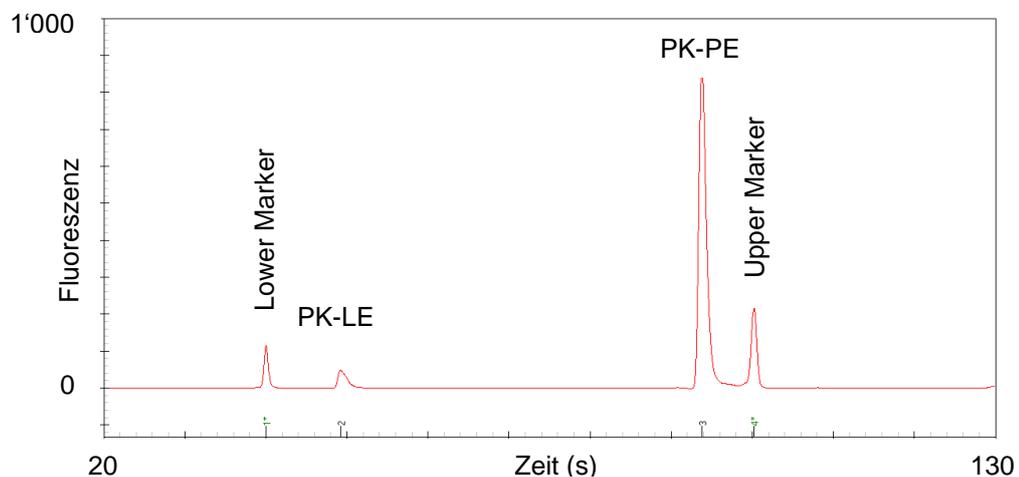


Abbildung 13: Elektropherogramm der Positivkontrollen mit Primern Cd-Cox und Fhr-II

Bei weiteren Untersuchungen wurden die Primer Cd-Cox und Fhr-II im Multiplex-Versuch mit *C. daubneyi*-Mirazidien getestet. Dabei gab es bei mehreren Proben unspezifische Banden bei 81 bp. Auch Negativkontrollen wiesen dieses Signal auf.

2.1.2. Primerpaar 2: Cd-Cox (PE) und Fh-Cox (LE)

Die Primerpaar-Kombination aus MARTÍNEZ-IBEAS et al. (2013) ergab deutliche Peaks mit der erwarteten Basenpaarlänge (Abbildung 14). Die Negativkontrolle war nicht in jedem Durchlauf negativ. Unspezifische Peaks waren bei Basenpaarlängen um 41-45 bp zu sehen.

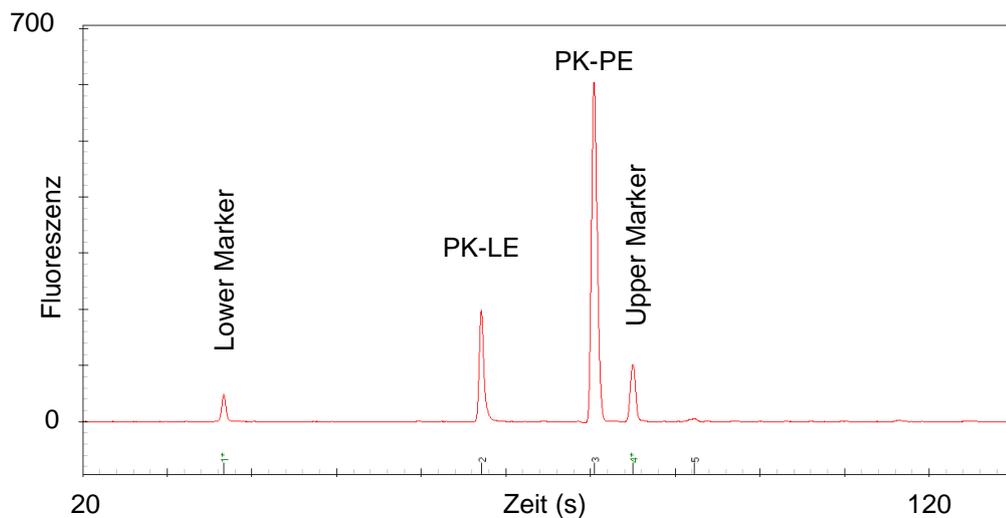


Abbildung 14: Elektropherogramm der Positivkontrollen mit Primern Cd-Cox und Fh-Cox

2.1.3. Primerpaar 3: Cd-Cox (PE) und Fh-Cox Neu (LE)

Bei dieser Kombination kamen in Multiplex-Versuchen unspezifische Reaktionen vor. Diese lagen zwischen 102 bp und 105 bp. Die Negativkontrolle (NTC) blieb negativ, wenn Fh-Cox Neu allein eingesetzt wurde. Untersuchungen der Larvenstadien von *C. daubneyi* (PK-M) zeigten unspezifischen Reaktionen zwischen 49 bp und 63 bp beim Einsatz von Cd-Cox allein, auch in der NTC.

Zusätzlich lieferte die Kombination dieser Primerpaare inkongruente Ergebnisse. Proben die zuvor *Fasciola hepatica*-positive Signale zeigten, waren bei wiederholten Versuchen negativ. Eine Probe mit zwei gepoolten *F. hepatica*-infizierten Schnecken war im Multiplex-Versuch mit Cd-Cox und Fh-Cox deutlich positiv, beim ersten Durchgang mit Cd-Cox und Fh-Cox Neu mit geringerer Konzentration positiv und beim zweiten und dritten Durchgang negativ, obwohl die Positivkontrollen (PTC) in allen vier PCR-Läufen vergleichbar waren (Tabelle 9).

Tabelle 9: Multiplex-PCR-Durchläufe eines 2er-Pools mit *F. hepatica* infizierten Schnecken

Primerpaare	Konzentration des PCR-Produktes (ng/μl)	Konzentration der PTC (ng/μl)
Cd-Cox und Fh-Cox	3,68	8,78
Cd-Cox und Fh-Cox Neu (1. Durchgang)	0,34	10,50
Cd-Cox und Fh-Cox Neu (2. Durchgang)	kein Signal	7,72
Cd-Cox und Fh-Cox Neu (3. Durchgang)	kein Signal	9,08

2.1.4. Primerpaar 4: Cd-Cox Neu (PE) und Fh-Cox Neu (LE)

Bei dieser Primerpaar-Kombination traten sowohl bei den adulten Egel-Proben (PK-PE, PK-LE) als auch bei den Larven-Proben (PK-M, PK-S2) spezifische Reaktionen mit der erwarteten bp-Länge auf (Tabelle 10, Abbildung 16). Bei den adulten Proben wurden jeweils zwei Peaks detektiert (Abbildung 15). Bei *C. daubneyi* war das Produkt dieses Nebenpeaks stets ca. 12 bp länger als das Produkt des Hauptpeaks. Im Elektropherogramm stellte sich dies als zwei eng nebeneinander liegende Peaks dar. Dasselbe Phänomen war mit der adulten *F. hepatica*-Probe zu beobachten. Hier ging im Elektropherogramm dem Hauptpeak ein deutlich kleinerer Nebenpeak voraus mit einem Produkt, welches ca. 20 bp kürzer war. Der Hauptpeak war in allen Versuchen deutlich prominenter als der Nebenpeak. Bei den Larvenstadien (PK-M und PK-S2) trat der Nebenpeak nicht auf.

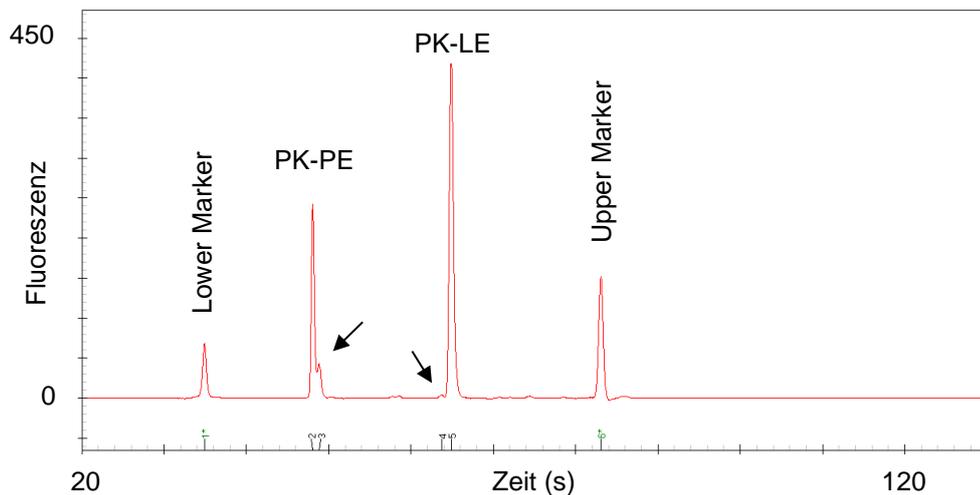


Abbildung 15: Elektropherogramm der Positivkontrollen mit Primern Cd-Cox Neu; Hauptpeaks mit den jeweiligen Nebenpeaks (Pfeile)

Der Tabelle 10 sind die jeweiligen Konzentrationen und bp-Längen der PCR-Produkte aus den Haupt- (fett gedruckt) und Nebenpeaks eines Multiplex-Versuchs mit den Positivkontrollen zu entnehmen. Dabei wurden die Primer auf Kreuzreaktionen zwischen *C. daubneyi* und *F. hepatica* getestet. Die Abbildung 16 zeigt das virtuelle Gel dieses Versuches. Dabei wurde die Darstellung aller Banden anhand des größten Peaks kalibriert, weswegen schwache Signale im virtuellen Gel kaum oder nicht mehr sichtbar sein können (vgl. insbesondere Bahn 7 in Tabelle 10 und Abbildung 16).

Tabelle 10: Multiplex-PCR (Cd-Cox Neu und Fh-Cox Neu) der Positivkontrollen mit Auswertungen der bp-Längen und PCR-Produkt-Konzentrationen

Bahn	Proben	bp	Konzentration (ng/μl)
1	PK-PE	171	4,81
		182	1,01
2	PK-M	82*	0,17
		170	1,12
3	PK-LE	389	0,06
		409	10,18
4	PK-S2	409	0,29
5	PK-PE + PK-LE	170	4,61
		181	0,87
		390	0,07
		410	7,29
6	PK-M + PK-S2	170	0,22
		412	0,53
7	PK-PE + PK-S2	171	4,91
		182	0,85
		415	0,09
8	PK-LE + PK-M	171	0,23
		393	0,09
		417	10,36
9	NTC	-	-
10	NTC	-	-
11	H ₂ O	-	-

Symbolerklärung: * unspezifisches Signal

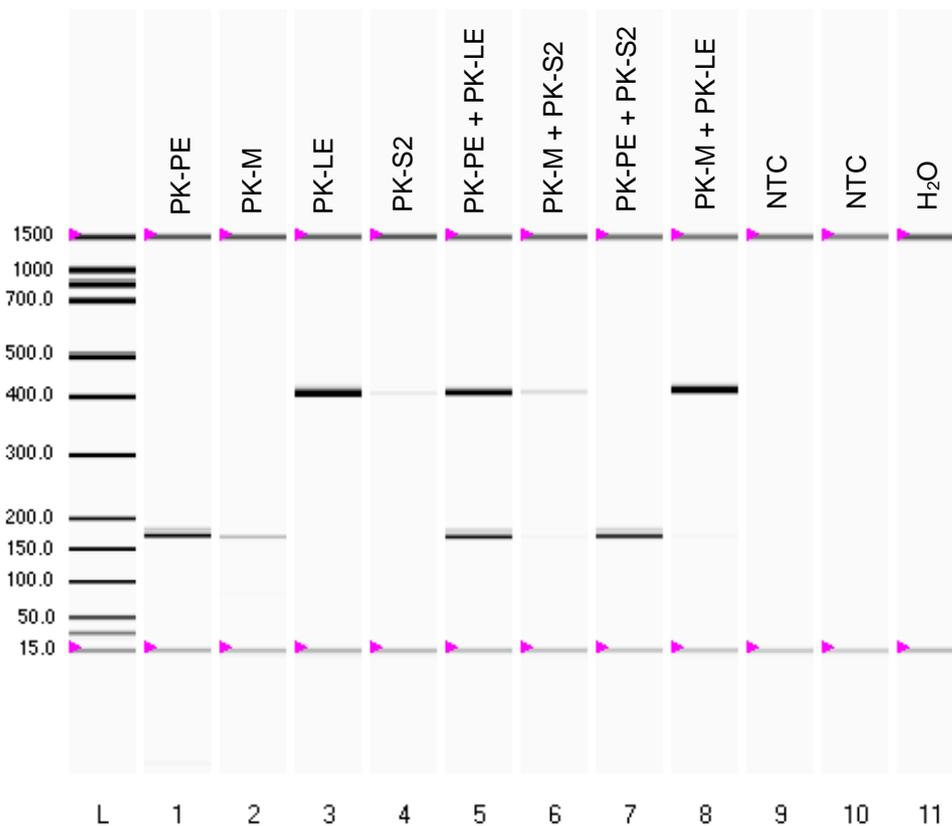


Abbildung 16: Virtuelles Gel der Positivkontrollen mit Primern Cd-Cox Neu und Fh-Cox Neu

2.1.5. Sequenzierungsergebnisse

Zur Sicherstellung der Primer-Spezifität wurden einzelne PCR-Produkte aufgereinigt und sequenziert. Die Sequenzierungsergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Ergebnisse Sequenzierung aus BLAST

Probe	Primer	Spezies	Übereinstimmung	Acc. No.
PK-PE	Cd-Cox	<i>C. daubneyi</i>	98,56 %	JQ815200.1
PK-LE	Fhr-II	<i>F. hepatica</i>	95,56 %	AH004409.2
PK-M	Cd-Cox	<i>C. daubneyi</i>	87,71 %	JQ815200.1
PK-S1	Fhr-II	<i>F. hepatica</i>	97,83 %	AH004409.2
PK-PE + PK-LE	Fh-Cox	<i>F. hepatica</i>	98,48 %	AF216697.1
PK-PE + PK-LE	Cd-Cox Neu	<i>C. daubneyi</i>	97,14 %	JQ815200.1
PK-PE + PK-LE	Fh-Cox Neu	<i>F. hepatica</i>	99,79 %	AP017707.1

2.2. Untersuchungen zur Sensitivität

2.2.1. Einfluss der Schnecken-DNA auf das PCR-Produkt

Bei der Zusammensetzung von 0,8 ng/µl Panseneigel- und Leberegel-DNA und 0,2 ng/µl Panseneigel- und Leberegel-DNA mit H₂O waren alle Signale vorhanden.

Wurden die Proben mit Schnecken-DNA einer Konzentration von 95,2 ng/µl (errechneter Wert) gespiked, konnte keine Leberegel-DNA nachgewiesen werden. Panseneigel-DNA war nachweisbar. Zum direkten Vergleich dieser beiden PCR-Durchläufe dient Tabelle 12 als Übersicht.

Tabelle 12: Vergleich der PCR-Produkte ohne und mit Schnecken-DNA im Ansatz

Konz. Ansatz-DNA	ohne Schnecken-DNA	mit Schnecken-DNA (NK-SRI 95,2 ng/µl)
PE 0,8 ng/µl	Signal	Signal
LE 0,8 ng/µl	Signal	kein Signal
PE 0,2 ng/µl	Signal	Signal
LE 0,2 ng/µl	Signal	kein Signal

Im Direktvergleich mit einer Schnecke mit geringerer DNA-Konzentration (23,76 ng/µl, errechneter Wert) zeigte sich, dass alle Reaktionen spezifische Signale hervorbrachten (Tabelle 13) und bei den Proben mit der höher konzentrierten Schnecke nur ein Signal (PE 0,8 ng/µl) detektierbar war.

Tabelle 13: Vergleich der PCR-Produkte mit unterschiedlichen Schnecken-DNA-Konzentrationen im Ansatz

Konz. Ansatz-DNA	NK-SGt (23,76 ng/µl)	NK-SRI (95,2 ng/µl)
PE 0,8 ng/µl	Signal	Signal
LE 0,8 ng/µl	Signal	kein Signal
PE 0,2 ng/µl	Signal	kein Signal
LE 0,2 ng/µl	Signal	kein Signal

Im Durchgang mit den annähernd angeglichenen Schnecken-DNA-Konzentrationen waren bei allen Reaktionen, außer beim Ansatz LE 0,2 ng/μl mit NK-SGt (23,76 ng/μl), spezifische Signale nachweisbar (Tabelle 14).

Tabelle 14: Vergleich der PCR-Produkte mit annähernd angeglichenen Schnecken-DNA-Konzentrationen

Konz. Ansatz-DNA	NK-SGt (23,76 ng/μl)	NK-SRI 1:3 (31,74 ng/μl)
PE 0,8 ng/μl	Signal	Signal
LE 0,8 ng/μl	Signal	Signal
PE 0,2 ng/μl	Signal	Signal
LE 0,2 ng/μl	kein Signal	Signal

2.2.2. Versuch eines Schnecken-Pools

Beim Versuch eines Pools aus fünf Schnecken, mit einer *F. hepatica*-positiven Schnecke (mit mikroskopisch nachgewiesener Infektion) und vier negativen Schnecken, gab es konträre Ergebnisse. Im ersten Durchgang war der Pool negativ (mit einem unspezifischen Signal von 82 bp Länge) und die ungepoolte positive Schnecke gab ein deutliches Signal bei 406 bp mit einer Konzentration von 4,66 ng/μl.

Bei der Wiederholung des Pools wurde ein abgerundeter Peak aus zwei Signalen bei 389 bp und 393 bp mit Konzentrationen von 0,11 ng/μl und 0,15 ng/μl detektiert (Abbildung 17). Die PTC dieses Durchgangs lag bei 420 bp und die in diesem Durchgang getestete positive Schnecke, die im Pool enthalten war, lag bei der ungepoolten Testung bei 417 bp (0,19 ng/μl). Dieser Peak konnte als spezifisch für *F. hepatica* gewertet werden. Der Peak des 5er-Pools (Abbildung 17) galt mit der festgelegten Spanne von +/- 10 bp von der PTC entfernt, als Kriterium für ein spezifisches Signal, nicht als positiv.

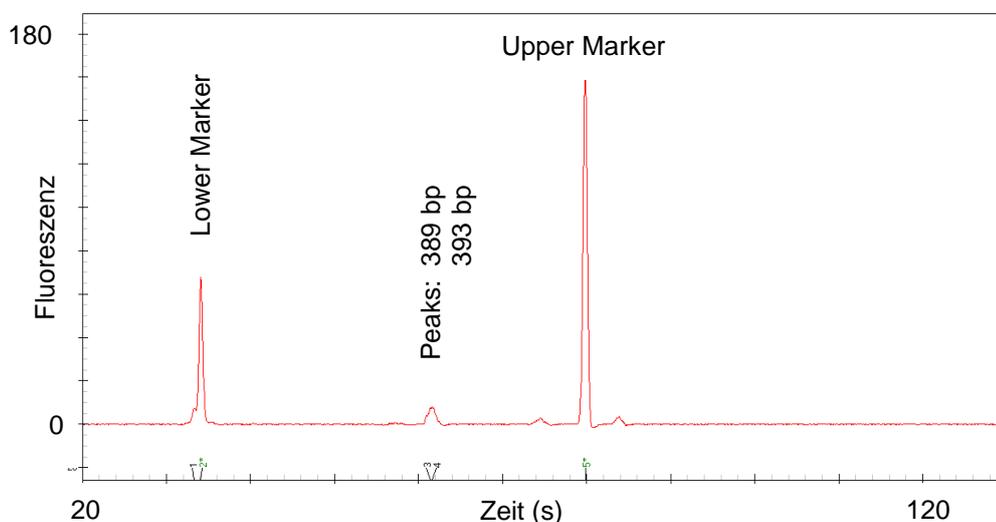


Abbildung 17: Elektropherogramm eines fraglich spezifischen Signals eines 5er-Schnecken-Pool mit einer *F. hepatica*-infizierten Schnecke

Bei einer weiteren Wiederholung des Pools gab es einen spezifischen Peak bei 428 bp mit einer Konzentration von 0,16 ng/ μ l. Die Positivkontrolle lag bei 429 bp. Somit konnte der Peak beim dritten Durchgang als positiv gewertet werden (Abbildung 18).

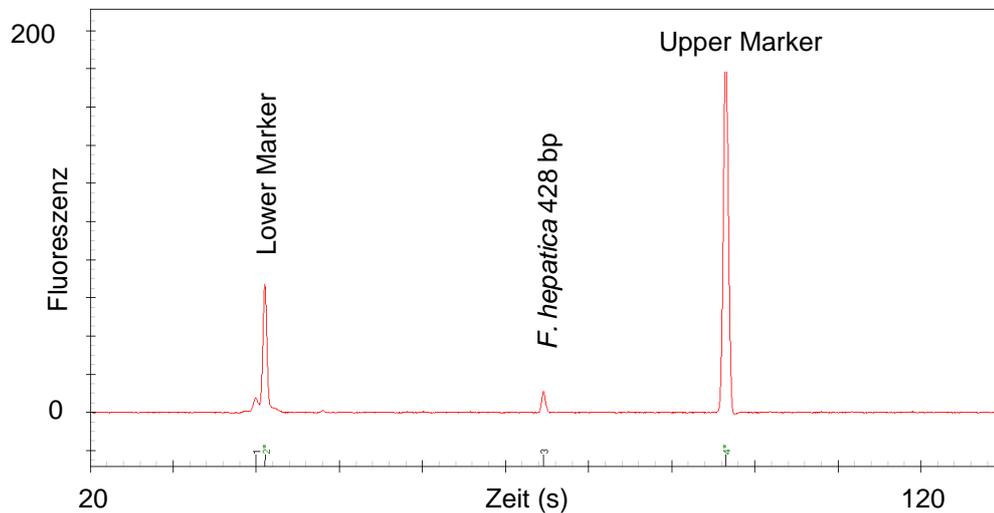


Abbildung 18: Elektropherogramm der Wiederholung des 5er-Schnecken-Pools mit spezifischem Signal für *F. hepatica*

2.3. Schneckeninfektionsversuche mit Pansenegel-Mirazidien

Mit dem genannten Vorversuchsprotokoll wurden alle infizierten Schnecken negativ getestet. Zwei der getesteten *Galba truncatula* wiesen unspezifische Reaktionen (81 bp) auf, welche die Negativkontrolle dieses Durchgangs ebenfalls aufwies (79 bp). In der Mikroskopie waren keine Larvenstadien nachweisbar.

3. Labordiagnostischer Hauptversuch: Prävalenzen von *C. daubneyi* und *F. hepatica* im Zwischenwirt

Gesammelte Schnecken aus 17 Betriebesbesuchen (von 15 Betrieben) wurden für die Ermittlung der Prävalenzen untersucht. Insgesamt wurden 544 Schnecken mit 12 vertretenen Arten (Ausnahme: *Succinea* spp. nicht spezifiziert) untersucht. Davon gehörten 240 der Art *Galba truncatula* an, die als Hauptzwischenwirt fungiert und 304 Schnecken anderer Arten, wovon 20 zu den Landlungenschnecken gehörten. In der Abbildung 19 werden die im Hauptversuch mittels Multiplex-PCR untersuchten Schnecken in einem Balkendiagramm dargestellt.

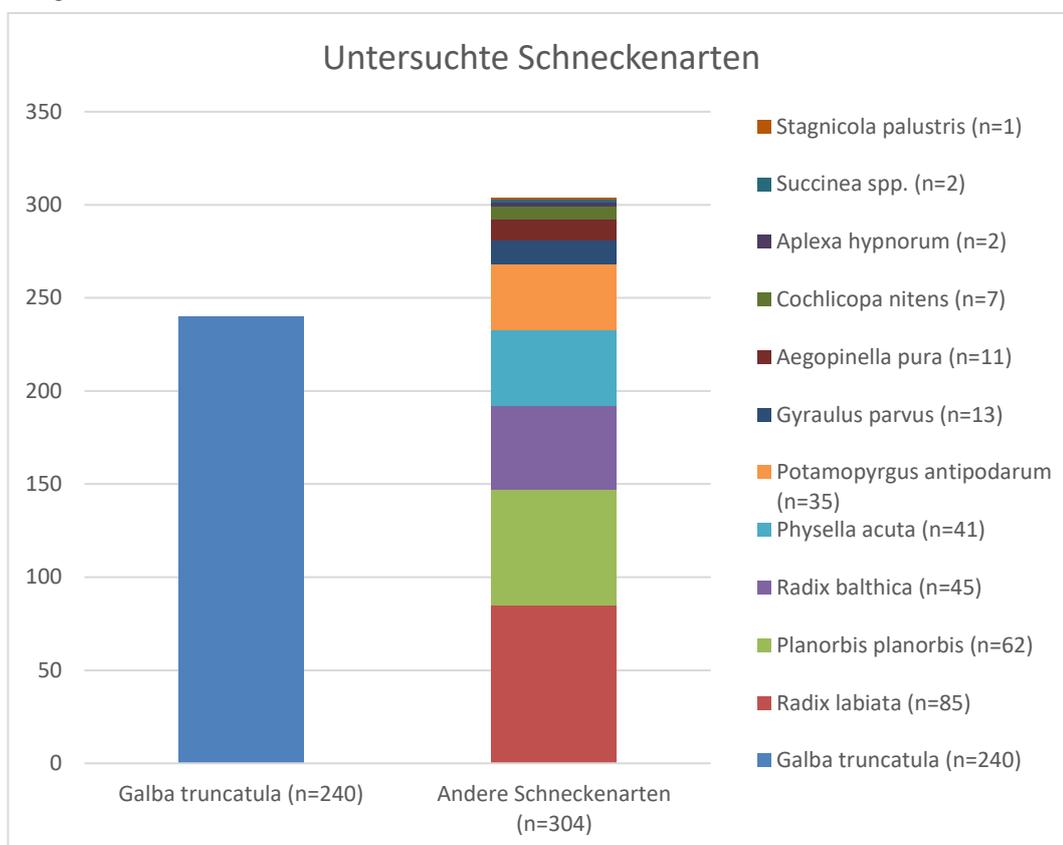


Abbildung 19: Balkendiagramm der im Hauptversuch mittels Multiplex-PCR untersuchten Schneckenarten

3.1. Prävalenzen von *C. daubneyi* und *F. hepatica* in *Galba truncatula*

240 *Galba truncatula* wurden mittels Multiplex-PCR auf Vorhandensein von *C. daubneyi*- und *F. hepatica*-DNA untersucht. Im Vorfeld wurden 138 davon mikroskopisch auf Larvenstadien untersucht. Die Tabelle 15 zeigt eine Übersicht über die ermittelten Infektionsraten.

Tabelle 15: Mittels Multiplex-PCR ermittelte Infektionsraten von *G. truncatula* und Ergebnisse der Mikroskopie

Bestands- besuch	Anzahl <i>G. truncatula</i>			
	Total	<i>C. daubneyi</i> - Infektion	<i>F. hepatica</i> - Infektion	Positive Mikroskopie
07.02.18	40	2	0	-
07.06.18	4	0	0	-
19.06.18	8	0	0	-
03.07.18	14	0	0	-
25.09.18	25	0	0	-
02.10.18	11	0	0	-
08.05.19	3	0	0	0
09.05.19	11	0	3	0
10.07.19	50	0	9	1
17.07.19	20	0	0	0
31.07.19	1	0	0	0
18.09.19	26	0	0	0
25.09.19	10	0	3	3
02.10.19	17	0	0	0
Total	240	2	15	4

Bei 0,83 % der untersuchten *G. truncatula* war eine *C. daubneyi*- und bei 6,25 % eine *F. hepatica*-Infektion mittels Multiplex-PCR nachweisbar. Die Tabelle 21 und Tabelle 22 im Anhang zeigen eine Übersicht über die PCR-Ergebnisse der positiv getesteten Schnecken mit der jeweiligen PCR-Produkt- und Ansatz-DNA-Konzentration.

Bei vier Betrieben konnte eine Pansen- oder Leberegelinfektion in Schnecken nachgewiesen werden. Die Schnecken mit der Pansenegelinfektion wurden im Februar 2018 gesammelt. Von den dort gesammelten *G. truncatula* waren 2/40 (5,0 %) in der Multiplex-PCR positiv für *C. daubneyi*. Die drei Betriebe mit Leberegelinfektionen in den Schnecken wurden im Mai 2019, Juli 2019 und September 2019 besucht und wiesen interne Prävalenzen von 27,3 %, 18,0 % und 30,0 % auf.

Beim Vergleich der Zwischenwirtsinfektionen mit dem Infektionsstatus der Betriebe (Tabelle 19 im Anhang) zeigt sich, dass in allen Fällen die Parasitenart in End- und Zwischenwirt übereinstimmt. Bei zwei Betrieben waren beide Parasiten bei den Rindern nachweisbar, im Zwischenwirt dann im Fall eines Betriebs nur *C. daubneyi* und des anderen nur *F. hepatica*. Bei den anderen beiden dieser vier Betriebe wurde im End- und Zwischenwirt nur *F. hepatica* nachgewiesen.

3.1.1. Sequenzierungsergebnisse

Aus den jeweiligen Betrieben mit Zwischenwirtsinfektionen wurde jeweils das PCR-Produkt einer oder zwei positiven Schnecke(n) zur Speziesbestätigung zur Sequenzierung geschickt. Die Sequenzierungsergebnisse sind der Tabelle 16 zu entnehmen.

Tabelle 16: Sequenzierungsergebnisse

Probe	Primer	Spezies	Übereinstimmung	Acc. No.
PE-positive <i>G. truncatula</i>	Cd-Cox Neu	<i>C. daubneyi</i>	99,23 %	JQ815200.1
PE-positive <i>G. truncatula</i>	Cd-Cox Neu	<i>C. daubneyi</i>	96,99 %	JQ815200.1
LE-positive <i>G. truncatula</i>	Fh-Cox Neu	<i>F. hepatica</i>	99,75 %	AF216697.1
LE-positive <i>G. truncatula</i>	Fh-Cox Neu	<i>F. hepatica</i>	94,07 %	AF216697.1
LE-positive <i>G. truncatula</i>	Fh-Cox Neu	<i>F. hepatica</i>	98,39 %	AP017707.1

3.1.2. Mikroskopie

Bei 4 von 138 *G. truncatula* konnte eine Infektion mit *F. hepatica* mikroskopisch nachgewiesen werden. Die vier Infektionen wurden in der PCR bestätigt. Von den *F. hepatica*-Infektionen der im Mai 2019 gesammelten Schnecken wurde mikroskopisch kein Larvenstadium nachgewiesen. Bei den infizierten Schnecken im Juli konnte in einer von neun in der PCR positiven Schnecken Redien und Zerkarien von *F. hepatica* mikroskopisch dargestellt werden. Die im September gesammelten infizierten Schnecken waren ebenfalls alle bereits in der Mikroskopie positiv. In einer *G. truncatula* waren nur Zerkarien, in einer nur Redien und in der dritten waren Redien und Zerkarien von *F. hepatica* zu sehen (Abbildung 20, Abbildung 21).

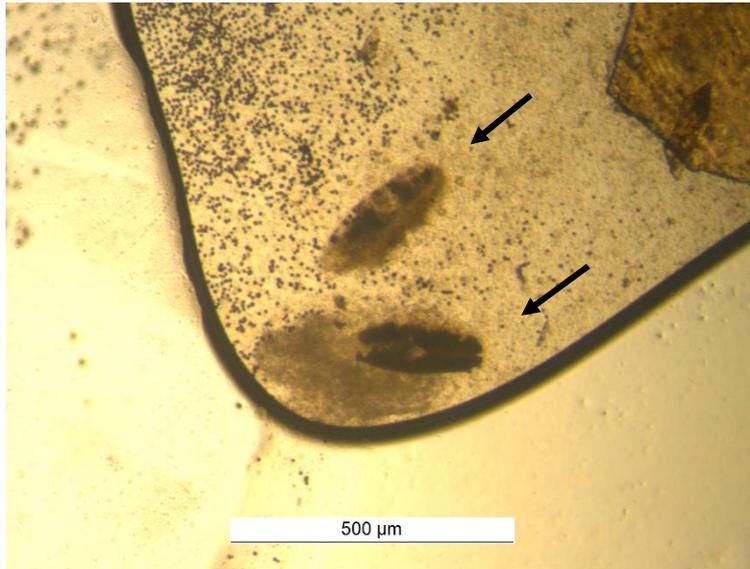


Abbildung 20: Redien von *F. hepatica* in *G. truncatula* (Mikroskopie Quetsch-Präparat, Pfeile) (Foto: Andrea KÜchler)

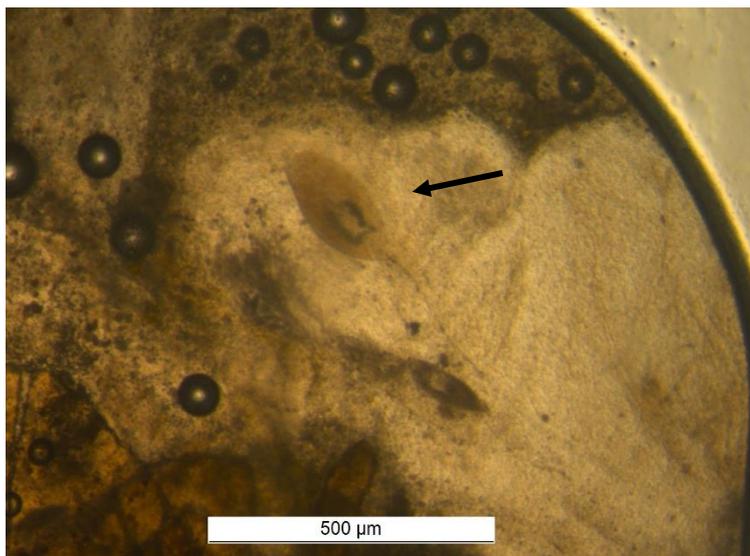


Abbildung 21: Zerkarie von *F. hepatica* in *G. truncatula* (Mikroskopie Quetsch-Präparat, Pfeil) (Foto: Andrea KÜchler)

3.2. Andere Schneckenarten

Bei keiner anderen Schneckenart als *Galba truncatula* konnte in dieser Studie eine Infektion mit *C. daubneyi* oder *F. hepatica* mittels PCR oder Mikroskopie nachgewiesen werden (n=304).

V. DISKUSSION

1. Einleitung

Der Pansenegel *Calicophoron daubneyi* sorgt für vermehrte Aufmerksamkeit, da dieser Parasit scheinbar „neu“ in unseren Breitengraden auftritt. Wann der Pansenegel aus den tropischen Gebieten eingetragen wurde, ist nicht genau bekannt. Vor ca. 30 Jahren, wurden in Frankreich erste umfassende Prävalenzstudien in Europa durchgeführt (MAGE et al., 2002). Schon vorher war der Pansenegel bekannt, allerdings wurde angenommen, dass es sich dabei vorwiegend um die Art *Paramphistomum cervi* handelte. Diese beiden Arten unterscheiden sich morphologisch kaum, jedoch nutzen ihre Larvenstadien unterschiedliche Zwischenwirte. *C. daubneyi* ist in seiner Entwicklung auf die Zwergschlamm Schnecke (*G. truncatula*) angewiesen, welche ebenfalls von *F. hepatica* als Zwischenwirt genutzt wird (DEPLAZES et al., 2020). *F. hepatica* ist in süddeutschen Rinderbeständen mit Weidehaltung weit verbreitet und auch der Zwischenwirt *G. truncatula* kommt in diesen Regionen häufig vor (GLÖER, 2002; KOCH, 2005). Überall wo *G. truncatula* auf der Weide vorkommt besteht für *C. daubneyi* das Potenzial sich ebenfalls zu entwickeln und seinen Zyklus zu schließen. Es wird vermutet, dass noch andere Wasserlungenschneckenarten im Entwicklungszyklus dieser beiden Parasiten eine Rolle spielen könnten, da Endwirte häufig mit beiden Parasitenarten infiziert sind, aber in Zwischenwirten vergleichsweise geringe Prävalenzen festgestellt werden und bisher selten Doppelinfektionen im selben Zwischenwirt gefunden wurden (JONES et al., 2017b). Aus Studien anderer Länder sind bisher nur für *F. hepatica* weitere Zwischenwirte wie *Omphiscola glabra* und *Radix* sp. bekannt (ABROUS et al., 1996; CARON et al., 2007; JONES et al., 2015). Aus experimentellen Studien gehen jedoch noch mehr Arten als potenzielle Alternativzwischenwirte hervor (DEGUEURCE et al., 1999).

Diese Studie hatte das Ziel ein möglichst breites Spektrum an potenziellen Zwischenwirten, mit speziellem Augenmerk auf *Galba truncatula* als vermuteter Hauptzwischenwirt, auf Infektionen mit *F. hepatica* und *C. daubneyi* mittels Multiplex-PCR zu untersuchen. Bislang wurde in Deutschland noch keine Schneckenart als Zwischenwirt von *C. daubneyi* bestätigt. Dazu wurden süddeutsche Rinderbestände mit Weidehaltung koproskopisch und serologisch untersucht, um den Infektionsstatus im Endwirt abzuklären. Die Weiden wurden begangen und typische Habitate nach Schnecken abgesucht. Diese wurden

gesammelt und für eine PCR-Untersuchung aufbereitet. Ein Teil der Schnecken wurde vor der PCR mikroskopisch untersucht, um Larvenstadien morphologisch zu bestimmen. Zur Methodenetablierung wurden unterschiedliche Primer getestet und Untersuchungen zur Sensitivität gemacht. Als Hauptversuch wurde eine Prävalenzbestimmung von *C. daubneyi* und *F. hepatica* in unterschiedlichen potenziellen Zwischenwirten (n=544) durchgeführt.

2. Prävalenzen von *C. daubneyi* und *F. hepatica* in Zwischenwirten

2.1. Prävalenz in *G. truncatula*

Calicophoron daubneyi (Pansenegel)

Die natürliche Prävalenz von *C. daubneyi* in den untersuchten *G. truncatula* betrug 0,83 %. Die zwei infizierten Schnecken (von 240 untersuchten) wurden auf demselben Betrieb im Februar gefunden. Die Parasiten sind fähig im Zwischenwirt zu überwintern und im Frühjahr durch die Zerkarienemission aus der Schnecke und die Umwandlung zu infektiösen Metazerkarien Endwirte zu infizieren. Laut ABROUS et al. (1999c) sind starke Temperaturschwankungen und kühle Temperaturen der Emission sogar förderlich. Demnach könnte es sein, dass Weiden gerade im Frühjahr bei kühlen Nächten und warmen Tagen vermehrt mit *C. daubneyi*-Metazerkarien kontaminiert werden. Möglicherweise wird hierzulande das Infektionsgeschehen im Endwirt aus der überwinterten Generation angetrieben. Während der Weideperiode (Frühjahr bis Herbst) wurde kein *C. daubneyi* in den Schnecken nachgewiesen, obwohl die Rinder bei vier Betriebsbesuchen mit *G. truncatula*-Funden zwischen Juni und Oktober 2018 und zwei Betriebsbesuchen im Mai und Juli 2019 Eier des Pansenegels ausschieden. Auch aus der Studie von IGLESIAS-PIÑEIRO et al. (2016) ging hervor, dass die Population von *G. truncatula*, welche mit *C. daubneyi* infiziert waren, mit wärmeren Temperaturen abnahm. In welchen Zwischenwirten sich *C. daubneyi* während der Weideperiode aufhält, konnte im Rahmen dieser Studie nicht geklärt werden. Es gibt jedoch Studien, die Infektionen von *G. truncatula* während der Sommermonate aufzeigten (JONES et al., 2015; IGLESIAS-PIÑEIRO et al., 2016). Diese stammten aus Galizien (Spanien) und Wales (Vereinigtes Königreich). Die Autor/innen vermuteten, dass sich der Parasit in einem Anpassungsprozess befindet und nennen zwei unterschiedliche Erkenntnisse als mögliche Gründe für diese Annahme. Als Indiz nannten JONES et al. (2017b), dass die Endwirte deutlich mehr Eier von *C. daubneyi* als von *F. hepatica* ausschieden, die *C. daubneyi*-

Prävalenz in *G. truncatula* jedoch während allen Sammelmonaten geringer war. In dieser Studie wurden nur adulte *G. truncatula* (> 4 mm) untersucht. Eine weitere interessante Erkenntnis hatten IGLESIAS-PIÑEIRO et al. (2016) bezüglich der Gehäusegröße bzw. des Schneckenalters. Knapp über 50 % der mit *C. daubneyi* infizierten *G. truncatula* waren zwischen 3 und 3,9 mm groß, also im präadulten Stadium. Auch dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich Parasit und Schnecke in gegenseitiger Anpassung befinden oder die parasitäre Belastung die Schnecke in ihrem Wachstum hemmt. Die infizierten Schnecken aus der vorliegenden Studie maßen beide 5 mm. Eine Infektion im präadulten Stadium im Vorjahr ist denkbar. Von diesen Schnecken liegen keine mikroskopischen Befunde vor, da sie in Ethanol konserviert wurden, welche eine Durchleuchtungsmikroskopie mittels Quetsch-Präparat verunmöglichte. Die morphologische Bestimmung des Larvenstadiums wäre für zukünftige Untersuchungen lohnend, um anhand dessen abzuschätzen zu können, wann die Infektion ungefähr stattgefunden hat (RONDELAUD et al., 2009).

Aus anderen Studien gehen natürliche Prävalenzen von 19,1 % im Nordwesten Spaniens sowie 11,2 % und 4,0 % in Gebieten Großbritanniens hervor. Für die spanische Studie wurden Schnecken aus mehreren Gebieten zweier Provinzen mittels PCR untersucht (MARTÍNEZ-IBEAS et al., 2013). Diese vergleichsweise hohe Prävalenz weist auf eine Etablierung von *C. daubneyi* in diesen Gebieten hin. Der Zeitraum der Sammlung ist nicht bekannt. Umgekehrt untersuchten IGLESIAS-PIÑEIRO et al. (2016) Zwergschlammschnecken aus einem Betrieb derselben Region (Galizien) über eine Zeitdauer von zwei Jahren und ermittelten eine Prävalenz von 4,4 %. Ob dieser Prävalenzunterschied der Nachweismethode (PCR vs. Mikroskopie), der Prävalenz in den Endwirten oder dem Untersuchungszeitraum geschuldet ist, kann aufgrund der vorhandenen Angaben nicht beantwortet werden. Die Probensammlungen der Studien aus Wales liegen ein Jahr auseinander und geben die Prävalenzen in *G. truncatula* aus sechs Betrieben (11,2 %) und aus zehn Betrieben (4,0 %) wieder, welche mit der Methode der Multiplex-PCR ermittelt wurden (JONES et al., 2015; JONES et al., 2017b). Auch dort scheint sich *C. daubneyi* bereits adaptiert zu haben.

Fasciola hepatica (Großer Leberegel)

F. hepatica war mit einer natürlichen Prävalenz von 6,25 % im Vergleich zu den Nachweisen von *C. daubneyi* häufiger in *G. truncatula* zu finden. Dabei gelang der mikroskopische sowie der molekularbiologische Nachweis mittels PCR. Mikroskopisch wurden reife Redien- und Zerkarienstadien nachgewiesen, welche sich vermutlich in einem späten Stadium im Zwischenwirtszyklus befanden

(RONDELAUD et al., 2009). Bereits MARTÍNEZ-IBEAS et al. (2013) beschrieben die Schwierigkeit, frühe Infektionsstadien mikroskopisch zu erkennen. Dabei gelang mit Schneckeninfektionsversuchen ein mikroskopischer Nachweis erst 33 Tage p. i.

In einer umfangreichen Studie aus der Schweiz wurden 4733 *G. truncatula* aus 70 Fasciola-positiven Betrieben mittels quantitativer Real-time PCR auf *F. hepatica* untersucht (SCHWEIZER et al., 2007). Dabei wurde eine Prävalenz von 7 % erhoben. Die klimatischen und geografischen Gegebenheiten der Nordostschweiz ähneln dem teils angrenzenden süddeutschen Voralpenland. Daraus lässt sich schließen, dass das Vorkommen der Zwergschlammschnecke und die epidemiologischen Zustände ähnlich sind, was sich vermutlich in der ähnlichen Prävalenz widerspiegelt. Studien aus anderen Ländern zeigten sehr unterschiedliche Prävalenzen von *F. hepatica* im Zwischenwirt. Jedoch ist hierbei auch die geografische und klimatische Lage unterschiedlich. CARON et al. (2014) untersuchten insgesamt fünf Gebiete in Belgien und Luxemburg und erhoben eine Prävalenz von 1,31 %. Ob die Gebiete von Nutzzrindern beweidet wurden, ist der Studie nicht zu entnehmen. CARON et al. (2011) untersuchten *G. truncatula* aus Algerien und ermittelten dieselbe Prävalenz von 6,25 %. In Spanien wurde eine Prävalenz von 40,4 % erhoben in einem Gebiet, wo *F. hepatica* und *C. daubneyi* endemisch sind (MARTÍNEZ-IBEAS et al., 2013). In Studien aus Wales wurden die natürlichen Prävalenzen von 13,4 % und 5,6 % mittels PCR ermittelt (JONES et al., 2015; JONES et al., 2017b).

Die infizierten Schnecken wiesen Gehäusegrößen zwischen 3,5 und 8,0 mm auf. In einer Studie von IGLESIAS-PIÑEIRO et al. (2016) ließen sich ebenfalls über alle Größenkategorien infizierte Schnecken finden.

Doppelinfektionen

Doppelinfektionen des Zwischenwirtes mit *C. daubneyi* und *F. hepatica* wurden in dieser Studie keine festgestellt. Gleiches lag bei der Studie von MARTÍNEZ-IBEAS et al. (2013) vor, obwohl die Prävalenzen der Einzelinfektionen (mit 40,4 % bei *F. hepatica* und 19,1 % bei *C. daubneyi*) weitaus höher waren. JONES et al. (2015) und JONES et al. (2017b) fanden Doppelinfektionen bei 0,75 % und 0,22 % der untersuchten *G. truncatula*.

Es kann davon ausgegangen werden, dass der Zwischenwirt eine begrenzte Kapazität hat, Parasiten aufzunehmen und eine Konkurrenzsituation um Ressourcen entsteht, was das seltene Vorkommen von Doppelinfektionen erklären würde. Möglicherweise geht eine Doppelinfektion mit einer erhöhten Mortalität der

Schnecke einher oder ein Parasit wird eliminiert (RONDELAUD et al., 2007a; BORN-TORRIJOS et al., 2014).

2.2. Andere Schneckenarten

Keine andere Schneckenart als *Galba truncatula* war in dieser Studie nachweislich mit *C. daubneyi* oder *F. hepatica* infiziert. Es wurden 304 Schnecken von 12 unterschiedlichen Arten untersucht. Generell scheinen alternative Zwischenwirte besonderen Mechanismen zu unterliegen. Zum einen waren in Untersuchungen anderer Studien juvenile Schnecken anfälliger und zum anderen führten Doppelinfektionen oder vorgängige Infektionen mit *C. daubneyi* zu einer Komplettierung des Zyklus von *F. hepatica* (DEGUEURCE et al., 1999; DREYFUSS et al., 2000).

Radix spp.

In dieser Studie wurden *Radix labiata* (n=85) und *Radix balthica* (n=45) untersucht. Die taxonomische Unterscheidung dieser Arten kann durch molekularbiologische Untersuchungen ergänzt werden (BARGUES et al., 2001). Sinnvoll ist das, wenn es um spezifische Fragestellungen geht, die die einzelne Art betrifft. So wurde beispielsweise nur *R. labiata* als Zwischenwirt mit einer Ausscheidung von infektiösen Metazerkarien im experimentellen Rattenmodell bestätigt (CARON et al., 2007). Mit *Radix balthica* gelang dies nicht. Zudem scheint *R. balthica* höhere Umwelanforderungen zu haben, was eine Anzucht und experimentelle Versuche erschwert. Dies widerspiegelte sich in erhöhten Mortalitätsraten in einer Schneckenzucht (CARON et al., 2007). Unter natürlichen Bedingungen konnten teils hohe *F. hepatica*-Prävalenzen von 25 % in den gefundenen *Radix balthica* nachgewiesen werden. Diese Schnecken stammten von einer Weide, wo auch fast die Hälfte der gefundenen *G. truncatula* eine Infektion mit *C. daubneyi* aufwies. Möglicherweise war der Infektionsdruck auf die Schnecken so hoch, dass sich hier ein Phänomen des Ausweichens eines Parasiten auf einen alternativen Zwischenwirt zeigte (JONES et al., 2015). Dieser Zustand wird vermutlich in süddeutschen Rinderbetrieben (noch) nicht erreicht. In Belgien und Luxemburg ermittelten CARON et al. (2014) eine natürliche *F. hepatica*-Prävalenz von 0,16 % in *R. balthica*. Eine Untersuchung dieser Schneckengattung wäre insbesondere bei hoher Kontamination der Weiden mit Pansenegelein und Leberegeleiern und bei der Abwesenheit von *G. truncatula* interessant.

Omphiscola glabra

Diese Schneckenart ist für *F. hepatica* und potenziell für *C. daubneyi* in Frankreich ein alternativer Zwischenwirt zu *G. truncatula*. Natürliche Infektionen wurden mikroskopisch nachgewiesen und die Prävalenz der Doppelinfektionen war höher als bei *G. truncatula* (ABROUS et al., 2000; DREYFUSS et al., 2003, 2005; DREYFUSS et al., 2014; VIGNOLES et al., 2016). Dem Phänomen der Doppelinfektion fällt in dieser Schneckenart eine besondere Rolle zu, da in experimentellen Studien mit Schneckeninfektionen nur Doppelinfektionen zur Zerkarienemission von *F. hepatica* führten (ABROUS et al., 1996; DEGUEURCE et al., 1999). Da sie in Süddeutschland nicht vorkommt, wurde sie in dieser Studie nicht untersucht. Jedoch ist sie in Norddeutschland verbreitet und einzelne Funde gab es im südlichen Hessen und Rheinland-Pfalz (GLÖER & MEIER-BROOK, 2003). Eine Untersuchung dieser Schneckenart wäre angesichts der Studienergebnisse aus Frankreich auch in Deutschland interessant.

Stagnicola palustris

Im Rahmen dieser Studie wurde nur ein Exemplar dieser Art gefunden. Wie *O. glabra* ist auch *S. palustris* vermehrt im Norddeutschen Raum zu finden. Einzelfunde gab es in Süddeutschland in Baden-Württemberg (GLÖER & MEIER-BROOK, 2003). *S. palustris* hat das Potenzial als Zwischenwirt für *F. hepatica* und *C. daubneyi* zu fungieren. Dies wurde sowohl bei natürlich als auch bei experimentell infizierten Schnecken untersucht (DEGUEURCE et al., 1999). Juvenile Schnecken hatten höhere Infektionsraten. Diese Art sollte in einem größeren Probenumfang untersucht werden.

Planorbidae

Schnecken aus der Familie der Planorbidae sind typische Zwischenwirte für andere Pansengelarten (DEPLAZES et al., 2020). *Anisus leucostoma* ist ein Vertreter dieser Familie, der potenziell im Zyklus von *F. hepatica* eine Rolle spielt (ABROUS et al., 1998; ABROUS et al., 2000; DREYFUSS et al., 2002). Diese Schneckenart wurde jedoch im Rahmen dieser Studie nicht gefunden. Es wurden *Planorbis planorbis* (n=62) und *Gyraulus parvus* (n=13) untersucht. Bei Nachweisen von anderen Pansengelarten werden Schneckenarten aus dieser Familie relevant.

Physidae

Physella acuta (n=41) wurden im Rahmen dieser Studie untersucht. Hierbei konnten nur Stichproben untersucht werden, da die Art in gewissen Habitaten

eines Betriebs zahlreich vorgefunden wurde. In der Literatur gibt es Nachweise von natürlichen Infektionen mit *C. daubneyi* und *F. hepatica*, jedoch gibt es bisher keine Hinweise, dass der Zyklus abgeschlossen werden kann (ABROUS et al., 1998; DEGUEURCE et al., 1999; DREYFUSS et al., 2002; IGLESIAS-PIÑEIRO et al., 2016). Weitere Untersuchungen wären nötig, um das Potenzial dieser Schneckenart als Zwischenwirt zu evaluieren.

Potamopyrgus antipodarum

Diese Art sieht *G. truncatula* aufgrund der Form und Farbe auf den ersten Blick ähnlich. Sie ist jedoch kleiner, könnte aber mit jungen Stadien verwechselt werden. *P. antipodarum* besitzt einen Deckel, welcher bei genauem Hinsehen auffällt. Zudem ist die Mündung runder und geschlossen (GLÖER & MEIER-BROOK, 2003). Diese Art ist in ganz Deutschland verbreitet und wurde in der Studie in einem Betrieb teilweise massenhaft in mehreren Habitaten gefunden. JONES et al. (2015) wiesen mittels PCR natürliche Infektionen (Prävalenz: 3,85 %) mit *F. hepatica* nach, obwohl *G. truncatula* ebenfalls anwesend war. Ob der Zyklus in dieser Art abgeschlossen wird, ist bisher unbekannt. Generell sind invasive Arten bezüglich der Verbreitung von Krankheitserregern von wissenschaftlichem Interesse und sollten auch in zukünftigen Studien Beachtung finden.

Landlungenschnecken

Landlungenschnecken wurden in dieser Studie nur untersucht, wenn keine Wasserlungenschnecken gefunden wurden. Dies traf auf einen Betriebsbesuch zu. Die geringere Priorisierung dieser Gruppe wird damit begründet, dass Landlungenschnecken in der Literatur bisher wenig Beachtung fanden und Infektionen nur aus einer Studie bekannt sind, aus einem Gebiet, wo keine *G. truncatula* gefunden wurden (RELF et al., 2009). Experimentelle Infektionsstudien mit Landlungenschnecken sind nicht bekannt.

2.3. Mikroskopie und PCR zur Prävalenzbestimmung

Aus früheren Studien ist bereits bekannt, dass die PCR eine sensitivere Methode als die Mikroskopie zur Prävalenzbestimmung darstellt (CARON et al., 2007; MARTÍNEZ-IBEAS et al., 2013). Dies wurde in dieser Studie ebenfalls bestätigt. 73,33 % der *F. hepatica*-Infektionen in *G. truncatula* wurden mit der mikroskopischen Methode nicht erkannt. Auf einen ähnlichen Wert kamen CUCHER et al. (2006) in ihrer Studie, in der 65,85 % der PCR-positiven *L. columella* mit der Mikroskopie nicht gesehen wurden. Eine mögliche Begründung könnte sein, dass Larven erst ab einem gewissen Entwicklungsstadium gesehen

werden können (MARTÍNEZ-IBEAS et al., 2013). Davor sind sie in einem anderen Teil der Schnecke lokalisiert und sind in geringerer Zahl vorhanden (FRANSEN & CHRISTENSEN, 1984; ABROUS et al., 1997). Bei der in dieser Studie gewählten Quetschmethode, könnte es zusätzlich durch Überlagerungen des Gewebes zur Einschränkung der Sichtbarkeit kommen. Somit konnten die Larven auch keiner spezifischen Lokalisation zugeordnet werden. Diese Methode ist gegenüber der Schneckensektion zeitsparend und einfacher durchzuführen und eignet sich, wenn kein Stereomikroskop zur Sektion zur Verfügung steht.

Eine Kombination aus beiden Untersuchungsmethoden ist sinnvoll, da die PCR keine Informationen zum Entwicklungsstadium der Larven und der Befallsstärke erbringt. Fehlwirte, in denen es zu keiner Zerkarien-Ausscheidung kommt, können nicht von wahren Zwischenwirten unterschieden werden. Zur Ergründung in welchen Schneckenarten der Parasit fähig ist seinen Zyklus zu vollenden, ist die Beobachtung des Zerkarienaustritts entweder bei gesammelten natürlich oder experimentell infizierten Schnecken zu empfehlen. Ergänzend hierzu ist eine Mikroskopie an lebendigen Schnecken beschrieben, bei der juvenile Schnecken mit noch durchsichtigem Gehäuse untersucht und zur Beobachtung der Zerkariemission selektiert wurden (ABROUS et al., 2001). Zur Ermittlung der Befallsstärke könnte die Anwendung der quantitativen Real-time PCR in Betracht gezogen werden. Eine solche wurde bereits zur Prävalenzbestimmung von *F. hepatica* etabliert (SCHWEIZER et al., 2007).

3. Methodische Aspekte

Zur Prävalenzbestimmung der Parasiten in den Zwischenwirten wurde die Methode der Multiplex-PCR, teilweise kombiniert mit der Mikroskopie, angewendet. Dieses Kapitel beleuchtet die wichtigsten Punkte der molekularbiologischen Methode im Zusammenhang mit dem Nachweis von *C. daubneyi* und *F. hepatica* im Zwischenwirt.

3.1. Aufbereitung und DNA-Extraktion

Konservierung

Zur Konservierung und Lagerung bis zur DNA-Extraktion wurde ein Teil der Schnecken in Ethanol ($\geq 99,5\%$, Ph. Eur., reinst) eingelegt und ein Teil ohne Medium bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Beide Methoden finden Anwendung in molekularbiologischen Studien zum Trematoden-Nachweis in Schnecken (BARGUES et al., 2001; CUCHER et al., 2006; SCHWEIZER et al., 2007; MARTÍNEZ-IBEAS et al., 2013; BORN-TORRIJOS et al., 2014; CARON et al.,

2014). Die Konservierung in Ethanol hatte den Vorteil, dass zur morphologischen Bestimmung, die im Rahmen dieser Studie extern stattfand, keine Schädigung der DNA durch eine Unterbrechung der Kühlkette zu erwarten war. Ein Nachteil der Methode ist die Änderung der Gewebekonsistenz durch den dehydrierenden Effekt, der eine direkte Durchleuchtungsmikroskopie der Quetsch-Präparate verunmöglichte. Zur Anfertigung von Quetsch-Präparaten eignete sich die Methode des Einfrierens, da nach dem Auftauen die Schnecken eine Gewebekonsistenz aufwiesen, die eine Durchleuchtung zuließ.

Gewebszerkleinerung

Für die Gewebszerkleinerung wurde die Technik einer maschinellen Homogenisierung gewählt. Das Proben-Handling ist sehr einfach, da die Schnecke lediglich mit einer Pinzette in das Röhrchen mit Keramik-Beads gegeben wird, welches dann der Maschine zugeführt wird. Das nach der Zentrifugation zurückbleibende Pellet bestand aus sehr festen Bestandteilen des Kopfes, welche nicht homogenisiert wurden. Durch das Verwerfen des Pellets wurde somit ein Teil der nicht benötigten Fremd-DNA eliminiert. Ein gewisses Risiko, dass auch Parasitenbestandteile durch das Abpipettieren des Überstandes im Röhrchen verbleiben, ist vermutlich nicht auszuschließen. Soll das Schneckengewebe als Gesamtheit ohne vorherige maschinelle Homogenisierung lysiert werden, könnte zur vollständigen Auflösung des Gewebes eine über Nacht-Inkubation im Lysepuffer und zusätzlicher Zugabe von Proteinase K in Erwägung gezogen werden (O'SHAUGHNESSY et al., 2017).

DNA-Extraktion

Für die DNA-Extraktion wurde das Kit gemäß SCHWEIZER et al. (2007) verwendet. Die Inkubationsdauer des Lysierungsschrittes wurde von anfänglich 1,5 h zu einer über Nacht-Inkubation geändert, da beobachtet wurde, dass die Lyse in einigen Fällen nicht ausreichte und immer noch Gewebestücke vorhanden waren. Dies kann zu einer Überladung oder Verstopfung der Membran in der Aufreinigungssäule führen.

In unterschiedlichen Studien fanden weitere Extraktionskits und -methoden zur Isolierung von Trematoden-DNA in Schnecken Anwendung (CARON et al., 2007; MARTÍNEZ-IBEAS et al., 2013; O'SHAUGHNESSY et al., 2017). Früher wurde unter anderem die Phenol-Chloroform-Methode angewendet, die jedoch aufgrund der gesundheitsschädigenden Stoffe nicht mehr zeitgemäß ist (BARGUES et al., 2001). Als praktikabel wurde die Chelex-Methode, die zur DNA-Extraktion aus forensischen Proben dient, beschrieben (WALSH et al., 1991; CARON et al., 2011;

JONES et al., 2015). Diese Methode war im Vergleich zur Phenol-Chloroform-Methode wesentlich schneller und kostengünstiger. Die Ausbeute der DNA-Konzentration war höher, jedoch war die Reinheit geringer (CARON et al., 2011).

3.2. Primer-Kompatibilität und -Spezifität

Vier Primerpaar-Kombinationen wurden im Verlauf dieser Studie in Multiplex-Versuchen getestet. Das erste Primerpaar Cd-Cox (PE) und Fhr-II (LE) wurde verworfen, da unspezifische Signale auftraten, welche ähnliche Basenpaarlängen wie das *F. hepatica*-Produkt aufwiesen. Dies ist im Hinblick auf die Interpretation und der Darstellung auf dem virtuellen Gel nicht optimal. Zusätzlich sind bei der Positivkontrolle mit einer *F. hepatica*-infizierten Schnecke (PK-S1) lediglich geringe Produkt-Konzentrationen nachgewiesen worden. Da die Fluoreszenz abhängig von der Basenpaarlänge ist, wurden mitunter deswegen schwache Signale nachgewiesen.

Die zweite Primerpaar-Kombination aus Cd-Cox und Fh-Cox (gemäß MARTÍNEZ-IBEAS et al., 2013) wurde nicht verwendet, da der Fh-Cox-Primer nicht vollständig zur Sequenz der angegebenen Accession number passte. Die Sequenz des neuen Fh-Cox-Primers wurde der Sequenz angepasst und erneut in der Kombination mit Cd-Cox verwendet. Mit dieser Primerpaar-Kombination (Cd-Cox und Fh-Cox Neu) wurden nicht reproduzierbare Ergebnisse generiert, weswegen auch diese Kombination ausschied.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die erste und dritte Kombination zu verwerfen sind. Die Kombination aus MARTÍNEZ-IBEAS et al. (2013) sollte mit den dort angegebenen Sequenzen als Alternative zur in dieser Studie verwendeten Primer-Kombination reevaluiert werden.

Die Hauptversuche zur Prävalenzbestimmung wurden mit den Primern Cd-Cox Neu (aus JONES et al. (2015)) und Fh-Cox Neu (modifizierte Sequenz aus MARTÍNEZ-IBEAS et al. (2013)) durchgeführt. Diese Kombination ergab Signale bei den erwarteten Basenpaarlängen mit DNA von adulten Egel (PK-PE und PK-LE) und DNA von Larvenstadien (PK-M und PK-S2). Die detektierten Nebenpeaks sind vermutlich im Fall von *C. daubneyi* etwas längere und bei *F. hepatica* etwas kürzere Sequenzvarianten. Auf dem virtuellen Gel wurde der Nebenpeak von *C. daubneyi* als schwache Bande neben der Hauptbande abgeleitet. Zur Untersuchung dieser Sequenzen könnte sich eine Trennung mittels herkömmlicher Gelelektrophorese und eine separate Sequenzierung der beiden nahe gelegenen Banden eignen. Durch die Testung auf Kreuzreaktionen zwischen *C. daubneyi* und

F. hepatica und die Sequenzierung von PCR-Produkten konnte die Primer-Spezifität innerhalb dieser Trematoden-Arten bestätigt werden.

3.3. Sensitivität

Als minimal nachzuweisende Einheit in der Schnecke wurde sich an den Angaben zu einer Mirazidie mit einer DNA-Konzentration von 0,8 ng/µl gemäß MAGALHAES et al. (2004) orientiert. In der vorliegenden Studie konnte somit eine mit Spike-Proben simulierte Mirazidie von *C. daubneyi* in Proben mit einem Schnecken-DNA Anteil von bis zu 95,2 ng/µl im Multiplex-Versuch nachgewiesen werden. Bei der Simulierung einer *F. hepatica*-Mirazidie vermischt mit Schnecken-DNA war ein Nachweis nur bis 31,74 ng/µl möglich. Der Nachweis in 95,2 ng/µl Schnecken-DNA gelang bei *F. hepatica* nicht. Diese Ergebnisse stellen im Hinblick auf Schneckenarten mit höheren DNA-Konzentrationen ein Problem dar. Für die Studie gesammelte große Schnecken wiesen höhere DNA-Konzentrationen auf, beispielsweise *Radix labiata*, *Radix balthica* und *Stagnicola palustris* mit arithmetischen Mittelwerten von 162,25 ng/µl, 175,25 ng/µl und 141,00 ng/µl (Tabelle 20 im Anhang). Hierbei wären Zwischenwirtsinfektionen (zumindest mit *F. hepatica*) erst ab einer bestimmten Bürde nachweisbar. Auch das Pooling aus fünf *G. truncatula* mit einem *F. hepatica*-infizierten Exemplar erwies sich als nicht reproduzierbar und somit nicht praktikabel im Feldversuch. Einen Einfluss der Schnecken-DNA auf die Sensitivität stellten auch CUCHER et al. (2006) fest. Die Proben mit 0,01 ng *F. hepatica*-DNA waren mit einem Anteil von 10 % der Schnecken-DNA nachweisbar. Bei der Zugabe von 20 % der Schnecken-DNA stieg die Nachweisgrenze um den Faktor 10 (0,1 ng).

Ein Grund für die schlechtere Nachweisbarkeit bei höherem Fremd-DNA-Anteil könnten PCR-Inhibitoren (z. B. komplexe Polysaccharide, Huminsäure, Proteinase) sein (CARON et al., 2011; CARON et al., 2014). Diese wurden bereits von mehreren Autor/innen thematisiert und ihr Ausschluss in die Versuche zur Prävalenzermittlung integriert. MARTÍNEZ-IBEAS et al. (2013) schlossen Inhibitoren aus, indem sie alle negativ getesteten Schnecken mit 60 ng adulter Egel-DNA spiketen und erneut testeten. Einen direkteren Weg zum Ausschluss von Inhibitoren wählten CARON et al. (2011). Sie etablierten eine Multiplex-PCR, womit jeweils eine unterscheidbare Sequenz aus dem ITS-2 Gen von *F. hepatica* und von der Schnecke nachgewiesen wurde. Die Schnecke diente somit als interne Positivkontrolle und war entsprechend positiv ohne Inhibitoren. Bei einem negativen Befund wurde der Einfluss der Inhibitoren durch Verdünnungen (1:10 und 1:100) getestet. Bei einer 1:100-Verdünnung waren Inhibitoren ausgeschaltet (positive interne Positivkontrolle). Auch JONES et al. (2015) verdünnten die

Proben vor der PCR 1:10 und poolten jeweils sechs Schnecken. Zur Eliminierung von Inhibitoren wurden, außer der Probenverdünnung, die Verwendung von 0,048 % BSA im PCR-Mix (CUCHER et al., 2006) oder die DNA-Isolation mit einem für fäkale Proben geeigneten Extraktionskit erwähnt (KOZAK & WĘDRYCHOWICZ, 2010). In der vorliegenden Studie wurden die Proben nicht vorverdünnt oder auf Inhibitoren getestet. Dies wäre einer der nächsten Schritte der Methodenoptimierung. Als weiteren Ansatz zur Verringerung von Schnecken-DNA könnte das Abtrennen von Schneckenteilen (vor der DNA-Extraktion) sein, in denen sich die Larvenstadien während ihrer Entwicklung nicht aufhalten. Beispielsweise haben BORN-TORRIJOS et al. (2014) nur die Mitteldarmdrüse und die Gonaden verwendet. So könnte der Schnecken-DNA-Anteil verringert werden. Zur Methoden-Optimierung könnte auch die Konzentration der Primer erhöht und die Zyklenzahl des PCR-Durchlaufs auf 30-40 hochgefahren werden.

4. Ausblick

Diese Studie war eine breit angelegte Studie, welche sich mit der Methodenetablierung einer Multiplex-PCR und der Untersuchung möglicher Zwischenwirte von *C. daubneyi* und *F. hepatica* auseinandersetzte. In diesem Kapitel werden aus den Ergebnissen der Studie entstandene Ideen für weitere Projekte und wissenschaftliche Fragestellungen zusammengetragen.

4.1. Untersuchung einzelner Betriebe im Jahresverlauf

Ein Rinderbestand aus dieser Studie erwies sich als sehr interessant hinsichtlich der Artenvielfalt gefundener Schnecken. In zwei Besuchen wurden zehn unterschiedliche Wasserlungenschneckenarten gefunden, darunter der Hauptzwischenwirt *Galba truncatula* und potenzielle Zwischenwirte wie *Radix labiata*, *Radix balthica*, *Stagnicola palustris*, *Potamopyrgus antipodarum*, *Physella acuta* und unterschiedliche Tellerschneckenarten. Eine Populationsbestimmung dieser Schneckenarten und eine Definierung ihrer Habitate könnten in der Kombination mit einer mikroskopischen und molekularbiologischen Prävalenzbestimmung wertvolle Informationen bezüglich alternativer Zwischenwirte und deren Lebensweise geben. Im Rahmen dieser Studie wurden alle aus diesem Betrieb untersuchten Schnecken (n=243) negativ getestet. Die Schnecken wurden während zwei Begehungen im kurzen Abstand (Juli 2018 und September 2018) gesammelt. Eine Untersuchung der Schnecken und Endwirte im Jahresverlauf wäre bei diesem Betrieb sinnvoller. Epidemiologische Zustände, wie das Zusammenkommen von End- und Zwischenwirten mit saisonalen und ggf. meteorologischen und klimatischen Gegebenheiten müssen genauestens beachtet

und die Begehungen gut geplant werden, insbesondere bei Betrieben mit Umtriebsweide. Basierend auf den bisherigen Untersuchungsergebnissen und dem aktuellen Wissensstand ist mit niedrigen Prävalenzen im Zwischenwirt zu rechnen. Unter epidemiologischen Gesichtspunkten und der Fragestellung nach potenziellen alternativen Zwischenwirten zu *Galba truncatula* wäre eine Untersuchung dieses Gebietes von hohem Interesse.

Des Weiteren würde sich ein anderer Studienbetrieb zur genaueren Betrachtung der Rolle von *G. truncatula* als Zwischenwirt eignen. Es handelt sich um einen Milchviehbetrieb mit 60 Kühen, welche mit beiden Trematoden infiziert waren. In diesem Betrieb wurden 40 *G. truncatula* gefunden wovon zwei mit *C. daubneyi* infiziert waren. Dies war der zweitgrößte Fund von *G. truncatula* während eines Betriebsbesuches. Eine Prävalenzstudie die End- und Zwischenwirte einschließt, wäre aufgrund der Gegebenheiten geeignet und könnte Aufschluss über die Infektion von *G. truncatula* mit *C. daubneyi* und *F. hepatica* im Jahresverlauf geben. Hierbei könnte *G. truncatula* mittels Mikroskopie und Multiplex-PCR auf (Doppel-)Infektionen untersucht werden.

4.2. Schneckeninfektionsversuche

Experimentelle Infektionen von Zwischenwirtsschnecken können für unterschiedliche Indikationen genutzt werden. Es können biologische Prozesse wie die Zerkarienemission unter Laborbedingungen beobachtet werden, zur Ermittlung potenzieller Zwischenwirte (ABROUS et al., 1996; DEGUEURCE et al., 1999; CARON et al., 2007). Die Methode kann ebenfalls zur Sensitivitätsprüfung und zum Vergleich der Mikroskopie und PCR zu verschiedenen Zeitpunkten der Larvenentwicklung herangezogen werden (CARON et al., 2007; MARTÍNEZ-IBEAS et al., 2013). Der Vorteil gegenüber natürlichen Infektionen ist, dass genau bekannt ist, mit wie vielen Mirazidien eine Schnecke unter welchen Bedingungen infiziert wurde. Alternativ können zur Sensitivitätsprüfung der PCR mit Parasiten-DNA gespikte Schneckenproben untersucht werden, wie in der vorliegenden Studie (vgl. IV.2.2). Zur Optimierung der PCR wären infizierte Schnecken mit bekannter Parasitenlast als interne Positivkontrolle wünschenswert. Dies war in der vorliegenden Studie der Grund für den Versuch von experimentellen Schneckeninfektionen. Des Weiteren können experimentelle Schneckeninfektionen nötig werden, wenn eine Gewinnung von Metazerkarien angestrebt wird für Infektionsversuche von Endwirten (CARON et al., 2007). Der Prozess ist mit einem sehr hohen logistischen und zeitlichen Aufwand verbunden. Wie eine Studie gezeigt hat, sind auch nicht alle Schneckenarten zur Anzucht geeignet (CARON et al., 2007).

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Studie wurden Schnecken unterschiedlicher Arten (n=544) auf Infektionen mit *C. daubneyi* und *F. hepatica* untersucht. Molekularbiologische Untersuchungen mittels Multiplex-PCR haben gezeigt, dass *Galba truncatula* auch in Süddeutschland als Zwischenwirtsschnecke von *C. daubneyi* fungiert. Von 240 *G. truncatula* wiesen zwei eine Infektion mit *C. daubneyi* (Prävalenz: 0,83 %) und 15 eine Infektion mit *F. hepatica* (Prävalenz: 6,25 %) auf. Gemischte Infektionen in der Zwischenwirtpopulation und Doppelinfektionen einzelner Schnecken wurden keine festgestellt, wobei 40 % der beteiligten Betriebe Mischinfektionen im Endwirt aufwiesen. Ein mikroskopischer Nachweis von Larvenstadien in der Schnecke gelang bei 4 von 15 mit *F. hepatica* infizierten *G. truncatula*. Bei keiner anderen untersuchten Schneckenart (n=304) konnte eine Infektion mit einem der beiden Parasiten nachgewiesen werden. Darunter waren unter anderem *Radix* spp., *Potamopyrgus antipodarum* und *Physella acuta* als potenzielle Zwischenwirte von *F. hepatica* vertreten. Die Multiplex-PCR basierte auf der Amplifizierung von Sequenzen der Cox-Gene von *C. daubneyi* und *F. hepatica*. Während zufriedenstellende spezifische Reaktionen resultierten, müssen Verbesserungen der Sensitivität angestrebt werden. Der hohe Anteil von Fremd-DNA der Schnecke gegenüber der Ziel-DNA des Parasiten scheint die Sensitivität erheblich zu reduzieren. Für die weitere Erforschung der Zwischenwirte bedarf es umfangreicheren Untersuchungen unterschiedlicher Schneckenarten im Jahresverlauf. Zur Etablierung einer sensitiveren Methode würden sich experimentelle Schneckeninfektionsversuche eignen.

Die Studie hat gezeigt, dass *C. daubneyi* in gewissen Massen bereits an den Zwischenwirt *G. truncatula* angepasst ist oder sich im Prozess der Anpassung befindet. Im weiteren Verlauf der Ausbreitung und bei einer Zunahme der Prävalenzen im Endwirt könnte die Infektion als Parasitose an Bedeutung gewinnen. Auswirkungen auf die Hausrindpopulation bezüglich Pathogenität und Leistungskapazität sollten vorwiegend hinsichtlich der Tiergesundheit aber auch der Wirtschaftlichkeit untersucht werden. Des Weiteren ist die epidemiologische Dynamik zwischen *C. daubneyi* und *F. hepatica* und ihren Zwischenwirten von wissenschaftlichem Interesse, da eine Berücksichtigung der Zwischenwirte für effiziente Bekämpfungsmaßnahmen in Rinderbeständen essenziell ist.

VII. SUMMARY

In this study, snails of different species (n=544) were examined for infections with larval stages of *C. daubneyi* and *F. hepatica* with a multiplex-PCR protocol. The study confirmed that *Galba truncatula* acts as an intermediate host of *C. daubneyi* in southern Germany. Of 240 *G. truncatula* probes examined, two showed an infection with *C. daubneyi* (prevalence: 0.83 %) and 15 with *F. hepatica* (prevalence: 6.25 %). Mixed infections within the snail population and double infections of individual snails were not detected, although 40% of the participating farms showed mixed infections in the cattle, which act as final host. Microscopic detection of larval stages was successful in 4 of 15 *G. truncatula* infected with *F. hepatica*. No other snail species examined (n=304) was found to be infected with either parasite. These included *Radix spp.*, *Potamopyrgus antipodarum* and *Physella acuta* as potential intermediate hosts of *F. hepatica*. The multiplex-PCR technic is based on the amplification of Cox gene-sequences of *C. daubneyi* and *F. hepatica*. While specific reactions were seen, improvements in sensitivity must be considered. The high proportion of snail DNA relative to the target (parasite DNA) appears to reduce the sensitivity severely. Larger studies including different snail species with observations throughout the seasons are needed for further research on the spectrum of intermediate hosts. Experimental snail infections would be suitable for establishing a more sensitive method.

This study has shown that *C. daubneyi* is already adapted to the intermediate host *G. truncatula* and probably is still in the process of further adaptation. As the infection might emerge in the future with increasing prevalence in the final host, this infection could progress to a concerning parasitosis. Effects on the domestic cattle population in terms of pathogenicity and performance should be investigated mainly for animal welfare but also for economic reasons. Furthermore, the epidemiological dynamics between *C. daubneyi* and *F. hepatica* and their intermediate hosts is of scientific interest, as the consideration of intermediate hosts is essential for efficient control programs in cattle herds.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Abrous M, Rondelaud D, Dreyfuss G. *Paramphistomum daubneyi* and *Fasciola hepatica*: the effect of dual infection on prevalence and cercarial shedding in preadult *Lymnaea glabra*. *J Parasitol* 1996; 82: 1026-9.

Abrous M, Rondelaud D, Dreyfuss G. *Paramphistomum daubneyi*: the development of redial generations in the snail *Lymnaea truncatula*. *Parasitol Res* 1997; 83: 64-9.

Abrous M, Rondelaud D, Dreyfuss G, Cabaret J. Unusual Transmission of the Liver Fluke, *Fasciola hepatica*, by *Lymnaea glabra* or *Planorbis leucostoma* in France. *J Parasitol* 1998; 84: 1257-9.

Abrous M, Rondelaud D, Dreyfuss G. Influence of low temperatures on the cercarial shedding of *Paramphistomum daubneyi* from the snail *Lymnaea truncatula*. *Parasite* 1999a; 6: 85-8.

Abrous M, Rondelaud D, Dreyfuss G, Cabaret J. Infection of *Lymnaea truncatula* and *Lymnaea glabra* by *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi* in farms of central France. 1999b; 30: 113-8.

Abrous M, Rondelaud D, Dreyfuss G. *Paramphistomum daubneyi* and *Fasciola hepatica*: influence of temperature changes on the shedding of cercariae from dually infected *Lymnaea truncatula*. *Parasitology Research* 1999c; 85: 765-9.

Abrous M, Rondelaud D, Dreyfuss G. A field study of natural infections in three freshwater snails with *Fasciola hepatica* and/or *Paramphistomum daubneyi* in central France. *Journal of Helminthology* 2000; 74: 189-94.

Abrous M, Vareille-Morel C, Rondelaud D, Dreyfuss G, Cabaret J. Metacercarial aggregation in Digenea (*Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*): environmental or species determinism? *Journal of Helminthology* 2001; 75: 307-11.

Anuracpreeda P, Wanichanon C, Sobhon P. Paramphistomum cervi: Antigenic profile of adults as recognized by infected cattle sera. *Experimental Parasitology* 2008; 118: 203-7.

Anuracpreeda P, Poljaroen J, Chotwiwatthanakun C, Tinikul Y, Sobhon P. Antigenic components, isolation and partial characterization of excretion–secretion fraction of *Paramphistomum cervi*. *Experimental Parasitology* 2013; 133: 327-33.

Arias MS, Sanchís J, Francisco I, Francisco R, Piñeiro P, Cazapal-Monteiro C, Cortiñas FJ, Suárez JL, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A. The efficacy of four anthelmintics against *Calicophoron daubneyi* in naturally infected dairy cattle. *Veterinary Parasitology* 2013; 197: 126-9.

Bargues MD, Vigo M, Horak P, Dvorak J, Patzner RA, Pointier JP, Jackiewicz M, Meier-Brook C, Mas-Coma S. European Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences. *Infect Genet Evol* 2001; 1: 85-107.

Belfaiza M, Rondelaud D, Moncef M, Dreyfuss G. *Fasciola hepatica*: cercarial productivity of redial generations in long-surviving *Galba truncatula*. *Journal of Helminthology* 2004; 78: 115-20.

Bogon K (1990) *Landschnecken: Biologie – Ökologie – Biotopschutz*. Natur-Verl., Augsburg

Boray JC. Bekämpfung der Fasciolose und der Dicrocoeliose des Rindes. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 1972; 114: 639–51.

Born-Torrijos A, Poulin R, Raga JA, Holzer AS. Estimating trematode prevalence in snail hosts using a single-step duplex PCR: how badly does cercarial shedding underestimate infection rates? *Parasit Vectors* 2014; 7: 243.

Boubaker G, Macchiaroli N, Prada L, Cucher MA, Rosenzvit MC, Ziadinov I,

Deplazes P, Saarma U, Babba H, Gottstein B, Spiliotis M. A multiplex PCR for the simultaneous detection and genotyping of the *Echinococcus granulosus* complex. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7: e2017.

Caron Y, Lasri S, Losson B. *Fasciola hepatica*: An assessment on the vectorial capacity of *Radix labiata* and *R. balthica* commonly found in Belgium. *Veterinary Parasitology* 2007; 149: 95-103.

Caron Y, Rondelaud D, Losson B. The detection and quantification of a digenean infection in the snail host with special emphasis on *Fasciola* sp. *Parasitol Res* 2008; 103: 735-44.

Caron Y, Righi S, Lempereur L, Saegerman C, Losson B. An optimized DNA extraction and multiplex PCR for the detection of *Fasciola* sp. in lymnaeid snails. *Vet Parasitol* 2011; 178: 93-9.

Caron Y, Martens K, Lempereur L, Saegerman C, Losson B. New insight in lymnaeid snails (Mollusca, Gastropoda) as intermediate hosts of *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea) in Belgium and Luxembourg. *Parasit Vectors* 2014; 7: 66.

Cringoli G, Taddei R, Rinaldi L, Veneziano V, Musella V, Cascone C, Sibilio G, Malone JB. Use of remote sensing and geographical information systems to identify environmental features that influence the distribution of paramphistomosis in sheep from the southern Italian Apennines. *Veterinary Parasitology* 2004; 122: 15-26.

Cucher MA, Carnevale S, Prepelitchi L, Labbé JH, Wisnivesky-Colli C. PCR diagnosis of *Fasciola hepatica* in field-collected *Lymnaea columella* and *Lymnaea viatrix* snails. *Veterinary Parasitology* 2006; 137: 74-82.

Dar Y, Rondelaud D, Vignoles P, Dreyfuss G. *Pseudosuccinea columella*: age resistance to *Calicophoron daubneyi* infection in two snail populations. *Parasite* 2015; 22

Degueurce F, Abrous M, Dreyfuss G, Rondelaud D, Gevrey J. Paramphistomum daubneyi and Fasciola hepatica: the prevalence of natural or experimental infections in four species of freshwater snails in eastern France. Journal of Helminthology 1999; 73: 197-202.

Deplazes P, Joachim A, Mathis A, Strube C, Taubert A, von Samson-Himmelstjerna G, Zahner H. Familie Paramphistomidae (Pansenege). In: Parasitologie für die Tiermedizin, 4. Auflage edn: Thieme 2020: 185-7.

Devos J. Paramphistomosis in sheep; Natural infection of lambs by Calicophoron daubneyi. Revue Méd. Vét. 2013; 164: 528-35.

Díaz P, Lomba C, Pedreira J, Arias M, Sánchez-Andrade R, Suárez JL, Díez-Baños P, Morrondo P, Paz-Silva A. Analysis of the IgG antibody response against Paramphistomidae trematoda in naturally infected cattle: Application to serological surveys. Veterinary Parasitology 2006; 140: 281-8.

Díaz P, Paz-Silva A, Sánchez-Andrade R, Suárez JL, Pedreira J, Arias M, Díez-Baños P, Morrondo P. Assessment of climatic and orographic conditions on the infection by Calicophoron daubneyi and Dicrocoelium dendriticum in grazing beef cattle (NW Spain). Veterinary Parasitology 2007a; 149: 285-9.

Díaz P, Pedreira J, Sánchez-Andrade R, Suárez JL, Arias MS, Francisco I, Fernández G, Díez-Baños P, Morrondo P, Paz-Silva A. Risk periods of infection by Calicophoron daubneyi (Digenea:Paramphistomidae) in cattle from oceanic climate areas. Parasitology Research 2007b; 101: 339-42.

Dinnik JA. Paramphistomum daubneyi sp.nov. from cattle and its snail host in the Kenya Highlands. Parasitology 1962; 52: 143-51.

Dreyfuss G, Vignoles P, Rondelaud D. Variability of Fasciola hepatica infection in Lymnaea ovata in relation to snail population and snail age. Parasitology Research 2000; 86: 69-73.

Dreyfuss G, Vignoles P, Abrous M, Rondelaud D. Unusual snail species involved in the transmission of *Fasciola hepatica* in watercress beds in central France. *Parasite* 2002; 9: 113-20.

Dreyfuss G, Vignoles P, Rondelaud D. Natural infections of *Omphiscola glabra* (Lymnaeidae) with *Fasciola hepatica* in central France. *Parasitology Research* 2003; 91: 458-61.

Dreyfuss G, Vignoles P, Rondelaud D. *Fasciola hepatica*: epidemiological surveillance of natural watercress beds in central France. *Parasitol Res* 2005; 95: 278-82.

Dreyfuss G, Vignoles P, Rondelaud D. *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: Decrease in prevalence of natural infection in habitats colonized by *Galba truncatula* and *Lymnaea glabra*. *Revue Méd. Vét.* 2014; 165: 160-6.

Ferreras MC, González-Lanza C, Pérez V, Fuertes M, Benavides J, Mezo M, González-Warleta M, Giráldez J, Martínez-Ibeas AM, Delgado L, Fernández M, Manga-González MY. *Calicophoron daubneyi* (Paramphistomidae) in slaughtered cattle in Castilla y León (Spain). *Veterinary Parasitology* 2014; 199: 268-71.

Foster AP, Otter A, Sullivan T, Cranwell MP, Twomey DF, Millar MF, Taylor MA. Rumen fluke (paramphistomosis) in British cattle. *Veterinary Record* 2008; 162: 528.

Fox NJ, White PCL, McClean CJ, Marion G, Evans A, Hutchings MR. Predicting Impacts of Climate Change on *Fasciola hepatica* Risk. *PLOS ONE* 2011; 6: e16126.

Frandsen F, Christensen NO. An introductory guide to the identification of cercariae from African freshwater snails with special reference to cercariae of trematode species of medical and veterinary importance. *Acta Trop* 1984; 41: 181-202.

Fuertes M, Pérez V, Benavides J, González-Lanza MC, Mezo M, González-Warleta M, Giráldez FJ, Fernández M, Manga-González MY, Ferreras MC. Pathological changes in cattle naturally infected by *Calicophoron daubneyi* adult flukes. *Veterinary Parasitology* 2015; 209: 188-96.

Glöer P (2002) Süßwassergastropoden Nord- und Mitteleuropas : Mollusca I : Bestimmungsschlüssel, Lebensweise, Verbreitung, 2., neubearbeitete Auflage edn. ConchBooks, Hackenheim

Glöer P, Meier-Brook C (2003) Süßwassermollusken, 13. neubearbeitete Auflage edn. Deutscher Jugendbund für Naturbeobachtung DJN

González-Warleta M, Lladosa S, Castro-Hermida JA, Martínez-Ibeas AM, Conesa D, Muñoz F, López-Quílez A, Manga-González Y, Mezo M. Bovine paramphistomosis in Galicia (Spain): Prevalence, intensity, aetiology and geospatial distribution of the infection. *Veterinary Parasitology* 2013; 191: 252-63.

Gordon DK, Roberts LCP, Lean N, Zadoks RN, Sargison ND, Skuce PJ. Identification of the rumen fluke, *Calicophoron daubneyi*, in GB livestock: possible implications for liver fluke diagnosis. *Veterinary Parasitology* 2013; 195: 65-71.

Heussler V, Kaufmann H, Strahm D, Liz J, Dobbelaere D. DNA probes for the detection of *Fasciola hepatica* in snails. *Molecular and Cellular Probes* 1993; 7: 261-7.

Iglesias-Piñeiro J, González-Warleta M, Castro-Hermida JA, Córdoba M, González-Lanza C, Manga-González Y, Mezo M. Transmission of *Calicophoron daubneyi* and *Fasciola hepatica* in Galicia (Spain): Temporal follow-up in the intermediate and definitive hosts. *Parasites & Vectors* 2016; 9: 610.

Jones RA, Williams HW, Dalesman S, Brophy PM. Confirmation of *Galba truncatula* as an intermediate host snail for *Calicophoron daubneyi* in Great Britain, with evidence of alternative snail species hosting *Fasciola hepatica*. *Parasites & Vectors* 2015; 8: 656.

Jones RA, Brophy PM, Mitchell ES, Williams HW. Rumen fluke (*Calicophoron daubneyi*) on Welsh farms: prevalence, risk factors and observations on co-infection with *Fasciola hepatica*. *Parasitology* 2017a; 144: 237-47.

Jones RA, Williams HW, Dalesman S, Ayodeji S, Thomas RK, Brophy PM. The prevalence and development of digenean parasites within their intermediate snail host, *Galba truncatula*, in a geographic area where the presence of *Calicophoron daubneyi* has recently been confirmed. *Veterinary Parasitology* 2017b; 240: 68-74.

Kaplan RM, Dame JB, Reddy GR, Courtney CH. A repetitive DNA probe for the sensitive detection of *Fasciola hepatica* infected snails. *Int J Parasitol* 1995; 25: 601-10.

Kaplan RM, Dame JB, Reddy GR, Courtney CH. The prevalence of *Fasciola hepatica* in its snail intermediate host determined by DNA probe assay. *Int J Parasitol* 1997; 27: 1585-93.

Knubben-Schweizer G, Rüegg S, Torgerson PR, Rapsch C, Grimm F, Hässig M, Deplazes P, Braun U. Control of bovine fasciolosis in dairy cattle in Switzerland with emphasis on pasture management. *The Veterinary Journal* 2010; 186: 188-91.

Knubben-Schweizer G, Scheuerle M, Pfister K. Die Bekämpfung des großen Leberegels beim Rind. *Tierarztl Prax Ausg G* 2011; 39: 179-85.

Koch S (2005) Untersuchungen zur Verbreitung von *Fasciola hepatica* im bayerischen Milchviehbestand. In: Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie. Ludwig-Maximilians-Universität München

Kozak M, Wędrychowicz H. The performance of a PCR assay for field studies on the prevalence of *Fasciola hepatica* infection in *Galba truncatula* intermediate host snails. *Veterinary Parasitology* 2010; 168: 25-30.

Kraneburg W. Beiträge zur Biologie und Pathogenität des einheimischen

Pansenegels Paramphistomum cervi. Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift 1977; 90: 316-20.

Magalhaes K, Jannotti-Passos L, dos Santos Carvalho O. Detection of Lymnaea columella infection by Fasciola hepatica through Multiplex-PCR. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004; 99: 421-4.

Magalhaes KG, Jannotti-Passos LK, Caldeira RL, Berne ME, Muller G, Carvalho OS, Lenzi HL. Isolation and detection of Fasciola hepatica DNA in Lymnaea viatrix from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues through multiplex-PCR. Vet Parasitol 2008; 152: 333-8.

Mage C, Bourgne H, Toullieu J, Rondelaud D, Dreyfuss G. Fasciola hepatica and Paramphistomum daubneyi: changes in prevalences of natural infections in cattle and in Lymnaea truncatula from central France over the past 12 years. Vet. Res. 2002; 33: 439-47.

Malrait K, Verschave S, Skuce P, Van Loo H, Vercruysse J, Charlier J. Novel insights into the pathogenic importance, diagnosis and treatment of the rumen fluke (Calicophoron daubneyi) in cattle. Veterinary Parasitology 2015; 207: 134-9.

Martínez-Ibeas AM, Martínez-Valladares M, González-Lanza C, Miñambres B, Manga-González MY. Detection of Dicrocoelium dendriticum larval stages in mollusc and ant intermediate hosts by PCR, using mitochondrial and ribosomal internal transcribed spacer (ITS-2) sequences. Parasitology 2011; 138: 1916-23.

Martínez-Ibeas AM, González-Warleta M, Martínez-Valladares M, Castro-Hermida JA, González-Lanza C, Miñambres B, Ferreras C, Mezo M, Manga-González MY. Development and validation of a mtDNA multiplex PCR for identification and discrimination of Calicophoron daubneyi and Fasciola hepatica in the Galba truncatula snail. Veterinary Parasitology 2013; 195: 57-64.

Millar M, Colloff A, Scholes S. Disease associated with immature paramphistome infection. Veterinary Record 2012; 171: 509.

Millar M, Foster A, Mitchell G, Skuce P, Wessels J, Velo-Rego E, Collins R, Stevenson H, Crutchley A. Rumen fluke in South American camelids in Great Britain. *Veterinary Record* 2017; 181: 123.

Mitchell A, Bourn D, Mawdsley J, Wint W, Clifton-Hadley R, Gilbert M. Characteristics of cattle movements in Britain – an analysis of records from the Cattle Tracing System. *Animal Science* 2007; 80: 265-73.

O'Shaughnessy J, Garcia-Campos A, McAloon CG, Fagan S, de Waal T, McElroy M, Casey M, Good B, Mulcahy G, Fagan J, Murphy D, Zintl A. Epidemiological investigation of a severe rumen fluke outbreak on an Irish dairy farm. *Parasitology* 2017; 145: 948-52.

Odening K, Bockhardt I, Gräfner G. Die Frage der Pansenegelarten in der DDR (Trematoda: Paramphistomidae) und ihrer Zwischenwirtsschnecken. *Monatshefte für Veterinärmedizin* 1978; 33: 179-81.

Ploeger HW, Ankum L, Moll L, van Doorn DCK, Mitchell G, Skuce PJ, Zadoks RN, Holzhauser M. Presence and species identity of rumen flukes in cattle and sheep in the Netherlands. *Veterinary Parasitology* 2017; 243: 42-6.

Pointier J-P, Coustau C, Rondelaud D, Theron A. *Pseudosuccinea columella* (Say 1817) (Gastropoda, Lymnaeidae), snail host of *Fasciola hepatica*: first record for France in the wild. *Parasitology Research* 2007; 101: 1389-92.

Rapsch C, Dahinden T, Heinzmann D, Torgerson PR, Braun U, Deplazes P, Hurni L, Bär H, Knubben-Schweizer G. An interactive map to assess the potential spread of *Lymnaea truncatula* and the free-living stages of *Fasciola hepatica* in Switzerland. *Veterinary Parasitology* 2008; 154: 242-9.

Relf V, Good B, McCarthy E, de Waal T. Evidence of *Fasciola hepatica* infection in *Radix peregra* and a mollusc of the family Succineidae in Ireland. *Veterinary Parasitology* 2009; 163: 152-5.

Rinaldi L, Perugini AG, Capuano F, Fenizia D, Musella V, Veneziano V, Cringoli G. Characterization of the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA of *Calicophoron daubneyi* from various hosts and locations in southern Italy. *Vet Parasitol* 2005; 131: 247-53.

Rognlie MC, Dimke KL, Knapp SE. Detection of *Fasciola hepatica* in Infected Intermediate Hosts Using RT-PCR. *J Parasitol* 1994; 80: 748-55.

Rolfe PF, Boray JC, Nichols P, Collins GH. Epidemiology of paramphistomosis in cattle. *International Journal for Parasitology* 1991; 21: 813-9.

Rondelaud D, Vignoles P, Dreyfuss G. Parasite development and visceral pathology in *Galba truncatula* co-infected with *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*. *Journal of Helminthology* 2007a; 81: 317-22.

Rondelaud D, Belfaiza M, Vignoles P, Moncef M, Dreyfuss G. Redial generations of *Fasciola hepatica*: a review. *Journal of Helminthology* 2009; 83: 245-54.

Rondelaud D, Hourdin P, Vignoles P, Dreyfuss G, Cabaret J. The detection of snail host habitats in liver fluke infected farms by use of plant indicators. *Veterinary Parasitology* 2011; 181: 166-73.

Rondelaud D, Vignoles P, Dreyfuss G. Larval trematode infections in *Galba truncatula* (Gastropoda, Lymnaeidae) from the Brenne Regional Natural Park, central France. *Journal of Helminthology* 2015; 90: 256-61.

Sanabria R, Titi A, Mekroud A, Vignoles P, Dreyfuss G, Rondelaud D, Romero J. *Paramphistomum daubneyi*: characteristics of infection in three lymnaeid species. *Parasite* 2012; 19: 445-9.

Sargison N, Francis E, Davison C, Bronsvort BMD, Handel I, Mazeri S. Observations on the biology, epidemiology and economic relevance of rumen flukes (*Paramphistomidae*) in cattle kept in a temperate environment. *Veterinary*

Parasitology 2016; 219: 7-16.

Sargison ND, Shahzad K, Mazeri S, Chaudhry U. A high throughput deep amplicon sequencing method to show the emergence and spread of *Calicophoron daubneyi* rumen fluke infection in United Kingdom cattle herds. *Vet Parasitol* 2019; 268: 9-15.

Schweizer G, Meli ML, Torgerson PR, Lutz H, Deplazes P, Braun U. Prevalence of *Fasciola hepatica* in the intermediate host *Lymnaea truncatula* detected by real time TaqMan PCR in populations from 70 Swiss farms with cattle husbandry. *Veterinary Parasitology* 2007; 150: 164-9.

Silvestre A, Sauve C, Cabaret J. Caprine *Paramphistomum daubneyi* (Trematoda) infection in Europe. *Veterinary Record* 2000; 146: 674-5.

Spence SA, Fraser GC, Dettmann EB, Battese DF. Production responses to internal parasite control in dairy cattle. *Australian Veterinary Journal* 1992; 69: 217-20.

Szmidt-Adjidé V, Abrous M, Adjidé CC, Dreyfuss G, Lecompte A, Cabaret J, Rondelaud D. Prevalence of *Paramphistomum daubneyi* infection in cattle in central France. *Veterinary Parasitology* 2000; 87: 133-8.

Taylor MA, Coop RL, Wall RL. Rumen fluke species identification. In: *Veterinary Parasitology*, 4th edn: Wiley 2016: 283.

Toolan DP, Mitchell G, Searle K, Sheehan M, Skuce PJ, Zadoks RN. Bovine and ovine rumen fluke in Ireland—Prevalence, risk factors and species identity based on passive veterinary surveillance and abattoir findings. *Veterinary Parasitology* 2015; 212: 168-74.

Vignoles P, Titi A, Mekroud A, Rondelaud D, Dreyfuss G. *Calicophoron daubneyi* and *Fasciola hepatica*: characteristics of natural and experimental co-infections of these digeneans in the snail *Lymnaea glabra*. *Journal of Helminthology* 2016; 91:

1-6.

Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 1991; 10: 506-13.

Wiese V (2014) *Die Landschnecken Deutschlands Finden - Erkennen - Bestimmen*, 1. Auflage edn. Quelle & Meyer Verlag GmbH & Co, Wiebelsheim

Zintl A, Garcia-Campos A, Trudgett A, Chryssafidis AL, Talavera-Arce S, Fu Y, Egan S, Lawlor A, Negredo C, Brennan G, Hanna RE, De Waal T, Mulcahy G. Bovine paramphistomes in Ireland. *Veterinary Parasitology* 2014; 204: 199-208.

IX. ANHANG

1. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Pansenegebefall der Hauben- und Pansenschleimhaut (Foto: Andrea Küchler).....</i>	<i>9</i>
<i>Abbildung 2: Galba truncatula (Zwerg-schlammschnecke) (Foto: Andrea Küchler)</i>	<i>12</i>
<i>Abbildung 3: Seichter Graben (Foto: Irene Schairer)</i>	<i>13</i>
<i>Abbildung 4: Typisches Habitat mit Binsengewächs (Foto: Irene Schairer).....</i>	<i>13</i>
<i>Abbildung 5: oben: Schl�pfende Mirazidie, links: Leere Eihülle (Foto: Andrea Küchler)</i>	<i>32</i>
<i>Abbildung 6: Frisch geschlüpfte Mirazidie (Länge ca. 160 �m) (Foto: Andrea Küchler)</i>	<i>32</i>
<i>Abbildung 7: Elektropherogramm der Leiter (Sequenzen definierter Basenpaarlängen)</i>	<i>38</i>
<i>Abbildung 8: Standardkurve der Zeitpunkte der maximalen Fluoreszenzsignale bei definierten Basenpaarlängen (bp)</i>	<i>38</i>
<i>Abbildung 9: Beispiel eines virtuellen Gels einer Multiplex-PCR; L = Leiter; Bahnen 1-6 = 1 Target im Ansatz; Bahnen 7-8 = 2 Targets im Ansatz; Bahn 9 = Positivkontrolle; Bahnen 10-11 = Negativkontrollen</i>	<i>39</i>
<i>Abbildung 10: Balkendiagramm der Infektionsstatus der Betriebe</i>	<i>41</i>
<i>Abbildung 11: Kartenausschnitt von Baden-Württemberg und Bayern mit besuchten Betrieben mit den jeweiligen Infektionsstatus</i>	<i>42</i>
<i>Abbildung 12: Balkendiagramm der saisonalen Verteilung der Betriebsbesuche mit Markierung des Infektionsstatus.....</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 13: Elektropherogramm der Positivkontrollen mit Primern Cd-Cox und Fhr-II.....</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 14: Elektropherogramm der Positivkontrollen mit Primern Cd-Cox und Fh-Cox.....</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 15: Elektropherogramm der Positivkontrollen mit Primern Cd-Cox Neu und Fh-Cox Neu; Hauptpeaks mit den jeweiligen Nebenpeaks (Pfeile).....</i>	<i>47</i>
<i>Abbildung 16: Virtuelles Gel der Positivkontrollen mit Primern Cd-Cox Neu und Fh-Cox Neu</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 17: Elektropherogramm eines fraglich spezifischen Signals eines 5er-Schnecken-Pool mit einer F. hepatica-infizierten Schnecke.....</i>	<i>50</i>
<i>Abbildung 18: Elektropherogramm der Wiederholung des 5er-Schnecken-Pools</i>	

<i>mit spezifischem Signal für F. hepatica</i>	51
<i>Abbildung 19: Balkendiagramm der im Hauptversuch mittels Multiplex-PCR untersuchten Schneckenarten</i>	52
<i>Abbildung 20: Redien von F. hepatica in G. truncatula (Mikroskopie Quetsch-Präparat, Pfeile) (Foto: Andrea KÜchler)</i>	55
<i>Abbildung 21: Zerkarie von F. hepatica in G. truncatula (Mikroskopie Quetsch-Präparat, Pfeil) (Foto: Andrea KÜchler)</i>	55

2. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Prävalenzen natürlicher Infektionen von G. truncatula mit F. hepatica und C. daubneyi</i>	14
<i>Tabelle 2: Methode der PCR und Multiplex-PCR zur Untersuchung von Zwischenwirtsinfektionen mit F. hepatica und C. daubneyi</i>	23
<i>Tabelle 3: Anzahl Schnecken mit unterschiedlichen DNA-Extraktionsprotokollen</i>	30
<i>Tabelle 4: Primer-Sequenzen und Literaturnachweise</i>	33
<i>Tabelle 5: Temperatur-Protokoll</i>	37
<i>Tabelle 6: Zeitpunkte (s) der maximalen Fluoreszenz bei der entsprechenden Basenpaarlänge (bp)</i>	39
<i>Tabelle 7: Anzahl Betriebe mit Befunden und Infektionsstatus</i>	42
<i>Tabelle 8: Gefundene Schneckenarten</i>	44
<i>Tabelle 9: Multiplex-PCR-Durchläufe eines 2er-Pools mit F. hepatica infizierten Schnecken</i>	46
<i>Tabelle 10: Multiplex-PCR (Cd-Cox Neu und Fh-Cox Neu) der Positiv-kontrollen mit Auswertungen der bp-Längen und PCR-Produkt-Konzentrationen</i>	48
<i>Tabelle 11: Ergebnisse Sequenzierung aus BLAST</i>	49
<i>Tabelle 12: Vergleich der PCR-Produkte ohne und mit Schnecken-DNA im Ansatz</i>	49
<i>Tabelle 13: Vergleich der PCR-Produkte mit unterschiedlichen Schnecken-DNA-Konzentrationen im Ansatz</i>	49
<i>Tabelle 14: Vergleich der PCR-Produkte mit annähernd angeglichenen Schnecken-DNA-Konzentrationen</i>	50
<i>Tabelle 15: Mittels Multiplex-PCR ermittelte Infektionsraten von G. truncatula und Ergebnisse der Mikroskopie</i>	53
<i>Tabelle 16: Sequenzierungsergebnisse</i>	54
<i>Tabelle 17: Referenzen zu Mastermix-Reagenzien</i>	90
<i>Tabelle 18: Übersicht der verwendeten Proben als Positiv- und Negativkontrollen in Haupt- und Vorversuchen</i>	90
<i>Tabelle 19: Übersicht der besuchten Betriebe und gesammelten Schnecken</i>	91
<i>Tabelle 20: Arithmetische Mittelwerte der Gehäusegrößen und DNA-Konzentrationen der im Hauptversuch beteiligten Schnecken</i>	96
<i>Tabelle 21: PCR-Ergebnisse von mit C. daubneyi infizierte G. truncatula</i>	97
<i>Tabelle 22: PCR-Ergebnisse von mit F. hepatica infizierte G. truncatula</i>	97

3. Tabellen des Anhangs

Tabelle 17: Referenzen zu Mastermix-Reagenzien

Reagenz	Bezeichnung	Hersteller
Puffer	5x Colorless GoTaq® Reaction Buffer	Promega
dNTP	dNTP Mix, 10 mM	Promega
Primer <i>C. daubneyi</i>	Cd Cox I-Neu for. Cd Cox I-Neu rev.	biomers.net GmbH
Primer <i>F. hepatica</i>	Fh Cox For. Neu Fh Cox1R	biomers.net GmbH
Taq-Polymerase	GoTaq® G2 DNA Polymerase	Promega
H ₂ O	dNase freies Wasser	Carl Roth GmbH + Co. KG

Tabelle 18: Übersicht der verwendeten Proben als Positiv- und Negativkontrollen in Haupt- und Vorversuchen

Probe	Benennung	Konzentration (ng/µl)	Reinheit (A260/280)
Adulter Pansenegel	PK-PE	257,0	2,012
Adulter Leberegel	PK-LE	223,0	2,035
18 Pansenegel-Mirazidien	PK-M	3,968	2,000
<i>F. hepatica</i> -infizierte <i>G. truncatula</i>	PK-S1	66,8	2,077
<i>F. hepatica</i> -infizierte <i>G. truncatula</i>	PK-S2	144,0	2,231
negativ getestete <i>G. truncatula</i>	NK-SGt	29,7	2,000
negativ getestete <i>R. labiata</i>	NK-SRI	119,0	2,000

Tabelle 19: Übersicht der besuchten Betriebe und gesammelten Schnecken

Bestandsbesuch	Betriebsart	Bestandsgröße (Adulte)	Infektionsstatus (Methode)	Schneckenart	Anzahl gesammelter Schnecken			
					Hauptversuch	PCR-Nachweis in Schnecken	ausgeschlossen	Total
13.07.2017	Milchvieh	30	LE (K+, S+)	<i>Galba truncatula</i> (Zwergschlammschnecke)	-	-	35	35
				<i>Cochlicopa lubrica</i> (Gemeine Glattschnecke)	-	-	1	1
				<i>Succinea putris</i> (Gemeine Bernsteinschnecke)	-	-	1	1
04.08.2017	Milchvieh	34	LE (K-, S+)	<i>Galba truncatula</i> (Zwergschlammschnecke)	-	-	13	13
17.11.2017	Milchvieh	52	LE (K-, S+)	<i>Galba truncatula</i> (Zwergschlammschnecke)	-	-	4	4
07.02.2018	Milchvieh	60	PE (K+) LE (K+, S+)	<i>Galba truncatula</i> (Zwergschlammschnecke)	40	<i>C. daubneyi</i> in 2 <i>G. truncatula</i>	-	40
				<i>Succinea sp.</i> (Bernsteinschnecke)	-	-	1	1
07.06.2018 ¹	Milchvieh	50	PE (K+) LE (K-, S+)	<i>Galba truncatula</i> (Zwergschlammschnecke)	4	negativ	-	4
				<i>Succinea spp.</i> (Bernsteinschnecke)	-	-	20	20
				<i>Aegopinella pura</i> (Kleine Glanzschnecke)	-	-	2	2
				<i>Petasina edentula</i> (Zahnlose Haarschnecke)	-	-	1	1
19.06.2018	Milchvieh	43	LE (K+, S+)	<i>Galba truncatula</i> (Zwergschlammschnecke)	8	negativ	-	8
				<i>Radix labiata</i> (Alpen-Schlammschnecke)	5	negativ	-	5
				<i>Succinea spp.</i> (Bernsteinschnecke, nicht spezifiziert)	-	-	12	12

Fortsetzung Tabelle 19

				<i>Zonitoides sp.</i> (Dolchschncke, nicht spezifiziert)	-	-	1	1
26.06.2018	Milchvieh	61	LE (K+, S+)	<i>Planorbis planorbis</i> (Gemeine Tellerschncke)	-	-	5	5
				<i>Bathyomphalus contortus</i> (Riementellerschncke)	-	-	1	1
				<i>Succinea spp.</i> (Bernsteinschncke, nicht spezifiziert)	-	-	3	3
03.07.2018 ²	Mutterkuh	133	PE (K+) LE (K+)	<i>Planorbis planorbis</i> (Gemeine Tellerschncke)	48	negativ	3	51
				<i>Galba truncatula</i> (Zwergschlammschncke)	14	negativ	17	31
				<i>Radix labiata</i> (Alpen- Schlammschncke)	13	negativ	48	61
				<i>Succinea spp.</i> (Bernsteinschncke, nicht spezifiziert)	-	-	27	27
				<i>Zonitoides spp.</i> (Dolchschncke, nicht spezifiziert)	-	-	7	7
04.07.2018	Milchvieh	66	LE (K-, S+)	<i>Galba truncatula</i> (Zwergschlammschncke)	-	-	1	1
10.07.2018 ³	Mutterkuh	12	PE (K+) LE (S+)	<i>Galba truncatula</i> (Zwergschlammschncke)	-	-	6	6
				<i>Succinea spp.</i> (Bernsteinschncke, nicht spezifiziert)	-	-	10	10
25.07.2018	Milchvieh	70	LE (K+, S+)	<i>Galba truncatula</i> (Zwergschlammschncke)	-	-	4	4
				<i>Planorbis planorbis</i> (Gemeine Tellerschncke)	-	-	8	8

Fortsetzung Tabelle 19

				<i>Planorbis carinatus</i> (Gekielte Tellerschnecke)	-	-	2	2
				<i>Radix balthica</i> (Gemeine Schlammschnecke)	-	-	2	2
				<i>Radix labiata</i> (Alpen-Schlammschnecke)	-	-	1	1
				<i>Bithynia tentaculata</i> (Gemeine Schnauzenschnecke)	-	-	1	1
				<i>Succinea</i> spp. (Bernsteinschnecke, nicht spezifiziert)	-	-	5	5
01.08.2018	Milchvieh	27	PE (K+) LE (K-, S+)	<i>Aegopinella pura</i> (Kleine Glanzschnecke)	9	negativ	3	12
				<i>Cochlicopa nitens</i> (Glänzende Glatt-/Achatschnecke)	7	negativ	-	7
				<i>Succinea</i> sp. (Bernsteinschnecke, nicht spezifiziert)	1	negativ	-	1
14.09.2018 ²	Mutterkuh	133	PE (K+) LE (K+)	<i>Potamopyrgus antipodarum</i> (Neuseeländische Deckelschnecke)	35	negativ	150	185
				<i>Physella acuta</i> (Spitze Blaseschnecke)	34	negativ	50	84
				<i>Radix labiata</i> (Alpen-Schlammschnecke)	47	negativ	8	55
				<i>Gyraulus parvus</i> (Amerikanisches Posthörnchen)	13	negativ	13	26
				<i>Radix balthica</i> (Gemeine Schlammschnecke)	22	negativ	-	22
				<i>Planorbis planorbis</i> (Gemeine Tellerschnecken)	14	negativ	-	14

Fortsetzung Tabelle 19								
				<i>Radix auricularia</i> (Ohrschlammschnecke)	-	-	10	10
				<i>Galba truncatula</i> (Zwergschlammschnecke)	-	-	4	4
				<i>Aplexa hypnorum</i> (Moosblasenschnecke)	2	negativ	-	2
				<i>Stagnicola palustris</i> (Gemeine Sumpfschnecke)	1	negativ	-	1
				<i>Succinea putris</i> (Gemeine Bernsteinschnecke)	-	-	7	7
				<i>Aegopinella spp.</i> (Glanzschnecke, nicht spezifiziert)	-	-	2	2
25.09.2018	Milchvieh	46	PE (K+) LE (K+, S+)	<i>Galba truncatula</i> (Zwergschlammschnecke)	25	negativ	65	90
				<i>Radix labiata</i> (Alpen- Schlammschnecke)	10	negativ	-	10
				<i>Physella acuta</i> (Spitze Blasenschnecke)	7	negativ	-	7
02.10.2018	Mutterkuh	140	PE (K+)	<i>Radix balthica</i> (Gemeine Schlammschnecke)	23	negativ	-	23
				<i>Galba truncatula</i> (Zwergschlammschnecke)	11	negativ	-	11
08.05.2018	Milchvieh	50	PE (K+) LE (K+, S+)	<i>Galba truncatula</i> (Zwergschlammschnecke)	3	negativ	-	3
				<i>Radix labiata</i> (Alpen- Schlammschnecke)	1	negativ	-	1
				<i>Succinea sp.</i> (Bernsteinschnecke, nicht spezifiziert)	1	negativ	-	1
09.05.2019 ¹	Milchvieh	40	LE (K+, S+)	<i>Galba truncatula</i> (Zwergschlammschnecke)	11	<i>F. hepatica</i> in 3 <i>G. truncatula</i>	3	14

Fortsetzung Tabelle 19								
26.06.2019	Milchvieh	50	LE (K-, S+)	<i>Aegopinella spp.</i> (Glanzschnecke, nicht spezifiziert)	2	negativ	1	3
10.07.2019 ³	Mutterkuh	12	PE (K+) LE (K+)	<i>Galba truncatula</i> (Zwergschlammschnecke)	50	<i>F. hepatica</i> in 9 <i>G. truncatula</i>	1	51
17.07.2019	Milchvieh	35	LE (K-, S+)	<i>Galba truncatula</i> (Zwergschlammschnecke)	20	negativ	-	20
				<i>Radix labiata</i> (Alpen- Schlammschnecke)	6	negativ	-	6
31.07.2019	Milchvieh	15	LE (K-, S+)	<i>Galba truncatula</i> (Zwergschlammschnecke)	1	negativ	-	1
18.09.2019	Milchvieh	46	LE (K-, S+)	<i>Galba truncatula</i> (Zwergschlammschnecke)	26	negativ	-	26
				<i>Radix labiata</i> (Alpen- Schlammschnecke)	3	negativ	-	3
25.09.2019	Milchvieh	41	LE (K+, S+)	<i>Galba truncatula</i> (Zwergschlammschnecke)	10	<i>F. hepatica</i> in 3 <i>G. truncatula</i>	13	23
02.10.2019	Milchvieh	49	LE (K-, S+)	<i>Galba truncatula</i> (Zwergschlammschnecke)	17	negativ	10	27
Total					544	-	582	1126

Symbol- und Begriffserklärung: ¹, ² und ³ jeweils gleicher Betrieb, zwei Besuche; LE=Leberegel; PE=Pansenegele; K+=Koproscopie positiv; K-=Koproscopie negativ; S+=Serologie positiv; blau=Wasserschlamm-; grün=Landlungenschnecke

Tabelle 20: Arithmetische Mittelwerte der Gehäusegrößen und DNA-Konzentrationen der im Hauptversuch beteiligten Schnecken

Schneckenart	Anzahl	Arithmetischer Mittelwert	
		Gehäusegröße (mm)	DNA-Konzentration (ng/μl)
<i>G. truncatula</i>	226	4,95	60,26
<i>R. labiata</i>	84	7,23	162,25
<i>P. planorbis</i>	59	5,99	78,74
<i>R. balthica</i>	45	7,54	175,24
<i>P. acuta</i>	40	6,79	77,38
<i>P. antipodarum</i>	35	3,86	30,33
<i>G. parvus</i>	13	3,38	15,40
<i>Aegopinella spp.</i>	11	5,09	100,89
<i>C. nitens</i>	7	5,14	61,87
<i>A. hypnorum</i>	2	6,75	137,00
<i>Succinea spp.</i>	2	4,50	37,40
<i>S. palustris</i>	1	13,50	141,00
Schnecken mit kaputtem Gehäuse	19	-	-
Total	544	-	-

Bemerkung: Schnecken mit kaputtem Gehäuse wurden für beide Berechnungen ausgeschlossen

Tabelle 21: PCR-Ergebnisse von mit *C. daubneyi* infizierte *G. truncatula*

Betriebs- besuch	Infektionsstatus des Betriebs	Gehäuse- größe (mm)	DNA-Konz. Schnecke (ng/µl)	DNA-Konz. PCR-Produkt (ng/µl)
07.02.2018	PE-Kopro +	5,0	14,4	0,39
	LE-Kopro + LE-Sero +	5,0	37,1	3,42

Begriffserklärung: PE-/LE-Kopro=Pansenegel-/Leberegel-Koproskopie; LE-Sero=
Leberegel-Serologie

Tabelle 22: PCR-Ergebnisse von mit *F. hepatica* infizierte *G. truncatula*

Betriebs- besuch	Infektionsstatus des Betriebs	Gehäuse- größe (mm)	DNA-Konz. Schnecke (ng/µl)	DNA-Konz. PCR-Produkt (ng/µl)
09.05.2019	PE-Kopro -	4,5	32,2	8,52
	LE-Kopro +	4,5	79,2	4,88
	LE-Sero +	5,0	104,0	0,18
10.07.2019	PE-Kopro +	3,5	20,8	5,38
	LE-Kopro +	3,5	27,2	5,35
		8,0	89,1	2,88
		5,0	32,2	2,69
		4,0	37,1	5,11
		3,5	17,3	0,47
		3,5	20,8	0,49
		4,0	27,2	0,67
		3,5	14,4	2,03
25.09.2019	PE-Kopro -	5,0	39,6	7,00
	LE-Kopro +	5,0	49,5	0,54
	LE-Sero +	4,5	19,8	4,66

Begriffserklärung: PE-/LE-Kopro=Pansenegel-/Leberegel-Koproskopie; LE-Sero=
Leberegel-Serologie

X. DANKSAGUNG

Bei Frau Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer möchte ich mich herzlich für die Überlassung dieses schönen Themas bedanken. Von Anfang an hast du mir sehr viel Vertrauen entgegengebracht, vielen Dank dafür!

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Frank Weber für die Unterstützung bei der Methodenetablierung. Gespräche mit dir brachten mich stets fachlich, aber auch mental weiter. Das habe ich sehr geschätzt.

Ein riesiges Dankeschön geht an Sandra. Ohne deinen stetigen Beistand und Support hätte ich es wohl nicht geschafft.

Ich möchte mich bei Katrin bedanken, die mit viel Geduld und Hingabe meine Schnecken bestimmt und mir bei jeglichen Schnecken-Fragen geholfen hat.

Ich danke Irene für die geteilte Freude am Schneckensuchen und natürlich für die wunderschönen Fotos.

Ich bedanke mich bei allen Landwirtinnen und Landwirten der teilnehmenden Betriebe für ihre Bereitschaft und ihre Zeit.

Bei den Mitarbeiterinnen des Labors möchte ich mich für die Bearbeitung der Kotproben herzlich bedanken.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter sowie Doktorandinnen und Doktoranden der Klinik für Wiederkäuer danke ich für die lehrreiche und unglaublich lustige Zeit.

Anika, Carina, Eva, Johanna, Katha, Laura, Sophie und Stine – ich danke euch, dass ihr mir die Promotionszeit so verschönert und erleichtert habt. Mit euch machts einfach Spaß!

Ein riesiger Dank gebührt all meinen großartigen Mädels in der Heimat. Andrea, Eva, Graziella, Irina, Kaja, Lilian, Lisa, Simi und Sophie danke für eure grenzenlose Freundschaft.

Ich möchte mich bei meiner Schwiegerfamilie bedanken für die Unterstützung und die schöne Zeit, die wir zusammen verbringen.

Danke Moni und Anita für die entspannenden Treffen und anregenden Gespräche.

Ein riesengroßer Dank geht an meine Familie. Mami, Dädi, ihr steht mir bei allem unterstützend zur Seite. Dafür bin ich euch sehr dankbar. Meinen lieben Geschwistern Peter, Gabriela, Regula und Chrigi und den Partnerinnen und Partnern danke ich sehr, dass sie immer für mich da sind!

Ein riesengroßer Dank gilt dir, Jonas. Danke für deine Unterstützung!