

Etablierung der Zucht von *Galba truncatula* unter Laborbedingungen zur  
Erforschung des Lebenszyklus von *Calicophoron daubneyi* im  
Zwischenwirt

von Verena Kerstin Elbert

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

Etablierung der Zucht von *Galba truncatula* unter  
Laborbedingungen zur Erforschung des Lebenszyklus von  
*Calicophoron daubneyi* im Zwischenwirt

von Verena Kerstin Elbert

aus Bergisch Gladbach

München 2024



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



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

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

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

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

Tag der Promotion: 06. Juli 2024



*Meinem Bruder*



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Paramphistomidose.....</b>	<b>3</b>
1.1.	Entwicklungszyklus des Pansenegels (Abb. 1).....	4
1.2.	Prävalenzen .....	6
1.3.	Klinik.....	7
1.4.	Diagnostik .....	8
1.5.	Therapie.....	10
<b>2.</b>	<b>Zwischenwirte mit Fokus auf <i>Galba truncatula</i>.....</b>	<b>11</b>
2.1.	Zwergschlammschnecke <i>Galba truncatula</i> .....	12
2.1.1.	Morphologie und Fortpflanzung .....	12
2.1.2.	Habitate .....	13
2.1.3.	Habitate unter Laborbedingungen.....	15
2.1.4.	Nahrung.....	17
<b>3.</b>	<b>Experimentelle Infektionen von <i>Galba truncatula</i> mit <i>Calicophoron daubneyi</i>.....</b>	<b>18</b>
3.1.	Miracidienentwicklung unter Laborbedingungen .....	19
3.2.	Infektionen mit <i>Calicophoron daubneyi</i> unter Laborbedingungen.....	19
3.3.	Co-Infektionen mit <i>Calicophoron daubneyi</i> und <i>Fasciola hepatica</i> .....	21
3.4.	Diagnostik von <i>Calicophoron daubneyi</i> im Zwischenwirt .....	21
3.4.1.	Schneckenzerquetschung .....	22
3.4.2.	Schneckensektion .....	22
3.4.3.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	22
3.5.	Fluoreszenzfärbung der Larvenstadien .....	22
<b>4.</b>	<b>Larvenstadien von <i>Calicophoron daubneyi</i> .....</b>	<b>24</b>
4.1.	Pansenegleier .....	24
<b>5.</b>	<b>Larvenstadien von <i>Calicophoron daubneyi</i> im Zwischenwirt .....</b>	<b>24</b>
5.1.	Miracidien .....	25
5.2.	Redien, freie (Pro-)Cercarien .....	25
5.3.	Metacercarien .....	27
5.4.	Larvenstadien von <i>Calicophoron daubneyi</i> im Endwirt .....	28

<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>29</b>
<b>1.</b>	<b>Zucht der Zwergschlammschnecke <i>Galba truncatula</i>.....</b>	<b>29</b>
1.1.	Habitate unter Laborbedingungen .....	29
1.2.	Schneckensammlung .....	35
1.3.	Monitoring der Schneckenzucht.....	36
1.4.	Fütterung .....	36
<b>2.</b>	<b>Schlupf des Pansenegel Miracidiums .....</b>	<b>37</b>
2.1.	Gewinnung der Pansenegelleier .....	37
2.2.	Entwicklung des Miracidiums.....	38
2.3.	Speziesbestimmung .....	39
<b>3.</b>	<b>Vorversuche: Untersuchungen zur Etablierung der Metacercarienproduktion.....</b>	<b>39</b>
3.1.	Verwendete Schnecken .....	39
3.2.	Miracidien .....	39
3.3.	Schneckeninfektionen .....	40
3.3.1.	Infektionen mit <i>Calicophoron daubneyi</i> Miracidien.....	40
3.3.2.	Infektionen mit <i>Fasciola hepatica</i> Miracidien.....	41
<b>4.</b>	<b>Untersuchung des Infektionsstatus des Zwischenwirtes .....</b>	<b>42</b>
4.1.	Mikroskopische Untersuchung.....	42
4.2.	Cercarienausschüttung natürlich infizierter Schnecken .....	42
4.3.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	43
4.3.1.	DNA-Extraktion .....	44
4.3.2.	Primer .....	44
4.3.3.	Positiv- und Negativkontrolle .....	44
4.3.4.	Elektrophorese.....	44
<b>5.</b>	<b>Untersuchungen zur Metacercarienproduktion.....</b>	<b>44</b>
5.1.	Temperaturveränderung .....	44
5.2.	Ausschüttung .....	45
5.3.	Vitalitätsprüfung.....	46
<b>6.</b>	<b>Vorversuche zur Fluoreszenzfärbung .....</b>	<b>46</b>
6.1.	Probenvorbereitung <i>Calicophoron daubneyi</i> Miracidium .....	46
6.2.	Lectin-FITC.....	47
6.3.	Nukleinsäurefarbstoff (Hoechst) .....	47

6.4.	Primärer und sekundärer Antikörper .....	47
6.5.	Fluoreszenzanalyse Metacercarie.....	48
7.	<b>Datenauswertung und -visualisierung .....</b>	<b>49</b>
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>51</b>
<b>1.</b>	<b>Zwergschlammschneckenzucht.....</b>	<b>51</b>
1.1.	Habitate unter Laborbedingungen .....	51
1.2.	Schneckenwachstum .....	54
1.3.	Fortpflanzung .....	58
1.4.	Fütterung .....	60
<b>2.</b>	<b>Etablierung der Metacercarienproduktion unter Laborbedingungen</b>	<b>61</b>
2.1.	Experimentelle <i>Galba truncatula</i> Infektionen .....	61
2.1.1.	Vorversuche: Infektionen mit <i>Calicophoron daubneyi</i> .....	61
2.1.2.	Infektionsversuch mit <i>Calicophoron daubneyi</i> und <i>Fasciola hepatica</i> ....	63
2.1.3.	Hauptversuche: Infektionen mit <i>Calicophoron daubneyi</i> .....	65
2.2.	Infektionsstatus des Zwischenwirtes mittels PCR .....	68
2.3.	Speziesbestimmung .....	69
2.4.	Metacercarienausschüttungen .....	70
<b>3.</b>	<b>Untersuchung der Larvenstadien von <i>Calicophoron daubneyi</i> und <i>Fasciola hepatica</i>.....</b>	<b>76</b>
3.1.	<i>Calicophoron daubneyi</i> Eier und Miracidien.....	77
3.2.	<i>Calicophoron daubneyi</i> Cercarie .....	80
3.3.	<i>Calicophoron daubneyi</i> Metacercarie .....	81
3.4.	Deskriptiver Vergleich der Cercarien und Metacercarien beider Trematoden <i>Fasciola hepatica</i> und <i>Calicophoron daubneyi</i> .....	82
<b>4.</b>	<b>Vorversuche zur Fluoreszenzfärbung .....</b>	<b>85</b>
4.1.	Untersuchung der Oberflächenkohlenhydrate von Miracidien mittels Lectin-FITC-Färbung .....	85
4.2.	Nachweis der Nukleinsäure in Miracidien mittels Hoechst-Färbung .....	87
4.3.	Untersuchung der Mikrotubulstruktur in Miracidien.....	87
4.4.	Analyse der Autofluoreszenz der Metacercarie .....	90
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>91</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>91</b>

<b>2.</b>	<b>Methodik der Zwergschlammschneckenzucht unter Laborbedingungen .....</b>	<b>92</b>
2.1.	Vergleich der verschiedenen Habitate unter Laborbedingungen .....	92
2.2.	Der Einfluss der Wasserqualität auf die <i>Galba truncatula</i> Zucht unter Laborbedingungen.....	96
2.3.	Vergleich der Vor- und Nachteile verschiedener Nahrungsquellen.....	98
2.4.	Die Relevanz von Erde in Habitaten unter Laborbedingungen.....	99
2.5.	Sonstige Bedingungen zur Zucht von <i>Galba truncatula</i> unter Laborbedingungen.....	100
2.6.	Fortpflanzung der <i>Galba truncatula</i> unter Laborbedingungen .....	100
<b>3.</b>	<b>Dynamik der Zwischenwirtinfektion.....</b>	<b>101</b>
<b>4.</b>	<b>Entwicklungsstadien von <i>Calicophoron daubneyi</i> .....</b>	<b>106</b>
4.1.	Eier .....	106
4.2.	Miracidien .....	107
4.3.	Metacercarien .....	108
4.4.	Weiterführende Diagnostik .....	109
<b>5.</b>	<b>Fazit und Ausblick .....</b>	<b>110</b>
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>113</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>115</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>117</b>
<b>IX.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>131</b>
1.	Abbildungsverzeichnis .....	131
2.	Tabellenverzeichnis.....	135
3.	Videoverzeichnis.....	136
4.	Tabellen des Anhangs .....	137
<b>X.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>139</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
bp	Basenpaar(e)
<i>C.</i>	<i>Calicophoron</i>
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CaCO <sub>3</sub>	Kalziumkarbonat
Cd	<i>Calicophoron daubneyi</i>
cm	Zentimeter
Cox	Cytochrom-c-Oxidase
°dH	Grad deutscher Härte
d. h.	das heißt
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminooethyl)tetraessigsäure
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent Assay (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
EpG	Eizahl pro Gramm Kot
<i>F.</i>	<i>Fasciola</i>
<i>G.</i>	<i>Galba</i>
g	Gramm
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff
<i>L.</i>	<i>Lymnaea</i>
l	Liter
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität München
lx	Lux
m	Meter
max.	maximal
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mm	Millimeter

---

mM	Millimolar
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NEJ	newly excysted juvenile (frisch ausgeschlüpfte Jungegel)
nm	Nanometer
O.	<i>Omphiscola</i>
p	Signifikanzwert
P.	<i>Paramphistomum</i>
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
p. e.	post exposition (nach der Exposition)
p. i.	post infectionem (nach der Infektion)
sp.	Spezies (Singular)
spp.	Spezies (Plural)
Tab.	Tabelle
z. B.	Zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
%	Prozent
∅	Durchmesser

## I. EINLEITUNG

In der veterinärmedizinischen Forschung spielt die Untersuchung von parasitären Erkrankungen der Wiederkäuer eine zentrale Rolle, um die Gesundheit und Produktivität der Nutztiere zu sichern. Eine dieser parasitären Erkrankungen ist die Paramphistomidose (DEPLAZES et al., 2020b). Die zunächst als unbedeutend angesehene Parasitose – im Gegensatz zu der durch den großen Leberegel verursachte Fasciolose – wurde lange Zeit nur in tropischen Gebieten beschrieben (DINNIK, 1962; DEPLAZES et al., 2020b). Allerdings zeigt sich nun auch in Europa eine zunehmende Prävalenz der Paramphistomidose (GONZÁLEZ-WARLETA et al., 2013; MARTINEZ-IBEAS et al., 2016; HUSON et al., 2017; O'SHAUGHNESSY et al., 2017; FORBES, 2018; NARANJO-LUCENA et al., 2018; ČERVENÁ et al., 2022) mit nicht nur subklinischen Verläufen. Insbesondere die intestinale Form löst auch klinische Symptome mit möglichen Einbußen in der Produktivität und der Gesundheit bis hin zu Todesfällen bei Wiederkäuern aus (MASON et al., 2012; MILLAR et al., 2012; FORBES, 2018). Die Paramphistomidose wird durch den Pansenegel, in Europa hauptsächlich durch die Art *Calicophoron daubneyi*, verursacht (MARTINEZ-IBEAS et al., 2013; JONES et al., 2015; KÜCHLER, 2021). Der Pansenegel durchläuft einen komplexen Entwicklungszyklus (SEY, 1980; DEPLAZES et al., 2020b), in dem die Zwergschlammschnecke *Galba truncatula* als Hauptzwischenwirt von essenzieller Bedeutung ist (SEY, 1980; CHIPEV et al., 1985; AUGOT et al., 1996; ABROUS et al., 1997; JONES et al., 2015). Das derzeitige Wissen über die Parasitendynamik in der Zwischenwirtpopulation sowie der Pathogenese und Präpatenz im Endwirt ist unzureichend (HUSON et al., 2017; ATCHESON et al., 2020; OLIVER, 2021; ČERVENÁ et al., 2022). Die Erforschung der parasitären Lebenszyklen und der Parasit-Zwischenwirt-Dynamik unter Laborbedingungen erfordert eine stabile und reproduzierbare Zucht des Zwischenwirts.

Das Ziel dieser Dissertation bestand darin, die Zucht von *Galba truncatula* unter kontrollierten Laborbedingungen zu etablieren, um den Lebenszyklus von *Calicophoron daubneyi* im Zwischenwirt zu untersuchen. Die Etablierung einer konstanten Schneckenpopulation und deren spezifischer Bedürfnisse unter Laborbedingungen zu verstehen, legt den Grundstein für experimentelle Infektionen der *Galba truncatula* mit *Calicophoron daubneyi*. Durch die

experimentellen Infektionsversuche können infektiöse Metacercarien unter Laborbedingungen gewonnen werden, die für weiterführende Experimente auf Ebene des Endwirts notwendig sind. Durch ein tieferes Verständnis des Lebenszyklus im Zwischen- und Endwirt können effektivere Präventions-, Diagnose- und Behandlungsstrategien entwickelt werden, die bereits auf Zwischenwirtebene Anwendung finden sollten. Die Relevanz dieser Arbeit wird durch die zunehmende Verbreitung der Paramphistomidose in Europa und den eingeschränkten Diagnose-, Kontroll- und Behandlungsmethoden unterstrichen (FORBES, 2018).

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Paramphistomidose

Die Paramphistomidose ist eine parasitäre Erkrankung, die durch den Pansenegel ausgelöst wird. Der Pansenegel gehört zu der Familie Paramphistomidae, zum Stamm der Plathelminthes (Plattwürmer) und zum Unterstamm der Trematoda (Saugwürmer). Auch der große Leberegel, *Fasciola hepatica* (*F. hepatica*), gehört diesem Stamm an.

Diese Arbeit befasst sich ausschließlich mit der Art *Calicophoron daubneyi* (*C. daubneyi*). Es sind auch weitere Arten, wie *Paramphistomum leydeni*, *Paramphistomum cervi*, *Paramphistomum ichikawai*, *Calicophoron microbothrium* und *Calicophoron calicophoron* beschrieben. Alle Arten zählt man aufgrund der Morphologie zur Ordnung der Amphistomida (PLOEGER et al., 2017; DEPLAZES et al., 2020b). Eine Differenzierung der unterschiedlichen Arten ist von großer Bedeutung, da verschiedene Schneckenarten als Zwischenwirte der Parasiten dienen (SEY, 1980). Eine Übertragung der Krankheit hängt somit immer vom Vorhandensein der entsprechenden Zwischenwirte ab (IGLESIAS-PINEIRO et al., 2016).

Erstmals wurde *C. daubneyi* im Jahr 1962 in Kenia nachgewiesen, damals noch unter der Bezeichnung *Paramphistomum daubneyi*<sup>1</sup>. *C. daubneyi* konnte aufgrund der unterschiedlichen Zwischenwirtsschnecken sicher von *Calicophoron microbothrium* differenziert werden (DINNIK, 1962). In Europa wurde diese Art erst 1971 entdeckt (SEY, 1980). Fast 20 Jahre später wurde es endgültig in *C. daubneyi*, aufgrund der typisch weit entwickelten pars musculosa, umbenannt (EDUARDO, 1983).

*Paramphistomum cervi* war lange in Europa die am häufigsten nachgewiesene Art. Allerdings haben aktuelle Studien gezeigt, dass *C. daubneyi* nun die führende Art ist und deshalb an großer Bedeutung gewonnen hat (GONZÁLEZ-WARLETA et al., 2013; GORDON et al., 2013; HUSON et al., 2017; PLOEGER et al., 2017;

---

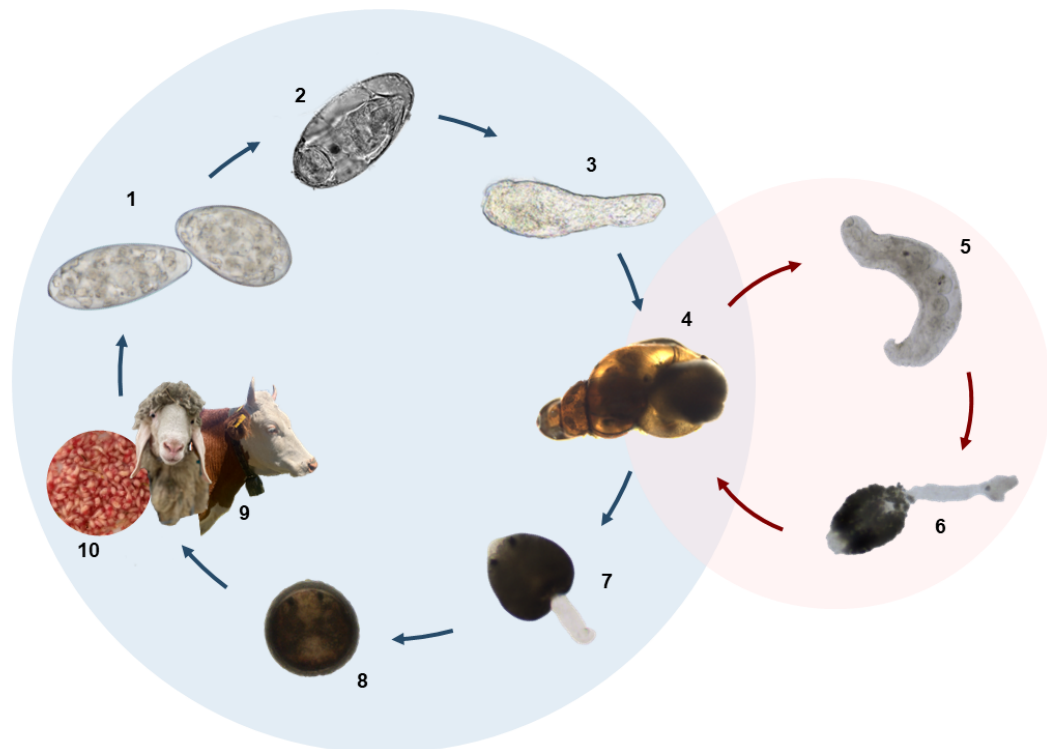
<sup>1</sup> Wird in dieser Arbeit konsequent als „*C. daubneyi*“ bezeichnet, obwohl in älteren Veröffentlichungen die frühere Bezeichnung „*P. daubneyi*“ genutzt wurde.

WENZEL et al., 2019; FORSTMAIER et al., 2021; WIEDERMANN et al., 2021; ALSTEDT et al., 2022). Vereinzelt trat außerdem *Paramphistomum leydeni* in Deutschland (FORSTMAIER et al., 2021), Irland (MARTINEZ-IBEAS et al., 2016) und den Niederlanden (PLOEGER et al., 2017) auf.

### 1.1. Entwicklungszyklus des Pansenegels (Abb. 1)

Die Pansenegel haben einen heteroxenen Zyklus. Dies bedeutet, dass sie einen Zwischenwirt für ihre Entwicklung benötigen. Je nach Gattung (*Calicophoron* oder *Paramphistomum*) kommen unterschiedliche Süßwasserschnecken als Zwischenwirte in Frage. Als Endwirte dienen domestizierte Wiederkäuer wie Rinder, Schafe, Ziegen und Büffel sowie Wildwiederkäuer und Neuweltkameliden (Abb. 1 [9]) (DEPLAZES et al., 2020b). Die infizierten Wiederkäuer scheiden mit ihrem Kot unembryonierte Eier aus (Abb. 1 [1]) (HORAK, 1971). Diese gelangen in die Umwelt und entwickeln sich (Abb. 1 [2]) unter bestimmten Bedingungen, wie einem feucht-wässrigen Milieu und bei Temperaturen zwischen 15–25 °C, innerhalb von drei Wochen zur Flimmerlarve, dem Miracidium (Abb. 1 [3]). Die Miracidien dringen durch bohrende Bewegungen ihres Penetrationsorgans bevorzugt in den Mantel der passenden Zwischenwirtsschnecke ein (Abb. 1 [4]). Dieser Vorgang dauert etwa 20–25 Minuten (SEY, 1977). In dem Zwischenwirt findet die direkte Entwicklung zur Sporozyste, durch den Verlust der bewimperten Epidermisplatten, des Penetrationsorgans und der inneren Strukturen (apikale Papille, Drüse und Penetrationsdrüsen), statt. Die Körperform der Sporozyste wird oval und sie wächst in der Schnecke innerhalb von neun Tagen auf ihre fast 10-fache Größe an. In der Sporozyste erfolgt die ungeschlechtliche Differenzierung der Redien aus den Keimballen (Abb. 1 [5]) der ersten (etwa an Tag 14 p. i.) und anschließend der zweiten Generation (ab Tag 28 p. i.) (KUMAR, 1999). Durch einen Riss in der Vorderwand verlassen die Redien die Sporozyste. Danach entwickeln sich Keimlinge im Körper aller Redien zu Procercarien (unreifen Cercarien) (Abb. 1 [6]). Die Procercarien verlassen die Redien und beenden ihre Differenzierung zu Cercarien im Schneckenkörper (ABROUS et al., 1997). Die Cercarien sind das letzte Stadium der Entwicklung im Zwischenwirt und werden von der Schnecke etwa 42 Tage nach Infektion ausgeschüttet (Abb. 1 [7]) (DINNIK, 1962; KUMAR, 1999). Die Cercarien enzystieren nach einigen Minuten bis Stunden durch den Schwanzabwurf und der Einkapslung an Pflanzen im Wasser zu Metacercarien (Abb. 1 [8]). Die bereits genannten Endwirte (Abb. 1 [9])

infizieren sich durch die Aufnahme infektiöser Metacercarien, die an dem Futter haften oder sich im Trinkwasser befinden. Die Metacercarien exzystieren im Dünndarm der Endwirte zu Jungegel. Dieser Prozess wird durch die Anwesenheit von Pepsin, dem niedrigem pH-Wert des Labmagens, Trypsin und Gallensäure begünstigt. Die Jungegel haften sich an den ersten Abschnitt der Dünndarmschleimhaut fest (KUMAR, 1999). Mit einer gewissen Größe wandern sie nach 1,5–2 Monaten weiter in Richtung Pansen (DEVOS et al., 2013). Im Pansen angekommen haften sich die Egel bevorzugt an den Pansenzotten des Pansenvorhofs fest (FUERTES et al., 2015). Etwa drei Monate nach Aufnahme sind die Egel (Abb. 1 [10]) ausgereift und legen Eier, die wiederum mit dem Kot der Endwirte ausgeschieden werden (Abb. 1 [1]) (SEY, 1977; DEPLAZES et al., 2020b).



**Abbildung 1: Entwicklungszyklus des Pansenegels *Calicophoron daubneyi*:**

(1) mit dem Kot ausgeschiedene unembryonierte Eier, (2) embryoniertes Ei mit vollständig entwickeltem Miracidium, das bereit zum Schlupf ist, (3) frisch geschlüpftes Miracidium auf der Suche nach einem passenden Zwischenwirt, (4) Zwischenwirt *Galba truncatula*; in ihr findet die Entwicklung zur Sporozyste, (5) Redie, (6) Procercarie (unreife Cercarie) und (7) schwimmfähiger Cercarie statt, (8) Metacercarie, das infektiöse Stadium, wodurch die Endwirte (9) sich infizieren, (10) adulte Pansenegel im Pansen der Endwirte

## 1.2. Prävalenzen

Lange Zeit wurde der Paramphistomidose außerhalb der Subtropen und Tropen kaum Aufmerksamkeit geschenkt. Dies hat sich in den letzten Jahren mit immer wieder auftretenden Nachweisen von *C. daubneyi* in Europa und weiteren Ländern stark verändert. Dabei konnten teilweise auch in Europa hohe Prävalenzen nachgewiesen werden. In Irland kommen mittlerweile mehr Infektionen mit dem Pansen- als mit dem großen Leberegel bei Rindern vor (NARANJO-LUCENA et al., 2018) und auch in Schafen hat der Pansenegel in Irland mit 77 % die höchste Prävalenz (MARTINEZ-IBEAS et al., 2016). In der Gesamtzahl betrachtet infizieren sich in Irland und dem Vereinigten Königreich jedoch mehr Rinder als Schafe mit *C. daubneyi* (FORBES, 2018). Es sind Prävalenzen bei Rindern von 6–36 % in Spanien (DÍAZ et al., 2007; GONZÁLEZ-WARLETA et al., 2013; FERRERAS et al., 2014), 20–44,7 % in Frankreich (SZMIDT-ADJIDÉ et al., 2000; MAGE et al., 2002), 15,8 % in den Niederlanden (PLOEGER et al., 2017) und 5,5 % in Deutschland (FORSTMAIER et al., 2021) beschrieben. Bei Schafen sind 5,8 % in den Niederlanden (PLOEGER et al., 2017) und 2,2 % in Deutschland (ALSTEDT et al., 2022) beschrieben.

Untersuchungen des Zwischenwirts zeigten, dass die allgemeine Infektionswahrscheinlichkeit des Zwischenwirts im Frühjahr und Sommer anstieg und vom Herbst bis zum Winter wieder abnahm. Der Endwirt hingegen konnte sich ganzjährig infizieren, da das ganze Jahr über unreife oder reife Cercarien in den Schnecken nachgewiesen werden konnten (IGLESIAS-PINEIRO et al., 2016).

Über die Ursachen des starken Anstiegs der Pansenegelinfektionen wird noch gemutmaßt. Gründe könnten sein: Verstärkter Tierhandel über die Ländergrenzen hinaus (EDUARDO, 1983), die Zwischenwirtspräsenz auf den Weiden (ABROUS et al., 1999a; JONES et al., 2015; NARANJO-LUCENA et al., 2018), der Klimawandel, der mildere Winter und mehr Niederschlag mit sich bringt (SKUCE et al., 2013), eingeschränkte Therapiemöglichkeiten der Paramphistomidose (FORBES, 2018) und der routinemäßige Einsatz von Anthelminthika zur Bekämpfung der Fasciolose, welcher eine Nische für die Ansiedlung und Ausbreitung von *C. daubneyi* öffnet (O'SHAUGHNESSY et al., 2017). Außerdem werden auch Wasservögel, die als Vektoren für Wasserschnecken dienen, als mögliche Verbreitungsmöglichkeit von *C. daubneyi* diskutiert (VAN LEEUWEN, 2012).

### 1.3. Klinik

Es gibt verschiedene Formen der Paramphistomidose. Einerseits die relevante intestinale Form, welche durch frisch exzystierte juvenile wandernde Jungegel verursacht wird und zur klinischen Paramphistomidose führt. Bei dieser Form heften sich die Jungegel an der Dünndarmschleimhaut fest und durch die mechanische Einwirkung an der Schleimhaut sowie durch die Wanderung der Egel kommt es zu einer akuten Entzündung (Enteritis) und Einblutungen im Darm. Meistens sind die ersten Meter des Duodenums und manchmal Teile des Jejunums betroffen (DEPLAZES et al., 2020b). Die klinischen Symptome gehen von wässrigem Durchfall, Inappetenz, Dehydration, Hypoalbuminämie, Gewichtsverlust und Schwäche bis hin zum Tod. Denn eine Infektion mit einer großen Menge an Metacercarien kann schwere und in manchen Fällen auch eine fatale akute intestinale Paramphistomidose auslösen (MASON et al., 2012; MILLAR et al., 2012; FORBES, 2018). Hierbei sind Krankheitsausbrüche beschrieben bei denen 30000 bis 66000 unreife Jungegel im Darm eines Tieres gefunden wurden (FORBES, 2018). Die akute Form wurde bisher bei Schafen und Ziegen aller Altersklassen diagnostiziert, bei Rindern jedoch nur bei Kälbern und Erstsömmrigen (MILLAR et al., 2012).

Auf der anderen Seite gibt es die ruminale Form, welche meist von den Endwirten gut toleriert wird (Abb. 2). Bei dieser Form verursachen die adulten Pansenegel nur kleine Gewebeschäden und post mortem kann eine Atrophie der Zotten im Dünndarm und im Pansen festgestellt werden (MASON et al., 2012; DEPLAZES et al., 2020b).



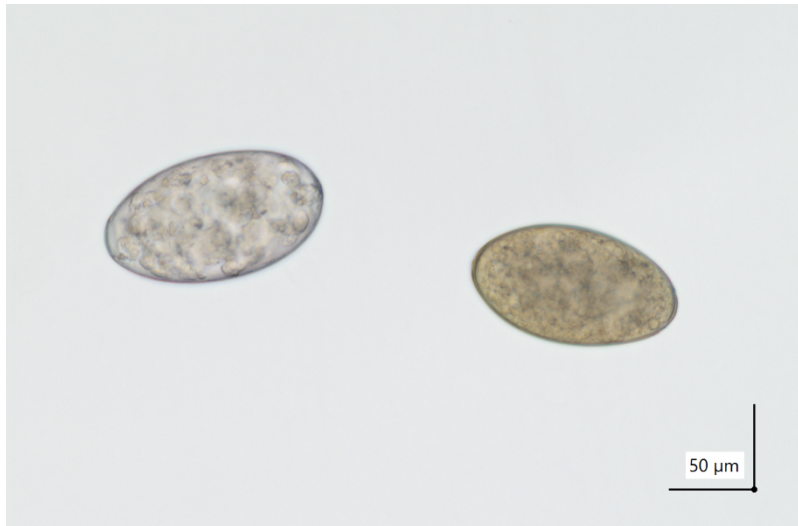
**Abbildung 2: Ruminale Form der Paramphistomidose mit anhaftenden Pansenegeln an den Pansenzotten**

#### **1.4. Diagnostik**

Die Diagnose einer Pansenegelinfektion beruht auf der Untersuchung der Vormägen der Endwirte auf adulte Egel post mortem, dem Nachweis der fäkalen Eiausscheidung und der Entdeckung von unreifen Egel im Kot (HUSON et al., 2017; WIEDERMANN et al., 2021).

Zur Diagnostik der fäkalen Eiausscheidungen eignet sich eine quantitative Sedimentationstechnik der Kotproben (HORAK, 1971; SARGISON et al., 2016; DEPLAZES et al., 2020a). Dafür werden 10 g Kot mit 100 ml Leitungswasser vermischt und gründlich zu einer homogenen Suspension verrührt. Diese Mischung wird dann durch ein 150 µm Sieb gegeben. Das gefilterte Material wird anschließend in ein Becherglas überführt und dreimal für jeweils 20 Minuten sedimentiert. Das aus dem Kot gewonnene Sediment wird dann unter einem Mikroskop auf Trematodeneier (Abb. 3) untersucht (IGLESIAS-PINEIRO et al., 2016). Zu beachten ist dabei, dass Eier des großen Leberegels (Abb. 3) wegen derselben Form und einer ähnlichen Größe den Eiern des Pansenegels ähneln. Sie können jedoch aufgrund der durch die Galle erhaltenen goldgelben Färbung voneinander differenziert werden. Eine aktuelle Studie aus dem Vereinigten Königreich verglich die unterschiedlichen Sedimentationstechniken, wie Mini-FLOTAC (MALRAIT et al., 2015) und den Flukefinder® miteinander. Die

Sensitivität wurde bei einer Infektionslast von  $> 20$  EpG (Eizahl pro Gramm Kot) für beide Methoden auf  $> 90$  % geschätzt. Bei niedriger Infektionslast von 10 EpG zeigte der Flukefinder® eine höhere Sensitivität. Die Mini-FLOTAC Technik hingegen war am genauesten, um die tatsächliche und geschätzte Infektionsintensität in EpG festzustellen (BOSCO et al., 2023).



**Abbildung 3: Mikroskopische Untersuchung der Trematodeneier in einer Kotprobe: *Calicophoron daubneyi* Ei (links) und *Fasciola hepatica* Ei (rechts)**

Die Menge der ausgeschiedenen und detektierbaren Eier steht in hoher Korrelation mit der Anzahl der Pansenegel im Vormagen, da die Eier direkt in den Magen-Darm-Trakt gelangen und so mit dem Kot der Endwirte ausgeschieden werden (GONZÁLEZ-WARLETA et al., 2013; SARGISON et al., 2016).

Die Diagnostik der intestinalen Paramphistomidose war bisher zuverlässig nur am toten Tier mit Hilfe des Sieb-Wasch-Verfahrens möglich: Dazu wird der Dünndarm mit einer Waschflüssigkeit ausgewaschen und diese anschließend gesiebt. Der Rückstand im Sieb wird auf juvenile Egel abgesucht. Dieses Verfahren kann auch mit abgesetztem Kot angewandt werden, um damit die intestinale Form beim lebenden Tier nachzuweisen (DEPLAZES et al., 2020a).

Als neuester diagnostischer Nachweis für *C. daubneyi* hat HUSON et al. (2021) einen Koproantigen-basierten enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA) entwickelt, der *C. daubneyi* Antigen im Kot natürlich infizierter Rinder ermittelt. Er weist nicht nur eine hohe Sensitivität von 93 % auf, sondern auch keine Kreuzreaktionen mit z. B. *F. hepatica*.

### 1.5. Therapie

Aktuell gibt es kein für die Therapie der Paramphistomidose zugelassenes Präparat. Zur Behandlung muss ein Präparat umgewidmet werden, welches ansonsten zur Therapie der Fasciolose verwendet wird. In Deutschland ist dies oft Distocur®. Denn einige Studien zeigten, dass der enthaltende Wirkstoff Oxyclozanid in einer hohen Dosis von 15 mg/kg auch als Therapie gegen den Pansenegel genutzt werden kann (ROLFE und BORAY, 1987; ROJO-VÁZQUEZ et al., 2012; ARIAS et al., 2013). ROLFE und BORAY (1987) untersuchten die Wirksamkeit von einem Kombinationspräparat aus 18,7 mg/kg Oxyclozanid und 9,4 mg/kg Levamisole gegen unreife und reife Pansenegel. Sie beschrieben eine Wirksamkeit von 50–96 % gegen unreife und von 93,6 % gegen adulte Pansenegel bei einer einmaligen Gabe des Kombinationspräparates. Bei einer zweiten Gabe drei Tage später stellten sie sogar eine Wirksamkeit von 99,9–100 % gegen unreife und von 97,3 % gegen adulte Pansenegel fest. Ebenso dokumentierten sie eine Reduzierung der Ei-Ausscheidung von 93–97,5 % nach 10 oder 14 Tagen nach Behandlung. Auch PARAUD et al. (2009) zeigten eine Reduktion der adulten Pansenegel von 95,6 % und 95,9 % bei behandelten Ziegen mit 15 mg/kg und 22,5 mg/kg Oxyclozanid zu Beginn der Patenz. Da Oxyclozanid in manchen Ländern jedoch nicht zugelassen ist, stellt Closantel in einer Dosierung von 10 mg/kg als orale Gabe eine akzeptable Alternative dar (ARIAS et al., 2013).

Die Autorinnen und Autoren unterstrichen darüber hinaus die Relevanz eines richtigen Weidemanagements, um die Entwicklung und die Verbreitung des Pansenegels zu reduzieren. Hierbei wird sich momentan noch an die Empfehlungen zur Bekämpfung und Prophylaxe der Fasciolose gehalten (KNUBBEN-SCHWEIZER und TORGERSON, 2015). Die vorrangige Zielsetzung ist die Verhinderung der Kontamination der Weiden mit Habitaten mit Parasiteneiern, zum Zeitpunkt der günstigsten Bedingungen für die Schneckenpopulation, welche in Europa im Sommer und Herbst ihren Höhepunkt erreicht (ABROUS et al., 1999a). Das Management richtet sich dann nach der Lage der Habitate bzw. infektiösen Weiden auf dem Betrieb und muss bestandsindividuell durchgeführt werden (KNUBBEN-SCHWEIZER et al., 2011).

## 2. Zwischenwirte mit Fokus auf *Galba truncatula*

Die Zwergschlammschnecke, *Galba truncatula*<sup>2</sup>, ist eine Süßwasserschnecke und der Haupt-Zwischenwirt von *C. daubneyi* (SEY, 1980; CHIPEV et al., 1985; AUGOT et al., 1996; ABROUS et al., 1997; ABROUS et al., 1999a; JONES et al., 2015).

In Großbritannien, Deutschland und Spanien wurden bisher keine weiteren Zwischenwirte für *C. daubneyi* gefunden (MARTINEZ-IBEAS et al., 2013; JONES et al., 2015; KÜCHLER, 2021). In Zentralfrankreich hingegen konnte *Omphiscola* (damals noch *Lymnaea*) *glabra* als Zwischenwirt nachgewiesen werden, wenn sie mit beiden Trematoden (*Fasciola* und *Calicophoron*) infiziert war. Allerdings wurde festgestellt, dass die Produktion von Metacercarien beider Trematoden in *O. glabra* geringer ist als in *G. truncatula*, was vermuten lässt, dass die Parasiten sich möglicherweise noch nicht vollständig an die Schnecke angepasst haben (ABROUS et al., 1999a; ABROUS et al., 2000; VIGNOLES et al., 2016).

Des Weiteren konnte bei einer Studie in Frankreich in *L. palustris* reife Redien, in *L. ovata* und *P. acuta* hingegen Sporozysten und unreife Redien entdeckt werden (DEGUEURCE et al., 1999). Zusätzlich konnten bei einer experimentellen Infektion auch Cercarien in *L. neotropica* und *L. viatrix* var. *ventricosa* identifiziert werden (SANABRIA et al., 2012). Als ein möglicher Zwischenwirt von *C. daubneyi* ist *Pseudosuccinea columella* beschrieben. Allerdings zeigte sich hier bei Schnecken in einer experimentellen Studie die Existenz einer altersabhängigen Resistenz gegen die Infektion mit *C. daubneyi*, die zum Zeitpunkt der Miracidienexposition größer als 2 mm waren (DAR et al., 2015). Dies beobachtet auch schon SEY (1977), da er keine Schnecke, die älter als ein Monat war, erfolgreich infizieren konnte. Die Wahrscheinlichkeit einer Infektion mit *C. daubneyi* nahm also mit zunehmendem Alter und Schneckengröße ab (IGLESIAS-PINEIRO et al., 2016). VIGNOLES et al. (2008) widersprachen mit ihrer Studie allerdings diesen Beobachtungen. Sie infizierten erfolgreich auch 6 mm und 7 mm große Schnecken, welche sogar eine höhere Anzahl an Metacercarien als kleinere Schnecken produzierten.

Obwohl, wie gerade erwähnt, in einigen Ländern weitere Zwischenwirte

---

<sup>2</sup> Wird in dieser Arbeit durchgehend als „*G. truncatula*“ bezeichnet, obwohl in älteren Publikationen die Bezeichnung „*L. truncatula*“ verwendet wurde.

beschrieben wurden, wird *G. truncatula* gegenüber den anderen Zwischenwirtschnecken bevorzugt, wenn diese im selben Habitat leben (ABROUS et al., 1999a).

Andere Arten aus der Familie der Paramphistomidae, wie *C. calicophoron* können hingegen auch Wasserschnecken der Familie *Planorbidae* (Tellerschnecken) als Zwischenwirt nutzen (SEY, 1980).

### **2.1. Zwergschlammschnecke *Galba truncatula***

Die Zwergschlammschnecke *Galba truncatula* gehört zur Familie der Schlammschnecken (*Lymnaeidae*), zu der die Gattungen *Lymnaea*, *Radix*, *Galba* und *Myxas* zählen. Die erste dokumentierte Beschreibung einer Zwergschlammschnecke stammt von Pfarrer Johann Samuel SCHRÖTER, der 1773 bei Thangelstedt fündig wurde. Er beschrieb sie als „kleine schwarze Flußtrompete mit 5–6 Gewinden“ (SCHRÖTER, 1779). Von Landwirten wird sie manchmal „Leberegelschnecke“ genannt, allerdings sollte diese Bezeichnung vermieden werden, da der Leberegel auch andere Schneckenarten als Zwischenwirt verwendet (MEHL, 1932).

Die meisten in Quelltümpel und Gräben lebenden Schnecken sterben nach 11–18 Monaten. Bei in strömenden Bächen lebenden Schnecken ist sogar ein Alter von 16–24 Monaten (MEHL, 1932) beschrieben. Unter Laborbedingungen wurden nur maximal 17 Monate alte Schnecken nachgewiesen (FRÖMMING, 1956).

#### **2.1.1. Morphologie und Fortpflanzung**

*G. truncatula* besitzt ein helles, fein gestreiftes hornbraunes Gehäuse, welches zwischen 5–14 mm, meist jedoch weniger als 12 mm (DREYFUSS et al., 2015) hoch und 5 mm breit ist und sich aus fünf bis sechs Gewinden um die eigene Achse zusammensetzt. Besonders auffällig ist der tiefe offene Nabel an der Mündungsöffnung (MEHL, 1932; FRÖMMING, 1956).

Die Zwergschlammschnecken sind wie alle Lungenschnecken (*Pulmonata*) Zwitter. Ihre Geschlechtsöffnungen liegen allerdings getrennt voneinander. Eine Schnecke muss als Männchen und eine als Weibchen während einer Begattung fungieren. Jedoch sind nicht zwingend zwei Schnecken notwendig, denn auch eine Selbstbefruchtung ist möglich (FRÖMMING, 1956). Unter Laborbedingungen konnte bislang keine Begattung beobachtet werden. Diese Schnecken zeigten eine

Präferenz für Selbstbefruchtung (ROBERTS, 1950).

Anhand ihrer Augen, die an der Basis der nicht rückziehbaren Fühler auf der Innenseite liegen, kann man *G. truncatula* der Unterordnung der Wasserlungenschnecken (*Basommatophora*) zuordnen (MEHL, 1932).

Sie besitzen eine Atemhöhle, die von Zeit zu Zeit durch das Atemloch mit Sauerstoff an der Wasseroberfläche gefüllt werden muss. Neugeborene hingegen können noch den gelösten Sauerstoff im Wasser verwenden (MEHL, 1932; FRÖMMING, 1956).

Die Geschlechtsreife tritt ein, bevor die Schnecken ausgewachsen sind und ist abhängig von vorhandener Nahrung und den Umweltbedingungen (FRÖMMING, 1956). Eine Laichablage konnte bei Schnecken nach fünf Wochen unter Laborbedingungen ohne saisonale Abhängigkeit entdeckt werden. In der Natur wird mit jährlich mindestens 500–800 Eiern pro Schnecke gerechnet. Bei einer Wassertemperatur von unter 10 °C findet keine Laichablage mehr statt. Deshalb sind die meisten Eier von April bis Mai und immer im Wasser auffindbar. Die daraus entstehenden Jungtiere können sich bereits im August oder September weiter fortpflanzen (MEHL, 1932). Die Eimassen sind kugelförmig und etwa 1,7–6 mm x 1,3–4 mm groß. Sie enthalten durchschnittlich 4–14 Eier und max. 31 Eier (MEHL, 1932; MOAZENI et al., 2018). Die einzelnen Eier liegen frei in der Laichhülle. Die Entwicklungsdauer ist von der Wasser- und Umgebungstemperatur abhängig und dauert zwischen 1–6 Wochen (MEHL, 1932). Beobachtungen zeigten, dass eine Schnecke unter Laborbedingungen innerhalb von zwölf Wochen und im Laufe von zwei Generationen mehr als 25000 Nachkommen bringen kann (OLLERENSHAW, 1971). Im Feld nimmt eine Schneckenpopulation mit steigenden Temperaturen deutlich zu (IGLESIAS-PINEIRO et al., 2016). Je mehr Nachkommen eine Schnecke produziert, desto schneller verendet diese jedoch (MEHL, 1932).

### **2.1.2. Habitate**

Die Zwergschlammschnecken gehören zu den amphibischen oder auch semi-aquatischen Schnecken. Schnecken, die in Höhenlagen von über 1000 m leben und ständig fließendem Wasser ausgesetzt sind, sind mehr aquatisch angepasst als diejenigen, die im Tiefland leben (DREYFUSS et al., 2015).

Ihre Lebensräume, auch Habitate genannt, sind kleine flache Gewässer, wie

langsam fließende Bäche, Gräben, Drainageabflüsse, Moorflächen, kleine Tümpel und Tränkstellen. Auch in temporären Wasseransammlungen, wie Pfützen und Trittlöcher der Wiederkäuer, die abhängig von der Niederschlagsmenge sind, kann man sie finden, vorausgesetzt, es befinden sich Lebensräume mit dauerhafter Feuchtigkeit (Primärhabitats) in der Nähe. Indikator-, Leit- oder Zeigerpflanzen für typische Habitats sind z. B. Schachtelhalme (*Equisetum*) und Binsen (*Juncus*) (MEHL, 1932; RONDELAUD et al., 2011).

Die Schnecken halten sich in ihren Habitats bevorzugt an der Uferzone im Wasser oder direkt oberhalb des Wasserspiegels auf. Auch ins Wasser ragende Pflanzen sind ein häufiger Fundort dieser Schneckenart (MEHL, 1932; FRÖMMING, 1956; DEPLAZES et al., 2020b). RONDELAUD et al. (2015) untersuchten in ihrer Studie, in welchen von sechs verschiedenen natürlichen Habitatarten die meisten mit *C. daubneyi* und / oder *F. hepatica* infizierten Schnecken aufzufinden waren. Sie fanden mit *C. daubneyi* infizierte Schnecken am häufigsten in mit Regenwasser getränkten Furchen vor.

MEHL (1932) beschrieb, dass die Bachläufe neutral bis alkalisches, algenreiches Wasser vorweisen müssen, um ein geeignetes Habitat darstellen zu können. Dies wurde allerdings von FRÖMMING (1956) widerlegt: Der pH-Wert des Wassers hat nach dessen Untersuchungen keine Auswirkung auf das Vorkommen von *G. truncatula*.

Trotz der Bevorzugung feuchter Habitats, ist die Zwergschlammschnecke gegenüber Austrocknung widerstandsfähig und kann bis zu 4,5 Monate ohne flüssiges Wasser auskommen, allerdings beeinflussen Umweltbedingungen, wie die Luftfeuchtigkeit diese Angaben. Bei Bedarf können die Schnecken einen Schleimfilm über der Gehäuseöffnung ausbilden, welcher Flüssigkeitsverluste vermindert. Auch kältere Temperaturen von bis zu  $-8^{\circ}\text{C}$  können sie mehrere Tage ertragen, wenn sie die Möglichkeit haben sich in den Schlamm zurückziehen zu können (MEHL, 1932).

Wenn das Wasser nicht mehr den bevorzugten Bedingungen der Schnecken entspricht, z. B. wenn Fäulnisstoffe entstanden sind, verlassen sie dieses umgehend, indem sie an ins Wasser ragenden Pflanzen oder Gegenständen hochkriechen. Sie kehren von allein nicht mehr ins Wasser zurück, sondern vertrocknen, wenn sie nicht durch Niederschlag wieder passiv ins Wasser gelangen (MEHL, 1932).

Die Besiedlung der Habitate erfolgt meistens durch Verschwemmung der lebenden Schnecken bei Hochwasser (MEHL, 1932) oder auch durch Verschleppung durch Vögel (VAN LEEUWEN, 2012). Eine Schnecke kann innerhalb von 24 Stunden vier Meter zurücklegen und das auch gegen die Strömungsrichtung (HOHORST, 1969).

### **2.1.3. Habitate unter Laborbedingungen**

Schon vor über 70 Jahren befassten sich unterschiedliche Autorinnen und Autoren mit der Aufgabe, Habitate unter Laborbedingungen für *G. truncatula* zu entwickeln, um diese kontrolliert zu züchten und weitere Forschungen durchführen zu können. Damals stand die Schneckenart hauptsächlich im Fokus zur Erforschung der Zwischenwirt-Interaktion mit *F. hepatica*. Ihre Zucht erwies sich aufgrund ihrer amphibischen oder auch semi-aquatischen Lebensweise schwieriger als bei rein aquatischen Schnecken (BORAY, 1969). Die älteste Methode um *G. truncatula* unter Laborbedingungen zu züchten beschrieben TAYLOR und MOZLEY (1948). Sie verwendeten Pfannen aus Terrakotta, die sie vorher in Teichwasser einweichten und anschließend mit einem Gefälle aus sterilisiertem Schlamm befüllten. Die Pfannen wurden danach bis zur Schlammoberfläche mit Teichwasser aufgefüllt und, um Wasserverdunstungen zu vermeiden, mit einer Glasscheibe abgedeckt. Das Behältnis wurde anschließend in einem Gewächshaus untergebracht. Die warme Umgebung förderte das Algenwachstum. Nach zwei bis drei Wochen konnten die ersten Schnecken hineingesetzt werden und sich von den Algen ernähren.

Eine weitere Methode war es, mit Plastik ausgekleidete 100 cm x 60 cm große Kisten mit einer Höhe von 10 cm als Habitat zu verwenden. Diese wurden mit sterilisiertem Schlamm befüllt, in dem daraufhin 3–4 cm tiefe Kanäle gegraben wurden. Die Kiste wurde an einem Ende erhöht gestellt, damit ein Gefälle entsteht. Entionisiertes Wasser wurde am höchsten Punkt in die Kisten mit einer Fließgeschwindigkeit von 100–200 ml/h getropft und am tiefsten Punkt befand sich ein Abflusssiphon (BORAY, 1963). Einige Jahre später verbesserte er diese Methode noch einmal selbst, indem er kleinere Plexiglas Kästen als Behältnisse verwendete, in denen der Schlamm sich nur noch in einer Ecke des Kastens befand. Die Kästen befanden sich in einem Raum ohne direktes natürliches Licht und bei einer konstanten Temperatur zwischen 22–24 °C (BORAY, 1969).

Auch die Kultivierung in mit Erde gefüllten Petrischalen von 9 cm oder 13 cm

wurden getestet. Die Schnecken wurden im Abstand von ein bis zwei Wochen in neue Petrischalen umgesetzt (GOLD, 1980).

Vor mehr als 20 Jahren wurden die ersten offenen Boxen ohne Erde, dafür mit Steinen und Wasser verwendet. Die Boxen standen in einem Raum mit einer konstanten Temperatur von 20 °C, einer Lichtintensität von 3000–4000 Lux und einer Tag-/Nachtphase von zwölf Stunden. Jeden Tag wurde ein Wasserwechsel durchgeführt (ABROUS et al., 1999c). Die Technik wurde angepasst, indem 60 cm lange und 15 cm hohe Boxen verwendet wurden, wie von DREYFUSS et al. (2015) beschrieben. Die Boxen enthielten einen Hügel aus Kieselsteinen, der von *Callitriche* sp. umgeben war. Zusätzlich wurden getrocknete Blätter von *Glyceria* sp. und Salat ergänzt. Die Lichtintensität und der Lichtrhythmus blieben unverändert, jedoch wurde die Temperatur auf 24 °C erhöht. Der Arbeitsaufwand wurde durch einen nur alle ein bis zwei Wochen erforderlichen Wasserwechsel reduziert.

Die Verwendung von Petrischalen mit einem 14 cm großen Durchmesser verringerte den Zeitaufwand für die Schneckenpflege nochmal erheblich, da auch eine experimentelle Infektion der Schnecken hier möglich war. In einer Petrischale befanden sich bis zu zehn Schnecken und 150 ml Quellwasser. Zweimal pro Woche wurden die Petrischalen gereinigt und es fand ein täglicher Wasserwechsel statt. Die Umgebungsbedingungen blieben gleich, wie oben erwähnt (ABROUS et al., 1999a; RONDELAUD et al., 2007b). Die Inhalte der Petrischalen wurden einige Jahre später mit getrocknetem Gras (*Molinia caerulea*) am Randboden, vier Stängel Quellmoos (*Fontinalis* sp.) und einem Stück getrocknetem Salat in der Mitte ergänzt. Während das Quellmoos für Sauerstoff im Wasser sorgte, reduzierte das getrocknete Gras das Ausbrechen der Schnecken. Die Wassermenge wurde auf 60 ml pro Petrischale reduziert. Weitere Vorteile für die Verwendung dieser Methode waren: Platzgewinnung (aufgrund des Stapelns der Petrischalen), schnelle Entdeckung und Eliminierung von Fremdparasiten und gute Identifizierung von Larvenstadien infizierter Schnecken (RONDELAUD et al., 2014; DREYFUSS et al., 2015).

MOAZENI et al. (2018) hingegen versuchten, ein natürliches Habitat nachzubauen. Dies war ein deutlicher Unterschied zu den beschriebenen Methoden der anderen Autorinnen und Autoren, die empfahlen, geschlossene Behälter zu verwenden, um eine konstante Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten. Sie hingegen entwickelten ein

offenes Aquarium aus einer Metallschale, die durch eine weitere Kiste unterteilt wurde. Kieselsteine, Tonscherben, Sand, Moos, Algen, Pflanzen und Erde kleideten die Schalen aus. Zwei elektrische Pumpen und ein Luftblasenstein sorgten für einen ständigen Wasser- und Sauerstoffaustausch. Auch sie installierten einen Lichtrhythmus von zwölf Stunden. Das offene Aquarium stand je nach Jahreszeit bei Temperaturen zwischen 18 °C und 32 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 22–37 %. Es fand alle zwei Wochen ein Wasserwechsel und eine Reinigung des offenen Aquariums statt.

Alle Autorinnen und Autoren bezogen ihr verwendetes Wasser sowie die Erde aus natürlichen Habitaten der Schnecken. Sie betonten die Bedeutung und Verwendung des optimalen Wassers und der geeigneten Erde für die Schneckenkultur. Eine Studie hat sogar gezeigt, dass der natürliche Boden und auch dessen Herkunft Auswirkungen auf das Schneckenwachstum hat (GOLD, 1980). Ohne diese wichtigen Bestandteile funktionierte eine Schneckenzucht unter Laborbedingungen nicht. Ebenso muss das konstante Vorhandensein von Futter gewährleistet sein und die Anzahl der Schnecken im Verhältnis zur Größe des Behältnisses beachtet werden, um ein Wettbewerb unter den Schnecken zu verhindern.

DREYFUSS et al. (2015) beschrieben auch die Relevanz der Durchführung einer Quarantänezeit neu gesammelter Schnecken, damit diese keine Fremdparasiten ins Laborhabitat hineinbringen.

#### **2.1.4. Nahrung**

Die Nahrung der Schnecken konnte ihr Wachstum, eine vermehrte Eiablage und die Produktion von Trematodenmetacercarien beeinflussen. Dies unterstreicht nochmal die Relevanz der Verwendung von geeigneter Nahrung, auch unter Laborbedingungen (DREYFUSS et al., 2015).

Die Schnecken ernähren sich sowohl in der Natur als auch unter Laborbedingungen überwiegend von Algen, wie Kieselalgen (*Diatomeen*) (MEHL, 1932) oder auch Grün- und Blaualgen unterschiedlicher Spezies (TAYLOR und MOZLEY, 1948; GOLD, 1980; DREYFUSS et al., 2015; MOAZENI et al., 2018), sowie von faulenden Pflanzenresten, wie modernem Gras- und Schwertlilienblättern (MEHL, 1932). Auch unbehandelter Salat, wie Kopfsalat, stellt eine beliebte Nahrungsquelle dar. Allerdings wurde dieser nur in getrockneter und über mehrere Tage in Wasser eingeweichter Form von den Schnecken akzeptiert (ABROUS et

al., 1999c; RONDELAUD et al., 2004; RONDELAUD et al., 2007b). Bei  $-18^{\circ}\text{C}$  gefrorene Pfirsichblätter oder Gras wurden ebenfalls gefressen (DREYFUSS et al., 2015).

Aufgrund dieser Erfahrungen und zur Standardisierung des Futters entschieden sich einige Autorinnen und Autoren dazu, zusätzlich Nahrungsergänzungsmittel einzusetzen. Dadurch entwickelten sie Diäten, die auf die Bedürfnisse der Schnecken zugeschnitten waren.

TAYLOR und MOZLEY (1948) fütterten ihre Schnecken zusätzlich zu den gewachsenen Algen einmal wöchentlich mit einem Mix aus Kreidepulver und feinen Haferflocken, welcher auf die Schlammoberfläche gestreut wurde. Die Fütterung von getrocknetem Salat wurde mit Kalziumsulfat (BORAY, 1966) und getrockneten Blättern von *Glyceria fluitans* (RONDELAUD et al., 2007b) ergänzt. BORAY (1969) kreierte ein Schneckenlaborfutter aus einer Mischung von 25 % getrocknetem Salat, 25 % getrockneten Luzernenblättern, 50 % gemahlenen Weizenkeimen, welchem noch 3 % Kalziumsulfat hinzugesetzt wurde. Eine Studie aus dem Iran berichtete von einer hohen Akzeptanz der Schnecken gegenüber einer Mischung aus Salatblätter-, Spirulinapulver, *Cyperus alternifolius*, *Orthotrichum rupestre* und Sepiaschalen als Kalziumquelle (MOAZENI et al., 2018).

Auch die Verwendung von Tetraphyll, das als Fischfutter eingesetzt wird, wurde untersucht. Je nach Größe des Behältnisses wurden 1–6 Flocken alle drei Tage über einen Zeitraum von zehn Stunden als Nahrung angeboten. Nicht verzehrte Reste wurden nach Ablauf der Zeit entfernt (RONDELAUD et al., 2004).

Bis heute gehen die Meinungen über die richtige Nahrungsquelle unter Laborbedingungen auseinander. Denn auch die hochwertigen Futtermittel dienen aufgrund ihres schnellen Abbaus im Wasser als Nährboden für Bakterien und sind daher nur eingeschränkt geeignet.

### **3. Experimentelle Infektionen von *Galba truncatula* mit *Calicophoron daubneyi***

Um die Parasit-Zwischenwirt-Interaktion zu untersuchen und Forschung an Trematodenstadien zu betreiben, wurden Zwergschlammschnecken experimentell infiziert.

BORAY (1966) züchtete für Infektionsversuche *G. truncatula* im Labor, um Schnecken ab der zweiten Generation zu nutzen, da diese sich an die kontrollierten Laborbedingungen angepasst haben.

### 3.1. Miracidienentwicklung unter Laborbedingungen

Zur Gewinnung der Pansenegleier wurden adulte Pansenegel aus dem Pansen geschlachteter Rinder gesammelt und für vier Stunden bei 37 °C in eine Kochsalzlösung (NaCl 0,9 % und Glukose 0,45 %) gegeben (RONDELAUD et al., 2007b). Die ausgeschütteten Eier wurden anschließend mehrmals mit Quellwasser gewaschen und bei 20 °C im Dunkeln für 20 Tage (OLLERENSHAW, 1971; ABROUS et al., 1997) oder bei 27 °C für neun Tage, wobei der Schlupfvorgang dann fünf bis sechs Tage lang dauerte (KUMAR, 1999), oder bei 27 °C für 12–15 Tagen (SEY, 1977) inkubiert. Es ist nicht nachgewiesen, dass *C. daubneyi* niedrigere Temperaturen als *F. hepatica* für die Entwicklung und den Schlupf der Eier benötigt, stattdessen beobachteten CHRYSSAFIDIS et al. (2015) sogar eine erfolgreiche Miracidienentwicklung bei einer Inkubation bei 27 °C mit Licht für 28 Tage.

Die Stimulation für den Schlupfvorgang des Miracidiums ist immer ein Lichtreiz für 10–20 Minuten (OLLERENSHAW, 1971; SEY, 1977; ABROUS et al., 1997; KUMAR, 1999; DREYFUSS et al., 2015).

### 3.2. Infektionen mit *Calicophoron daubneyi* unter Laborbedingungen

Es sind in der Literatur Infektionen mit einer unterschiedlichen Miracidienanzahl pro Schnecke beschrieben. ABROUS et al. (1999c) erreichten eine Infektionsrate von 39,7–51 % bei einer Infektion mit einem Miracidium. SEY (1977) dokumentierte sogar eine Infektionsrate von 60–75 % bei einer Infektion mit einem bis fünf Miracidien pro Schnecke.

Bei einer Single Miracidien Infektion wurde jede *G. truncatula* einem Miracidium für vier Stunden (ABROUS et al., 1997) oder auch eine Woche lang (SEY, 1977) bei 20 °C ausgesetzt. Wichtig zu beachten war, dass die Schnecken, die während der Miracidienexposition das Wasser verlassen haben, umgehend wieder in dieses zurückbefördert wurden (DREYFUSS et al., 2015). Nach Ablauf der vier Stunden zogen ABROUS et al. (1997) die infizierten Schnecken 49 Tage lang in einem geschlossenen Aquarium auf. Sie modifizierten ihre Technik ein paar Jahre später und setzten die Schnecken an Tag 30 nach Infektion in 35 mm Durchmesser

Petrischalen mit 2–3 ml Quellwasser um und hielten sie weiter unter denselben kontrollierten Laborbedingungen wie die Schneckenzucht (ABROUS et al., 1999c). Auch VIGNOLES et al. (2002b) verwendeten Petrischalen mit einem 35 mm Durchmesser ab Tag 30 p. e. RONDELAUD et al. (2007b) hingegen verglichen in ihrer Studie die Verwendung von 35 mm großen Petrischalen und 14 cm großen Petrischalen ab Tag 30 p. e. Sie fanden heraus, dass sich 14 cm große Petrischalen am besten eigneten, sowohl zur Zucht als auch zur Aufzucht nach der Miracidienexposition. Neben der Überlebens- und Infektionsrate der Schnecken, stieg dort sogar die Metacercarienzahl an.

SEY (1977) und DINNIK (1962) beschrieben die Problematik, dass die *C. daubneyi* Cercarienausschüttungen einer nachweislich infizierten *G. truncatula* unter Laborbedingungen reduziert oder gar nicht vorhanden waren. Cercarien konnten nur durch die Schneckensektion gewonnen werden, da sie sich aus bisher unbekannten Gründen im Schneckenkörper anhäuften, anstatt ausgeschüttet zu werden.

Die natürliche Ausschüttung kann durch unterschiedliche Faktoren wie Temperaturschwankungen und natürliches Licht (zwischen 601 und 1200 lx) (TITI et al., 2014) unterstützt werden. ABROUS et al. (1999c) erläuterten einen positiven Effekt eines einmal wöchentlichen Temperaturschocks von 6–8 °C auf die Ausscheidung von Cercarien. Einige Autorinnen und Autoren schilderten Cercarienausschüttungen unter Laborbedingungen. Die ersten natürlichen Cercarienausschüttungen wurden ab Tag 49 (bei 20 °C), ab Tag 55 (DINNIK, 1962; KUMAR, 1999), ab Tag 57 (bei 14–15 °C) und ab Tag 66 (bei 6–8 °C) bis zu 70 p. i. beobachtet (AUGOT et al., 1996; ABROUS et al., 1999c). DREYFUSS et al. (2015) beobachteten sogar eine Cercarienausschüttung erst nach neun Wochen. Teilweise wurden die Wände der Behälter vorher mit Zellophan ausgekleidet, damit die Cercarien daran enzystieren konnten (DREYFUSS et al., 2004).

Die ersten freien Cercarien konnten durch eine Schneckensektion an Tag 35 p. i. festgestellt werden, allerdings zeigten diese Metacercarien nicht dieselbe Infektiosität im Endwirt, wie Cercarien die erst ab Tag 45 p. i. gewonnen wurden (VIGNOLES et al., 2008).

KUMAR (1999) dokumentierte eine durchschnittliche Ausschüttung von 14–33 Cercarien über drei Tage einer natürlich infizierten Schnecke. Unter

Laborbedingungen sind sogar durchschnittliche Cercarienausschüttungen von 111 Cercarien pro Schnecke beschrieben (RONDELAUD et al., 2007b). ABROUS et al. (1999c) fanden maximal 146 ausgeschüttete Cercarien einer Schnecke und die Ausschüttungsdauer betrug 14 bis 16 Tagen.

Die Metacercarien wurden je nach Größe des Behältnisses entweder täglich oder zweimal die Woche (bei 14 cm Durchmesser Petrischalen) mit einer Pasteurpipette in Eppendorf® Gefäße überführt und bei 4 °C für maximal zwölf Wochen aufbewahrt (RONDELAUD et al., 2007b; RONDELAUD et al., 2014).

Die Überlebensrate von nicht infizierten Schnecken war höher als die von mit *C. daubneyi* infizierten Schnecken (ABROUS et al., 1999c). Es ist beschrieben, dass eine Infektion mit *C. daubneyi* zu schweren Nierenschäden bei den Zwischenwirtschnecken führt (RONDELAUD et al., 2007b). Dies ist bei Infektionen mit *F. hepatica* so nicht beobachtet worden. Im Gegenteil erwies sich dieser Parasit für die Schnecken als unschädlich und das Wachstum der Schnecken wurde sogar gesteigert (GOLD, 1980). Dies deutet auf eine bessere Anpassung von *F. hepatica* an *G. truncatula* als von *C. daubneyi* an *G. truncatula* hin (ABROUS et al., 1997).

### **3.3. Co-Infektionen mit *Calicophoron daubneyi* und *Fasciola hepatica***

Es wurden unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen den beiden Trematoden im Zwischenwirt beschrieben. CHIPEV et al. (1985) fanden eine Dominanz der ersten Trematodenart, die in die Schnecke eindringt: Nach Exposition durch ein Miracidium einer zweiten Trematodenart zehn Tage nach der Exposition durch die erste Trematodenart, fand eine Entwicklungshemmung des zweiten Trematodenmiracidiums statt.

AUGOT et al. (1996) fanden, dass das Miracidium von *C. daubneyi* bei einer vierstündigen versetzten Infektion mit *F. hepatica* die Larvenentwicklung von *F. hepatica* in der Schnecke begünstigte. Umgekehrt konnte dies nicht nachgewiesen werden. DREYFUSS et al. (2004) wiederum fanden, dass die Enzystierung von *F. hepatica* Cercarien durch die gleichzeitige Enzystierung von *C. daubneyi* Cercarien oder auch umgekehrt gestört wurde.

### **3.4. Diagnostik von *Calicophoron daubneyi* im Zwischenwirt**

Zum Nachweis einer Infektion mit *C. daubneyi* in einer Schnecke stehen

unterschiedliche Methoden zur Verfügung, wie die Schneckenzerquetschung, -sektion, die Polymerasen-Kettenreaktion und der natürliche Cercarienaustritt.

#### **3.4.1. Schneckenzerquetschung**

Der schnellste und einfachste Weg, um zwischen nicht infizierten und infizierten Schnecken, die keine Cercarien freigesetzt haben, zu unterscheiden, ist die Schneckenzerquetschung („snail crushing“). Das Schneckengehäuse wird mithilfe einer feinen Pinzette zerbrochen und der Schneckenkörper wird anschließend unter einem Stereomikroskop auf vorhandene Larvenstadien bzw. auf Anzeichen einer Trematodeninfektion untersucht. Zwar kann mit dieser Methodik nicht die Cercarienausschüttung betrachtet werden, ebenso ist die Enzystierrate der freigesetzten Cercarien reduziert, allerdings können so die Larvenstadien im Zwischenwirt identifiziert werden (RONDELAUD et al., 2007b; CARON et al., 2008; IGLESIAS-PINEIRO et al., 2016).

#### **3.4.2. Schneckensektion**

Viele Autorinnen und Autoren haben diese Methode genutzt, um auch die Larvenstadien im Schneckengewebe zu untersuchen und Schlussfolgerungen über die Infektionsintensität zu ziehen (ABROUS et al., 1999a; MAGE et al., 2002; DREYFUSS et al., 2005). Als erstes wird der Schneckenkörper aus dem Gehäuse gezogen. Anschließend werden die Eingeweide präpariert und auf Larvenstadien untersucht.

#### **3.4.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die höchste Sensitivität zeigte der Nachweis einer Zwischenwirtinfektion mittels PCR. Damit ist bereits ab dem zweiten Tag eine Infektion mit *C. daubneyi* in der Schnecke nachweisbar. Ein Nachweis ist mikroskopisch zu diesem Zeitpunkt nicht möglich, sondern erst ab Tag 29–33 p. i. Die Feststellung der Vitalität der unterschiedlichen Larvenstadien ist mittels PCR hingegen nicht möglich. Außerdem können falsch positive Ergebnisse entstehen, falls der Parasit sich nicht mehr im Schneckenkörper befindet, aber die DNA noch nachgewiesen werden kann (MARTINEZ-IBEAS et al., 2013; KÜCHLER, 2021).

#### **3.5. Fluoreszenzfärbung der Larvenstadien**

Zur genaueren Untersuchung der Parasiten werden mittlerweile unterschiedliche Immunfluoreszenztechniken angewandt. Besondere Aufmerksamkeit wurde dabei

der Parasit–Zwischenwirt-Interaktion geschenkt. Fluoreszenzfärbungen sind für *F. hepatica* etabliert, jedoch noch nicht in vergleichbarem Umfang für *C. daubneyi*.

GEORGIEVA et al. (2012) analysierten mittels Immunfluoreszenz die Kohlenhydratreste auf der Oberfläche von *F. hepatica* Miracidien, Sporozysten, Redien und Cercarien sowie die Oberflächenproteine von *G. truncatula* vor und nach einer Infektion mit *F. hepatica*. Ziel war es, die Interaktion zwischen Parasit und Zwischenwirt zu untersuchen. Dabei ging es um mögliche Strategien des Parasiten, sich dem Immunsystem des Zwischenwirts zu entziehen sowie um das Erkennen von Stimuli des Entwicklungsprozesses der verschiedenen Stadien. Nach einer Infektion konnten Abweichungen in den Kopf- und Mantelzellen und im Tubulusepithel des Hepatopankreas der Schnecken durch die Lectine *Glycine max.* und *Arachis hypogaea* festgestellt werden. Auch wurden Ähnlichkeiten in der Lectinbindung zwischen Schneckengeweben und der Oberfläche der Larvenstadien von *F. hepatica* entdeckt. Die Markierung der Lectine der verschiedenen Larvenstadien von *F. hepatica* ergab eine spezifische Oberflächenglykosylierung der einzelnen Stadien. Die Oberfläche der Redien konnte z. B. mit *Triticum vulgaris* markiert werden (GEORGIEVA et al., 2016).

In einer weiteren Studie bestätigten GEORGIEVA et al. (2019) die möglichen Wechselwirkungen zwischen Oberflächenkohlenhydraten und Rezeptoren zur biologischen Erkennung und damit verbundenen Übertragung von *F. hepatica* in *G. truncatula*. In der Studie wurden unterschiedliche Monosaccharide ins Wasser der Schnecken bei einer Miracidienexposition gegeben. Die Ergebnisse zeigten eine Reduzierung der Infektion mit *F. hepatica* in der Zwischenwirtsschnecke um 10,9–36,9 %.

Die Immunantwort des Zwischenwirts auf eine Infektion mit *C. daubneyi* ist noch nicht erforscht. Allerdings zeigt sich im Endwirt, dass *C. daubneyi* über Abwehrmaßnahmen gegen die Immunantwort des Endwirtes verfügt, was sich durch eine Infektion der Dünndarmschleimhaut durch die juvenilen Stadien des Pansenegels verdeutlicht.

HUSON et al. (2021) untersuchten in einer Studie den adulten Pansenegel genauer und etablierten schließlich als erste die immunfluoreszenzbasierte Darstellung der sezernierten Antigene des tegumentalen Synzytiums, der darunter liegenden tegumentalen Zellen und der von den gastrodermalen Zellen abstammenden

Lamellen, die von anti-*C. daubneyi* exkretorisch-sekretorischen Antikörpern erkannt werden.

#### **4. Larvenstadien von *Calicophoron daubneyi***

##### **4.1. Pansenegleier**

Die Pansenegleier, welche vom infizierten Endwirt in die Umgebung abgegeben werden, ähneln in ihrem Aussehen dem des großen Leberegeleis, weshalb eine Unterscheidung sich schwierig gestalten kann. Die Eier beider Parasiten sind oval und ähnlich groß. Sie unterscheiden sich allerdings in der Farbe. Die Pansenegleier erscheinen lichtmikroskopisch in einer grau-gelblichen Färbung, umhüllt von einer dicken, transparenten Schale. Die Eier des großen Leberegels hingegen sind aufgrund der Galle goldgelb gefärbt. Auch die großen Granula im Inneren des Pansenegleis ist ein Unterscheidungsmerkmal zwischen den beiden Parasiteneiern. Ein Pol des Eis ist bedecktelt. Der Deckel öffnet sich beim Miracidiumschlupf (SEY, 1977; KUMAR, 1999; DEPLAZES et al., 2020b). Unter experimentellen Bedingungen entwickeln sich im Laufe der Inkubation der Eier bei 27 °C die Embryos im Inneren. Mit der Bildung zweier sichtbarer Vakuolen, den sogenannten mukoiden Profen, ist die Entwicklung nach acht Tagen abgeschlossen und der Schlupfvorgang kann einsetzen, welcher fünf bis sechs Tage dauert (SEY, 1977). Unter natürlichen Bedingungen ist eine Entwicklungsdauer des Miracidiums von drei Wochen beschrieben (DEPLAZES et al., 2020b).

In einer feuchten Umgebung und bei kühlen Temperaturen können die Eier bis zu sechs Monate überleben, zeigen jedoch eine Empfindlichkeit gegenüber dem Austrocknen (DEPLAZES et al., 2020b). Eine Studie zur Lagerung bei 4 °C offenbarte, dass 40 % der Eier nach vier Monaten noch Virulenz aufwiesen (SEY, 1977).

#### **5. Larvenstadien von *Calicophoron daubneyi* im Zwischenwirt**

Die Literatur bietet nur eine begrenzte Anzahl an Beschreibungen zu den Entwicklungsstadien von *C. daubneyi* in der Schnecke, und selbst diese

Beschreibungen weisen untereinander Unterschiede auf. Zusammenfassend konnten die Stadien Sporozysten mit Keimmassen, Sporozysten mit Redien, unreife Redien oder mit Keimmassen, Redien mit Tochterredien, Redien mit Procercarien (unreifen Cercarien), Redien mit reifen Cercarien und Cercarien, die gerade von der Schnecke ausgeschüttet wurden, identifiziert werden (ABROUS et al., 1997; RONDELAUD et al., 2007a; IGLESIAS-PINEIRO et al., 2016).

IGLESIAS-PINEIRO et al. (2016) lieferten die erste detaillierte Beschreibung der Larvenmorphologie von *C. daubneyi*. Sie bestimmten die verschiedenen Entwicklungsstadien, indem sie sie mit den beobachteten verschiedenen Stadien vorheriger experimenteller Infektionen mit Miracidien dieses Parasiten verglichen. Bei Unsicherheiten, wie larvalen Stadien, die Sporozysten ähneln, wurde zudem auf molekularer Ebene die entsprechende Trematodenart bestimmt (MARTINEZ-IBEAS et al., 2013).

### **5.1. Miracidien**

Nachdem das frisch geschlüpfte Miracidium in den Zwischenwirt eingedrungen ist, beginnt die Entwicklung der Larvenstadien im Zwischenwirt.

KUMAR (1999) beschrieb das *C. daubneyi* Miracidium wie folgt: Es weist eine spindelförmige Form auf und ist im gestreckten Zustand etwa 155–225 µm x 34–55 µm groß. An der vorderen Spitze befindet sich das Penetrationsorgan, das Terebratorium. Mit Ausnahme davon ist sein Körper vollständig mit bewimperten Epidermisplatten bedeckt. Im Inneren des Miracidiums sind im vorderen Teil mehrere Drüsen lokalisiert, darunter die Penetrationsdrüse und die apikale Drüse, die zusammen im Terebratorium enden. Der hintere Teil beherbergt die Keimzellen sowie den Embryoballen. Das Ausscheidungssystem wird aus Flammzellen und den dazugehörigen Gängen gebildet.

Die Überlebenszeit eines Miracidiums bei Raumtemperatur in Leitungswasser liegt bei 9–10 Stunden. Allerdings ist es davon nur etwa vier Stunden lang in der Lage den Zwischenwirt erfolgreich zu infizieren (SEY, 1977).

### **5.2. Redien, freie (Pro-)Cercarien**

Die Redien stellen ein Entwicklungsstadium im Zwischenwirt dar, welches nur bei einer Schneckensektion oder -quetschung aufgefunden werden kann. Sie besitzen einen länglichen, wurstförmigen Körper und messen 100–200 µm x 80–190 µm. Ihr

Inneres setzt sich aus einem Verdauungs-, einem Nerven-, einem Ausscheidungs- und einem Keimsystem zusammen. Das Verdauungssystem beinhaltet unter anderem einen Pharynx und einen sackförmigen Darm. Im Laufe der Entwicklung der Redien im Zwischenwirt zeigen sich im Inneren die embryonalen Strukturen, wie Keimkugeln, Embryonen von Tochterredien, Tochterredien, Procercarienembryonen, Procercarien und Cercarien. Dabei kann jede Mutterredie zwischen ein bis vier Tochterredien enthalten (SEY, 1977).

SEY (1977) und KUMAR (1999) schilderten, dass die ersten freien Procercarien 16–35 Tage p. i. sichtbar waren. Die Procercarien stellen, wie ihr Name offenbart, die Vorstufe der Cercarien da. Sie bestehen aus einem kürzeren hellen Schwanz und einem noch unpigmentierten, weißlichen Körper (Abb. 4). Cercarien hingegen sind an ihrem ovalen bis speerförmigen Körper dunkelbraun pigmentiert und etwa ab Tag 55 p. i. als träge Schwimmer aufzufinden. Der Körper ist im gestreckten Zustand 280–400  $\mu\text{m}$  x 160–240  $\mu\text{m}$  groß mit einem anhängenden 190–300  $\mu\text{m}$  großen transparenten Schwanz. Die Cercarien verfügen über einen Pharynx, eine Speiseröhre, sowie ein röhrenförmiges Darmzäpfchen, die im Acetabulum enden. Besonders auffällig sind die dunkel pigmentierten Augenflecke auf beiden Seiten des Pharynx. Außerdem besitzen sie im Gegensatz zu ihrer Vorstufe die Fähigkeit zur Zystenbildung.



**Abbildung 4: *Calicophoron daubneyi* Procercarie (unreife Cercarie) gewonnen durch eine Sektion einer experimentell infizierten *Galba truncatula***

Eine Felduntersuchung in Frankreich demonstrierte, dass eine *G. truncatula* 14–33

Cercarien über drei Tage ausgeschüttet hat und trotzdem ca. 33 freie Redien und 33 freie Cercarien in ihrem Körper hatte. Die Prävalenz von *C. daubneyi* infizierten Schnecken stieg im Zeitraum 1989 bis 1996 von 3,7 % auf 5,3 % an. Auch die Anzahl freier Redien pro infizierter Schnecke stieg über die Jahre beträchtlich an, von 6,5 auf 13,8 (MAGE et al., 2002). Ähnliche Zahlen wurden bei experimentellen Untersuchungen gezählt. Bei der Sektion einer Schnecke mit einer Infektionsdosis von einem Miracidium wurden durchschnittlich 13,7 Redien sowie durchschnittlich 123,9 Procercarien und Cercarien in einem Schneckenkörper gefunden. Bei einer Dosis von fünf Miracidien hingegen wurden fast doppelt so viele Redien und beinahe fünfmal so viele Procercarien und Cercarien dokumentiert. Es können unter Laborbedingungen also mehrere Stadien auf einmal in einer Schnecke identifiziert werden (ABROUS et al., 1997).

Die Cercarien enzystieren meist innerhalb von 20 Minuten in direkter Umgebung ihrer Zwischenwirtschnecke zu Metacercarien. Die direkte Nähe zum Zwischenwirt wird auf das träge Schwimmen der Cercarie nach Ausschüttung zurückgeführt (SEY, 1977; DREYFUSS et al., 2004).

### 5.3. Metacercarien

Durch die Enzystierung der Cercarien entstehen runde Metacercarien mit einem Durchmesser von etwa 200–250 µm. Bei adäquaten feuchten Bedingungen sind sie in der Umwelt drei bis fünf Monate überlebensfähig, bei Trockenheit jedoch sterben sie schnell (DEPLAZES et al., 2020b). Die Lebensfähigkeit sinkt auch bei einer Kontamination mit Schimmelpilzen (HORAK, 1971).

Die infektiösen, runden Metacercarien weisen zwei Schichten auf: Die äußere Schicht besteht aus Mukopolysaccharid und die innere aus bräunlichem undurchsichtigem Material mit einem 140–150 µm großen, kugelförmigen Embryo (SEY, 1977; KUMAR, 1999). Unter experimentellen Bedingungen sind sie meist am Schalenboden (4–7 cm tief) zu finden oder, wenn vorhanden, an Binsenstängeln oder der Zellophanfolie im Wasser, im Gegensatz zu *F. hepatica* Metacercarien, welche den Schalenrand bevorzugen (ABROUS et al., 2001; DREYFUSS et al., 2004; RONDELAUD et al., 2007b). Der Fundort der *C. daubneyi* Metacercarien lässt auf eine positive Geotaxis und einen negativen Phototropismus schließen (DREYFUSS et al., 2004). Manchmal kann es ein bis zwei Tage dauern bis die frischen Metacercarien infektiös für die Endwirte werden. Die Infektiosität ist für

mehr als vier Wochen bei optimalen Umweltbedingungen beschrieben (KUMAR, 1999).

#### **5.4. Larvenstadien von *Calicophoron daubneyi* im Endwirt**

HUSON et al. (2021) stellten vier verschiedene Entwicklungsstadien im Endwirt dar: Die frisch exzystierten Jungegel, in dieser Arbeit als „NEJ“ (newly excysted juvenile) abgekürzt; die unreifen Egel vor ihrer Wanderung; kleine, kürzlich in den Pansen eingewanderte Egel sowie reife Pansenegel (Abb. 5).

Die NEJs, mit einer Länge von etwa 150 µm, verfügen bereits über ihre charakteristischen zwei Saugnäpfe. Im Vergleich dazu sind die unreifen Egel, die sich 1,5–2 Monate lang von dem Wirtsgewebe im Darm ernähren, mit 2–3 mm deutlich größer. Sie verursachen durch ihr Anhaften an der Schleimhaut die ausgeprägten Entzündungsreaktionen des Dünndarms bei der intestinale Paramphistomidose. Angekommen im Pansen, frühestens 38 Tage p. e. (DEVOS et al., 2013), sind die neu eingewanderten Egel schließlich doppelt so groß und weisen schon ihre typische hellrosa Farbe auf und sind nun zur Reproduktion fähig.

Die pink bis fleischfarbigen etwa 1,5–2 cm großen birnenförmigen adulten Pansenegel mit einer rötlichen Verdunklung um die beiden Saugnäpfe (Abb. 5), haften etwa drei Monate nach Aufnahme der Metacercarien an den Pansenzotten oder der Pansenwand und legen dort Eier ab, die dann vom Endwirt ausgeschieden werden.



**Abbildung 5: Frisch gesammelte adulte Pansenegel aus dem Pansen einer geschlachteten Kuh**

### III. MATERIAL UND METHODEN

#### 1. Zucht der Zwergschlammschnecke *Galba truncatula*

##### 1.1. Habitate unter Laborbedingungen

Im Zeitraum von April 2020 bis März 2023 wurden fünf unterschiedliche, natürliche Habitate der Zwergschlammschnecke in Bayern besucht, in welchen sich während den Sommermonaten Wiederkäufer mit bekannter Trematodeninfektion aufhielten. Bei diesen Besuchen wurden jeweils zwei Wasserproben entnommen und anhand dieser Referenzwerte zum optimalen pH-Wert sowie der Wasserhärte entwickelt. Ebenso wurden zwei Binsengewächse, eine Sumpfschwertlilie und drei verschiedene Bodenproben mitgenommen.

Eine Übersicht der verwendeten Habitate unter Laborbedingungen ist in Tabelle 1 dargestellt. Als erstes wurde ein Aquarium, welches nach oben geöffnet war, entworfen (modifiziert nach MOAZENI et al. (2018)) (Tab. 1). Dieses bestand aus einer 79 cm x 57 cm x 18 cm große Plastikbox mit einem Fassungsvermögen von 55 Liter (Abb. 6a, b). Die Plastikbox wurde mit einer weiteren Plastikbox mit den Maßen 27 cm x 34 cm x 9 cm unterteilt. Die kleinere Plastikbox wurde mit Erde aus einem natürlichen Habitat befüllt und mit drei Binsenablegern und einer Sumpfschwertlilie bepflanzt. Rundherum wurde Buntkies (WECO GmbH & CO. KG, Leer, Deutschland, WCFR0208FBU-V1) bis zu einer Höhe von 6 cm aufgeschüttet. In der Mitte entstand eine kleine Erhöhung aus feinem Sand, die in zwei zerbrochene Tonscherben überging. Der Sand wurde zusätzlich mit Aquariumkies (ROSNERSKI, Königslutter, Deutschland, 9901420) bedeckt.

Zwei große Natursteine (etwa 17 cm x 12 cm x 12 cm groß) befanden sich in einer Ecke der großen Plastikbox, um einen Wasserfall zu simulieren. An der langen Seite der Plastikbox wurden zwei elektrische Wasserpumpen (miniUp und miniFlat, EHEIM GmbH & Co. KG, Deizisau, Deutschland, 2204020, 2203020) installiert. Eine Pumpe bewässerte tropfenweise die kleine Box mit der Erde und die andere stellte ein Fließgewässer über die großen Steine dar. Der Sauerstoffgehalt im Wasser wurde durch einen 25 cm langen Sprudelstein mit einer angeschlossenen Luftpumpe (ProAir a50, JBL GmbH & Co. KG, Neuhofen, Deutschland, 6054600) gewährleistet. Die Beleuchtung (ClassicLED G2, NICREW, United States, N14583) über dem Aquarium lieferte konstant 3000–

4000 Lux für zwölf Stunden. Es herrschte überwiegend eine Raumtemperatur von etwa 20 °C, allerdings stieg diese in den Sommermonaten auf 24 °C. Einmal wöchentlich wurde das Wasser gewechselt.

Der pH-Wert und die Temperatur des Wassers wurden regelmäßig überprüft und dokumentiert. Für das Aquarium war eine Einlaufzeit von drei Wochen notwendig.



**Abbildung 6: Offenes Aquarium zur Zucht von *Galba truncatula* modifiziert nach MOAZENI et al. (2018): a) Ansicht von oben (links), b) Ansicht von vorne (rechts)**

Parallel hierzu wurde ein weiteres 19 cm x 10 cm x 7 cm großes Becken (Abb. 7), hier als Übergangsbecken (Tab. 1) bezeichnet, entworfen. In diesem befanden sich dieselbe Erde, Aquariumkies, eine Tonscherbe und Sumpfschwertlilie. Es diente als ein Quarantänebecken für neu gesammelte Schnecken, damit eine Einschleppung von Krankheiten verhindert werden konnte. Das Becken hatte die identischen Umgebungsbedingungen wie oben beschrieben. Es fand alle zwei Tage ein Wasserwechsel statt. Nach zwei Wochen wuchsen zusätzlich Süßgräser und Moos.

**Tabelle 1: Künstliche Habitate und Laborbedingungen zur Zucht von *Galba truncatula***

Verwendungs- zeitraum in Monat/Jahr	Künstliches Habitat	Anzahl Schnecken zu Beginn des Versuchs	Wasserart	Wasser- menge	pH- Wert	Wasserhärte in Kalzium- karbonat (CaCO <sub>3</sub> )	Wasser- temperatu r	Nahrung
04/20–09/21	Offenes Aquarium	21	Gefiltertes Wasser	2,5 l	7–8	> 100 mg/l <sup>3</sup>	19–22 °C	Algen
05/20–04/21	Übergangsbecken	23	Gefiltertes Wasser	80 ml	7	> 100 mg/l	21–22 °C	Algen, getrockneter Salat, Algenblätter
05/20–04/21	Kleines Becken 1	7	Gefiltertes Wasser	80 ml	7	> 100 mg/l	21–22 °C	Algen, getrockneter Salat
08/20–04/21	Kleines Becken 2	7	Leitungswasser	80 ml	7	> 300 mg/l und < 450 mg/l	21–22 °C	Algen, getrockneter Salat
12/20–04/21	Kleines Becken 3	7	Destilliertes Wasser	80 ml	7	0	21–22 °C	Algen, getrockneter Salat
07/21–11/21	Polystyrol-Petrischalen ø 9 cm	10	Gefiltertes Wasser	40 ml	7–8	> 100 mg/l	21–23 °C	Getrockneter Salat
01/22–05/22	6-Well-Platte (Angaben je Well)	1	Gefiltertes Wasser	3,5 ml	7–8	> 100 mg/l	21–23 °C	Getrockneter Salat
Seit 07/21	Glaspetrischale ø 9 cm	10	Gefiltertes Wasser	3,5 ml	7–8	> 100 mg/l	21–23 °C	Getrockneter Salat, Tetraphyll
Seit 05/21	Glaspetrischalen ø 14 cm	15	Gefiltertes Wasser	60 ml	7–8	> 100 mg/l	21–23 °C	Getrockneter Salat, Tetraphyll, Vitalpellets
Seit 06/22 <sup>4</sup>	Glaspetrischalen ø 3,5 cm	1	Gefiltertes Wasser	3,5 ml	7–8	> 100 mg/l	21–23 °C	Getrockneter Salat
Seit 02/23 <sup>5</sup>	Glaspetrischalen ø 14 cm am Fließsystem angeschlossen	15	Gefiltertes Wasser	60 ml mit stetigem Austausch	7–8	> 100 mg/l	21–23 °C	Getrockneter Salat

<sup>3</sup> Wenn in dieser Arbeit von einer Wasserhärte von > 100 mg/l die Rede ist, ist immer eine Wasserhärte zwischen 100 mg/l und 250 mg/l gemeint.

<sup>4</sup> Nur zur Haltung bei Infektionsversuchen ab Tag 30 p. i. verwendet.

<sup>5</sup> Hauptsächlich zur Haltung der Schnecken bei Infektionsversuchen bis Tag 30 p. i.



**Abbildung 7: Übergangsbecken zur Zucht von *Galba truncatula* um eine Einschleppung von Krankheiten zu verhindern**

Innerhalb von vier Monaten wurden noch drei weitere Becken, hier als „kleines Becken 1, 2 und 3“ benannt, mit denselben Bedingungen errichtet, um die verschiedenen Wasserarten zu testen (Tab. 1).

Von April 2020 bis Juni 2021 fand die Schneckenzucht ausschließlich im offenen Aquarium, sowie im kleinen Becken 1 und 2 statt.

In einem weiteren Schritt erfolgte die Erprobung weiterer unterschiedlicher Behältnisse als geeignete Lebensräume unter Laborbedingungen. Dazu gehörten unter anderem Petrischalen (Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich, 632181) (Abb. 8 und 9), die bereits von DREYFUSS et al. (2015) mit großem Erfolg eingesetzt wurden, sowie 6-Well-Platten (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz, 92006). Zunächst kamen für neun Wochen Petrischalen aus Polystyrol mit einem Durchmesser von 9 cm zum Einsatz. Diese wurden mit 40 ml gefiltertem Leitungswasser, dessen Härte und pH-Wert, dem eines natürlichen Habitat entsprach, befüllt. Das Leitungswasser wurde durch einen Wasserfilter<sup>6</sup> (BRITA, Taunusstein, Deutschland) aufgereinigt, welcher alle vier Wochen erneuert wurde. Es wurde ein Vergleichsversuch mit unterschiedlichen Wasserarten (destilliertes Wasser, Leitungswasser, gefiltertes Wasser) durchgeführt. Die optimale Wasserqualität wurde aufgrund der Beschaffenheit der Gehäuse und der Überlebensrate der Schnecken gewählt. Zusätzlich zum Wasser befanden sich vier Stängel *Fontinalis antipyretica* für den Sauerstoffgehalt und

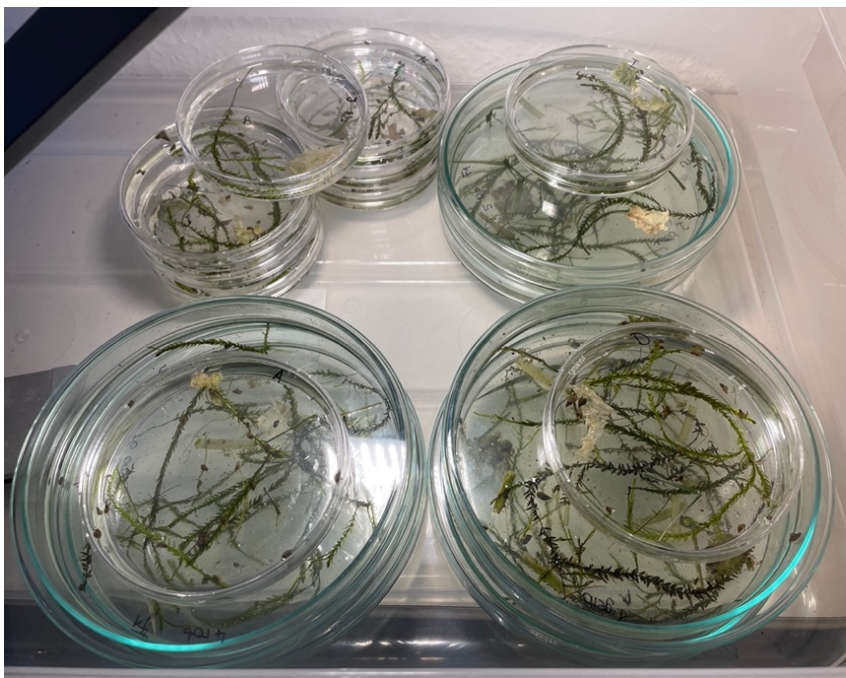
<sup>6</sup><https://www.brita.de/magazin/wasserfilter/wasser-filtern>. Letzter Zugriff: 20.03.2024.

Süßgräser in der Petrischale. Es waren maximal zehn Zwergschlammschnecken, mit gleicher Gehäusegröße, in einer Petrischale.

Zeitgleich wurden die Wells der 6-Well-Platte mit je 3,5 ml gefiltertem Leitungswasser und zwei Stängeln *Fontinalis antipyretica* befüllt. In jedes Well wurde eine Zwergschlammschnecke gegeben.

Ab Mai 2021 wurde sukzessive von Polystyrol-Petrischalen und dem offenen Aquarium auf Glaspetrischalen umgestellt und auch direkt zusätzlich größere Glaspetrischalen mit einem Durchmesser von 14 cm getestet (Abb. 9). Diese wurden mit 60 ml gefiltertem Leitungswasser, vier Stängeln *Fontinalis antipyretica*, und Süßgräsern befüllt. Es wurden maximal vier Petrischalen aufeinandergestapelt. Nach jedem Umsetzen der Schnecken in neue Glaspetrischalen wurden die alten Glaspetrischalen autoklaviert.

Die Petrischalen und auch die 6-Well-Platten befanden sich unter denselben Umgebungskonditionen, wie das offene Aquarium.



**Abbildung 8: Gestapelte Glaspetrischalen mit einem Durchmesser von 9 cm und 14 cm zur Zucht von *Galba truncatula***



**Abbildung 9: Glaspetrishale basierend auf DREYFUSS et al. (2015) nach Wasserentnahme**

Der Wasserwechsel fand alle zwei Tage mittels eines Pipettierhelfers (accu-jet®, BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland) und einer 25 ml großen, serologischen Pipette (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland, 612-3697) statt. Die Schneckenanzahl in einer Petrischale wurde auf 15 Schnecken erhöht.

Die bestehende Schneckenpopulation zum Aufbau einer Zucht unter Laborbedingungen wurde stets separiert von den Neuzugängen, die im Laufe der Zeit gesammelt wurden, gehalten. Es erfolgte immer ein Pipettenwechsel zwischen den Petrischalen, die die Zuchtschnecken und die neu gesammelten Schnecken enthielten.

Abschließend wurden zwei der 14 cm große Petrischalen um ein Pumpsystem erweitert. Dadurch entstand ein Fließsystem in den Petrischalen, welches einen kontinuierlichen Wasseraustausch gewährleistet (Abb. 10). Hierzu wurde eine Pumpe (WATSON-MARLOW GmbH, Rommerskirchen, Germany) verwendet, welche 80 ml Wasser pro Stunde durch eine Petrischale pumpt. Das Absaugen der Schnecken wurde durch Nylon Netzeinsätze 100 µm (Cell Strainer, FALCON, NY, USA, 352360), welche vor den Absaugschlauch geschaltet wurden, verhindert. Zwei Plastikdeckel von Impfflaschen wurden mit Tesafilm nebeneinander an der

Unterseite der Petrischale befestigt, damit die Petrischale eine leichte Neigung von  $10^\circ$  erhält. Der Wasserzufluss fand am höchsten und der Wasserabfluss am niedrigsten Punkt statt. Als Schlauch wurden ein steriles Infusionsbesteck ohne Filter verwendet, welches auf die passende Schlauchlänge zugeschnitten wurde. Das Frisch- und Abwasser wurde alle zwei Tage in den 10 l Kanister gewechselt. Unerwünschtes Algenwachstum im Frischwasserkarister wurde durch Umwickeln mit Aluminiumfolie verhindert.



**Abbildung 10: Fließsystem in Petrischalen zur Haltung von Zwergschlammschnecken**

Ab Oktober 2021 fand die Zwergschlammschneckenzucht vollständig in den Petrischalen statt.

### **1.2. Schneakensammlung**

Alle in dieser Arbeit verwendeten Schnecken für die Etablierung der Schneckenzucht wurden ursprünglich aus drei natürlichen Habitaten in Bayern gesammelt. Die natürlichen Habitate wurden anhand von Indikatorpflanzen und den bevorzugten Beschaffenheiten der Umgebung (feuchte Böden, Fließgewässer etc.) wie von MEHL (1932) und RONDELAUD et al. (2011) beschrieben, identifiziert. Es wurden insgesamt 242 Zwergschlammschnecken mit einer Größe von 2–5 mm aus der Natur verwendet. Die Schneckenartbestimmung wurde durch eine erfahrene

Person direkt vor Ort durchgeführt.

Die gesammelten Schnecken wurden umgehend in einem Kotprobenbecher mit Quellwasser transportiert und in ihr neues künstliches Habitat umgesetzt. Es fand keine Vermischung der Schnecken aus unterschiedlichen Habitaten statt.

### **1.3. Monitoring der Schneckenzucht**

Die Gehäuse der Zwergschlammschnecken wurden regelmäßig einmal wöchentlich mit einem digitalen Messschieber (CHIZEA, 2505B) vermessen und das entsprechende Wachstum in einer Excel Tabelle notiert. Die Vermessung fand von der unteren Mündungsöffnung des Gehäuses bis zur Gehäusespitze statt. Um die unterschiedlich großen Schnecken auseinander halten zu können, wurden sie einmalig an ihrem Gehäuse mit farbigem Nagellack markiert. Im späteren Verlauf waren die Glaspetrischalen mit Nummern beschriftet, statt einzelne Schnecken zu markieren.

Die Wasserparameter (pH-Wert, Wasserhärte und Wassertemperatur) wurden einmal wöchentlich erhoben.

Die stetige Laichablage wurde ebenfalls dokumentiert. Bei Überpopulation, d. h. mehr als 25 Schnecken mit einer Größe von  $> 1$  mm in einer Glaspetrischale, fand eine Umsetzung in eine zusätzliche Schale statt.

Wenn Fremdparasiten oder Einzeller in den Glaspetrischalen sichtbar waren, wurde die Schale komplett erneuert. Die Schnecken wurden mit Wasser abgewaschen und in eine neue frische vorbereitete Glaspetrischale umgesetzt. Die verunreinigten Schalen wurden mit heißem Wasser gereinigt und anschließend autoklaviert.

### **1.4. Fütterung**

Die Zwergschlammschnecken wurden über den ganzen Zeitraum alle zwei Tage mit getrockneten Bio-Salatblättern gefüttert. Dieser wurde zuvor im Backofen bei  $50^{\circ}\text{C}$  für etwa vier Stunden oder über mehrere Tage bei Raumtemperatur vollständig getrocknet. Der Salat sollte komplett getrocknet sein, bevor er verfüttert wurde. Die Salatblätter wurden in etwa 0,5 cm kleine Stücke geteilt und die Schnecken bekamen 3–4 Stücke pro Petrischale. Nicht gefressenes Futter vom Vortag wurde entfernt.

Ergänzend wurde von Mai bis August 2020 in kleinen Mengen einmal wöchentlich

zerkleinerte Algenfutterblätter (DENNERLE GmbH, Vinningen, Deutschland, 5917) gefüttert.

Danach wurden die Schnecken von September bis Dezember 2021 versuchsweise einmal wöchentlich mit 1–2 Tetraphyll Flocken (Tetra GmbH, Melle, Deutschland) pro Petrischale ernährt. Ab November 2021 bis Januar 2022 wurde einmal wöchentlich dazu auch die Schnecken-VITAL Pellets (Aqua-Tropica, Nürnberg, Deutschland) getestet. Zusätzlich fraßen die Schnecken über den ganzen Zeitraum die gebildeten Algen am Schalenboden.

Die Zwergschlammschnecken im offenen Aquarium wurden nicht zugefüttert und ernährten sich nur von den vorhandenen Algen, die innerhalb der ersten drei Wochen gewachsen waren.

## **2. Schlupf des Pansenegel Miracidiums**

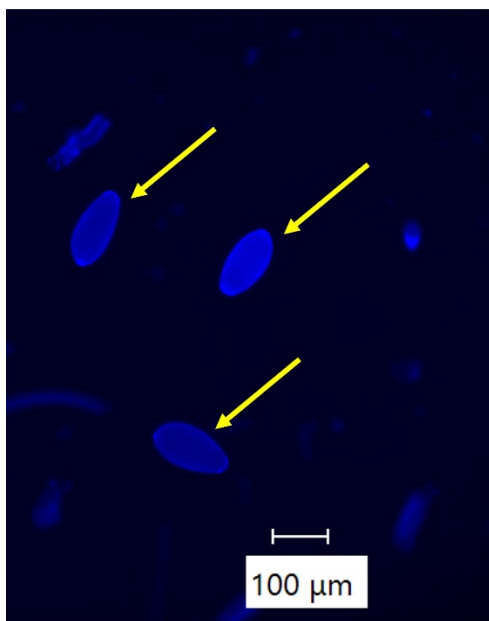
### **2.1. Gewinnung der Pansenegeleier**

Zur Gewinnung von Pansenegeleiern wurden ab November 2021 zum einen Kotproben von stark infizierten Rindern oder Wasserbüffeln verwendet, welche in den Bestandsuntersuchungen der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung der LMU München auffielen. Zum anderen stand im Juni 2022 kurzfristig ein infiziertes Rind mit einer niedrigen Eiausscheidung für wiederholte Probennahmen zur Verfügung.

Die Kotproben wurden mittels eines Sedimentationsverfahrens untersucht. Mit dem Kot des Tieres mit der geringen Eiausscheidung fanden Vorversuche mit größeren Mengen Kot in einem 10 l Eimer statt. Dafür wurde der Kot durch ein Haushaltssieb mithilfe von Leitungswasser in einen 10 l Eimer gesiebt. Die verwendete Kotmenge wurde dabei an der Größe des Haushaltssiebs angepasst. Die Suspension wurde 45 Minuten stehen gelassen und anschließend bis zum Sediment abgekippt. Anschließend fanden zwei weitere Sedimentationen von je 20–30 Minuten statt, wobei ein kleineres Gefäß (Becherglas 500 ml) hierfür gewählt wurde. Dabei ließen sich jedoch nur durch Kotpartikel stark verunreinigte Sedimente gewinnen, weshalb die verwendete Kotmenge schließlich angepasst wurde. Modifiziert nach DEPLAZES et al. (2020a) wurden beim Hauptversuch nur noch 10 g Kot mit Leitungswasser verdünnt und gut vermengt. Danach wurde die Suspension durch

ein 400  $\mu\text{m}$  großes Sieb, welches noch zusätzlich mit einem Gazetupfer bedeckt war, in ein 600 ml Becherglas gesiebt. Anschließend wurde das Becherglas mit 500 ml Leitungswasser aufgefüllt und mindestens viermal für 20 Minuten sedimentiert. 10 ml des letzten Sediments wurde unter dem Mikroskop auf Pansenegleier untersucht.

Die Pansenegleier wurden mittels der koproskopischen Untersuchung anhand ihrer Farbe und Größe identifiziert. Zusätzlich wurde stichprobenartig die deutliche Autofluoreszenz des Eis bei einer Wellenlänge von 360 nm +/- Anregung und 460 nm +/- 50 nm Emission überprüft (Abb. 11).



**Abbildung 11: Autofluoreszenz der Pansenegleier (gelbe Pfeile)**

Die Pansenegel-positiven Sedimente wurden in 10 ml großen Probenröhrchen mit Leitungswasser gefüllt und bei 4 °C im Kühlschrank bis zur weiteren Verwendung stehend gelagert.

## **2.2. Entwicklung des Miracidiums**

Im nächsten Schritt wurden 500  $\mu\text{l}$  des Sediments mit den Pansenegleiern aus dem Probenröhrchen in eine Mikroskopier-Schale gegeben und anschließend mit 1000  $\mu\text{l}$  destilliertem Wasser verdünnt. Die Eier wurden dann mit einer 200  $\mu\text{l}$  Mikropipette, unter Vermeidung von Fremdpartikeln, aufgenommen und in ein Well einer 24-Well-Platte (Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich, 662160) pipettiert. Die 24-Well-Platte wurde zuvor bereits mit 1000  $\mu\text{l}$

destilliertem Wasser pro Well vorbereitet. Danach sollten mindestens 20 Pansenegeleier in einem Well sichtbar sein.

Im Anschluss wurde sie basierend auf dem Protokoll für Eier des großen Leberegels von MAGALHAES et al. (2004) bei 27 °C im Dunkeln in der 24-Well-Platte für 12–15 Tage ohne Kohlenstoffdioxid im Inkubator (Forma Series II Water Jacketed Co<sup>2</sup> Incubator; Thermo Electron Corporation) bebrütet.

Nach frühestens zwölf Tagen wurde die 24-Well-Platte herausgenommen und einem Lichtreiz von 3000–4000 Lux für etwa zehn Minuten bei Raumtemperatur ausgesetzt. Nach zehn Minuten wurde mikroskopisch der Schlupf der Miracidien überprüft und mithilfe des Fluoreszenzmikroskop (BZ-X800, KEYENCE) gefilmt.

Der Anteil der frisch geschlüpften Miracidien wurde festgehalten.

### **2.3. Speziesbestimmung**

Die Artbestimmung fand mittels multiplex PCR basierend auf dem Protokoll von KÜCHLER (2021) statt, siehe Abschnitt III.4.3. Hierbei wurden Eier und infizierte Schnecken untersucht.

## **3. Vorversuche: Untersuchungen zur Etablierung der Metacercarienproduktion**

### **3.1. Verwendete Schnecken**

Für die Infektionsversuche wurden etwa 3–4 mm große Zwergschlammschnecken aus eigener Zucht, wie in Abschnitt III.1.1. beschrieben, verwendet. Diese sollten mindestens aus der 2. Generation stammen, damit eine natürliche Infektion ausgeschlossen werden konnte.

Die Schnecken wurden zwei Tage vor der Infektion bereits in eine separate Petrischale umgesetzt und makroskopisch auf ihre Vitalität überprüft. Die Vitalitätsparameter umfassten: Gehäusebeschaffenheit, Aktivität, Ausscheidungen und Fressverhalten. Falls eine Schnecke innerhalb der zwei Tage verendete, wurde sie durch eine weitere Schnecke ersetzt.

### **3.2. Miracidien**

Die Miracidien für den Infektionsversuch wurden wie in Abschnitt III.2.2.

beschrieben gewonnen. Der Schlupfvorgang sollte nicht länger als eine Stunde zurückliegen, damit die Miracidien noch eine vollständige Motilität aufwiesen.

Die Miracidien, die zur Infektion der *G. truncatula* dienten, wurden direkt nach dem Schlupf einzeln oder zu zweit mit einem Volumen von 1 µl in ein Well einer 24-Well-Platte unter mikroskopischer Kontrolle pipettiert. Die Wells waren entweder mit 1 ml gefiltertem Leitungswasser oder 1 ml destilliertem Wasser gefüllt.

### **3.3. Schneckeninfektionen**

Insgesamt wurden 281 Zwergschlammschnecken für die Infektionsversuche über einen Zeitraum von Februar 2022 bis Juni 2023 verwendet.

243 Schnecken wurden *C. daubneyi* Miracidien ausgesetzt und um die beiden Trematoden in einem direkten Versuch zu vergleichen, wurden 38 Schnecken *Fasciola hepatica* (*F. hepatica*) Miracidien ausgesetzt.

#### **3.3.1. Infektionen mit *Calicophoron daubneyi* Miracidien**

Es wurden gleichzeitig, je nach Vorhandensein von bewegungsfähigen *C. daubneyi* Miracidien, zwischen sechs und 38 Zwergschlammschnecken in einem Versuch infiziert (Tab. 2, 3 und 6).

Die Schnecken wurden einzeln in eine Vertiefung der 24-Well-Platte gesetzt, die bereits wie in Abschnitt III.3.2. beschrieben, vorbereitet war. Sie wurden den Miracidien vier Stunden lang ausgesetzt. Während dieser Exposition wurde permanent dafür gesorgt, dass die Schnecken sich im Wasser aufhielten, um ihnen einen kontinuierlichen Kontakt mit den Miracidien zu ermöglichen. In regelmäßigen Abständen wurde mikroskopisch die Vitalität der Schnecke und des Miracidiums überprüft. Zeitgleich konnte man auch die Penetration des Miracidiums in die Schnecke beobachten (Abb. 12). Nach vier Stunden wurden die Schnecken entweder in eine 9 cm oder 14 cm große Petrischale oder eine 6-Well-Platte, modifiziert nach VIGNOLES et al. (2002a) umgesetzt. Sie wurden 30 Tage lang unter den Laborbedingungen, wie in Abschnitt III.1.1. beschrieben, gehalten. Ebenso wurden zwei 6-Well-Platten in einen Inkubator bei 25 °C für 30 Tage gegeben, um die Auswirkungen einer unterschiedlichen Umgebungstemperatur zu überprüfen (Tab. 2).

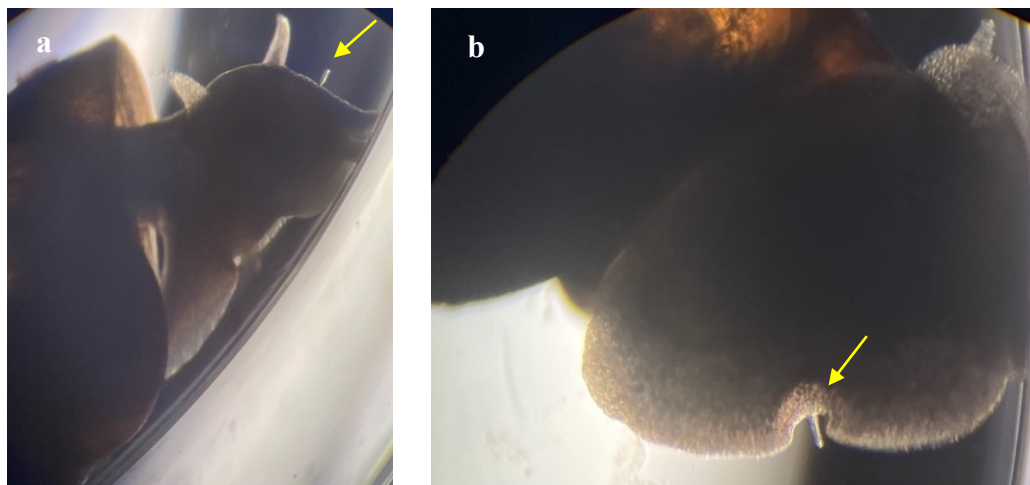
Alle zwei Tage fand ein Wasserwechsel mittels serologischer Pipette statt und die

Schnecken wurden makroskopisch auf ihre Vitalität überprüft. Falls es zum Verenden einer Schnecke kam, wurde diese umgehend aus der Schale entfernt und bei -20 °C für weitere Untersuchungen eingefroren.

Die Anzahl der verwendeten *C. daubneyi* Miracidien variierte zwischen 2, 4 und 30 Miracidien pro Schnecke (Tab. 2, 3, 6).

An Tag 30 p. i. wurden die infizierten Schnecken einzeln in 9 cm oder 14 cm große Petrischalen, 6-Well-Platten oder 35 mm große Petrischalen umgesetzt (Tab. 2, 5, 6). In den 9 cm große Petrischalen befand sich 40 ml gefiltertes Leitungswasser und zwei Stängel *Fontinalis antipyretica*, in den 14 cm großen Petrischalen 60 ml gefiltertes Leitungswasser und vier Stängel *Fontinalis antipyretica* und in den 35 mm großen Petrischalen und der 6-Well-Platte jeweils 3 ml gefiltertes Leitungswasser und ein Stängel *Fontinalis antipyretica*.

Die Schnecken wurden weiterhin mit getrocknetem Salat gefüttert und es fand alle zwei Tag ein Wasserwechsel statt. Die Versuche endeten erst mit dem Verenden der Schnecken.



**Abbildung 12: Penetration des Miracidiums (gelber Pfeil) in die a) Kopfregion oder b) Mantelregion der Schnecke**

### 3.3.2. Infektionen mit *Fasciola hepatica* Miracidien

Die *F. hepatica* Miracidien wurden identisch zu den *C. daubneyi* Miracidien, wie Abschnitt III.2.2. beschrieben, entwickelt.

38 *G. truncatula* wurden je zwei frisch geschlüpften Miracidien für vier Stunden ausgesetzt (Tab. 3).

Anschließend wurden sie 30 Tage lange unter Laborbedingungen gehalten, wie Abschnitt III.1.1. beschrieben. Am Tag 30 p. i. wurden die Schnecken mit einer Pinzette in 3,5; 9 oder 14 cm große Petrischalen oder in eine 6-Well-Platte umgesetzt (Tab. 5).

#### **4. Untersuchung des Infektionsstatus des Zwischenwirtes**

##### **4.1. Mikroskopische Untersuchung**

Ab Tag 30 p. i. wurden alle Behältnisse mit potenziell infizierten Schnecken alle zwei Tage unter dem Mikroskop in 10-facher Vergrößerung auf Cercarien oder Metacercarien untersucht. Um gefundene Larvenstadien sicher zu identifizieren, dienten die Abbildungen von IGLESIAS-PINEIRO et al. (2016).

Ebenso wurden Quetschpräparate von verendeten Schnecken, modifiziert nach dem Protokoll zur Schneckensektion von ABROUS et al. (1999a) und DREYFUSS et al. (2005), wie in Abschnitt II.3.4.2. beschrieben, angefertigt. Der herausgezogene Körper wurde mit einem weiteren Objektträger gequetscht und unter dem Mikroskop in 40-facher Vergrößerung auf das Vorhandensein von Larvenstadien inspiziert.

##### **4.2. Cercarienausschüttung natürlich infizierter Schnecken**

Es wurden 218 Zwergschlammschnecken mit einer durchschnittlichen Größe von 4 mm auf einer Grünfläche eines Betriebs in Bayern im Juli 2021 gesammelt. Auf dieser Fläche wurden einige Monate zuvor noch Wasserbüffel gehalten, welche nachweislich mit Pansen- und großem Leberegel infiziert waren. Die Leberegelprävalenz in der Wasserbüffelherde lag zum Untersuchungszeitpunkt bei 81 % und die Pansenegelprävalenz bei 21 %. Dies wurde im Rahmen einer jährlichen Bestandsuntersuchung der Klinik für Wiederkäuer mit Ambulanz und Bestandsbetreuung der LMU München ermittelt.

Die Schnecken wurden, wie in Abschnitt III.1.2. beschrieben, ins Labor transportiert. Anschließend wurden je 24 Schnecken zusammen in eine 9 cm große Polystyrol-Petrischale umgesetzt (Tab. 1). Sie wurden dann unter den in Abschnitt III.1.1. erwähnten Bedingungen gehalten.

Neun Petrischalen mit 24 Schnecken und eine Petrischale mit zwei Schnecken

wurden einmal wöchentlich einer Temperatur von etwa 12 °C für drei Stunden ausgesetzt. Hierfür wurden sie in den Morgenstunden ins Freie gestellt und der Temperaturabfalls des Wassers in den Schalen wurde mittels Thermometer (TURATA) überprüft. Die restliche Woche wurden die Petrischalen bei Raumtemperatur unter den in Abschnitt III.1.1. beschriebenen Bedingungen untergebracht. Dieser Temperaturschock wurde neun Wochen lang durchgeführt (RONDELAUD et al., 2013). Alle Petrischalen wurden täglich mikroskopiert, um sie auf eine Cercarienausschüttung zu überprüfen.

Drei Tage nach dem Start des Protokolls wurden Cercarien nachgewiesen. Diese waren jedoch der Gattung *Trichobilharzia* spp. zuzuordnen (Abb. 13). Nach neun Wochen war der Versuch beendet und die verblieben überlebenden Schnecken wurden zum weiteren Aufbau der Zucht in diese integriert.



**Abbildung 13: Ausschüttung von *Trichobilharzia* spp. (blaue Pfeile) aus einer *Galba truncatula***

#### **4.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Schnecken, welche *C. daubneyi* ausgesetzt waren, wurden nach ihrem Verenden mittels einer PCR auf eine stattgefundene Infektion mit diesem Parasiten untersucht. Ebenso wurde anhand der multiplex PCR die Spezies *C. daubneyi* identifiziert. Hierbei wurde das Protokoll aus der Dissertation von KÜCHLER (2021) verwendet.

#### **4.3.1. DNA-Extraktion**

Die DNA wurde mit dem DNeasy blood & tissue Kit (QIAGEN) aus dem Schneckenkörper extrahiert. Es wurde die maschinelle Zerkleinerung (SpeedMill PLUS, Analytik Jena GmbH & Co. KG) und die über Nacht Inkubation (10–15 Stunden) gewählt.

Alle weiteren Schritte verliefen nach Herstellerangaben und Angaben von KÜCHLER (2021).

#### **4.3.2. Primer**

Für alle Proben wurde der Primer Cd-Cox Neu (biomers.net GmbH) verwendet (Tab. 13 im Anhang).

#### **4.3.3. Positiv- und Negativkontrolle**

Die Positivkontrolle bestand aus der DNA eines adulten Pansenegels (PK-PE).

Als Negativkontrolle wurde 5 µl Nuklease-freies autoklaviertes Wasser verwendet und ebenso eine Zwergschlammschnecke aus eigener F2 Generation.

#### **4.3.4. Elektrophorese**

Die DNA wurde mit Hilfe eines automatisierten Elektrophoresesystem von 4150 TapeStation System (Agilent Technologies, Santa Clara, United States) analysiert. Zur Analyse wurde das D1000 ScreenTape (Agilent Technologies, Santa Clara, United States) verwendet. Das System ermöglichte eine Auftrennung von 25 bp (Lower-Marker) bis 1500 bp (Upper-Marker).

Die gesamte Analyse wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Als positiv wurden alle Proben gewertet, welche +/- 10 bp von der Positivkontrolle dieses Laufs abwichen (Abb. 28).

### **5. Untersuchungen zur Metacercarienproduktion**

#### **5.1. Temperaturveränderung**

Ein Behältnis mit potentiell infizierten Schnecken wurde pro Infektionsversuch einer kurzzeitigen Temperaturveränderung ab Tag 30 p. i. ausgesetzt, wie in Abschnitt III.4.2. beschrieben (RONDELAUD et al., 2013). Zur Provozierung des Temperaturabfalls wurde die Petrischale für ca. 2 min in den Kühlschrank bei 4 °C

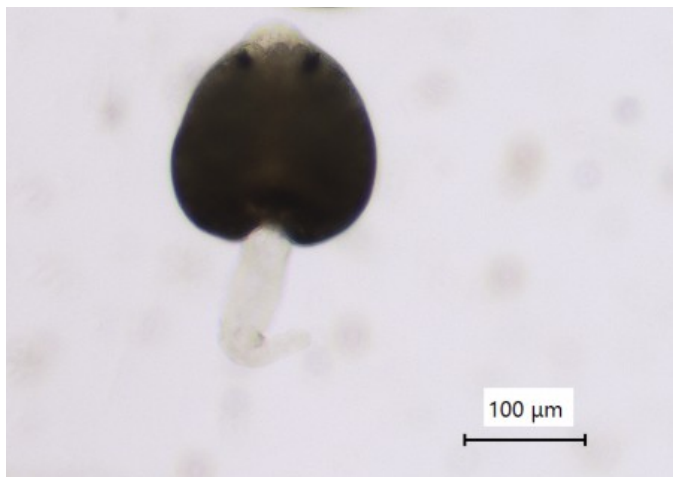
gestellt bis die Wassertemperatur auf 12 °C herabgefallen war.

## 5.2. Ausschüttung

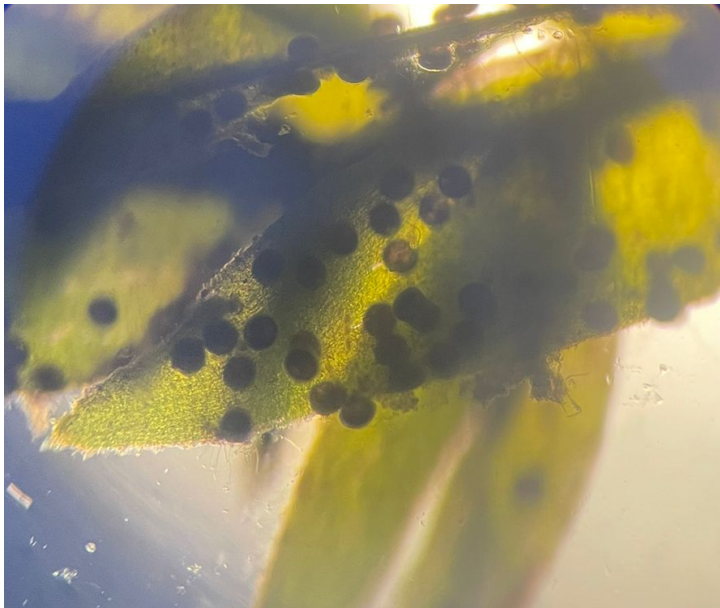
Wenn mikroskopisch Cercarien (Abb. 14) oder Metacercarien (Abb. 15) sichtbar waren, wurde die Schnecke in eine neue Petrischale umgesetzt. Die Petrischale wurde bis zur Zählung bei 4 °C gelagert.

Die Metacercarien wurden einzeln oder zu zweit mit einer Mikropipette in ein 5 ml Eppendorf Gefäß mit 2,5 ml gefiltertem Leitungswasser überführt. Die Umsetzung wurde unter dem Inversmikroskop durchgeführt. Es wurden maximal 100 Metacercarien in einem Gefäß aufbewahrt.

Der Tag der Ausschüttung, sowie die Anzahl der ausgeschütteten Metacercarien pro Tag wurde festgehalten.



**Abbildung 14:** *Calicophoron daubneyi* Cercarie aus einer experimentell infizierten *Galba truncatula*



**Abbildung 15:** *Calicophoron daubneyi* Metacercarien am Quellmoos

### 5.3. Vitalitätsprüfung

Alle zwei Wochen wurden fünf der eingelagerten Metacercarien auf ihre Vitalität überprüft. Zuerst fand eine mikroskopische Untersuchung statt und es wurden Form- sowie Farbveränderungen notiert. Anschließend wurden sie basierend auf dem Protokoll für eine in vitro Exzystierung für *F. hepatica* Metacercarien von GAYO et al. (2020) einer 1 % Natriumhypochlorit Lösung für fünf Minuten bei 39 °C ausgesetzt. Dies sorgte für eine sichtbare Bewegung im Inneren der Metacercarien. Die Bewegung zeigte somit auch die Vitalität der Metacercarien an. In weiteren Schritten wurden die Metacercarien noch Lösungen aus HCl und L-Cystein, sowie aus NaHCO<sub>3</sub>/NaCl und Natriumtaurocholat exponiert, um eine Exzystierung der Metacercarien zu provozieren.

## 6. Vorversuche zur Fluoreszenzfärbung

Alle Untersuchungen und Aufnahmen fanden mit einem Fluoreszenzmikroskop (BZ-X800, KEYENCE) statt.

### 6.1. Probenvorbereitung *Calicophoron daubneyi* Miracidium

Für die Fluoreszenzfärbung der Miracidien, wurde das Protokoll von GEORGIEVA et al. (2012) genutzt. Dafür wurden zur Vorbereitung die Wells der 24-Well-Platte

mit je einem runden Deckglas (Cover Slips,  $\varnothing$  12 mm, epredia) ausgestattet. Anschließend wurde, abweichend von den Herstellerangaben, unverdünnt je 250  $\mu$ l Poly-D-Lysin (Thermo Fisher Scientific, A3890401) auf die Deckgläser gegeben. Dies wurde dann für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Protokoll des Herstellers<sup>7</sup> zur Beschichtung der Deckgläser in den Wellplatten mit Poly-D-Lysin befolgt.

Die frisch geschlüpften Miracidien wurden in die beschichtete Well-Platte pipettiert und unter mikroskopischer Kontrolle, bis zum Anheften, beobachtet. Dieser Vorgang dauerte zehn Minuten. Dann wurden sie mit 4 % Paraformaldehyd + 0,1 % Glutaraldehyd in PBS über Nacht bei 4 °C fixiert modifiziert nach GEORGIEVA et al. (2012).

## 6.2. Lectin-FITC

Die fixierten Larven wurden für eine Stunde dem Lectin-FITC Farbstoff WGA, *Triticum vulgaris* (Sigma Aldrich, L9640), in einer Konzentration 20  $\mu$ g/ml in PBS im Dunkeln ausgesetzt. Nachfolgend wurden die markierten Larven dreimal für je fünf Minuten mit PBS gewaschen (GEORGIEVA et al., 2012).

Das runde Deckglas (Cover Slips,  $\varnothing$  12 mm, epredia) wurde auf einen Objektträger gegeben und mit einem Schnelleindeckmittel (Entellan®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) fixiert.

## 6.3. Nukleinsäurefarbstoff (Hoechst)

Die Miracidien wurden, wie in Abschnitt III.6.1. beschrieben, vorbereitet und anschließend mit Trihydrochloride, Trihydrate (Hoechst, invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, 33342) in einer Konzentration 50  $\mu$ g/ $\mu$ l in PBS für fünf Minuten inkubiert. Danach fanden drei Waschungen mit PBS für je fünf Minuten statt. Die Deckgläser wurden auf einen Objektträger gegeben.

## 6.4. Primärer und sekundärer Antikörper

Die *C. daubneyi* Miracidien wurden, wie in Abschnitt III.6.1. beschrieben, fixiert. Als Fixationslösung wurde diesmal ein Cytoskeleton Puffer, bestehend aus MES, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 5 mM Glukose, 5 mM MgCl<sub>2</sub> und 4 %

---

<sup>7</sup><https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FBI%2Fflyers%2Fgibco-poly-d-lysine-flyer.pdf>. Letzter Zugriff: 20.03.2024.

Paraformaldehyd (DEL ROSARIO et al., 2019), für 20 Minuten bei Raumtemperatur verwendet. Nach der Fixierung wurde das Medium entfernt und das fixierte Miracidium einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Miracidium mit einer Lösung aus 0,2 % Triton X-100 in PBS + 2 % BSA permeabilisiert und geblockt für 60 Minuten bei Raumtemperatur.

Der primäre Antikörper, Rat-Anti-Tubulin-alpha (Bio RAD, MCA77G) 1:500 verdünnt, wurde zusammen mit dem Puffer (0,2 % Triton X-100 in PBS + 2 % BSA) hinzugegeben und alles wurde bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Danach fanden drei Waschungen mit 0,2 % Triton X-100 in PBS statt. Der sekundäre Antikörper Goat-anti-Rat (Alexa Fluor™ 488, invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, A-11006) 1:1500 verdünnt, wurde im selben Puffer hinzugegeben und im Dunkeln für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In einem weiteren Schritt wurde das Medium mit Hilfe von drei Waschungen mit 0,2 % Triton X-100 in PBS entfernt. Die Zellkerne wurde mittels DAPI mit einer Verdünnung 1:500 für fünf Minuten angefärbt. Nach der letzten Waschung mit PBS wurde das Deckglas verkehrtherum auf einen Objektträger gelegt und mit Entellan® (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) fixiert.

Diese Methodik ermöglicht die Bereiche, in denen der Primärantikörper an alpha-Tubulin gebunden hat, durch die Fluoreszenz des Sekundärantikörper sichtbar zu machen, sowie die Zellkerne der Miracidien durch die DAPI-Färbung zu visualisieren.

### **6.5. Fluoreszenzanalyse Metacercarie**

Es fanden auch erste Vorversuche mit Fluoreszenzmarkierungen der *C. daubneyi* Metacercarien statt. Hierbei wurde sich an das Protokoll der Miracidien gehalten (Abschnitt III.6.1 und 6.2).

Die Metacercarien zeigten allerdings eine starke Autofluoreszenz. Um diese genauer zu überprüfen, gab man eine einzelne Metacercarie mit 1 µl destilliertem Wasser auf einen Objektträger und untersuchte sie in folgenden Kanälen: TxRed bei einer Anregung von 561 nm und Emission von 615 nm; DAPI bei einer Anregung von 360 nm und Emission von 460 nm und GFP bei einer Anregung von 488 nm und Emission von 510 nm.

## **7. Datenauswertung und -visualisierung**

Die Dokumentation der Daten und die Berechnungen erfolgten mittels Microsoft Office Excel 2021. Die Grafiken der vorliegenden Dissertation wurden mit GraphPad PRISM erstellt und die statistische Auswertung wurde mithilfe der Software R für Statistik und Grafik, Version 4.3.2, durchgeführt. Um signifikante Unterschiede zu ermitteln, wurde der p-Wert bestimmt und ab einem Wert von  $p < 0,05$  handelte es sich um ein statistisch signifikantes Ergebnis.



## IV. ERGEBNISSE

### 1. Zwergschlammschneckenzucht

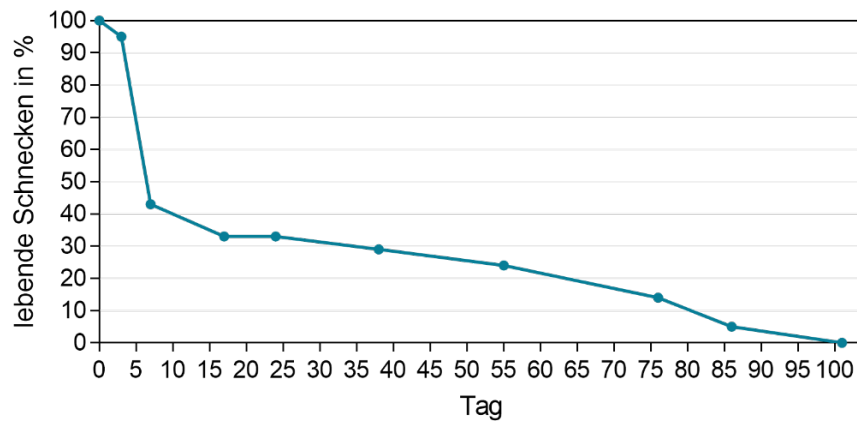
Die Zucht der Zwergschlammschnecke unter Laborbedingungen legt den entscheidenden Grundstein für die Erforschung des Lebenszyklus von *C. daubneyi*. Im Folgenden wird die Etablierung der Zucht von *G. truncatula* unter Laborbedingungen dargestellt.

#### 1.1. Habitate unter Laborbedingungen

Es wurden drei kleine Becken als künstliche Habitate angelegt, um darin die verschiedenen Wasserarten zu untersuchen. Zusätzlich wurde ein offenes Aquarium, ein kleines Übergangsbecken, 9 cm und 14 cm große Glaspetrischalen, 9 cm große Petrischalen aus Polystyrol und ein Fließsystem in 14 cm großen Glaspetrischalen als Habitate unter Laborbedingungen getestet (Tab. 1). Die künstlichen Habitate befanden sich alle in einer von der Jahreszeit abhängigen Umgebungstemperatur zwischen 19 °C und 25 °C mit variierenden Werten an Luftfeuchtigkeit. Die Luftfeuchtigkeit in den Petrischalen konnte nicht ermittelt werden, da sie in den geschlossenen Petrischalen nicht messbar war. Allerdings war deutlich Kondenswasser am Deckel der Glaspetrischalen sichtbar, welches auf eine hohe Luftfeuchtigkeit hinweist. In den offenen Behältnissen (offenes Aquarium, Übergangsbecken und kleines Becken 1–3) lag die Luftfeuchtigkeit zwischen 38 % und 53 %. Im offenen Aquarium lag der pH-Wert des gefilterten Wassers zwischen 7,0 und 8,0. In den Petrischalen wurde ein pH-Wert zwischen 6,8 und 7,5 gemessen. Die Wassertemperatur war von der Umgebungstemperatur abhängig und betrug unabhängig von der Art des Habitats zwischen 19 °C und 23 °C. Die Wasserhärte des gefilterten Wassers lag bei  $> 100 \text{ mg/l CaCO}_3$  (5,6 Grad deutscher Härte [°dH]) mit einer oberen Grenze von  $250 \text{ mg/l CaCO}_3$ . Beim Leitungswasser hingegen konnten  $> 300 \text{ mg/l CaCO}_3$  mit einer oberen Grenze von  $450 \text{ mg/l CaCO}_3$  gemessen werden und beim destillierten Wasser konnte kein Kalziumkarbonat nachgewiesen werden. Die entnommene Wasserprobe aus einem Bach in einem natürlichen Habitat der Schnecken zeigte zum Vergleich einen pH-Wert von 7,2 und eine Wasserhärte von  $> 100 \text{ mg/l CaCO}_3$ .

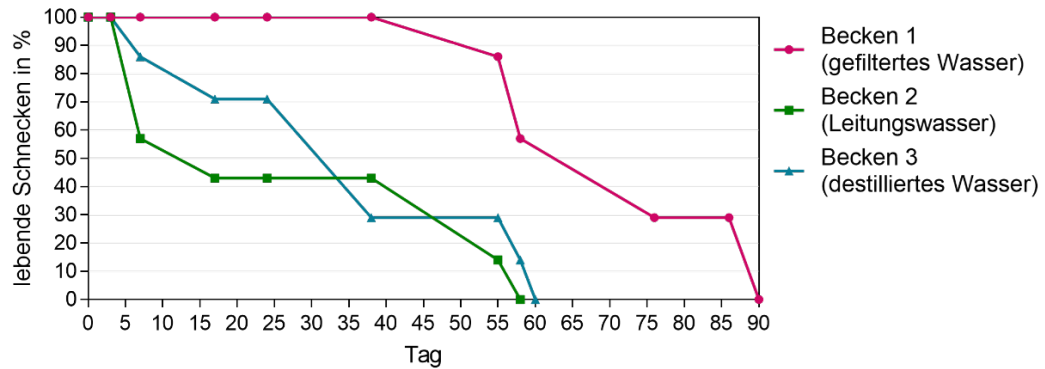
In den verschiedenen Habitaten wurde die Überlebenszeit der

Zwergschlammschnecken beobachtet. Die Abbildung 16 zeigt die durchschnittliche Überlebensdauer der Schnecken im Habitat „offenes Aquarium“. Sie lebten dort durchschnittlich 30,1 Tage. Die Lebensdauer betrug im offenen Aquarium mindestens drei Tage und maximal 101 Tage. Nicht wiederaufgefundene Schnecken wurden als verstorben gewertet.



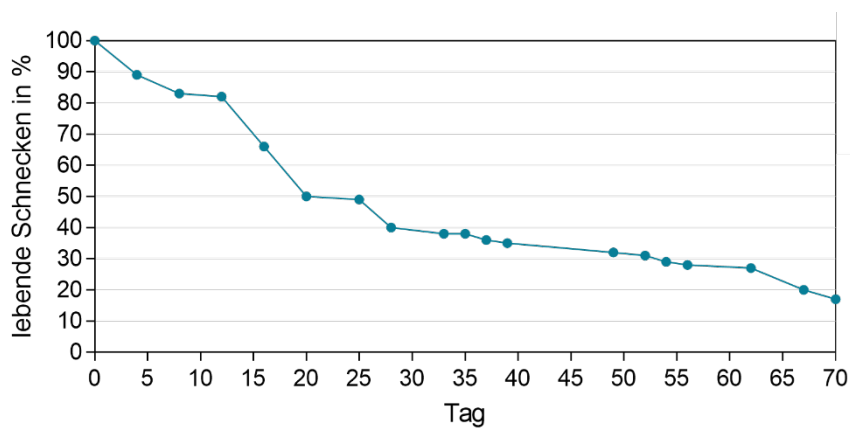
**Abbildung 16: Verlaufskurve der Überlebensrate von 21 Schnecken im offenen Aquarium über einen Zeitraum von 101 Tagen**

Beim Vergleich von drei Wasserarten (gefiltertes, destilliertes Wasser und Leitungswasser) im kleinen Becken (Abb. 17) war die Überlebensdauer der Schnecken mit gefiltertem Wasser am höchsten (Abb. 17, rosa Kurve) und lag durchschnittlich bei 71,9 Tagen. Sie überlebten hier mindestens 55 Tage und maximal 86 Tage. Im kleinen Becken 2 mit Leitungswasser (Abb. 17, grüne Kurve) lebten sie durchschnittlich nur 29,4 Tage bei einem Minimum von sieben Tagen und einem Maximum von 55 Tagen. Im kleinen Becken 3 mit destilliertem Wasser (Abb. 17, blaue Kurve) zeigten sie eine Überlebenszeit von 7–58 Tagen, durchschnittlich 36,6 Tagen.



**Abbildung 17: Verlaufskurven der Überlebensraten von je sieben Schnecken in drei identischen künstlichen Habitaten mit verschiedenen Wasserarten: gefiltertes Wasser, Leitungswasser und destilliertes Wasser**

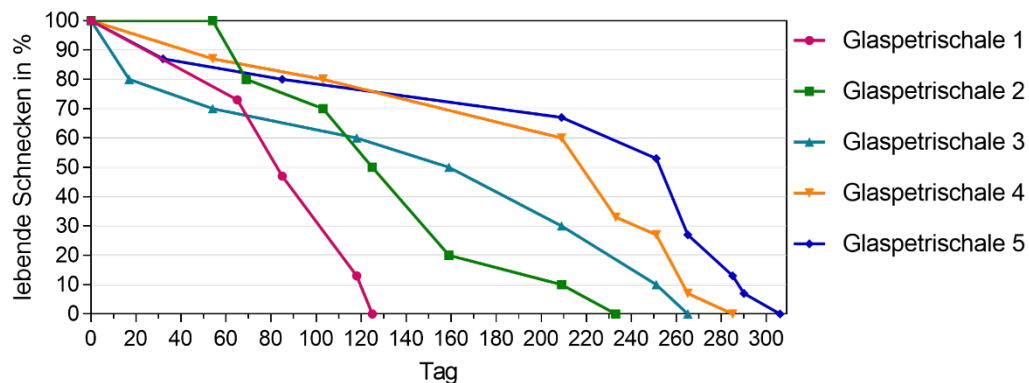
In den Polystyrol-Petrischalen zeigten die Schnecken eine kürzere durchschnittliche Lebenszeit von 22,4 Tagen (in einer Zeitspanne von vier Tagen bis 70 Tagen) (Abb. 18). Zu beachten ist jedoch, dass diese Schnecken potenziell natürlich infiziert waren und im neunwöchigen Versuch zur Cercarien ausschüttung, wie im Abschnitt III.4.2. beschrieben, verwendet wurden. Von den 218 im Feld gesammelten Schnecken lebten nach neun Wochen noch 37 Schnecken. *C. daubneyi* Cercarien hat keine dieser Schnecken ausgeschüttet. Die überlebenden Schnecken wurden anschließend in die Zucht integriert.



**Abbildung 18: Verlaufskurve der Überlebensrate von 218 in Polystyrol-Petrischalen gehaltenen potenziell mit *Calicophoron daubneyi* infizierten Schnecken über einen Zeitraum von neun Wochen**

Durch die Verwendung von Glaspetrischalen mit einem Durchmesser von 14 cm als Habitat, wie in Abschnitt III.1.1. beschrieben, stieg die durchschnittliche

Überlebenszeit der Schnecken pro Glaspetrischale ( $n = 5$ ) auf 107,2–141 Tage an (Abb. 19). Die durchschnittliche Lebensdauer zusammengefasst in den fünf Petrischalen betrug 168,2 Tage. Die Schnecken ( $n = 65$ ) lebten durchschnittlich mindestens 32–69 Tage und maximal 209–306 Tage in den Glaspetrischalen.

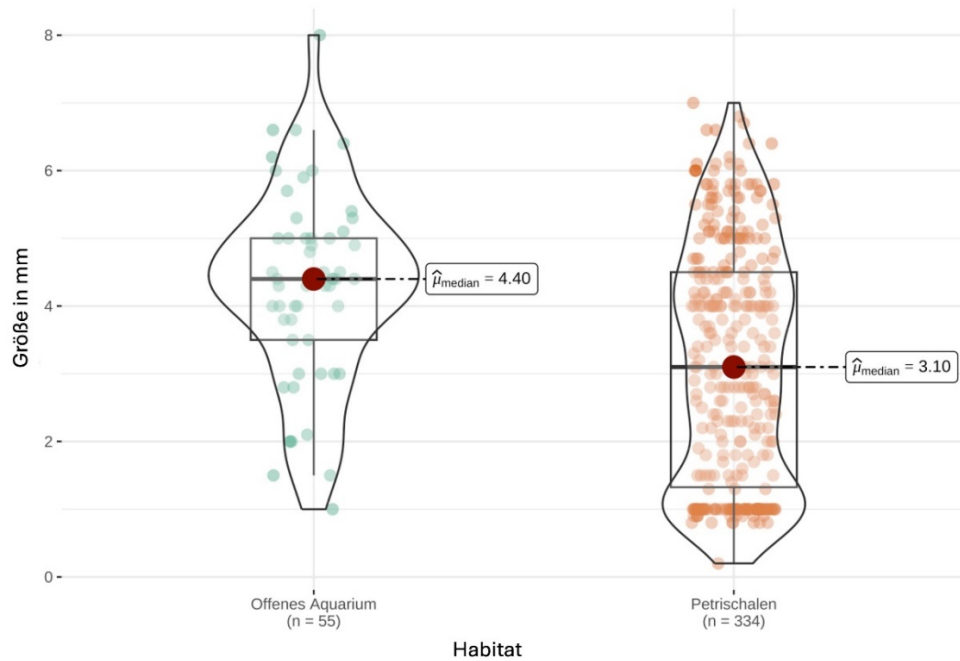


**Abbildung 19: Verlaufskurven der Überlebensrate von insgesamt 65 Schnecken aufgeteilt in fünf Glaspetrischalen mit je zehn oder 15 Schnecken**

Zur weiteren Optimierung der Glaspetrischalen wurde ein Durchflusssystem etabliert. Dieses wurde ausschließlich verwendet, um die infizierten Schnecken bis Tag 30 p. i. aufzuziehen. Die Überlebensrate der Schnecken aus dem Vergleichsversuch (Tab. 3 und 4) und des Hauptversuchs (Tab. 6) an Tag 30 p. i. stieg um 12,6 % auf 50 % mit der Verwendung des Durchflusssystems.

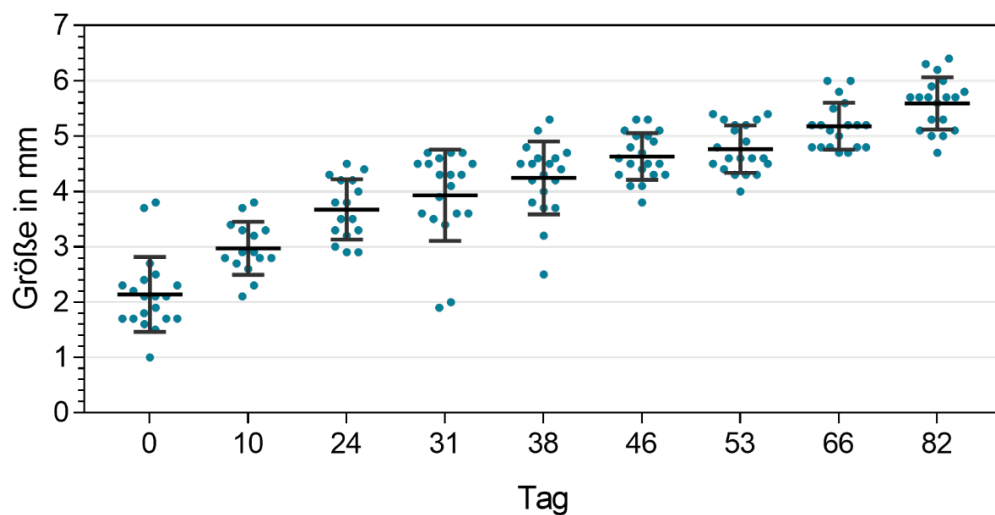
## 1.2. Schneckenwachstum

Die Größe der Schnecken in den unterschiedlichen Habitaten „Offenes Aquarium“ und „Petrischalen“ ist in Abbildung 20 dargestellt. Über einen Zeitraum von Mai bis Juli 2020 wurden in einem Abstand von sieben bis 17 Tagen sechs verschiedene Schneckengruppen mit insgesamt 22 Schnecken im offenen Aquarium vermessen. Eine Woche nach Beginn der Messungen wurden zusätzlich zwei weitere Gruppen mit insgesamt 25 Schnecken erfasst. Diese zwei Gruppen setzten sich aus den Schnecken zusammen, die im jeweiligen Habitat geboren waren. Die Schnecken im offenen Aquarium waren im Median 4,4 mm groß. In acht Petrischalen wurde die Gehäusegröße von insgesamt 94 Schnecken im Zeitraum Mai bis August 2021 in einem Abstand von neun bis 15 Tagen ermittelt. Hier betrug der Median 3,1 mm. Es fanden im offenen Aquarium  $n = 55$  Messungen und in den Petrischalen  $n = 334$  Messungen statt.



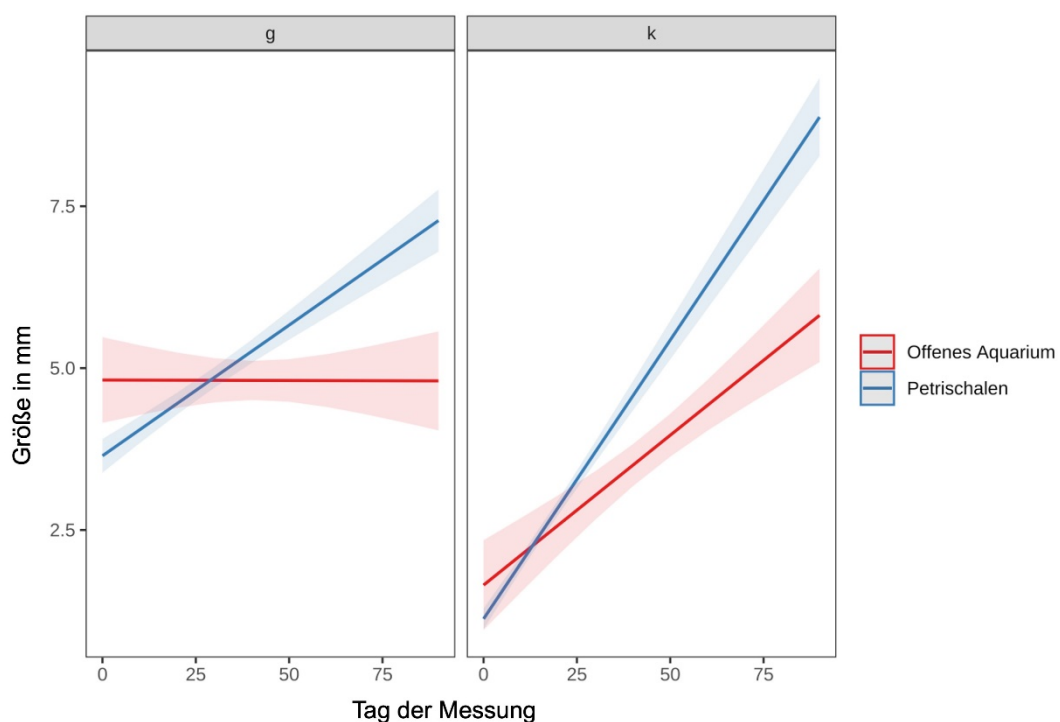
**Abbildung 20: Größe von Zwergschlammschnecken in zwei unterschiedlichen künstlichen Habitaten unter Laborbedingungen (erstellt von Yury Zablotski)**

Davon unabhängig wurden noch 20 Schnecken in einer Glaspetriscchale über einen Zeitraum von Dezember 2021 bis März 2022 in Abständen von sieben bis 16 Tagen vermessen (n = 162) (Abb. 21). Diese wurden bei der Median Berechnung nicht berücksichtigt.



**Abbildung 21: Gemessene Größe von 20 Schnecken in 14 cm großen Glaspetriscchalen unter Laborbedingungen innerhalb von 82 Tagen**

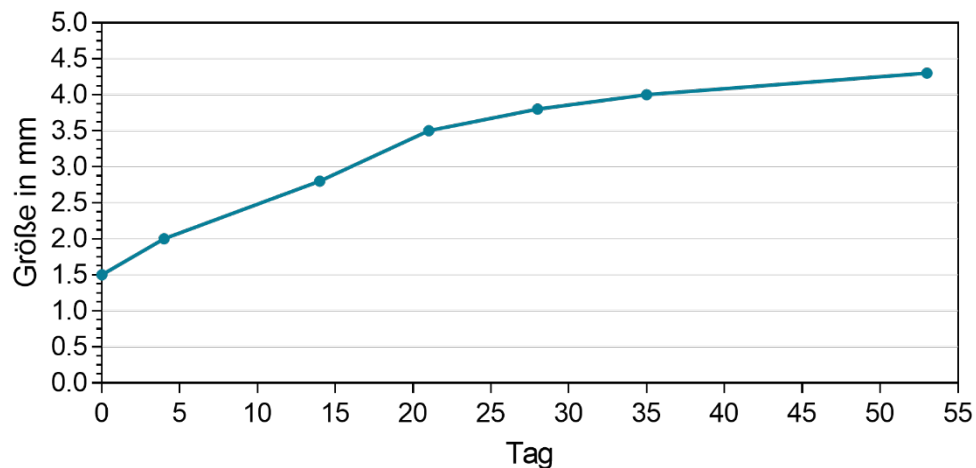
In einem weiteren Schritt wurde die Anfangsgröße der Schnecken beim Einzug ins jeweilige künstliche Habitat berücksichtigt. Dafür wurden die Schnecken in zwei Gruppen aufgeteilt. Die Schnecken, die zu Beginn kleiner als 2 mm waren oder im dargestellten Habitat geboren waren, bildeten Gruppe k ( $n = 73$ ), und die Schnecken, die 2 mm groß und größer waren, stellten Gruppe g ( $n = 31$ ) dar. Den Wachstumsverlauf innerhalb der unterschiedlichen Gruppen g und k in den zwei unterschiedlichen Habitaten „offenes Aquarium“ und „Petrischalen“ dokumentiert die Abbildung 22.



**Abbildung 22: Wachstumsverlauf von Zwergschlammschnecken in einem offenen Aquarium und in Petrischalen, aufgeteilt in zwei Gruppen g ( $\geq 2$  mm) und k ( $< 2$  mm) je nach ihrer Anfangsgröße (erstellt von Yury Zablotki)**

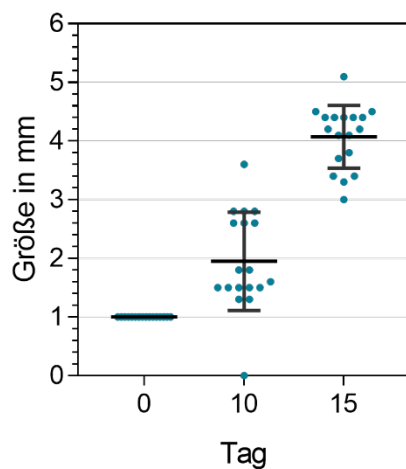
In Gruppe g wurde beim offenen Aquarium kein signifikantes Wachstum über den Messzeitraum April bis Juli 2020 festgestellt ( $p = 0,9838$ ). Die Schnecken in den Petrischalen sind jedoch über den Messzeitraum von Mai bis August 2021 signifikant gewachsen ( $p < 0,0001$ ). Die Gruppe k zeigt ein signifikantes Wachstum ( $p < 0,0001$ ) der Schnecken in beiden Habitaten. Die Schnecken in den Petrischalen zeigten auch hier einen noch stärkeren durchschnittlichen Zuwachs der Größe als im offenen Aquarium.

Die Zwergschlammschnecken ( $n = 13$ ) wuchsen im offenen Aquarium mit einer Anfangsgröße von 1,5 mm in der ersten Woche durchschnittlich 0,88 mm, dies entspricht einen Wachstumsanstieg um 58 %. In der zweiten Woche wuchsen sie durchschnittlich 0,56 mm (28 %) (Abb. 23).



**Abbildung 23: Durchschnittliches Wachstum von 13 Schnecken mit einer Startgröße von 1,5 mm im offenen Aquarium über 52 Tage**

Vergleichbar große Schnecken ( $n = 24$ ) mit einer Anfangsgröße von 1 mm wuchsen in den Petrischalen durchschnittlich um 0,75 mm in der ersten Woche und in der zweiten Woche 0,77 mm. Dies ist ein Wachstumsanstieg von 75 % in der ersten Woche und 37 % in der zweiten Woche (Abb. 24).



**Abbildung 24: Wachstum von 24 Schnecken mit einer Startgröße von 1 mm in 14 cm großen Glaspetrischalen innerhalb von 15 Tagen**

Größere Schnecken mit einer Anfangsgröße von 3,8 mm ( $n = 5$ ) wuchsen im offenen Aquarium durchschnittlich um 0,2 mm (5,3%) innerhalb zwei Wochen (Abb. 23). In den Petrischalen zeigten die vermessenen Schnecken ( $n = 19$ ) mit einer Anfangsgröße von 3,9 mm ein durchschnittliches Wachstum von 0,68 mm (17 %) innerhalb zwei Wochen (Abb. 21). Die größte Schnecke, die in dieser Studie vermessen wurde, war 7,3 mm groß und lebte 69 Tage lang unter Laborbedingungen in einer Glaspetrischale. Das genaue Alter ist nicht bekannt, da sie mit einer Größe von 4 mm im Feld gesammelt wurde.

### 1.3. Fortpflanzung

Die im Feld gesammelten Schnecken mit einer Größe von 2 mm bis 5 mm laichten nach Umsetzung in die Glaspetrischalen (Tab. 1), innerhalb von fünf bis acht Tagen ab. Der Laich war deutlich als ein ovales Paket mit einer Größe von 3–4 mm am Petrischalenrand, am Boden und am Moos sichtbar (Abb. 25–27). Aus einem Laichpaket entwickelten sich innerhalb von acht Tagen zwischen sieben und 14 Schnecken. Mikroskopisch konnte die Entwicklung der Schnecken im Laich beobachtet und nachverfolgt werden (Abb. 26 und 27).

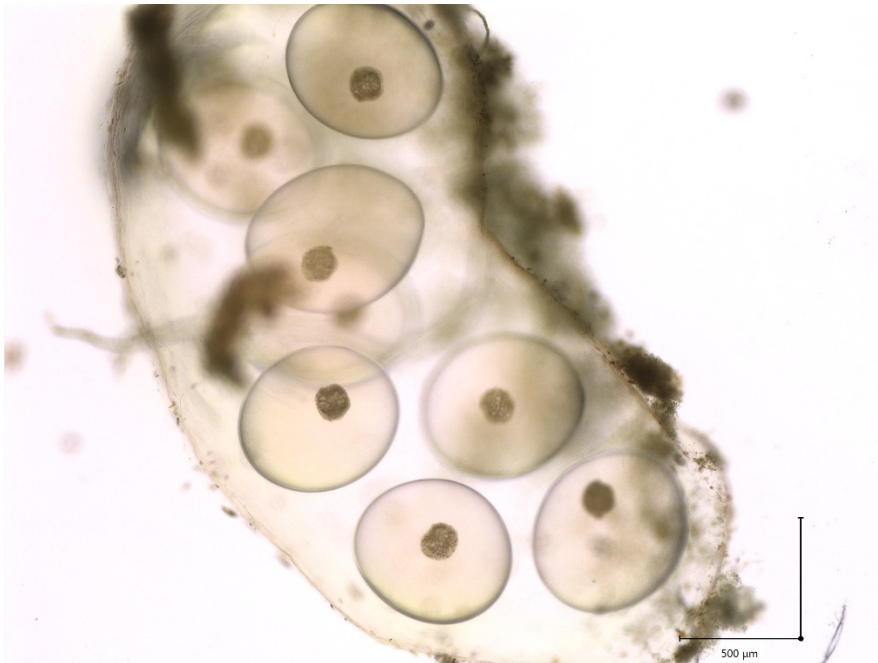
Die Schnecken, die im kleinen Becken 1, Abschnitt III.1.1., Tab. 1, aufgewachsen waren, laichten erst nach 65 Tagen ab. Es wurden acht Tage später etwa 30 Schnecken mit einer Größe von  $< 0,5$  mm im Becken aufgefunden. Die Hälfte der Schnecken befand sich innerhalb der ersten Woche an den Wänden des kleinen Beckens und kehrten nicht mehr zurück ins Wasser, weshalb sie dort vertrockneten.

Im offenen Aquarium konnte der Laich nicht aufgefunden werden. Jedoch waren auch dort vier Wochen nach Bezug des Aquariums Schnecken mit einer Größe von 0,5–0,8 mm sichtbar. Dies wies auf eine erfolgreiche Reproduktion der Schnecken hin. Im kleinen Becken 2 und 3 konnte kein Laich und kein Nachwuchs detektiert werden.

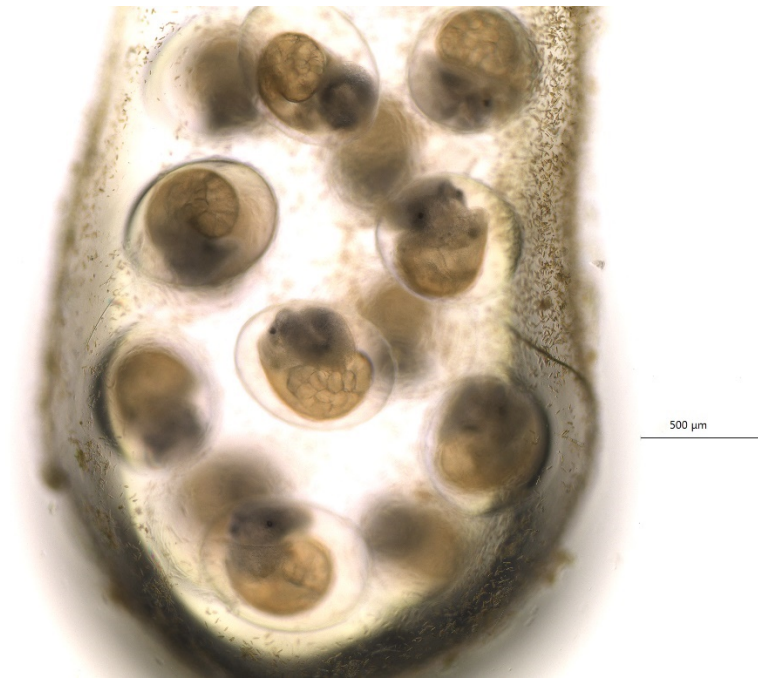
Ein exaktes Monitoring der Laichablage war erst ab Verwendung der Petrischalen möglich. Die erste Eiablage von 40 beobachteten Schnecken, die in Glaspetrischalen mit einem Durchmesser von 14 cm gezüchtet wurden, war zwischen Tag 25 und 31, durchschnittlich nach 28 Tagen, sichtbar. Die ersten Schnecken schlüpften ebenfalls acht Tage später. Es trat erst eine Laichablage ab einer Gehäusegröße von mindestens 3 mm auf. Zusammenfassend konnte die größte Menge an Laich in den Glaspetrischalen nachgewiesen werden.



**Abbildung 25: Zwei Laichpakete von Zwergschlammschnecken, gehalten unter Laborbedingungen am Boden einer Glaspetrischale**



**Abbildung 26: Zwei Tage alter Laich einer in einer Glaspetrischale gehaltenen Zwergschlammschnecke**



**Abbildung 27: Sieben Tage alter Laich einer in einer Glaspetrischale gehaltenen Zwergschlammschnecke**

Die Gesamtanzahl der Schneckenpopulation in den 14 cm großen Glaspetrischalen stieg in einem Zeitraum von Mai 2021 bis September 2021 von 55 Schnecken in vier Schalen auf insgesamt 248 Schnecken in zehn Schalen an. In den darauffolgenden drei Monaten vermehrten sich die Schnecken sogar auf eine Gesamtanzahl von 436 Schnecken in 15 Schalen. Die Schneckenpopulation stieg stetig weiter an und erreichte ihren höchsten Wert im Februar 2022 mit 541 Zwergschlammschnecken, aufgeteilt in 23 Schalen. Im Zeitraum vom September 2021 bis Februar 2022 wurden keine Schnecken vom Feld in die Zucht integriert.

#### **1.4. Fütterung**

Die Zwergschlammschnecken bevorzugten alle den im Backofen getrockneten Bio-Salat, wie in Abschnitt III.1.4. beschrieben. Zum Auffressen von drei etwa 0,5 cm großen Stücken benötigten die Schnecken ( $n = 15$ ) einer Petrischale zwei Tage.

Die Tetraphyll Flocken waren nach zwei Tagen noch über 90 % vorhanden und die Schnecken-VITAL Pellets, sowie die Algenfutterblätter blieben unberührt.

## **2. Etablierung der Metacercarienproduktion unter Laborbedingungen**

Mit der Etablierung der Zucht der Zwergschlammschnecken unter Laborbedingungen konnten die gezüchteten Schnecken genutzt werden, um die Produktion von *C. daubneyi* Metacercarien zu etablieren.

### **2.1. Experimentelle *Galba truncatula* Infektionen**

#### **2.1.1. Vorversuche: Infektionen mit *Calicophoron daubneyi***

In den ersten Versuchen von Februar bis Mai 2022 wurden 66 Zwergschlammschnecken *C. daubneyi* Miracidien ausgesetzt. Keine davon zeigte eine Cercarien ausschüttung. Auch in den angefertigten Quetschpräparaten der verwendeten Schnecken ließen sich keine Larvenstadien nachweisen. Die Tabelle 2 zeigt die verwendeten Bedingungen für die ersten vier Infektionsversuche sowie die Überlebensrate der Schnecken an Tag 30 p. i. Bei einer Erhöhung der Miracidienanzahl von zwei auf 30 Miracidien pro Schnecke überlebten nur 25 % der Schnecken Tag 30 p. i. Die Infektionsversuche mit je zwei Miracidien pro Schnecke zeigten eine Überlebensrate der Schnecken an Tag 30 p. i. von 41,7–66,7 %. Keine der verwendeten Schnecken des Vorversuchs wurde mittels PCR-Analyse auf eine mögliche Infektion untersucht.

**Tabelle 2: Versuchsaufbau der ersten vier Infektionsversuche von *Galba truncatula* mit *Calicophoron daubneyi* Miracidien**

Versuchszeitpunkt in Monat/Jahr	Anzahl Schnecken	Anzahl Miracidien pro Schnecke	Wasserart	Umgebungstemperatur	Behältnis ab Tag 0 p. i.	Behältnis ab Tag 30 p. i.	Anzahl der Schnecken Tag 30 p.i. (Überlebensrate)
02/22	24	2	Gefiltertes Wasser	25 °C im Inkubator	Je 6 Schnecken in ø 9 cm Glaspetrischalen und je 6 Schnecken in einer 6-Well- Platte	Einzel in 6- Well-Platten	16 (66,7 %)
04/22	24	2	Gefiltertes Wasser	20–25 °C	Je 12 Schnecken in ø 9 cm Glaspetrischalen und je 12 Schnecken in ø 14 cm Glaspetrischalen	Einzel in 6- Well-Platten	10 (41,7 %)
04/22	12	30 insgesamt	Gefiltertes Wasser	20–25 °C	Je 12 Schnecken in ø 14 cm Glaspetrischale	Einzel in 6- Well-Platten	3 (25 %)
05/22	6	2	Gefiltertes Wasser	25 °C im Inkubator	Je 6 Schnecken in einer 6- Well-Platte	Einzel in 6- Well-Platten	3 (50 %)

### 2.1.2. Infektionsversuch mit *Calicophoron daubneyi* und *Fasciola hepatica*

Im Juni 2022 fand ein Infektionsversuch statt, bei dem 76 Zwergschlammschnecken entweder mit *C. daubneyi* oder *F. hepatica* Miracidien infiziert wurden. Parallel dazu lief eine Kontrollgruppe unter denselben Bedingungen mit (Tab. 3 und 4). Zeitgleich wurden die Behältnisse verglichen, in denen die Schnecken bis Tag 30 p. i. und nach Tag 30 p. i. aufgezogen wurden. Die Schnecken wurden einzeln, wie in Abschnitt III.3.3.1. und 3.3.2. beschrieben, zwei Miracidien der entsprechenden Trematode ausgesetzt und anschließend 30 Tage lang im Habitat unter Laborbedingungen gehalten, wie in Tabelle 3 dargestellt. Alle Behältnisse befanden sich bei Raumtemperatur (20–25 °C) und bei einer Lichtintensität von 3000–4000 Lux. Die Tabelle 3 zeigt die Gesamtschneckenanzahl in den entsprechenden Gruppen und Behältnissen am Tag der Infektion.

**Tabelle 3: Versuchsaufbau des Vergleichsversuchs der Infektion von *Galba truncatula* mit *Calicophoron daubneyi* und *Fasciola hepatica* Miracidien am Tag der Infektion**

Behältnis	Anzahl <i>G. truncatula</i>		
	<i>C. daubneyi</i> - Infektion	<i>F. hepatica</i> Infektion	Kontrollgruppe
Glaspetrischale ø 9 cm	6	6	6
Glaspetrischale ø 9 cm	6	6	6
Glaspetrischale ø 9 cm	6	6	6
Glaspetrischale ø 14 cm	10	10	10
Glaspetrischale ø 14 cm	10	10	10

Nur zwei Schnecken, die *F. hepatica* Miracidien ausgesetzt wurden, überlebten 30 Tage p. i. (Tab. 4). Die Größe der Behältnisse hatte bei einer Infektion mit *F. hepatica* kaum einen Einfluss auf die Überlebensrate der Schnecken an Tag 30 p. i. In den 9 cm großen Glaspetrischalen lebten noch 5,6 % und in den 14 cm großen Glaspetrischalen noch 5 % an Tag 30 p. i. Die neun überlebenden Schnecken, die mit *C. daubneyi* infiziert wurden, befanden sich hingegen alle in den größeren 14 cm Glaspetrischalen (Tab. 4). Hier lebten 45 % der Schnecken an Tag 30 p. i. in den 14 cm Glaspetrischalen und in den 9 cm großen Glaspetrischalen hingegen null. Am stärksten vertreten war an Tag 30 p. i. die Kontrollgruppe mit 16 lebenden Schnecken (Tab. 4). Hier erreichten 55,6 % der Schnecken in den 9 cm großen Glaspetrischalen Tag 30 p. i., im Gegensatz zu 30 % in den 14 cm großen

Glaspetrischalen.

**Tabelle 4: Verbleibende Schneckenanzahl an Tag 30 p. i. beim Vergleichsversuch der Infektion von *Galba truncatula* mit *Calicophoron daubneyi* und *Fasciola hepatica***

Behältnis	Anzahl <i>G. truncatula</i> (Überlebensrate)		
	<i>C. daubneyi</i> -Infektion	<i>F. hepatica</i> -Infektion	Kontrollgruppe
Glaspetrischale ø 9 cm	0	0	0
Glaspetrischale ø 9 cm	0	1 (16,7 %)	4 (66,7 %)
Glaspetrischale ø 9 cm	0	0	6 (100 %)
Glaspetrischale ø 14 cm	2 (20 %)	1 (10 %)	1 (10 %)
Glaspetrischale ø 14 cm	7 (70 %)	0	5 (50 %)
Totale Überlebensrate pro Gruppe	23,7 %	5,3 %	42,1 %

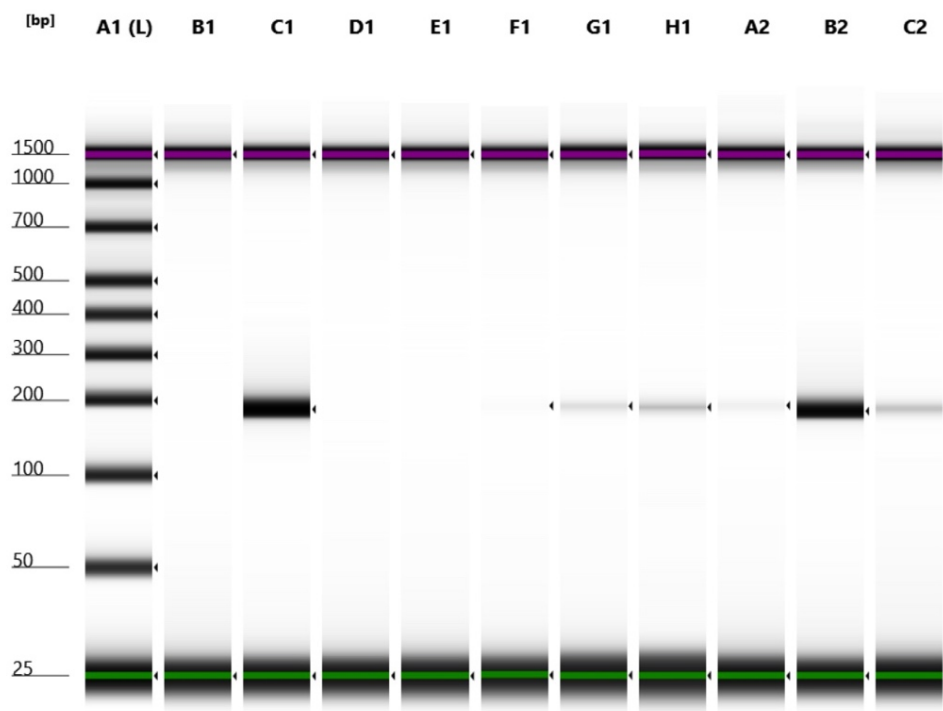
Ab Tag 30 p. i. wurden die Schnecken einzeln in je ein Well einer 6-Well-Platte, oder einzeln in ø 3,5 cm große Glaspetrischalen oder drei oder vier Schnecken zusammen in eine ø 9 cm große Glaspetrischale umgesetzt, wie die Tabelle 5 zeigt.

**Tabelle 5: Versuchsaufbau des Vergleichsversuchs der Infektion von *Galba truncatula* mit *Calicophoron daubneyi* und *Fasciola hepatica* Miracidien ab Tag 30 p. i.**

Behältnis	Anzahl <i>G. truncatula</i>		
	<i>C. daubneyi</i> -Infektion	<i>F. hepatica</i> Infektion	Kontrollgruppe
6-Well-Platte	0	0	2
Glaspetrischale ø 3,5 cm	5	2	5
Glaspetrischale ø 9 cm	4	0	9

An Tag 35 p. i. waren in zwei ø 3,5 cm großen Glaspetrischalen und in einer ø 9 cm großen Glaspetrischale bei drei Schnecken, die *C. daubneyi* Miracidien ausgesetzt waren, mikroskopisch Metacercarien sichtbar. Auch bei einer Schnecke, die *F. hepatica* ausgesetzt war, zeigten sich an Tag 39 p. i. Metacercarien in der ø 3,5 cm großen Glaspetrischale. Die erfolgreiche Metacercarienausschüttung beider Trematoden zeigt ein funktionierendes Versuchsprotokoll.

Sechs verstorbene Schnecken dieses Vergleichsversuchs wurden mittels PCR-Analyse auf *C. daubneyi*-DNA, wie in Abschnitt III.4.3. beschrieben, untersucht. In allen sechs Proben konnte DNA von *C. daubneyi* mittels PCR amplifiziert werden. Entsprechend konnten positive Signale in den Banden F1, G1, H1, A2, B2, C2 (Abb. 28) detektiert werden. Die Bande C1 ist die Positivkontrolle und zeigt das positive Signal eines adulten Pansenegels.



**Abbildung 28: Virtuelles Gel der PCR von verendeten, experimentell infizierten Zwergschlammschnecken mit positivem Signal für *Calicophoron daubneyi*-DNA in Banden C1, F1, G1, H1, A2, B2 und C2 basierend auf dem Protokoll von KÜCHLER (2021)**

### 2.1.3. Hauptversuche: Infektionen mit *Calicophoron daubneyi*

Nachfolgend fanden elf weitere Infektionsversuche (Tab. 6) statt, um ein standardisiertes Protokoll zur Metacercarienproduktion zu etablieren. Es variierte die Anzahl der Miracidien, die jeweils einer Schnecke ausgesetzt waren; die Behältnisse, in denen die Schnecken bis Tag 30 p. i. und ab Tag 30 p. i. aufgezogen wurden; sowie die Wasserart, die während der Miracidienexposition verwendet wurde.

**Tabelle 6: Versuchsbedingungen der unterschiedlichen elf experimentellen Infektionen von *Galba truncatula* mit *Calicophoron daubneyi* (Versuche mit erfolgreicher Metacercarienproduktion sind fett gedruckt)**

Versuchszeitpunkt in Monat/Jahr	Anzahl Schnecken	Anzahl Miracidien pro Schnecke	Wasserart zur Infektion	Umgebungstemperatur	Behältnis ab Tag 0 p. i.	Behältnis ab Tag 30 p. i.	Schneckenanzahl an Tag 30 p. i. (Überlebensrate)
08/22	20	2	Gefiltertes Wasser	20–25 °C	je 10 Schnecken in ø 14 cm Glaspetrishalen	Einzeln in ø 3,5 cm Glaspetrishalen	2 (10 %)
09/22	20	2	Gefiltertes Wasser	20–25 °C	je 10 Schnecken in ø 14 cm Glaspetrishalen	Einzeln in ø 3,5 cm Glaspetrishalen	4 (20 %)
11/22	16	2	Gefiltertes Wasser	20–25 °C	Je 8 Schnecken in ø 14 cm Glaspetrishalen	Einzeln in ø 3,5 cm Glaspetrishalen	5 (31,3 %)
<b>11/22</b>	<b>15</b>	<b>2</b>	<b>Gefiltertes Wasser</b>	<b>20–25 °C</b>	<b>15 Schnecken in ø 14 cm Glaspetrishalen</b>	<b>Einzeln in ø 3,5 cm Glaspetrishalen</b>	<b>14 (93,3 %)</b>
<b>01/23</b>	<b>12</b>	<b>2</b>	<b>Gefiltertes Wasser</b>	<b>20–25 °C</b>	<b>12 Schnecken in ø 14 cm Glaspetrishalen im Fließsystem</b>	<b>Einzeln in ø 3,5 cm Glaspetrishalen</b>	<b>8 (66,7 %)</b>
<b>02/23</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>Destilliertes Wasser</b>	<b>20–25 °C</b>	<b>8 Schnecken in ø 14 cm Glaspetrishalen im Fließsystem</b>	<b>Einzeln in ø 3,5 cm Glaspetrishalen</b>	<b>3 (37,5 %)</b>
02/23	4	4	Destilliertes Wasser	20–25 °C	4 Schnecken in ø 14 cm Glaspetrishalen im Fließsystem	Einzeln in ø 3,5 cm Glaspetrishalen	3 (75 %)

Fortsetzung Tabelle 6							
Versuchszeitpunkt in Monat/Jahr	Anzahl Schnecken	Anzahl Miracidien pro Schnecke	Wasserart zur Infektion	Umgebungstemperatur	Behältnis ab Tag 0 p. i.	Behältnis ab Tag 30 p. i.	Schneckenanzahl an Tag 30 p. i. (Überlebensrate)
03/23	4	2, bei je 2 Schnecken Miracidien direkt auf Schnecke aufgetragen	Destilliertes Wasser	20–25 °C	4 Schnecken in ø 14 cm Glaspetrishalen im Fließsystem	Einzel in ø 3,5 cm Glaspetrishalen	2 (50 %)
04/23	16	2	Destilliertes Wasser	20–25 °C	Je 10 oder 6 Schnecken in ø 14 cm Glaspetrishalen im Fließsystem	Einzel in ø 3,5 cm Glaspetrishalen	6 (37,5 %)
<b>05/23</b>	<b>12</b>	<b>2</b>	<b>Destilliertes Wasser</b>	<b>20–25 °C</b>	<b>Je 12 Schnecken in ø 14 cm Glaspetrishalen im Fließsystem</b>	<b>Einzel in ø 3,5 cm Glaspetrishalen</b>	<b>4 (33,3 %)</b>
06/23	12	2	Destilliertes Wasser	20–25 °C	Je 10 oder 6 Schnecken in ø 14 cm Glaspetrishalen im Fließsystem	3 einzeln in ø 3,5 cm Glaspetrishalen, je 2 und je 3 in ø 9 cm Glaspetrishalen	8 (66,7 %)

Es wurden insgesamt 139 Zwergschlammschnecken in den elf Hauptinfektionsversuchen *C. daubneyi* Miracidien ausgesetzt. Es lebten an Tag 30 p. i. noch 59 Schnecken, dies entspricht einer totalen Überlebensrate von 42,4 %.

Aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche (Tab. 4) wurden ab dem Tag der Infektion nur noch Glaspetrischalen mit einem Durchmesser von 14 cm für Infektionen mit *C. daubneyi* eingesetzt, da der Vorversuch zeigte, dass 45 % der Schnecken in diesen Schalen Tag 30 p. i. erreichten. Bei 68 experimentell infizierten Schnecken wurden die  $\varnothing$  14 cm Glaspetrischalen um ein Fließsystem, wie im Abschnitt III.1.1. beschrieben, erweitert (Tab. 6). Durch die Verwendung des Fließsystems stieg die Schneckenanzahl der überlebenden Schnecken an Tag 30 p. i. um 14,8 % an, im Vergleich zu bis Tag 30 p. i. in Glaspetrischalen gehaltenen Schnecken (Tab. 6). Die Überlebensrate der Schnecken an Tag 30 p. i. bei der Verwendung der  $\varnothing$  14 cm Glaspetrischalen bis Tag 30 p. i. lag bei 35,2 %.

Ab Tag 30 p. i. wurden die  $\varnothing$  3,5 cm Glaspetrischalen bevorzugt, da sich diese ideal für eine mikroskopische Untersuchung eigneten. Ebenso ermöglichten sie durch die Einzelhaltung der Schnecken eine sichere Identifizierung jener Schnecke (Tab. 14 im Anhang), die Metacercarien produziert hat.

Die Erhöhung der Anzahl der Miracidien von zwei auf vier Miracidien pro Schnecke zeigte keine Metacercarienausschüttung. Die Überlebensrate an Tag 30 p. i. lag bei 75 % (Tab. 6). Dies liegt über der totalen Überlebensrate von 42,4 %.

Einerseits kam es zu drei erfolgreichen Metacercarienproduktionen bei der Verwendung von gefiltertem Wasser während der Miracidienexposition, andererseits zeigten sich bei der Verwendung von destilliertem Wasser innerhalb der Exposition nur zwei Ausschüttungen.

## **2.2. Infektionsstatus des Zwischenwirtes mittels PCR**

Die Überprüfung einer Infektion des Zwischenwirtes anhand der PCR fand nur stichprobenartig ( $n = 80$ ) bei den Infektionsversuchen ab Juni 2022 bis Mai 2023 statt (Tab. 7). Die Schnecken, die zuvor verstorben sind, wurden als Quetschpräparat auf vorhandene Larvenstadien untersucht.

Es wurden insgesamt 80 von 243 Schnecken (32,9 %) mittels einer PCR-Analyse, wie in Abschnitt III.4.3 beschrieben, auf das Vorkommen von *C. daubneyi*-DNA untersucht (Stand Mai 2023). Alle Schnecken sind vor der PCR-Analyse bereits

verstorben. Es wurde nicht differenziert an welchem Tag des Infektionsversuchs die Schnecken verendet sind. 41 von den getesteten Schnecken zeigten ein positives Signal für *C. daubneyi*-DNA. Dies entspricht einer Infektionsrate von 51,3 %. Das bedeutet, dass jede zweite Schnecke erfolgreich mit der Trematode *C. daubneyi* infiziert wurde. Eine Schnecke, die zwei Wochen nach der Ausschüttung von 156 Metacercarien verendete, zeigte in der PCR kein positives Signal. Am Tag des Verendens hatte sie bereits seit zwei Wochen keine Metacercarien mehr ausgeschüttet. Zwei von drei untersuchten Zwergschlammschnecken, die mit je vier Miracidien infiziert worden waren, wiesen in der PCR ein positives Signal auf.

**Tabelle 7: Mittels PCR ermittelten Nachweis von *Calicophoron daubneyi* Infektion in *Galba truncatula***

Datum der Infektion	Anzahl der untersuchten Schnecken	Anzahl der positiven Schnecken
Juni 2022	10	9
September 2022	8	2
November 2022	6	2
November 2022	15	9
Januar 2023	13	7
Februar 2023	8	5
März 2023	2	0
April 2023	12	3
Mai 2023	6	4
Total	80	41

### 2.3. Speziesbestimmung

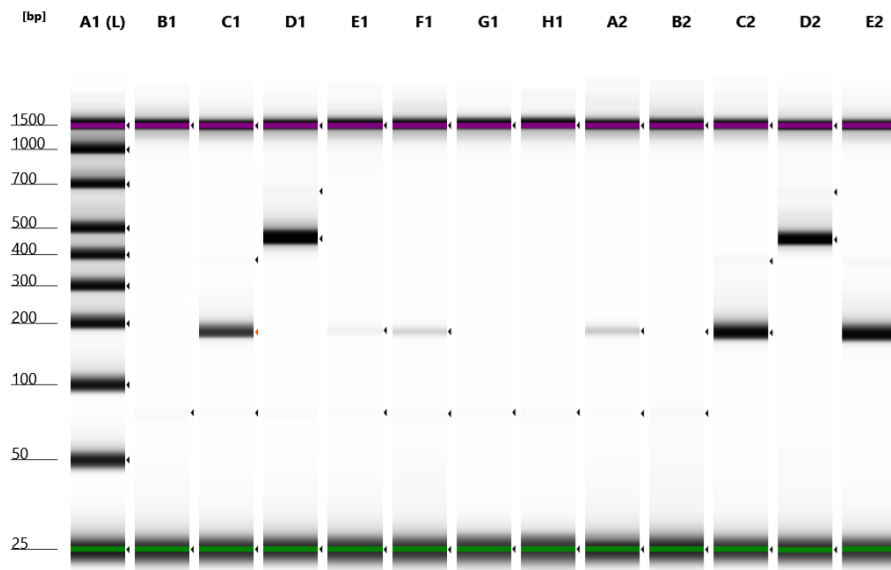
Das virtuelle Gel der PCR in Abbildung 29 zeigt die sichere Identifizierung der Spezies *C. daubneyi* und *F. hepatica* in adulten Egel und Eiern.

Auf der Bande C1 ist die Positivkontrolle, ein adulter Pansenegel<sup>8</sup>, für *C. daubneyi* und auf der Bande D1 die Positivkontrolle, ein adulter Leberegel<sup>9</sup>, für *F. hepatica* sichtbar. Die Bande C2 zeigt *C. daubneyi*-DNA eines adulten Pansenegels und die Bande D2 zeigt *F. hepatica*-DNA eines adulten Leberegels, welche im September

<sup>8</sup> Der verwendete Pansenegel wurde im Rahmen der Dissertation von KÜCHLER (2021) zur Art *C. daubneyi* zugeordnet.

<sup>9</sup> Der verwendete Leberegel wurde im Rahmen der Dissertation von KÜCHLER (2021) als *F. hepatica* bestimmt.

2023 bei einer Schlachtung einer Kuh gesammelt wurde. Die Bande E2 bestätigt *C. daubneyi*-DNA in den verwendeten Pansenegelen zur experimentellen Infektion der Zwergschlammschnecken. Die Banden E1, F1, A2 und B2 zeigen ein positives Signal bei experimentell mit *C. daubneyi* infizierten Schnecken im März 2023. In den Banden G1 und H1 wird kein Signal für *C. daubneyi* angezeigt. Diese untersuchten, experimentell infizierten Schnecken waren somit nicht positiv für *C. daubneyi* und die Infektion war nicht erfolgreich.



**Abbildung 29: Virtuelles Gel der multiplex PCR zur Identifizierung von *Calicophoron daubneyi* und *Fasciola hepatica*-DNA basierend auf dem Protokoll von KÜCHLER (2021)**

#### 2.4. Metacercarienausschüttungen

Die Tabellen 8 bis 12 zeigen einen Überblick über die entsprechenden Metacercarienausschüttungen der einzelnen Schnecken im jeweiligen Monat.

Die erste mikroskopisch nachgewiesene *C. daubneyi* Metacercarienausschüttung von drei experimentell infizierten Zwergschlammschnecken fand im August 2022 statt (Tab. 8). Die drei Schnecken P, O und R (Tab. 14 im Anhang) schütteten alle ab Tag 35 p. i. aus. Schnecke P produzierte acht Tage lang Metacercarien, wobei am dritten Tag ein Anstieg der Metacercarienzahl von sechs Metacercarien auf 49 Metacercarien beobachtet wurde. Die Anzahl sank im Laufe der acht Tage wieder. Schnecke O und R schütteten dagegen nur drei Tage lang Metacercarien aus. Hier zeigte sich zu Beginn eine höhere Anzahl der Metacercarien als am letzten

Tag der Ausschüttung. Insgesamt produzierten die drei Schnecken zusammen 159 Metacercarien. Die Schnecken verendeten alle innerhalb einer Woche nach dem letzten Tag der Ausschüttung.

**Tabelle 8: *Calicophoron daubneyi* Metacercarienausschüttung dreier experimentell infizierter Schnecken (P, O und R) im August 2022**

Tag der Ausschüttung p. i.	Metacercarienzahl		
	Schnecke P	Schnecke O	Schnecke R
35	6	32	42
37	49	6	3
39	13	0	0
42	8	0	0
Total	76	38	45

Eine weitere Ausschüttung fand im Dezember 2022 statt (Tab. 9). Die Schnecke 4f (Tab. 14 im Anhang) produzierte in unregelmäßigen Abständen 156 Metacercarien über einen Zeitraum von zehn Tagen. Auch hier begann die Ausschüttung an Tag 35 p. i.

**Tabelle 9: *Calicophoron daubneyi* Metacercarienausschüttung einer experimentell infizierten Schnecke (4f) im Dezember 2022**

Tag der Ausschüttung p. i.	Metacercarienzahl
35	41
37	60
42	14
44	41
Total	156

Im März 2023 folgte eine erneute Metacercarienausschüttung einer Schnecke (Tab. 10). Die Metacercarien waren nun erst an Tag 69 p. i. mikroskopisch sichtbar. Die Schnecke 2 schüttete in Summe 76 Metacercarien innerhalb von sieben Tagen aus. Die Anzahl der Metacercarien war mit 50 Metacercarien am ersten Tag der Ausschüttung deutlich höher als bei den darauffolgenden Ausschüttungen.

**Tabelle 10: *Calicophoron daubneyi* Metacercarienausschüttung einer experimentell infizierten Schnecke (2) im März 2023**

Tag der Ausschüttung p. i.	Metacercarienzahl
69	50
70	7
71	12
75	7
Total	76

Der längste bei einer Schnecke gemessene Zeitraum einer Metacercarienausschüttung betrug 16 Tage im April 2023 (Tab. 11). Die Schnecke 1 (Tab. 14 im Anhang) begann ab Tag 52 p. i. Metacercarien auszuschütten. Insgesamt konnten hier 186 *C. daubneyi* Metacercarien gewonnen werden. Auch hier war die Anzahl der Metacercarien bei der ersten Ausschüttung der Schnecke am höchsten.

**Tabelle 11: *Calicophoron daubneyi* Metacercarienausschüttung einer experimentell infizierten Schnecke (1) im April 2023**

Tag der Ausschüttung p. i.	Metacercarienzahl
52	72
53	35
54	31
56	18
59	10
61	4
68	16
Total	186

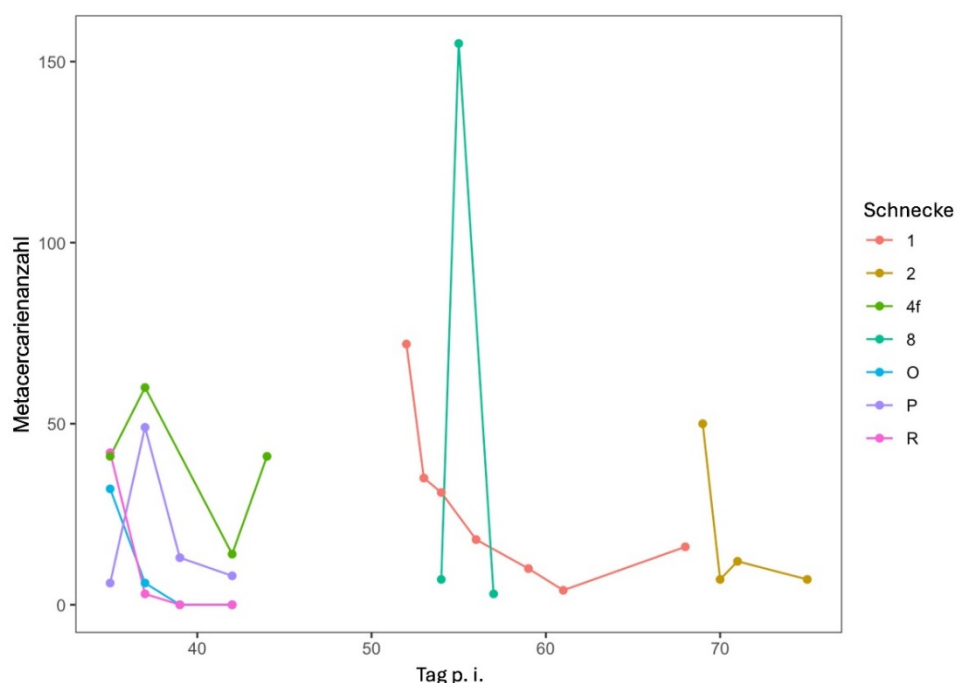
Die letzte dokumentierte Produktion von *C. daubneyi* Metacercarien fand von der experimentell infizierten Schnecke 8 (Tab. 14 im Anhang) im Juni 2023 statt (Tab. 12). Bei dieser Ausschüttung wurden ebenfalls 17 *C. daubneyi* Cercarien gesichtet und dokumentiert. Die Schnecke produzierte die größte Metacercarienzahl an einem Tag mit 155 Metacercarien. Sie produzierte insgesamt innerhalb der vier Tage 165 Metacercarien.

**Tabelle 12: *Calicophoron daubneyi* Cercarien- und Metacercarienausschüttung einer experimentell infizierten Schnecke (8) im Juni 2023**

Tag der Ausschüttung p. i.	Metacercarienzahl	Cercarienzahl
54	7	17
55	155	0
57	3	0
Total	165	17

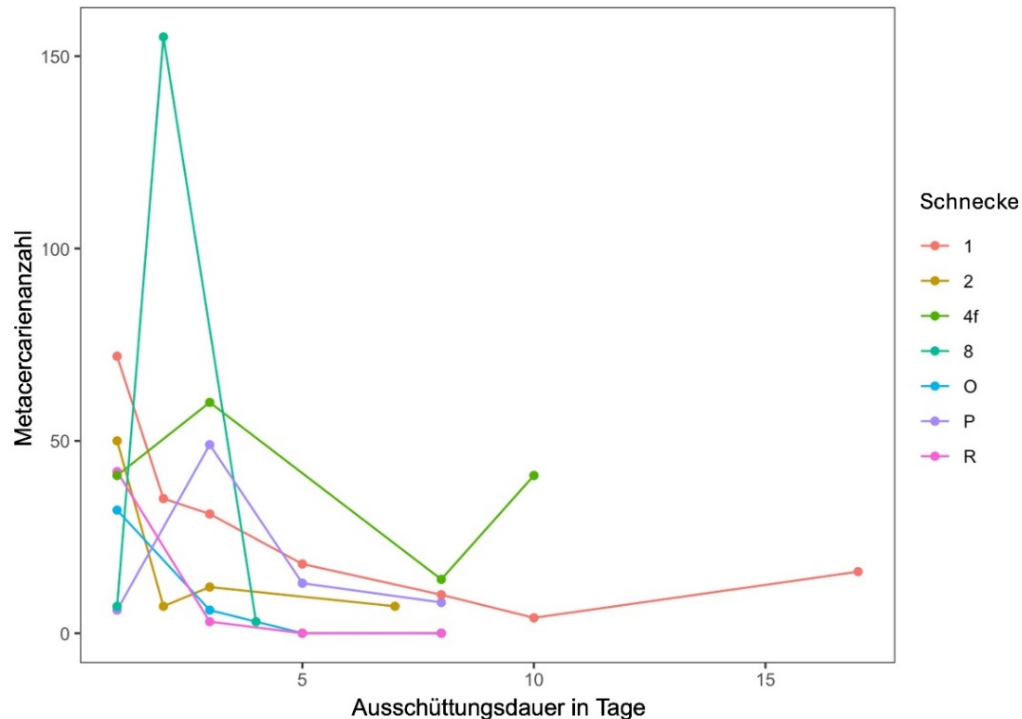
Zusammenfassend zeigten sieben der 177 experimentell mit *C. daubneyi* infizierten Schnecken (Schnecken aus dem Vorversuch sind nicht mit einberechnet) eine nachweisliche Produktion von *C. daubneyi* Metacercarien unter Laborbedingungen (Abb. 30). Ein Temperaturschock auf 12 °C, in Abschnitt III.5.1. beschrieben, zeigte keine Stimulation für einen Cercarienaustritt, denn keine der elf Schnecken, die der Temperaturveränderung ausgesetzt wurde, schüttete Cercarien aus.

Die Anzahl der produzierten Metacercarien, sowie die Ausschüttungsdauer der experimentell infizierten Schnecke variierte in den sieben Infektionsversuchen.



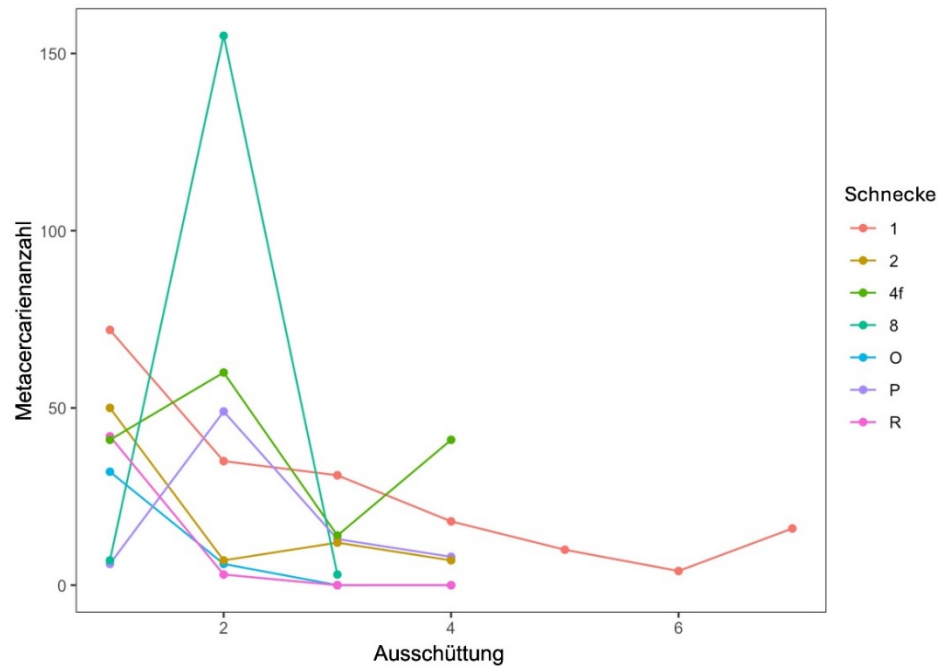
**Abbildung 30: Überblick der ausgeschütteten Anzahl *Calicophoron daubneyi* Metacercarien pro Schnecke und Tag p. i. nach experimenteller Infektion von *Galba truncatula* (erstellt von Yury Zablotzki)**

Die Ausschüttungsdauer der sieben experimentell mit *C. daubneyi* infizierten Schnecken lag zwischen drei und 17 Tagen (Abb. 31). Alle Metacercarien in den fünf beschriebenen Infektionsversuchen wurden über einen Verlauf von mehreren Tagen in unregelmäßiger Anzahl ausgeschüttet.



**Abbildung 31: Überblick der Dauer der Ausschüttung von *Calicophoron daubneyi* Metacercarien pro Schnecke nach experimenteller Infektion von *Galba truncatula* (erstellt von Yury Zablotski)**

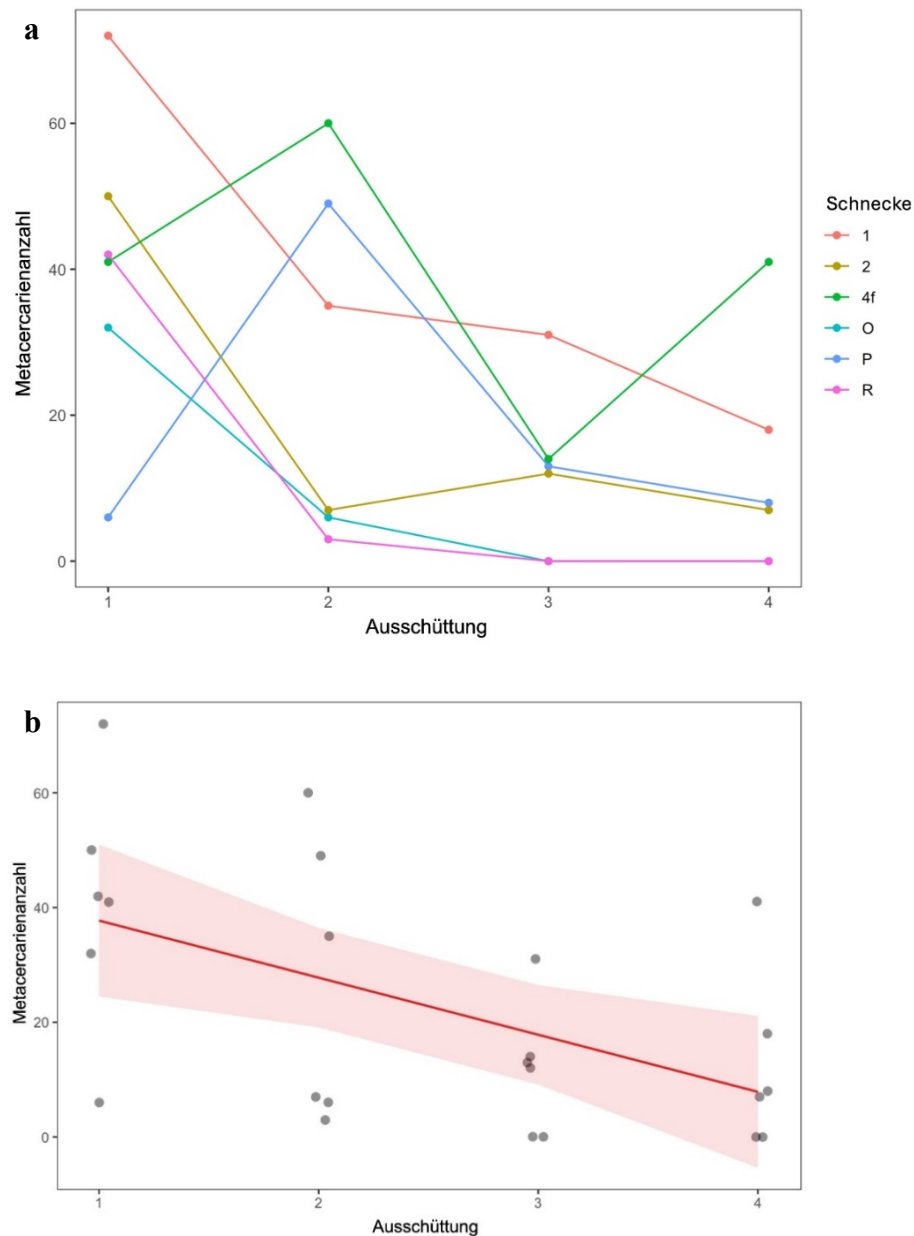
Im Zeitraum von August 2022 bis Juni 2023 konnten insgesamt 742 Metacercarien gewonnen werden. Die Zwergschlammschnecken produzierten je zwischen 38 und 186 Metacercarien (Abb. 30, 31). Durchschnittlich wurden 106 Metacercarien pro Schnecke dokumentiert. Die Abbildung 32 zeigt die Anzahl der Ausschüttungen pro Schnecke mit der jeweiligen Metacercarienzahl.



**Abbildung 32: Verlaufskurve der Anzahl *Calicophoron daubneyi* Metacercarien pro Schnecke nach experimenteller Infektion von *Galba truncatula* (erstellt von Yury Zablotski)**

Wenn man nur die ersten vier Ausschüttungen betrachtet (Abb. 33a und b), erkennt man einen signifikanten Abfall der Metacercarienzahl um durchschnittlich zehn Metacercarien pro Ausschüttung pro Schnecke ( $p = 0,008$ ) (Abb. 33b). Die Schnecke 8 wurde in diese Grafik nicht einbezogen, da sie mit 150 Metacercarien an einem Tag von der Menge zu stark abweicht.

Zusammenfassend produzierten sechs der experimentell infizierten Schnecken durchschnittlich eine verringerte Metacercarienzahl je Ausschüttung innerhalb der ersten vier Ausschüttungen (Abb. 33).



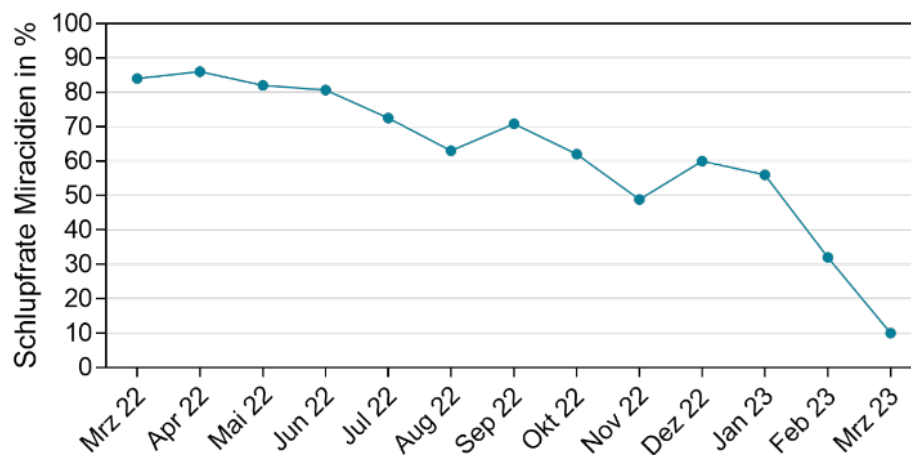
**Abbildung 33: Verlauf der Anzahl *Calicophoron daubneyi* Metacercarien der ersten vier Aussüttungen pro Schnecke nach experimenteller Infektion von *Galba truncatula* a) Überblick, b) lineares Regressionsmodell zur Darstellung des signifikanten Abfalls ( $p = 0,008$ ) der Metacercarienzahl (erstellt von Yury Zablotzki)**

### 3. Untersuchung der Larvenstadien von *Calicophoron daubneyi* und *Fasciola hepatica*

Mit der erfolgreichen experimentellen Infektion der Zwergschlammschnecken mit Miracidien konnten die Larvenstadien Miracidien, Cercarien und Metacercarien, sowie die Entwicklung der Eier und der Miracidien untersucht werden.

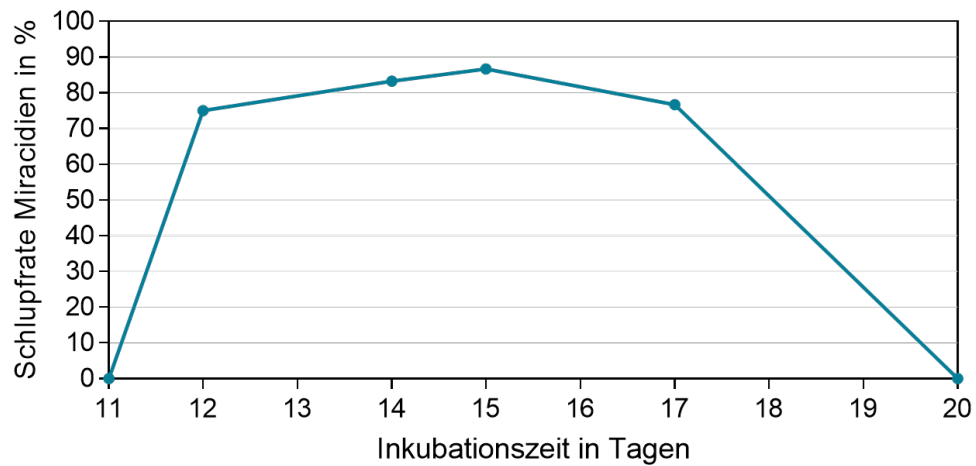
### 3.1. *Calicophoron daubneyi* Eier und Miracidien

Zur Infektion des Zwischenwirtes mit *C. daubneyi* und zur Untersuchung der Larvenstadien im Zwischenwirt wurden aus Kotsedimenten gewonnene Pansenegleier, welche bis zu einem Jahr bei 4 °C stehend im Kühlschrank gelagert wurden, wie in Abschnitt III.2.1. beschrieben, für die Entwicklung der Miracidien verwendet. Aus den ein Jahr gelagerten Pansenegleiern schlüpften nur noch 10 % der Miracidien (Abb. 34) und subjektiv nahm die Geschwindigkeit der geschlüpften Miracidien ab. Die Geschwindigkeit wurde in dieser Studie nicht gemessen. In dem Monat davor konnten Schlupfeinbußen von 68 % beobachtet werden. Die durchschnittliche Schlupfrate lag in den ersten vier Monaten bei 83,2 % (Abb. 34).



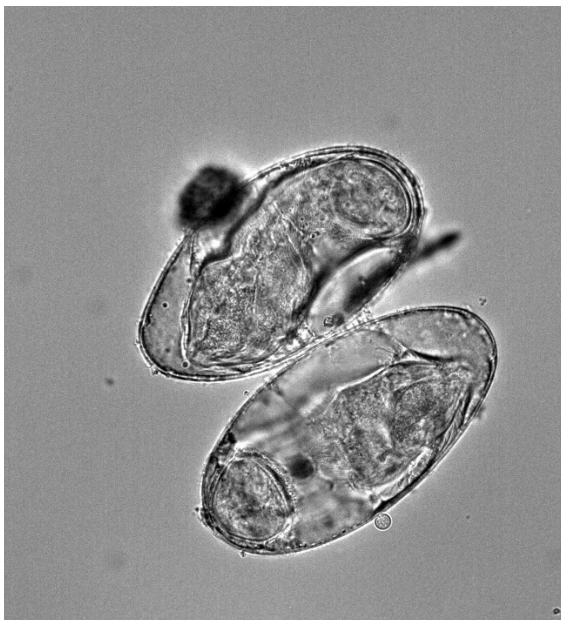
**Abbildung 34: Schlupfrate von Miracidien aus *Calicophoron daubneyi* Eiern (gewonnen aus Kot eines Rindes), welche über den Zeitraum eines Jahres genutzt wurden**

Der Schlupfvorgang ist in Abbildung 39 und dem Video 1 und 2 dargestellt und dauert zwischen 18 und 30 Sekunden. Es wurde eine höhere Schlupfrate bei einer Inkubation zwischen zwölf und 15 Tagen beobachtet, bei einer längeren Inkubation von 18 Tagen sank die Schlupfrate auf 16,7 % und ab einer Inkubation von 20 Tagen konnte kein Schlupf mehr detektiert werden (Abb. 35).



**Abbildung 35: Schlupfrate der *Calicophoron daubneyi* Miracidien bei entsprechender Inkubationszeit bei 27 °C in Dunkelheit zwischen elf und 20 Tagen nach Lichtreiz**

Zwanzig der Miracidien wurden ausgemessen. Diese waren zwischen 127  $\mu\text{m}$  und 134  $\mu\text{m}$  (durchschnittlich 131,2  $\mu\text{m}$ ) groß. Die Miracidien erschienen in einer grau-beigen Farbe (Abb. 36–38). An der kompletten Oberfläche befand sich ein Flimmerepithel (Abb. 37, Pfeil).



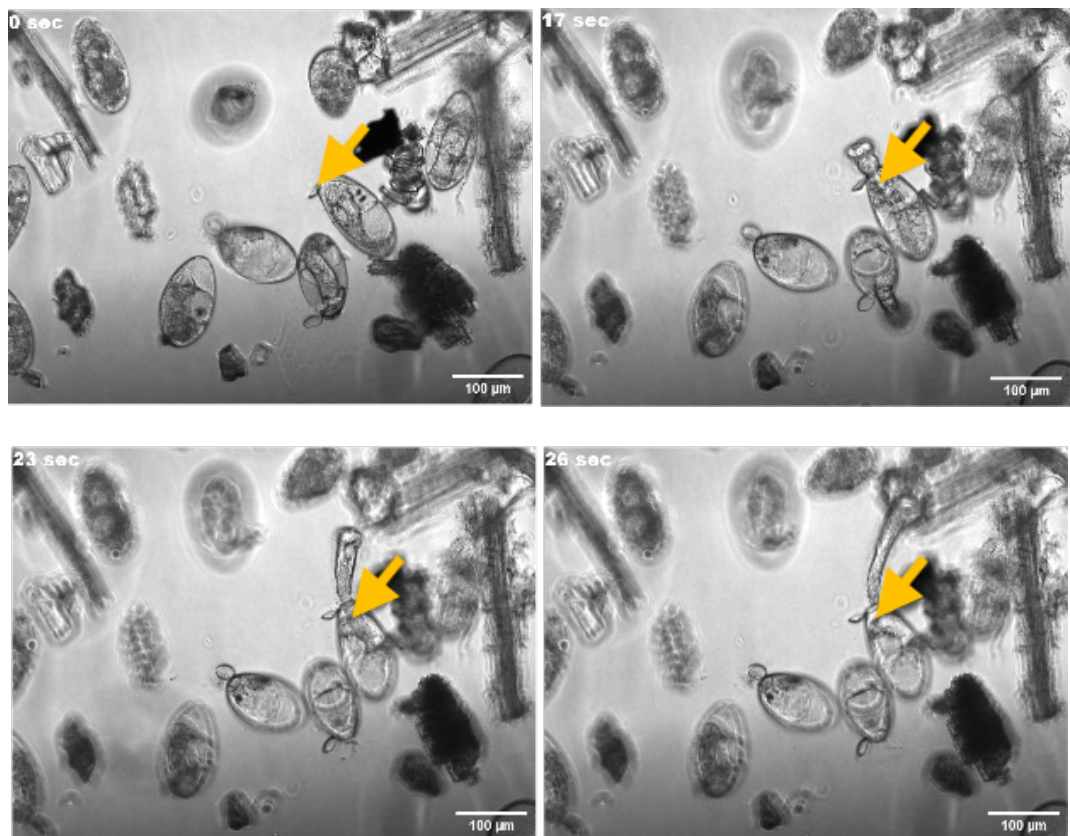
**Abbildung 36: Zwei entwickelte *Calicophoron daubneyi* Miracidien im Ei kurz vor dem Schlupf**



**Abbildung 37:** Frisch geschlüpftes *Calicophoron daubneyi* Miracidium mit Flimmerepithel (Pfeil)



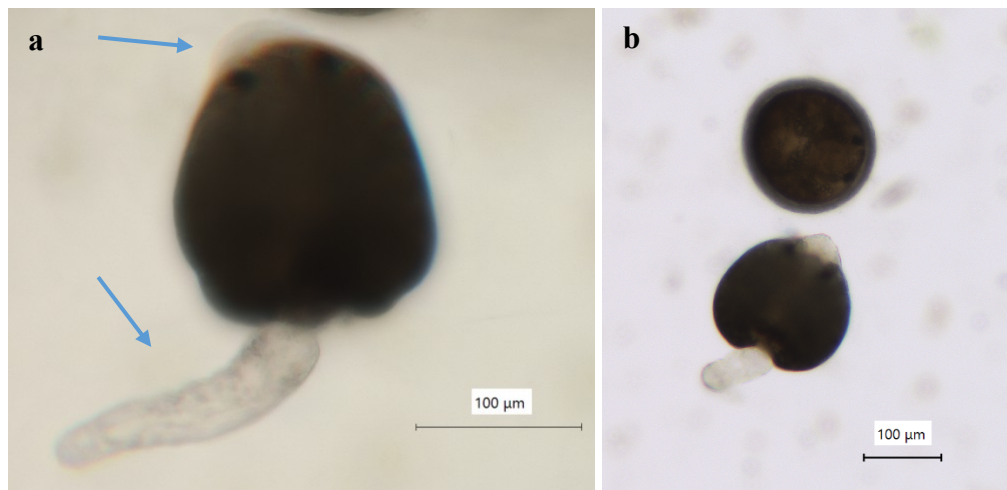
**Abbildung 38:** Frisch geschlüpftes *Calicophoron daubneyi* Miracidium direkt unter einem embryonierten Ei nach 14 Tagen Inkubation



**Abbildung 39: Schlupf eines *Calicophoron daubneyi* Miracidiums (gelber Pfeil) innerhalb von 26 Sekunden (auch in Video 1 zu sehen)**

### 3.2. *Calicophoron daubneyi* Cercarie

Die Cercarien (Abb. 40a, b und Video 3) sind im Gegensatz zu den Metacercarien beweglich und schwimmen umher. Sie können ihren Körper in die Länge ziehen und ihren Durchmesser dadurch halbieren (Video 3). Besonders auffällig ist der graue spitzförmige vordere Teil der Cercarie und der Schwanz, der dieselbe Farbe aufweist (Abb. 40a, Pfeile). Ihre Beweglichkeit endet mit dem Abwurf des Schwanzes. Dies geschieht direkt nach der Anhaftung des Cercarienkörpers an einem Untergrund. Ihr Körper ist dunkelbraun und weist am Schwanzansatz eine Einbuchtung auf. Bei der Messung von 15 Cercarien lag die durchschnittliche Größe, von der Spitze bis zum Schwanzende, zwischen 329 µm und 340 µm, im Durchschnitt 334 µm. Die mikroskopischen Beobachtungen zeigten, dass die Cercarien innerhalb von zwei bis drei Stunden zur Metacercarie enzystieren. Genaue Zeitmessungen wurden nicht durchgeführt.

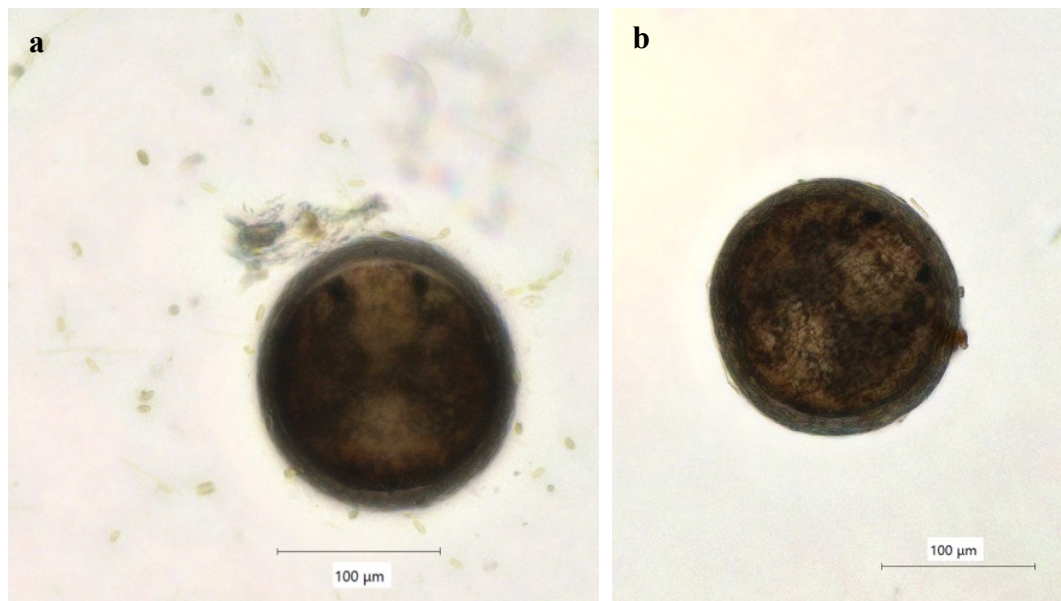


**Abbildung 40: *Calicophoron daubneyi* Cercarie nach Ausschüttung aus *Galba truncatula*, a) Cercarie mit gleichfarbiger grauer Spitze und Schwanz (blaue Pfeile), b) Metacercarie (oben), Cercarie (unten)**

### 3.3. *Calicophoron daubneyi* Metacercarie

Die Abbildungen 41a und b zeigen jeweils eine Metacercarie der Trematode *C. daubneyi*. Sie sind rund und dunkelbraun, mit flächenhaften Aufhellungen im Inneren am vorderen und hinteren Abschnitt. Mit dem bloßen Auge sind sie als kleiner, schwarzer Punkt sichtbar. Bei der Messung von 20 Metacercarien ergab sich eine Größe zwischen 161 µm und 170 µm, durchschnittlich 166,4 µm. Die Kapsel, die jede Metacercarie außen umgibt, ist 13 µm dick. Im Inneren des vorderen Teils sind zwei schwarze Flecken sichtbar, die als Augen identifiziert werden konnten. Die Metacercarien sind unbeweglich und haften am Boden oder Rand der Petrischale bzw. am Quellmoos (Abb. 15) an. Meistens sind mehrere Metacercarien in direkter Nähe zueinander auffindbar. Nur selten wurden einzelne Metacercarien in einer Petrischale an einer Stelle gefunden. Durch Berührung mit der Pipettenspitze können sie losgelöst, eingesammelt und gelagert werden.

Die in gefiltertem Wasser gelagerten Metacercarien wurden einer Vitalitätsprüfung, wie in Abschnitt III.5.3 beschrieben, unterzogen. Bei bis zu 13 Wochen lang in gefiltertem Wasser gelagerten Metacercarien wurden noch mikroskopisch sichtbare Bewegungen beobachtet. Bei Metacercarien ohne Wasser hingegen konnte eine stark verkürzte Lebenszeit beobachtet werden. Innerhalb von zwei Minuten ohne Wasser war keine Vitalität mehr sichtbar und auch die Farbe der Metacercarien veränderte sich und wurde dunkler.



**Abbildung 41: a, b) *Calicophoron daubneyi* Metacercarie**

Die Infektiosität der gewonnenen Metacercarien wurde durch einen experimentellen Infektionsversuch des Endwirtes getestet. Es wurden drei Schafe mit je 150 Metacercarien mit unterschiedlicher Lagerungsdauer oral infiziert. Zwei der drei Tiere schieden ab Tag 86 p. i. Pansenegleier aus. Sie zeigten während des Versuches keine klinischen Symptome (C. WENZEL, unveröffentlichte Daten, 2024).

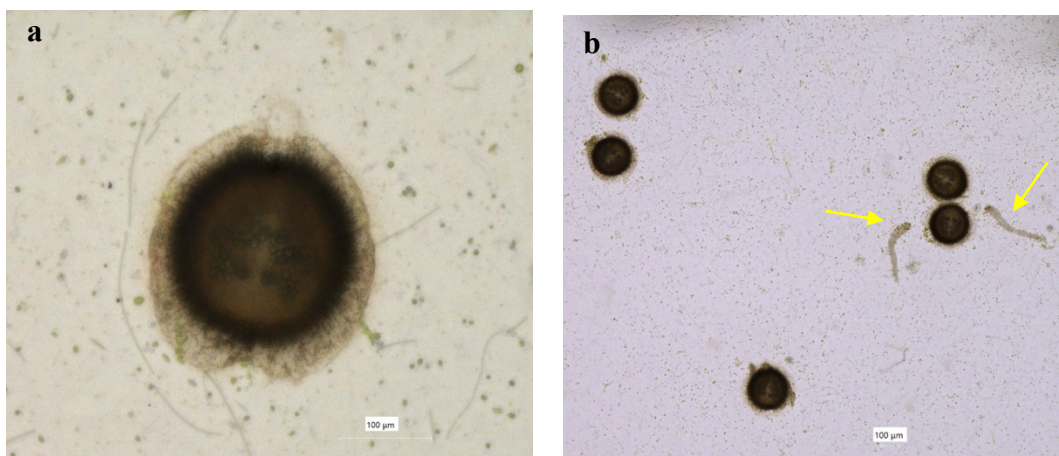
### **3.4. Deskriptiver Vergleich der Cercarien und Metacercarien beider Trematoden *Fasciola hepatica* und *Calicophoron daubneyi***

Die *F. hepatica* Cercarie (Abb. 42) ist mit einer Gesamtgröße von 590–600 µm bei 15 vermessenen Cercarien mit einer durchschnittlichen Größe von 595,2 µm fast doppelt so groß wie die Cercarie von *C. daubneyi*. Sie ist heller als die *C. daubneyi* Cercarie (Abb. 40a und b). Die Kapsel ist nicht klar abgrenzbar.

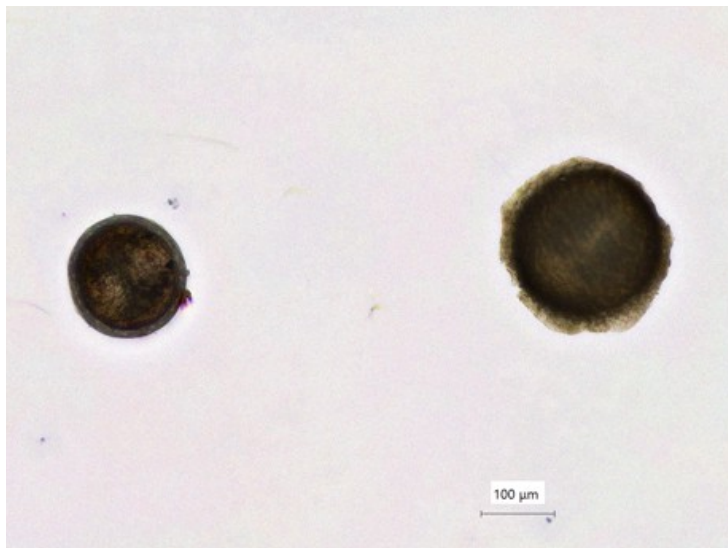


**Abbildung 42: *Fasciola hepatica* Cercarie kurz vor dem Schwanzabwurf**

Auch die *F. hepatica* Metacercarien (Abb. 43a und b) sind größer als die von *C. daubneyi* (Abb. 41a und b). Dies verdeutlicht Abbildung 44 im direkten Vergleich. Zwanzig *F. hepatica* Metacercarien wiesen eine Größe zwischen 200–210 µm auf, mit einer durchschnittliche Größe von 206,3 µm.



**Abbildung 43: *Fasciola hepatica* Metacercarien a) einzelne Metacercarie, b) Metacercarien mit abgeworfenen Schwänzen (gelbe Pfeile)**



**Abbildung 44: Vergleich beider Trematodenmetacercarien: *Calicophoron daubneyi* Metacercarie (links) und *F. hepatica* Metacercarie (rechts)**

Die Abbildung 45 zeigt jeweils eine Metacercarie beider Trematoden nach einer Quetschung mit einem Objektträger. Die *C. daubneyi* Metacercarie ist fragiler und zerbricht schon bei leichtem Druck, welchem die *F. hepatica* Metacercarie standhält.



**Abbildung 45: Quetschung beider Trematodenmetacercarien, *Calicophoron daubneyi* Metacercarie (links) und *Fasciola hepatica* Metacercarie (rechts); die Metacercarie von *Fasciola hepatica* hält dem leichten Druck stand, während diejenige von *Calicophoron daubneyi* zerbricht**

#### 4. Vorversuche zur Fluoreszenzfärbung

Um mehr über den Aufbau des *C. daubneyi* Miracidiums und der Parasit-Zwischenwirt-Dynamik zu erfahren, insbesondere im Vergleich mit dem *F. hepatica* Miracidium, erfolgten Vorversuche zur Fluoreszenzfärbung. Ebenso wurde die Autofluoreszenz der Metacercarien analysiert.

##### 4.1. Untersuchung der Oberflächenkohlenhydrate von Miracidien mittels Lectin-FITC-Färbung

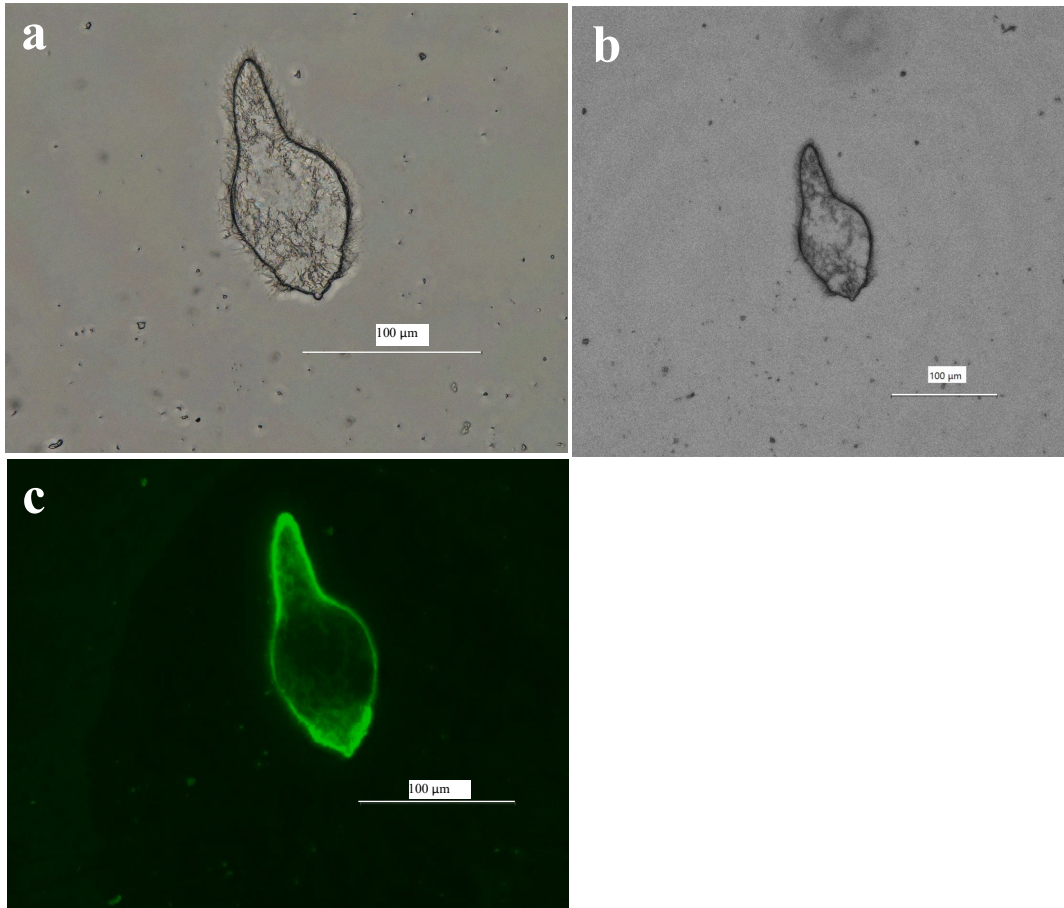
Im Folgenden wurden die Oberflächenkohlenhydrate des *C. daubneyi* Miracidiums untersucht. Fixierte *C. daubneyi* Miracidien wurden mit dem Lectin-FITC Farbstoff WGA aus *Triticum vulgaris* angefärbt (Abb. 46-48). In den Abbildungen 46c, 47c und 48a und b sind exemplarische Miracidien dargestellt. Ihre Oberflächen erscheinen grün fluoreszierend durch den Lectin-FITC Farbstoff. Es ist eine Verdichtung der Fluoreszenz am Kopf des Miracidiums und vereinzelt am hinteren



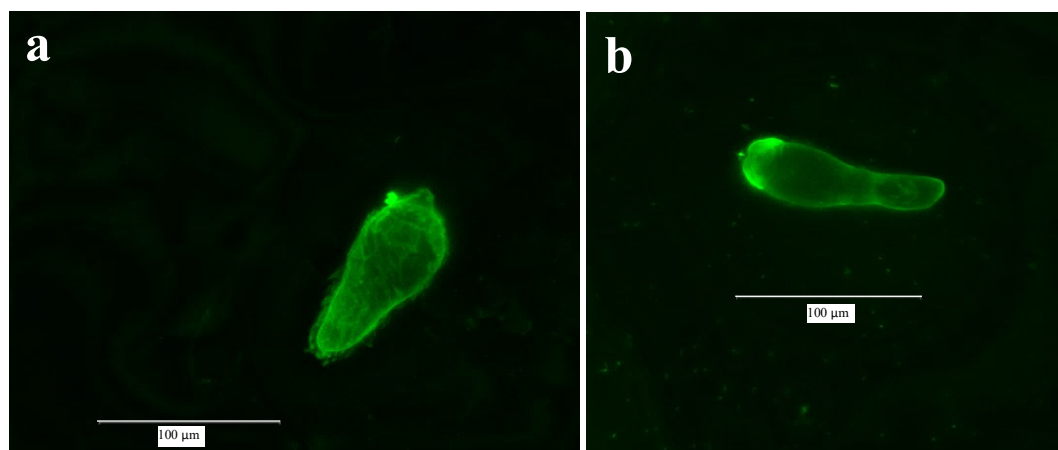
**Abbildung 46: Lectin-FITC markiertes *Calicophoron daubneyi* Miracidium: (a) Hellfeld, (b) Phasenkontrast, (c) Lectin-FITC Färbung detektiert im GFP Kanal**

Bereich sichtbar.

Dies deutet auf das Vorhandensein von N-Acetylglukosamin an der Oberfläche der Miracidien mit einer Verstärkung im Kopfbereich hin.



**Abbildung 47: Lectin-FITC markiertes *Calicophoron daubneyi* Miracidium: (a) Hellfeld, (b) Phasenkontrast, (c) Lectin-FITC Färbung detektiert im GFP Kanal**

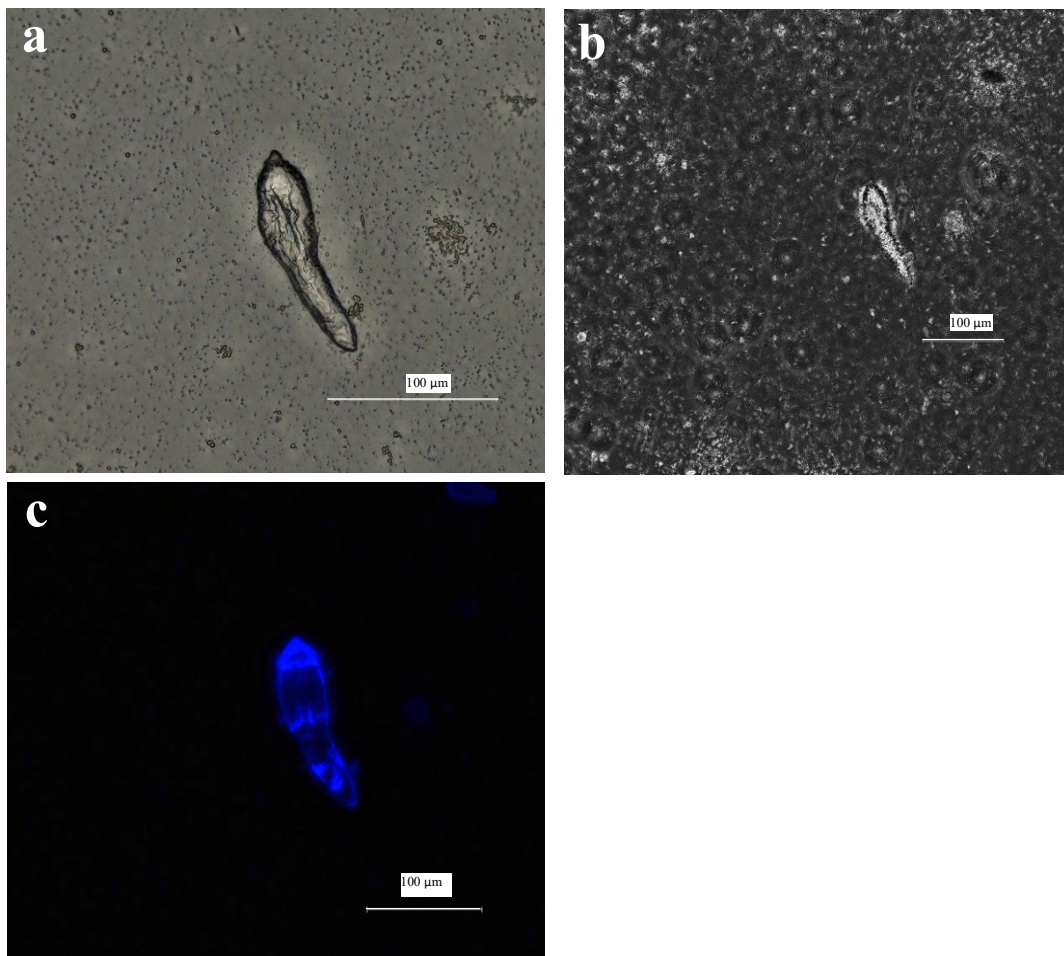


**Abbildung 48: Lectin-FITC markierte *Calicophoron daubneyi* Miracidien, im GFP Kanal detektiert**

#### 4.2. Nachweis der Nukleinsäure in Miracidien mittels Hoechst-Färbung

Des Weiteren wurden die Nukleinsäuren, hauptsächlich die Adenin-Thymin-Regionen in der DNA, mit Hoechst angefärbt und mikroskopisch untersucht (Abb. 49).

Das Miracidium weist blau fluoreszierende Bereiche durch die Markierung mit Trihydrochloride, Trihydrate im Kopf, in der Mitte des Körpers und im hinteren Drittel des Körpers auf (Abb. 49c).



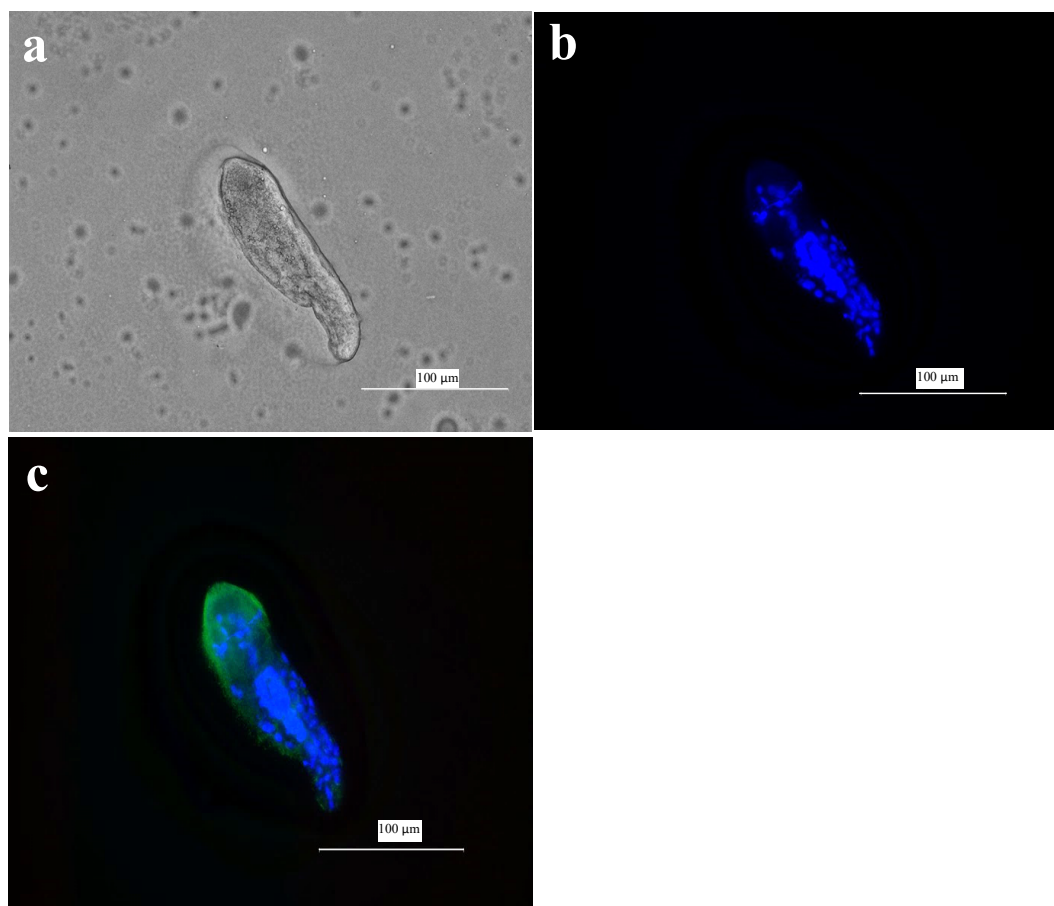
**Abbildung 49: Hoechst markiertes *Calicophoron daubneyi* Miracidium: (a) Hellfeld, (b) Phasenkontrast, (c) Hoechst-Färbung detektiert im DAPI Kanal**

#### 4.3. Untersuchung der Mikrotubulstruktur in Miracidien

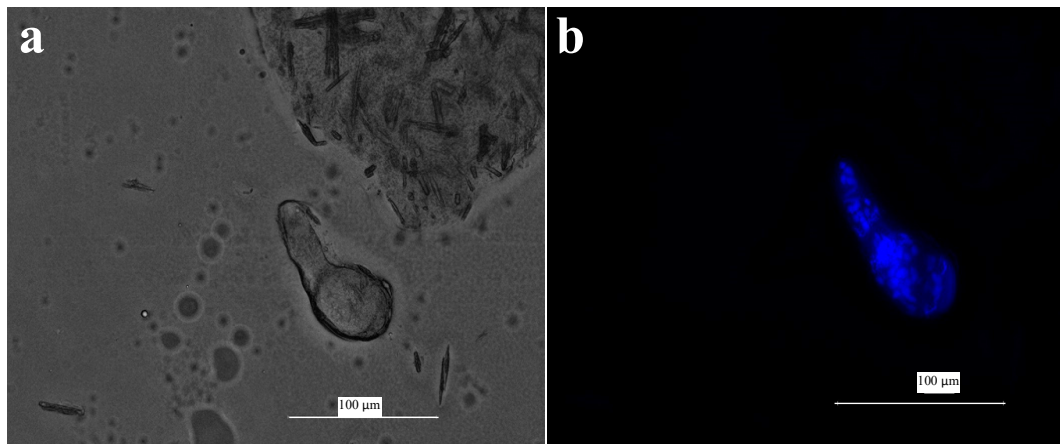
Die Verwendung von dem Primärantikörper Rat-Anti-Tubulin-alpha Antikörper und dem Sekundärantikörper Goat-Anti-Rat Antikörper (Abb. 50-52) ist in der Fluoreszenzfärbung eine bekannte Methode, um die Mikrotubuli in Zellen zu

visualisieren.

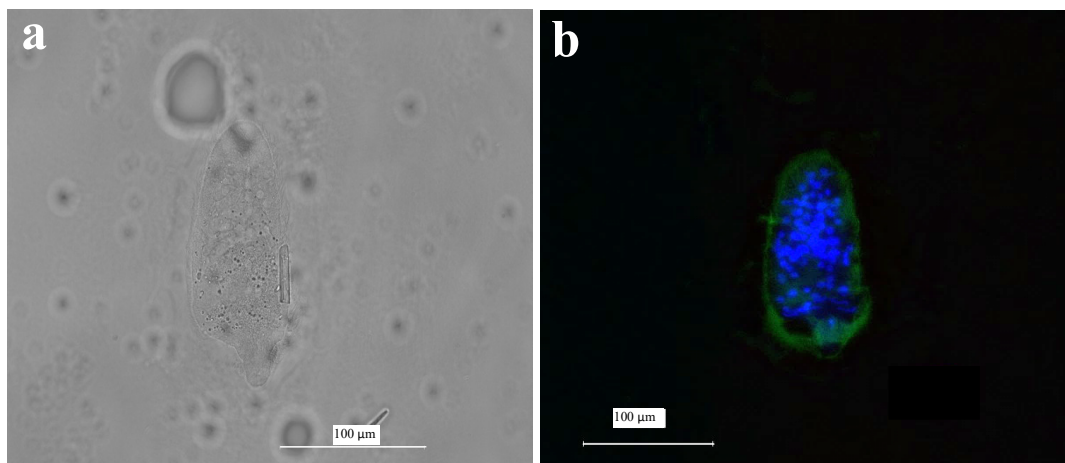
Der Primärantikörper bindet, wie bereits seinem Namen zu entnehmen, an das Zielprotein alpha-Tubulin. Der Sekundärantikörper ist gegen diesen Antikörper gerichtet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff (hier grün) markiert, der unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht wird. In den Abbildungen 50b und c, 51b und 52b zeigen die *C. daubneyi* Miracidien rundlich blaue fluoreszierende Areale im Inneren des Miracidiums. Diese stellen die Zellkerne da und wurden durch die DAPI-Färbung im letzten Schritt (Abschnitt III.6.4.) sichtbar gemacht. Durch den fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper ist eine leichte grüne Fluoreszenz an der Oberfläche und verstärkt im Kopfbereich sichtbar (Abb. 50c, 52b).



**Abbildung 50: Primärer und sekundärer Antikörper markiertes *Calicophoron daubneyi* Miracidium: (a) Phasenkontrast, (b) DAPI Kanal (c) DAPI + GFP Kanal**



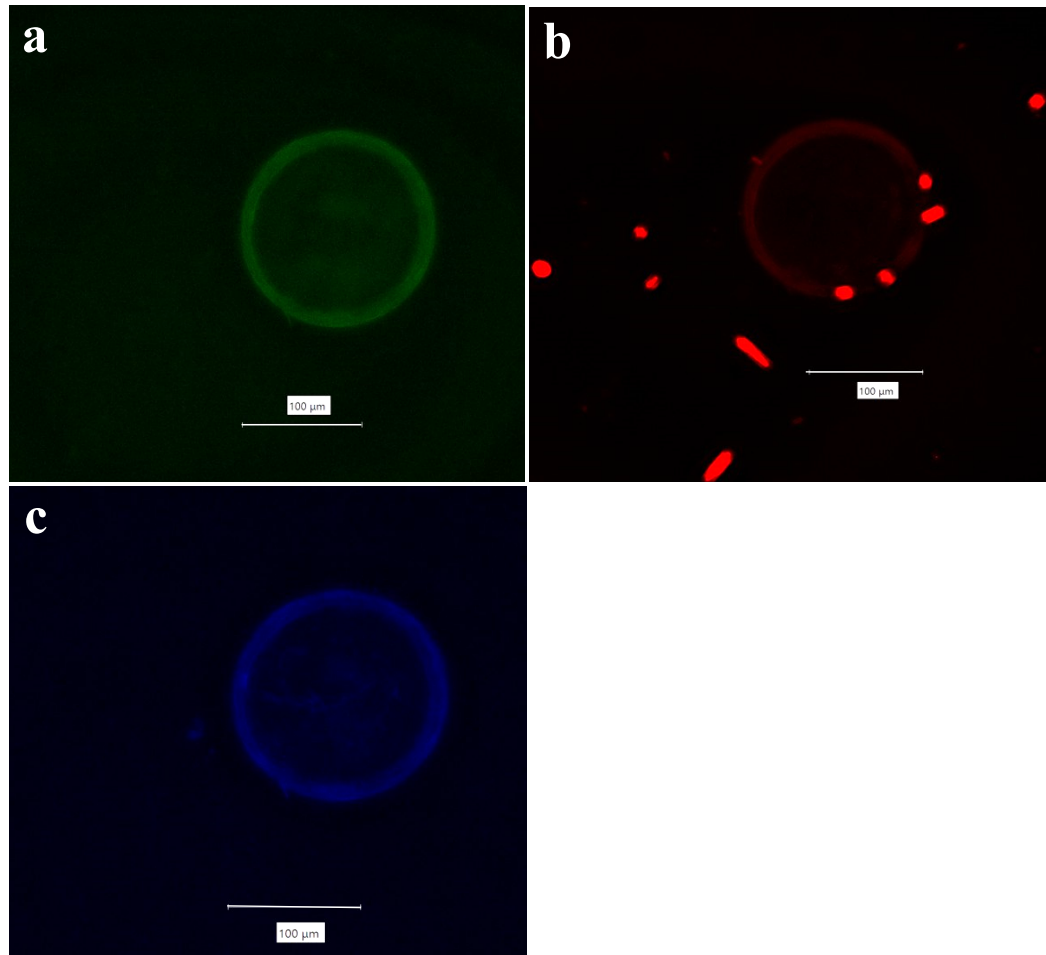
**Abbildung 51:** Primärer und sekundärer Antikörper markiertes *Calicophoron daubneyi* Miracidium: (a) Phasenkontrast, (b) DAPI Kanal



**Abbildung 52:** Primärer und sekundärer Antikörper markiertes *Calicophoron daubneyi* Miracidium: (a) Phasenkontrast, (b) DAPI Kanal + GFP Kanal

#### 4.4. Analyse der Autofluoreszenz der Metacercarie

In den Abbildungen 53a, b und c sind die Autofluoreszenzen der *C. daubneyi* Metacercarien detektiert. Es sind in allen drei Kanälen Autofluoreszenzen sichtbar. Im TxRed Kanal (Abb. 53b) ist sie am schwächsten, allerdings sind weitere, nicht definierte Artefakte sichtbar.



**Abbildung 53: Autofluoreszenzen einer *Calicophoron daubneyi* Metacercarie: (a) GFP Kanal, (b) TxRed Kanal, (c) DAPI Kanal**

## V. DISKUSSION

### 1. Einleitung

Dem Pansenegel *C. daubneyi* wurde lange Zeit keine Aufmerksamkeit geschenkt, obwohl er bereits 1971 in Europa entdeckt wurde (SEY, 1980). In den letzten Jahren hat die Ausbreitung von *C. daubneyi* in Europa jedoch stark zugenommen. Die damals als ungefährlich geltende Parasitose stand lange im Schatten des gut erforschten großen Leberegels. In Irland hat sich die Situation jedoch geändert und die Fasciolose wurde von der Paramphistomidose überholt (NARANJO-LUCENA et al., 2018). In Deutschland sind mit 2,2–5,5 % betroffener Wiederkäuerbestände zwar noch keine hohen Prävalenzen nachgewiesen (FORSTMAIER et al., 2021; ALSTEDT et al., 2022), aufgrund der stetig steigenden Entwicklung in den letzten Jahren ist jedoch mit einem Anstieg der Zahlen zu rechnen. Die eingeschränkten Therapiemöglichkeiten (FORBES, 2018), sowie die routinemäßige Behandlung des großen Leberegels (O'SHAUGHNESSY et al., 2017) und auch der Klimawandel, verbunden mit milderem Winter und mehr Niederschlag (SKUCE et al., 2013), werden vermutlich dazu beitragen. Die Paramphistomidose erregt inzwischen auch die Aufmerksamkeit von Tierärztinnen und Tierärzten sowie Landwirtinnen und Landwirten, da die akute intestinale Form nicht mehr ausschließlich in den tropischen Gebieten vorkommt, sondern auch Fälle in Europa dokumentiert wurden, in denen Infektionen zu schweren Krankheitsverläufen und sogar zum Tod führten (MASON et al., 2012; MILLAR et al., 2012; O'SHAUGHNESSY et al., 2017; FORBES, 2018). Diese Beobachtungen sind alarmierend und werfen wichtige Fragen auf, wie z. B. die Pathogenität des Pansenegels, die zu solchen schweren Verläufen führen kann, die Präpatenz im Endwirt und die Parasitendynamik in der Zwischenwirtpopulation – insbesondere auch im Zusammenspiel mit dem großen Leberegel. Erkenntnisse zu diesen Fragen sind entscheidend für die Entwicklung effektiver Präventions- und Behandlungsstrategien, die bereits auf der Ebene der Zwischenwirte ansetzen sollten.

Die zunehmende Verbreitung in Europa in Kombination mit unklaren klinischen und wirtschaftlichen Konsequenzen und sehr eingeschränkten Behandlungsmöglichkeiten (in Deutschland steht aktuell nur ein Oxyclozanid-

Präparat zur Verfügung) erhöht die Dringlichkeit, *C. daubneyi* besser bezüglich seiner Biologie, Epidemiologie und Klinik zu verstehen. In Anbetracht dieser Aspekte wird eine konstante Zwischenwirtpopulation unter Laborbedingungen benötigt, um die Parasit-Zwischenwirt-Interaktion zu erforschen und Türen für Infektionsversuche mit *C. daubneyi* im Zwischenwirt und Endwirt zu öffnen. In Deutschland, Großbritannien und Spanien konnte bislang als Zwischenwirt für *C. daubneyi* nur die Zwergschlammschnecke *G. truncatula* nachgewiesen werden (MARTINEZ-IBEAS et al., 2013; JONES et al., 2015; KÜCHLER, 2021). Somit liegt sie als Hauptzwischenwirt des Lebenszyklus von *C. daubneyi* im Fokus dieser Arbeit.

Die Zielsetzung dieser Studie war es, den Lebenszyklus von *C. daubneyi* im Zwischenwirt *G. truncatula* unter Laborbedingungen zu erforschen. Durch den erfolgreichen Aufbau einer Zucht der Zwergschlammschnecke unter kontrollierten Laborbedingungen konnte eine konstante Schneckenpopulation aufgebaut werden. Zur Methodenetablierung wurden natürliche und künstliche Habitate verglichen und schließlich ein Habitat unter Laborbedingungen entwickelt. Dies ermöglichte experimentelle Infektionen des Zwischenwirtes mit *C. daubneyi*, mit dem Ziel, die Rolle von *G. truncatula* als Zwischenwirt besser zu verstehen und ein umfassendes Verständnis der frei- und im Zwischenwirt lebenden Larvenstadien und ihrer Entwicklung zu erlangen.

## **2. Methodik der Zwergschlammschneckenzucht unter Laborbedingungen**

### **2.1. Vergleich der verschiedenen Habitate unter Laborbedingungen**

Durch die amphibische und semi-aquatische Lebensweise der Zwergschlammschnecke wurde ein breites Spektrum an künstlichen Habitaten getestet, die von offenem Aquarium bis hin zu Petrischalen reichten. Die sorgfältige Nachahmung ihrer natürlichen Lebensräume, wie feuchte Weiden bis hin zu temporären Wasseransammlungen (FRÖMMING, 1956; SCHWEIZER et al., 2007; RONDELAUD et al., 2011; DEPLAZES et al., 2020b), zielten darauf ab, die realen Lebensbedingungen der Schnecken zu simulieren.

Der ursprüngliche Sammelort der Zwergschlammschnecken wurde bei der

Auswahl der Behältnisse und den Bedingungen im Labor in dieser Studie nicht berücksichtigt. Es wurde jedoch beobachtet, dass manche Schnecken Präferenzen zeigten und sich lieber im Wasser und andere hingegen überwiegend außerhalb des Wassers aufhielten. Dies unterstreicht die Beobachtungen von DREYFUSS et al. (2015), die eine Anpassung der Schnecken an die gegebenen Lebensbedingungen beschrieben. Denn sie konnten feststellen, dass die Schnecken, die aus einer reinen aquatischen Lebensweise entstammten, diese bevorzugten und sich überwiegend im Wasser aufhielten.

In der vorliegenden Studie wurden zwei wichtige Parameter für den Vergleich der Habitate untersucht: Das Schneckenwachstum und die Überlebensrate. In den Glaspetrischalen konnte ein signifikant ( $p < 0,0001$ ) besseres Wachstum der Schnecken im Gegensatz zum Wachstum im offenen Aquarium beobachtet werden, unabhängig von ihrer Startgröße, ab der sie im künstlichen Habitat lebten. Die aufgefundenen, vermessenen Schnecken aus der „Gruppe g“ wuchsen in der ersten Woche um 75 % in den Glaspetrischalen, während sie im offenen Aquarium um 58 % wuchsen. Auch die Überlebenszeit der Schnecken in den Glaspetrischalen lag mit durchschnittlich 168,2 Tagen über der Lebenszeit sowohl von Schnecken im offenen Aquarium (durchschnittlich 30,1 Tage), als auch der in den Polystyrol-Petrischalen (durchschnittlich 22,4 Tage) gehaltenen Schnecken. Das bessere Wachstum und die längere Überlebenszeit der in den Glaspetrischalen lebenden Schnecken deuten auf eine bessere Überwachung der Schnecken und der Umgebungsbedingungen im Vergleich zu denen in dem offenen Aquarium oder in den Polystyrol-Petrischalen lebenden Schnecken hin.

Insgesamt ist zu vermerken, dass es einfacher war, das Wachstum und die Überlebensrate in den Petrischalen zu bestimmen, da die Schnecken dort konstant zu finden waren, im Gegensatz zum offenen Aquarium. Dies erklärt den großen Unterschied in der Anzahl der erfassten Messungen zwischen den zwei künstlichen Habitaten (Petrischalen  $n = 334$  vs. offenes Aquarium  $n = 55$ ).

Die in dieser Studie erfolgreich verwendeten 14 cm großen Glaspetrischalen unterschieden sich durch den Ausbau zu einem Fließsystem von der etablierten Methode von DREYFUSS et al. (2015). Das Fließsystem wurde überwiegend für die Aufzucht der infizierten Schnecken bis Tag 30 p. i. verwendet. Durch das Durchflusssystem konnte der Zeitaufwand für die Reinigung der Schalen alle zwei Tage erheblich reduziert werden, ebenso konnte ein Anstieg der Überlebensrate an

Tag 30 p. i. um 12,6 % beobachtet werden. Mögliche Gründe für den Anstieg könnten eine bessere Kontrolle der Lebensbedingungen, wie z. B. der Wasserqualität durch einen konstanten Wasseraustausch sein. Des Weiteren wurde in der vorliegenden Studie beobachtet, dass sobald eine Schnecke in einer Petrischale verendete, häufig ein Verenden weiterer Schnecken in den darauffolgenden Tagen in dieser Schale folgte. Ein konstanter Austausch des Wassers reduzierte das Auftreten dieses "Massensterbens" in den Petrischalen, vermutlich durch eine Verbesserung der Wasserqualität und eine Vermeidung der Ansammlung von toxischen Substanzen. YANYGINA (2021) fand heraus, dass es beim Zersetzungsprozess toter Schnecken zu einer Veränderung der Wasserqualität durch den Sauerstoffverbrauch und die Freisetzung von Ammoniak und Phosphor kommt. Es konnte gezeigt werden, dass die Veränderung der Wasserqualität für das „Massensterben“ verantwortlich war.

Der Einsatz von Glaspetrischalen zur Zucht von *G. truncatula* ermöglicht außerdem die Kontrolle der Besatzdichte (DREYFUSS et al., 2015; VINARSKI und VÁZQUEZ, 2023). VINARSKI und VÁZQUEZ (2023) wiesen auf die wichtigen Parameter des Konkurrenzkampfes und der Parasiteneliminierung hin, um eine erfolgreiche Zucht unter Laborbedingungen zu etablieren. Beobachtungen während der vorliegenden Studie bestätigen diese Parameter. Die kontrollierte Besatzdichte beendete den Konkurrenzkampf z. B. um die Nahrung zwischen den Schnecken.

Mit dem Einsatz der Glaspetrischalen konnte des Weiteren ein früheres Auffinden und das Eliminieren von toten Schnecken und unerwünschten Wasserparasiten, welche die Entwicklung der Zwergschlammschnecken beeinträchtigen können (RONDELAUD et al., 2014; DREYFUSS et al., 2015), gewährleistet werden. Eine wichtige Strategie zur Vermeidung von Krankheitserregern in der Schneckenpopulation ist die Verwendung steriler Materialien. Die Glaspetrischalen konnten vor und nach der Verwendung autoklaviert werden, wodurch mögliche Pathogene beseitigt werden konnten.

Auch für experimentelle Infektionen sind die Glaspetrischalen bestens geeignet, da einzelne Variablen, wie die Gesundheit der Schneckenpopulation, überprüft werden können. Des Weiteren erbrachte die Möglichkeit, die Petrischalen zu mikroskopieren, ein verbessertes Handling während experimenteller Infektionen mit *G. truncatula* (RONDELAUD et al., 2007b).

Besonders auffällig war die kurze Überlebenszeit (22,4 Tage) und die ausbleibende Fortpflanzung der Schnecken in den Polystyrol-Petrischalen. Ein möglicher Grund für die verkürzte Lebenszeit könnte der verschlechterte Gasaustausch sein, da der Deckel fester verschlossen war als bei den Glaspetrischalen. DREYFUSS et al. (2015) bestätigten, dass ein künstliches Habitat weder zu feucht noch zu trocken sein darf. Glas besitzt eine höhere Wärmeleitfähigkeit als Polystyrol und könnte für stabilere Temperaturen sorgen, da Temperaturschwankungen zu Stress bei den Schnecken führen können. Ein Vergleich zu anderen Studien ist nicht möglich, da Polystyrol-Petrischalen in keiner anderen Arbeit zum Einsatz kamen. Die Polystyrol-Petrischalen eigneten sich basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit aufgrund der ausbleibenden Fortpflanzung und der geringen durchschnittlichen Lebenszeit nicht zur Zucht von *G. truncatula* unter Laborbedingungen.

Das offene Aquarium simuliert durch sein größeres Volumen sowie unterschiedlichen Bodengründe und Pflanzen am besten eine natürliche Umgebung. Allerdings ist es anfälliger für Schwankungen in der Wasserqualität und einer Aussetzung gegenüber Pathogenen, dies spiegelte sich auch in der kürzeren durchschnittlichen Lebenszeit der Schnecken von 30,1 Tagen im Vergleich zu der durchschnittlichen Lebenszeit in den Glaspetrischalen (168,2 Tage) wider. Durch den Einsatz von Erde ist nur eine eingeschränkte Reinigung und Entfernung der biologischen Substanzen oder der Hinterlassenschaften der Schnecken möglich. VINARSKI und VÁZQUEZ (2023) beschrieben den Einfluss der vielen Ausscheidungsprodukte auf die Wasserqualität und auch MOAZENI et al. (2018) erläuterte dies als einen Kritikpunkt bei der Verwendung eines offenen Aquariums mit Erde.

Ebenso musste mit dieser Methode die ständige Verdunstung des Wassers beachtet werden. Aus diesem Grund bevorzugten die meisten anderen Autorinnen und Autoren diverser Studien (inklusive dieser) den Einsatz eines geschlossenen Systems, wie Glaspetrischalen, zur Zucht und Haltung von *G. truncatula* (TAYLOR und MOZLEY, 1948; GOLD, 1980; RONDELAUD et al., 2007b; RONDELAUD et al., 2013; DREYFUSS et al., 2015; VINARSKI und VÁZQUEZ, 2023). Weitere große Kritikpunkte für den Einsatz eines offenen Aquariums waren die erschwerten Beobachtungen der Schnecken und die Durchführung von Experimenten mit ihnen. Die schlechte Wachstumsrate von 5,3 % der fünf

vermessenen 3,8 mm großen Schnecken innerhalb von zwei Wochen im offenen Aquarium verdeutlicht, dass die Bedingungen nicht optimal waren. In den Glaspetrishalen wurde bei vergleichbar großen Schnecken hingegen ein durchschnittlicher Wachstumsanstieg von 17 % innerhalb von zwei Wochen detektiert.

Diese Beobachtungen heben hervor, wie entscheidend es ist, standardisierte Bedingungen zu schaffen, um sowohl ein erfolgreiches Wachstum als auch eine verlängerte Lebenszeit der Schnecken zu erlangen. Dies wird unter anderem durch die Möglichkeit, Umgebungsbedingungen, wie die Wasserqualität, genau zu steuern, begünstigt.

## **2.2. Der Einfluss der Wasserqualität auf die *Galba truncatula* Zucht unter Laborbedingungen**

Diverse Studien entwickelten Methoden zur Zucht von *G. truncatula* unter Laborbedingungen (TAYLOR und MOZLEY, 1948; BORAY, 1963; GOLD, 1980; ABROUS et al., 1999; RONDELAUD et al., 2014; DREYFUSS et al., 2015; MOAZENI et al., 2018). In allen bisherigen Studien wurde destilliertes Wasser oder Quellwasser aus einem natürlichen Habitat verwendet. Der konstante Zugang zu Quellwasser aus einem natürlichen Habitat stellt allerdings eine große Einschränkung für den Aufbau einer Zucht unter standardisierten Bedingungen im Labor dar. Natürliche Habitate können in den Sommermonaten völlig austrocknen oder durch z. B. biologische Stoffe kontaminiert werden.

In dieser Arbeit wurde die Präferenz der Zwergschlammschnecke für pH-Wert und Wasserhärte untersucht, um Referenzwerte zu ermitteln. Dies erlaubte es, eine geeignete Wasserqualität zu etablieren, die auch unabhängig von der Jahreszeit durchgehend verfügbar ist. Im Wasser des natürlichen Habitats wurde ein pH-Wert von 7,2 und eine Härte  $> 100$  mg/l Kalziumkarbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) ermittelt. Die Referenzwerte der vorliegenden Studie orientierten sich an den im natürlichen Habitat ermittelten Werten und lagen bei einem pH-Wert von 6,6–8 und einer Wasserhärte von  $> 100$  mg/l  $\text{CaCO}_3$  (5,6 °dH). Durch die Verwendung von Wasserteststreifen wurde die Gesamthärte des Wassers durch die Konzentration von Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) und Magnesium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) bestimmt. Dies wird anhand der Teststreifen in Kalziumkarbonat angegeben, das allerdings nicht frei im Wasser vorliegt. Deshalb messen die Teststreifen nicht direkt die Menge an

Kalziumkarbonat, sondern die Ionen, die zur Gesamthärte beitragen und zeigen diese dann in der äquivalenten Menge an Kalziumkarbonat an, um eine Schätzung von der Härte des Wassers zu erlangen. MOAZENI et al. (2018) führten eine chemische Analyse des verwendeten Wassers im Habitat unter Laborbedingungen durch und maßen unter anderem 32 mg/l  $\text{Ca}^{2+}$  und 52,8 mg/l  $\text{Mg}^{2+}$ , was einer Wasserhärte von etwa 300 mg/l  $\text{CaCO}_3$  und 16,8 °dH entspricht. Die ermittelte Wasserhärte in der Studie von MOAZENI et al. (2018) stimmt mit der gemessenen Wasserhärte bei Verwendung von Leitungswasser in dieser Studie überein.

Der in dieser Studie durchgeführte Vergleich der Schneckenzucht mit unterschiedlichen Wasserarten zeigte, dass gefiltertes Wasser gegenüber Leitungswasser sowie destilliertem Wasser zur Zucht von *G. truncatula* präferiert werden sollte. Im Vergleichsversuch mit Leitungswasser, destilliertem Wasser und gefiltertem Wasser ergab sich eine höhere Lebenserwartung der Schnecken im gefilterten Wasser als in den beiden anderen Wasserarten. Die Schnecken im künstlichen Habitat mit Leitungswasser überlebten durchschnittlich nur 29,4 Tage. Die Verwendung von destilliertem Wasser ließ die durchschnittliche Überlebenszeit nur auf 36,6 Tage ansteigen. Im Habitat mit gefiltertem Wasser hingegen überlebten die Schnecken durchschnittlich sogar 71,9 Tage. Die Messungen zeigten, dass das Leitungswasser zwar eine hohe Härte von 300 mg/l  $\text{CaCO}_3$  aufwies, wie ebenfalls von MOAZENI et al. (2018) in ihrer Studie zur Zucht von *G. truncatula* verwendeten, die längste Lebenszeit konnte mit Leitungswasser jedoch nicht erzielt werden. Einerseits ist die Wasserhärte optimal für die Schneckengehäuse, andererseits spielen aber eventuell auch Chlor und andere (Schad-)Stoffe, die noch im Leitungswasser enthalten sein können, eine Rolle und führen zu einer Verschlechterung der Wasserqualität und der damit eingehenden Reduzierung der Lebenszeit der Schnecken. Im destillierten Wasser hingegen fehlen essenzielle Mineralien, besonders das Fehlen von Kalzium, was durch die Ermittlung von 0 mg/l  $\text{CaCO}_3$  bestätigt wurde, ist problematisch, da es lebensnotwendig für die Schnecken ist, und durch die kürzeste Lebenszeit der Schnecken in dieser Studie untermauert wird. DE JESÚS-NAVARRETE et al. (2023) bekräftigten durch ihre Forschung die wichtige Rolle von Kalzium im Leben einer Schnecke. Kalzium sorgt hauptsächlich für die Entwicklung und den Erhalt des Schneckenhauses, welches bei vergleichbaren Schneckenarten zu mindestens 97 % aus Kalziumkarbonat besteht.

Durch die Herstellung von gefiltertem Wasser mithilfe der Verwendung eines BRITA Wasserfilters wurde in unserem Labor eine ähnliche Wasserhärte wie in einem natürlichen Habitat (5,6 °dH) erlangt. Der BRITA Wasserfilter sorgt für eine Verbesserung der Qualität des Leitungswassers durch die Reduktion von Schadstoffen, Chlor, Kalk und anderen Substanzen, die die Qualität des Wassers beeinträchtigen können. Der Filter nutzt Aktivkohle und Ionenaustauscher, um Verunreinigungen aus dem Wasser zu entfernen. Mit einer verbliebenen Menge von  $> 100 \text{ mg/l CaCO}_3$  im gefilterten Wasser eignet sich dieses besonders für die Zucht von *G. truncatula*, was durch die verdoppelte durchschnittliche Lebenszeit bestätigt wird.

Die vorliegende Arbeit stellte fest, dass ein pH-Wert-Bereich von 6,8–7,5 keinen Einfluss auf das Wachstum und die Überlebensdauer der Schnecken hatte. Diese Ergebnisse bestätigten auch FRÖMMING (1956) und GOLD (1980). Des Weiteren deuten diese Ergebnisse auf eine gute Anpassung der Zwergschlammschnecken an sowohl saure als auch alkalische Böden hin (DREYFUSS et al., 2015).

Obwohl in der vorliegenden Studie nur der pH-Wert und der Härtegrad des Wassers untersucht wurden, konnten insbesondere mit der Standardisierung des Härtegrades durch den BRITA Filter in einem Bereich von 100–250 mg/l  $\text{CaCO}_3$  eine Verbesserung des Wachstums und der Überlebensdauer der Schnecken erreicht werden. Welche anderen Inhaltsstoffe des Leitungswassers durch den BRITA Filter verändert wurden und möglicherweise zu einer Verbesserung der Lebensbedingungen für die Schnecken geführt hat, wurde nicht weiter untersucht.

### **2.3. Vergleich der Vor- und Nachteile verschiedener Nahrungsquellen**

In der vorliegenden Studie wurden unterschiedliche Nahrungsquellen auf ihre Akzeptanz getestet. Die Beobachtungen zeigten, dass sich alle Schnecken erfolgreich von dem getrockneten Salat ernährten, unabhängig von ihrem Alter. Dies steht in Widerspruch zu den Erkenntnissen von ABROUS et al. (1999c); RONDELAUD et al. (2004) und RONDELAUD et al. (2007b), die nur von einer Akzeptanz des Salates in eingeweichter Form berichteten. Eingeweichter Salat führte in der vorliegenden Studie schnell zu Geruchsabweichungen und wurde von den Schnecken nicht gefressen. Das gemessene durchschnittliche Wachstum von mit getrocknetem Salat gefütterten 1 mm großen Zwergschlammschnecken ( $n = 24$ ) betrug in der ersten Woche 0,75 mm und in der zweiten Woche 0,77 mm. Der

geringe wöchentliche Wachstumsanstieg deutet auf eine eventuell noch nicht optimierte verwendete Nahrungsquelle der Schnecken hin, da DREYFUSS et al. (2015) ein durchschnittliches Wachstum von 1 mm pro Woche beschrieben. In der erwähnten Studie wurden die Schnecken nur mit Algen oder zusätzlich noch mit einem Ergänzungsfutter gefüttert.

Als Alternative wurden die Schnecken mit Tetraphyll Flocken gefüttert, welche jedoch nur vereinzelt von wenigen Schnecken angenommen wurden. Die nicht verzehrten Flocken zersetzen sich sehr schnell im Wasser, was dazu führte, dass die Schnecken das Wasser umgehend verließen. MEHL (1932) beschrieb bereits dieses Phänomen des Flüchtens aufgrund von einer Veränderung der Wasserqualität.

Ob die Schnecken sich in der vorliegenden Arbeit eventuell zusätzlich auch von abgestorbenen Pflanzenteilen ernährten, wie MEHL (1932) und FRÖMMING (1956) dokumentierten, kann nur vermutet werden. In dieser Studie konnte das von FRÖMMING (1956) beschriebene Alter von 13–15 Monaten bei Schnecken, die in einem Sumpfaquarium gehalten und mit verrottenden Blättern gefüttert wurden, nicht erreicht werden. Ob die verkürzte Lebenszeit von etwa 5–10 Monaten in dieser Studie Rückschlüsse auf eine nicht optimierte Nahrungsquelle liefert, ist ungewiss. Die Nahrungsquellen konnten nicht genau bestimmt werden und die Schnecken könnten sich in einer unbekannten Menge zusätzlich von den gewachsenen Algen ernährt haben.

Des Weiteren wissen wir nicht, ob der Salat tatsächlich den kompletten Bedarf der Schnecken abgedeckt hat. Es kann davon ausgegangen werden, dass eine einseitige Ernährung mit nur getrocknetem Salat über einen längeren Zeitraum nicht empfohlen werden kann, da dies mit hoher Wahrscheinlichkeit zu Mangelercheinungen führt. In der vorliegenden Studie konnte jedoch außer getrocknetem Salat keine weitere Futterquelle ermittelt werden, die von allen Schnecken durchgehend akzeptiert wurde.

#### **2.4. Die Relevanz von Erde in Habitaten unter Laborbedingungen**

In dieser Arbeit wurde im Habitat unter Laborbedingungen bewusst auf die Verwendung von Erde verzichtet. Zum einen, weil dadurch die Gewährleistung der Biosicherheit erschwert worden wäre, zum anderen, weil der konstante Zugang zu geeigneter Erde nicht möglich war. Des Weiteren war es das Ziel dieser Studie, standardisierte Laborbedingungen zu etablieren. Die mögliche Relevanz der Erde

und deren Einfluss auf das Vorhandensein von essenziellen Spurenelementen im Habitat sollte jedoch diskutiert werden und in weiteren Studien untersucht werden. Eine vergangene Studie diskutierte bereits die Verwendung von Erde in der Schneckenzucht. Ein besonderes Augenmerk lag hier auf der Benutzung von saurer Erde. Bereits 10–20 Schnecken erreichten in dieser Studie verlässlich den Aufbau einer neuen Population auf sauren Böden (DREYFUSS et al., 2021).

Obwohl in der vorliegenden Studie kein direkter Vergleich zwischen einer Haltung der Schnecken in Petrischalen mit und ohne Erde gemacht wurde, konnten wir zeigen, dass eine erfolgreiche Reproduktion und Wachstum auch ohne die Verwendung von Erde im künstlichen Habitat zu erreichen ist.

## **2.5. Sonstige Bedingungen zur Zucht von *Galba truncatula* unter Laborbedingungen**

Zur Zucht von *G. truncatula* unter Laborbedingungen wurde in dieser Studie durchgehend ein 12 h Lichtrhythmus mit einer Lichtquelle, die konstant zwischen 3000–4000 Lux lieferte, verwendet. Dies ist im Einklang mit den Berichten von ABROUS et al. (1999c), RONDELAUD et al. (2007b), DREYFUSS et al. (2015) und MOAZENI et al. (2018). Dieser Rhythmus ahmt die Lichtverhältnisse zwischen dem Wechsel von Tag und Nacht unter natürlichen Bedingungen am realistischsten nach. Jedoch sollte in weiteren Studien auch dieser Umgebungsparameter untersucht werden, um die Auswirkungen auf die Fortpflanzung, sowie Aktivität und Futteraufnahme der Schnecken bei veränderten Lichtrhythmus zu erfassen.

Zusammenfassend sollten die Laborbedingungen noch weiter optimiert werden, um die Lebenszeit der Schnecken zu verlängern. Unter den beschriebenen Bedingungen konnten wir eine Lebenszeit von durchschnittlich 168,2 Tagen und maximal 306 Tagen in 14 cm großen Glaspetrischalen erreichen. Angestrebt werden laut FRÖMMING (1956) 17 Monate.

## **2.6. Fortpflanzung der *Galba truncatula* unter Laborbedingungen**

Die ausbleibende Fortpflanzung der *G. truncatula* im kleinen Becken 2 und 3, bei der Verwendung von destilliertem Wasser und Leitungswasser, steht im Einklang mit den Erkenntnissen von ROBERTS (1950). Die Studie bestätigte, dass Leitungswasser ungeeignet für die Zucht von *G. truncatula* ist.

In der vorliegenden Studie konnte eine schnelle Laichablage nach fünf bis acht Tagen nach dem Umsetzen aus einem natürlichen Habitat in ein künstliches Habitat beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Laichablage eine Stressreaktion der Schnecken ist. Dieses Phänomen zeigen einige Tierarten, um ihre Chance auf Fortpflanzung zu erhöhen und ihre Gene weitergeben zu können. Ein anderer möglicher Grund wären die verbesserten Umgebungsbedingungen durch die gesteigerte Wasserqualität, weniger Konkurrenzkampf und durch stetige Verfügbarkeit von Nahrung.

Es wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Laichablage bei Schnecken ab einer Gehäusegröße von 3 mm detektiert. Die ermittelte Gehäusegröße widerspricht den Angaben von KENDALL (1953). Er nahm eine Laichablage erst ab einer Gehäusegröße von 4,5 mm wahr. Eimengen von sieben bis 14 Eiern pro Laichpaket wurden in der vorliegenden Studie beobachtet, bei KENDALL (1953) und FRÖMMING (1956) traten ähnliche Eimengen von 12–15 und 7–10 Eiern pro Laichpaket auf. Die beobachtete Laichablage in einem jüngeren Alter der Schnecken, welches durch die geringere Gehäusegröße vermutet wird, im Vergleich zur beobachteten Laichablage ab einer Gehäusegröße ab 4,5 mm, lässt auf eine schnellere Entwicklung und damit eintretende Reproduktion der Schnecken schließen. Es ist wichtig, diese Erkenntnis bei der Betrachtung der Faktoren, die die Ausbreitung der Paramphistomidose beeinflussen, zu berücksichtigen, da eine frühere Reproduktion des Zwischenwirts einen Anstieg der Zwischenwirtpopulation vermuten lässt.

### **3. Dynamik der Zwischenwirtinfektion**

Die experimentellen Infektionsversuche von *G. truncatula* mit *C. daubneyi* und *F. hepatica* ermöglichten es, die Dynamik der Parasiteninfektionen im Zwischenwirt detaillierter zu erforschen.

Anhand der stichprobenartigen PCR-Analyse ( $n = 80$ ) der verendeten, infizierten Schnecken und den Metacercarien ausschüttenden Schnecken ( $n = 7$ ) wurde eine Infektionsrate von 60 % der experimentell mit zwei, vier oder 30 Miracidien infizierten Schnecken ( $n = 243$ ) ermittelt. Dies stimmt mit den Ergebnissen von ABROUS et al. (1999c) überein, die eine Infektionsrate von 51,9 % bei einer Infektion mit einem Miracidium nachwiesen. SEY (1977) beschrieb bei einer Infektion mit 1–5 Miracidien ebenfalls eine Infektionsrate von 60–70 %. Eine

verhältnismäßig niedrige Infektionsrate von 21 % trat bei einer Doppelinfektion von je einem Miracidium im Abstand von vier Stunden auf (AUGOT et al., 1996). DREYFUSS et al. (2007) erforschten den Anstieg der Infektionsrate von Schnecken, die einem *F. hepatica* Miracidium ausgesetzt wurden, von 1990 bis 2006. Sie entdeckten eine gleichbleibend gute Überlebensrate von 60 % der Schnecken an Tag 30 p. i. und vermuteten anhand dieser Ergebnisse eine höhere Infektiosität des *F. hepatica* Miracidiums über den Verlauf der Jahre. Die experimentelle Prävalenz der Infektionen mit *C. daubneyi* über den Verlauf mehrerer Jahre wurde zum aktuellen Stand noch nicht ermittelt. Eine Verbesserung der Infektionsrate könnte der Einsatz kleinerer Gefäße zur Miracidienexposition darstellen, um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass das Miracidium seinen Zwischenwirt erfolgreich auffindet.

Die vorliegende Studie zeigte, dass es zu einer Reduzierung der Überlebensrate der Schnecken durch eine Infektion mit *C. daubneyi* im Vergleich zu uninfizierten Schnecken kam. Uninfizierte Schnecken (n = 15) zeigten eine durchschnittliche Überlebensrate an Tag 32 von 86,6 % in 14 cm großen Glaspetrischalen. Die durchschnittliche Überlebensrate von infizierten Schnecken (n = 91) an Tag 30 p. i. hingegen betrug nur noch 37,4 % unter denselben Bedingungen. Bei der Verwendung des Durchflusssystems stieg die Überlebensrate an Tag 30 p. i. um 12,6 % auf 50 % an. Die mit *C. daubneyi* infizierten Schnecken (n = 200) in der Studie von RONDELAUD et al. (2013) zeigten vergleichbare Überlebensraten von 41,5 % an Tag 30 p. i. in 35 mm großen Petrischalen. Sie stellten auch eine ähnliche Überlebensrate von 39,5 % für mit *F. hepatica* infizierte Schnecken (n = 400) unter denselben Bedingungen fest. In 14 cm großen Glaspetrischalen dokumentierten RONDELAUD et al. (2007b) sogar eine durchschnittliche Überlebensrate der mit *C. daubneyi* infizierten Schnecken (n = 120) an Tag 30 p. i. von 84,1 % und der mit *F. hepatica* (n = 160) von 80 %. ABROUS et al. (1999c) hingegen beschrieben eine durchschnittliche Überlebensrate von 49,3 % an Tag 30 p. i. bei *C. daubneyi* infizierten Schnecken (n = 294), die in Boxen gehalten wurden. DREYFUSS et al. (2015) schafften es sogar über einen Zeitraum von acht Jahren die Überlebensrate der infizierten Schnecken von 62,3 % auf 80,4 % zu steigern.

Mögliche Gründe für die geringere Überlebensrate der potenziell infizierten Schnecken an Tag 30 p. i. könnte die Schädigung der Schnecke durch den Parasiten *C. daubneyi* sein (RONDELAUD et al., 2007a). Auch eine nicht vollständige

Anpassung von *C. daubneyi* an *G. truncatula* spiegelt die Überlebensrate wider, während für *F. hepatica* eine bessere Anpassung an *G. truncatula* beschrieben ist (ABROUS et al., 1997). Die Entwicklung des Parasiten im Zwischenwirt kostet Energie, die die Schnecken sonst zur Fortpflanzung und zum Wachstum benötigen würden. Auch eine mögliche Abwehr des Parasiten verbraucht Energie. Das Verenden aller infizierten Schnecken nach erfolgreicher Cercarienausschüttung verdeutlicht noch einmal den hohen Energieverbrauch durch die Infektion und den dadurch verbundenen Einfluss auf die Vitalität. Deshalb kann eine weitere Reinfektion der Schnecke vollkommen ausgeschlossen werden. Ein Feldversuch dazu wäre nicht hilfreich, da die Infektionsdynamik dort nicht detailliert beobachtet werden kann.

In der vorliegenden Studie kamen nur Zwergschlammschnecken mit einer Größe von etwa 4 mm für die Infektionsversuche zum Einsatz. DAR et al. (2015) stellten in ihrer Forschung eine altersabhängige Resistenz gegenüber einer Infektion mit *C. daubneyi* bei *Pseudosuccinea columella* fest, wobei erfolgreiche Infektionen lediglich bei Schnecken beobachtet wurden, die 1–2 mm groß waren. Diese interessanten Erkenntnisse bestätigte SEY (1980) auch in *G. truncatula*. In der Studie von IGLESIAS-PINEIRO et al. (2016) hingegen war die Hälfte der mit *C. daubneyi* infizierten Zwergschlammschnecken 3–3,9 mm groß und auch RONDELAUD et al. (2007b) gelang es erfolgreich 4 mm große *G. truncatula* zu infizieren. VIGNOLES et al. (2008) stellten sogar eine höhere Produktion von Metacercarien bei 6–7 mm großen Schnecken fest. Die vorliegende Studie erlaubt keine Rückschlüsse auf eine mögliche altersbedingte Resistenz, da hierfür Schnecken verschiedener Größen unter identischen Bedingungen infiziert werden müssten, um festzustellen, ob sich die Infektionsrate von 60 % verändert.

SEY (1977) beobachtete, dass die Mortalitätsrate der Schnecken mit der Erhöhung der eingesetzten Miracidienanzahl bei Infektionen von 20–30 % anstieg. Dies untermauert die Ergebnisse der vorliegenden Studie. Auch hier führte eine Erhöhung der Miracidienanzahl von zwei auf 30 Miracidien für die Infektion einer Schnecke (n = 12) zu einer deutlich verkürzten Überlebensrate der Schnecken von durchschnittlich 41,2 % auf 25 % an Tag 30 p. i. Eine mögliche Begründung könnte sein, dass eine hohe Parasitenbürde zu größeren Schäden im Zwischenwirt führt und diesen zu viel Energie kostet. In dieser Studie zeigten zwei von drei Schnecken

mit einer Exposition von vier Miracidien ein positives Signal für *C. daubneyi* DNA in der PCR-Analyse und auch die Überlebensrate an Tag 30 p. i. stieg auf 75 % an. Jedoch führte eine Infektionsdosis von vier Miracidien in dieser Studie zu keiner Cercarienausschüttung. In der vorliegenden Studie schütteten trotz einer Infektionsrate von 60 % nur sieben (10,3 %) von 68 Schnecken, die Tag 30 p. i. überlebten, Cercarien aus. Die Problematik der meist ausbleibenden Cercarienausschüttung bei erfolgreich experimentell infizierten Schnecken wurde auch schon von SEY (1977) beobachtet. Ihm gelang trotz nachweislicher Anhäufung der entwickelten Larvenstadien im Schneckenkörper keine erfolgreiche Ausschüttung dieser. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass ein möglicher Stimulus zur Ausschüttung bislang unbekannt ist. Zurzeit werden dieselben Ausschüttungsstimuli für *C. daubneyi* wie für *F. hepatica* getestet: Temperaturschwankungen, natürliches Licht und ein Wasserwechsel (ABROUS et al., 1999c, 1999b; TITI et al., 2014). Die Anwendung des Temperaturschocks während einer Infektion brachte in der vorliegenden Studie keine Ausschüttung hervor. RONDELAUD et al. (2013) hingegen schafften es die Ausschüttungsrate der *C. daubneyi* infizierten und Tag 30 p. i. überlebten Schnecke durch einen einmal wöchentlichen dreistündigen Temperaturschock auf 12 °C von 18,1 % auf 69,4 % anzuheben. Auch die Rate der Ausschüttung bei einer *F. hepatica* Infektion stieg mit dem Temperaturschock von 23,4 % auf 54 % an. Für die Infektion von *G. truncatula* mit *F. hepatica* ist eine stimulierbare Cercarienausschüttung bekannt (GAYO et al., 2020), ebenso sind höhere Ausschüttungsraten beschrieben (RONDELAUD et al., 2013). Für die weitere Forschung wäre es von großem Interesse die Faktoren herauszufinden, die die Cercarienausschüttung fördern oder hemmen, um Strategien zu entwickeln, die die Parasitenentwicklung unterbrechen. Ein bekannter Stimulus lässt auch eine Synchronisation der Cercarienausschüttung zu und bietet dadurch eine verbesserte Planung für experimentelle Infektionsversuche der Endwirte, wenn Cercarien nicht durch Sektionen der Schnecken gewonnen werden sollen.

Diese Arbeit untersuchte unter anderem auch die Dynamik der Metacercarienausschüttung. Es wurden nur natürliche Ausschüttungen dokumentiert und keine Sektion an infizierten Schnecken zum Cercarienaustritt vorgenommen. Die Ausschüttungen von *C. daubneyi* starteten in dieser Arbeit bei 57,1 % ab Tag 35 p. i. (bei 19–20 °C) bis hin zu Tag 69 p. i. (bei 19–20 °C). Eine

so frühe Ausschüttung wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Hier startete die Ausschüttung an Tag 49 (bei 20 °C), 55, 57 (bei 14–15 °C), 66 (bei 6–8 °C), 70 p. i. (DINNIK, 1962; AUGOT et al., 1996; ABROUS et al., 1999c; KUMAR, 1999; DREYFUSS et al., 2015). Dies könnte auf eine nun schnellere Entwicklung des Parasiten im Zwischenwirt hinweisen. Da für *C. daubneyi* bislang nur höhere Präpatenzen insbesondere auch im Vergleich zu *F. hepatica* beschrieben wurden (RONDELAUD et al., 2013). Dies konnte in dieser Studie nicht bestätigt werden, da *F. hepatica* Metacercarien erst an Tag 39 p. i. sichtbar waren. Aufgrund der geringen Anzahl an Infektionsversuchen mit *F. hepatica*, wurde allerdings auch nur eine Ausschüttung dieser Trematode beobachtet.

Überraschenderweise zeigte auch der Ausschüttungstag Einfluss auf die Infektiosität der *C. daubneyi* Metacercarien im Endwirt, denn aus an Tag 60 p. i. gewonnen Metacercarien entwickelten sich mehr adulte Pansenegel im Endwirt, als aus Metacercarien, die an Tag 30 p. i. gewonnen wurden (VIGNOLES et al., 2008).

Es zeigte sich über den gesamten Zeitraum eine intermittierende Ausschüttung über mehrere Tage. DREYFUSS et al. (2015) beschrieben ebenfalls diese Dynamik und beobachteten die spannenden Veränderungen der Ausschüttungsdynamik über die Jahre 1999 bis 2007. Am Anfang des beobachteten Zeitraums schütteten die Schnecken überwiegend (59,7 %) nur einmal aus. Darauf folgten, wie in der vorliegenden Studie dokumentiert, fast nur noch Ausschüttungen über mehrere Tage (92,4 %). Dieselbe Ausschüttungsdynamik wurde bei Infektionen mit *F. hepatica* beschrieben. Die meisten Metacercarien wurden in drei bis fünf Ausschüttungen freigesetzt. Allerdings stellten DREYFUSS et al. (2015) keinen signifikanten Unterschied in der *F. hepatica* Metacercarienzahl pro Ausschüttung fest. Diese Ergebnisse konnte die vorliegende Arbeit für *C. daubneyi* Ausschüttungen widerlegen, hier sank die Anzahl der Metacercarien signifikant durchschnittlich um zehn Metacercarien pro Ausschüttung innerhalb der ersten vier Ausschüttungen, was auf eine Erschöpfung des Zwischenwirts zurückzuführen sein kann. Die wechselnde Ausschüttungsdynamik von einer einmaligen bis hin zu drei bis fünf Ausschüttungen bei *C. daubneyi* und *F. hepatica* Infektionen lässt eine voranschreitende Adaption der Parasiten an ihre Zwischenwirte vermuten, da eine einmalige Ausschüttung eine schlechte Anpassung offenbart im Gegensatz zu Schnecken, die ihre Parasiten in mehreren Wellen ausscheiden (DREYFUSS et al., 2015). Dies könnte auch ein Hinweis auf eine unterschiedliche Entwicklungsdauer

des Parasiten im Zwischenwirt, sowie verschiedene Generationen der einzelnen Stadien sein.

RONDELAUD et al. (2013) ermittelten eine durchschnittliche Anzahl von 77,1–92,1 Metacercarien pro Schnecke bei einer Infektion mit zwei *C. daubneyi* Miracidien unter Laborbedingungen ohne Temperaturschock. Bei einem verwendeten Temperaturschock ergab sich sogar eine durchschnittliche Anzahl von 163,6–211,9 Metacercarien. In dieser Studie wurde eine vergleichbare Anzahl an *C. daubneyi* Metacercarien unter Laborbedingungen von durchschnittlich 106 Metacercarien pro Schnecke bei einer Infektion mit zwei Miracidien produziert. Die produzierte *C. daubneyi* Metacercarienzahl liegt noch deutlich unter der Anzahl der beschriebenen *F. hepatica* Metacercarien von 143,3 bis 231,8 Metacercarien pro Schnecke (RONDELAUD et al., 2013).

Die natürlichen Ausscheidungen bestätigten eine erfolgreiche Beendigung des Lebenszyklus von *C. daubneyi* im Zwischenwirt. Die Ausscheidungsdauer über mehrere Tage sollten bei Kontroll- und Behandlungsstrategien des Zwischenwirtes zwingend berücksichtigt werden.

#### **4. Entwicklungsstadien von *Calicophoron daubneyi***

##### **4.1. Eier**

Die erfolgreiche Gewinnung der Pansenegleier aus dem Kot infizierter Wiederkäuer erbrachte viele Vorteile. Alle bisher dokumentierten Studien zur experimentellen Infektion mit *C. daubneyi* verwendeten ausgeschiedene Eier aus frisch gesammelten Pansenegeln (OLLERENSHAW, 1971; ABROUS et al., 1997; RONDELAUD et al., 2007b; CHRYSSAFIDIS et al., 2015).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von CHRYSSAFIDIS et al. (2015), die die höchste Entwicklungsrate der *C. daubneyi* Eier nach 28 Tagen Inkubation mit einer Lichtquelle feststellten, präsentierte die vorliegende Studie die höchste Entwicklungsrate der Eier nach bereits 15 Tagen Inkubation ohne Lichtquelle bei derselben Temperatur von 27 °C. Bei einer in dieser Arbeit nachgewiesenen Schlupfrate von 83,3 % nach 14 Tagen Inkubation, beobachteten CHRYSSAFIDIS et al. (2015) hingegen in ihrer Studie noch keinen Schlupf nach derselben Inkubationslänge. Mögliche Gründe für die Abweichungen der Entwicklungsraten

über die Inkubationslänge könnten die unterschiedlichen Methoden der Eigewinnung liefern. Die Darmpassage könnte eventuell einen Einfluss auf die Entwicklungsdauer der Eier haben. Allerdings konnten MARTINEZ-IBEAS et al. (2013) erfolgreich einen Miracidien schlupf nach einer Inkubation von zwölf Tagen bei 20 °C nachweisen, obwohl die Eier, wie von CHRYSSAFIDIS et al. (2015) beschrieben, direkt aus Pansenegeln gewonnen wurden. Die Sedimente, die innerhalb dieser Arbeit aus Kot gewonnen wurden, zeigten einen höheren Verschmutzungsgrad als frisch ausgeschiedene Eier der Pansenegel. Diese Eigewinnung erforderte einen höheren zeitlichen Aufwand, um große Mengen an Miracidien für experimentelle Versuche des Zwischenwirtes zu gewinnen.

Die hergestellten Kotsedimente konnten bis zu einem Jahr im Kühlschrank gelagert werden und aus diesen schlüpften noch 10 % der Miracidien. OLIVER (2021) lieferte in ihrer Studie mögliche Hinweise für diese lange Überlebenszeit der Eier. Sie dokumentierte höhere Widerstandsfähigkeit der *C. daubneyi* Eier gegenüber extremen pH-Werten und Natriumhypochlorit als *F. hepatica* Eier. Dies könnte möglicherweise auf die verschiedene Proteinvernetzung in der Eischale von *C. daubneyi* im Vergleich zu *F. hepatica* zurückzuführen sein. Sie entdeckte als Erste das gummiartige Protein Pro-Resilin in den Eischalen. Dieser Aufbau schützt die Eier vermutlich auf ihrem Weg im Endwirt, da sie schon dort pH-Wert Schwankungen insbesondere im Labmagen, durch den *F. hepatica* Eier nicht passieren müssen, ausgesetzt sind.

#### 4.2. Miracidien

Die Überlebensdauer der Miracidien liegt laut der Forschung von SEY (1977) bei neun bis zehn Stunden bei Raumtemperatur. Er konnte nach vier Stunden allerdings keine Infektiosität der Miracidien mehr nachweisen. Dies stimmt mit den Resultaten der vorliegenden Studie überein. Nach vier Stunden p. e. war keine schwimmende Miracidie mehr sichtbar. Im Laufe der vier Stunden wurde eine deutliche Geschwindigkeitsabnahme der Miracidien mikroskopisch beobachtet. Diese wurde in dieser Arbeit allerdings nicht objektiv erfasst. Je höher die Umgebungstemperatur, desto geringer war die Lebenszeit des Miracidiums. Es konnte allerdings auch ein Überleben von zwölf Stunden bei Raumtemperatur beobachtet werden, wenn die Miracidien keiner Schnecke ausgesetzt wurden. Ohne Wasser stirbt das Miracidium jedoch innerhalb von zwei Sekunden. Augenscheinlich schwimmt das *C. daubneyi* Miracidium etwas langsamer als das

*F. hepatica* Miracidium. Objektive Messungen fanden diesbezüglich aber nicht statt. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Erkenntnissen von SEY (1977) und DREYFUSS et al. (2015).

#### 4.3. Metacercarien

In der vorliegenden Studie war es gelungen, die produzierten Metacercarien unter Laborbedingungen bis zu 13 Wochen bei 4 °C zu lagern. Sie waren nachweislich nach diesem Zeitraum auch noch infektiös.

DEPLAZES et al. (2020) beschrieben ein Überleben von drei bis fünf Monaten bei genügend Feuchtigkeit in der Natur. Auch MORLEY (2017) berichtete von einer Überlebenszeit von Wochen bis Monaten der Metacercarien auf den Weiden, abhängig von ihren vorhandenen Glykogenspeichern. Parallel begründete er dies durch die positive Geotaxis der Cercarien, wodurch sich die Metacercarien hauptsächlich in der Nähe der Erdoberfläche befinden, die die optimalen Bedingungen bieten und sie so vor Austrocknung schützt. Auch die Bildung von Aggregaten von bis zu zwei Metacercarien minimiert das Risiko der Austrocknung (ABROUS et al., 2001). DREYFUSS et al. (2004) bestätigten in ihrer Feldstudie die Präferenz der *C. daubneyi* Metacercarien für die Erdoberfläche und tieferen Regionen. Diese Erkenntnisse stimmen mit den ermittelten Ergebnissen dieser Studie überein. Die Metacercarien wurden überwiegend am Boden oder am Quellmoos gesichtet. Der Klimawandel könnte in Zukunft jedoch einen Einfluss auf den Fundort der Metacercarien haben, indem er das starke Pflanzenwachstum fördert und somit die Metacercarien, die an den Pflanzen haften, vom Boden abhebt (MORLEY, 2017). Bisher wurden noch keine exakten Angaben zur Lagerungslänge und zum Überleben in der Natur der *C. daubneyi* Metacercarien dokumentiert. Die hohe Widerstandsfähigkeit und das lange Überleben der Metacercarien werden das Kontroll- und Behandlungsmanagement stark erschweren.

Die gemessene durchschnittliche Größe einer Metacercarie entsprach in dieser Studie 166,4 µm. Dies stimmt nicht mit den bekannten Größenangaben aus der Literatur überein. SEY (1977) beschrieb einen Durchmesser von 200 µm bei Metacercarien, die an Tag 55 p. i. ausgeschüttet worden und DREYFUSS et al. (2015) sogar einen Durchmesser von 250 µm. Allerdings kann man aus ihrer Studie nicht entnehmen, ob die Metacercarien durch eine natürliche Ausschüttung oder

einer Schneckensektion gewonnen wurden. Diese Größenunterschiede könnten auf mehrere Faktoren zurückzuführen sein, darunter die Umgebungsbedingungen während der Entwicklung, die genetische Variabilität und das Alter bzw. die Größe der Zwischenwirtschnecken. Weitere Forschung ist erforderlich, um die Ursachen dieser Größenunterschiede zu verstehen und ihre Auswirkungen auf die Parasit-Wirt-Interaktion zu klären.

Auch die beobachtete unterschiedliche Fragilität der *F. hepatica* und *C. daubneyi* Metacercarien sollte weiter untersucht werden. Hier könnte man an die Arbeit von OLIVER (2021) anschließen und den Aufbau der *C. daubneyi* Metacercarien anhand der Histologie und einem Elektronenmikroskop untersuchen und so die Unterschiede zu identifizieren.

#### **4.4. Weiterführende Diagnostik**

Diese Arbeit brachte erste Versuche zur Immunfluoreszenzfärbung der *C. daubneyi* Miracidien hervor. Es wurde hier zuerst nur das Lectin WGA aus *Triticum vulgare*, verwendet, welches bereits gute Resultate zum Anfärben der *F. hepatica* Miracidien lieferte (GEORGIEVA et al., 2016). Sie dokumentierten in ihrer Forschung identische Ergebnisse bei den *F. hepatica* Miracidien wie in dieser Studie bei den *C. daubneyi* Miracidien. Dies bestätigt, dass beide Trematodenmiracidien das Glykoprotein N-Acetylglukosamin an ihrer Oberfläche aufweisen. In weiteren Forschungen sollte man auf diesen Vorversuchen aufbauen und auch die Oberflächenglykoproteine der anderen Larvenstadien, wie Sporozysten, Redien und Cercarien, ermitteln, um herauszufinden, wie sich diese während der Entwicklung der unterschiedlichen Stadien verändern. Des Weiteren sollten in einer Studie die Oberflächenproteine von *G. truncatula* vor und nach einer Infektion mit *C. daubneyi* untersucht werden, um die Parasit-Zwischenwirt-Interaktion genauer zu verstehen und Informationen zur Chemotaxis des Miracidiums zu seinem Zwischenwirt zu erlangen. KALBE et al. (2000) haben Fucose und Galactose als Bestandteile der *F. hepatica* und *Trichobilharzia ocellata* miracidienanziehenden Glykoproteine identifiziert. Diese Erkenntnis fehlt bislang für das *C. daubneyi* Miracidium.

## 5. Fazit und Ausblick

Angesichts einer hohen Ausbreitungswahrscheinlichkeit der Paramphistomidose in Europa ist ein umfassendes Verständnis der führenden Panselegelart *C. daubneyi* von großer Bedeutung (HUSON et al., 2017).

Die Etablierung einer konstanten Schneckenzucht setzte einen wichtigen Grundstein zur Erforschung des Lebenszyklus von *C. daubneyi* im Zwischenwirt. Erwähnenswert ist an der Stelle, dass es zwar viele Beschreibungen der Haltung von Zwergschlammschnecken unter Laborbedingungen gibt, allerdings ist oft unklar, über wie viele Generationen die Schneckenpopulation tatsächlich aufgebaut werden konnte. So wurden Schnecken für Infektionsversuche in französischen Studien über Jahre aus natürlichen Habitaten gewonnen und nur für den Versuch selbst im Labor gehalten (AUGOT et al., 1996; ABROUS et al., 1999c; ABROUS et al., 2001; VIGNOLES et al., 2006; RONDELAUD et al., 2007a; DREYFUSS et al., 2008; RONDELAUD et al., 2013). Die vorliegende Studie beschreibt eine erfolgreiche Methode, *G. truncatula* unter Laborbedingungen, in 14 cm großen Glaspetrischalen mit gefiltertem Wasser, zu züchten und über mehrere Generationen stabil aufzubauen. Die Auswahl des optimalen künstlichen Habitats zum Aufbau einer Schneckenzucht unter Laborbedingungen wurde in dieser Studie anhand der längsten Überlebensdauer, dem stärksten Wachstum und der höchsten Reproduktionsrate getroffen. Für die optimale Haltung infizierter Schnecken bis Tag 30 p. i. eignete sich das Fließsystem in den 14 cm großen Glaspetrischalen. Die Überlebensrate der infizierten Schnecken an Tag 30 p. i. stieg um 12,6 % an, verbunden mit einem verringerten zeitlichen Reinigungsaufwand. Diese Methoden benötigten keinen konstanten Zugang zu einem natürlichen Habitat durch den Verzicht auf Erde und Quellwasser. Die präzise Kontrolle der entwickelten Umgebungsbedingungen ermöglicht es, die Überlebensdauer der Schnecken zu erhöhen, wodurch eine Population etabliert werden konnte, um experimentelle Infektion durchzuführen. Um die Schneckenzucht unter Laborbedingungen (noch) weiter zu optimieren sollten die drei Aspekte von VINARSKI und VÁZQUEZ (2023) befolgt werden: Berücksichtigung der amphibischen Lebensweise, Qualität des Futters und Wassers, sowie eine Verhinderung des Konkurrenzkampfes.

Die Durchführung von Infektionsversuchen mit *C. daubneyi* in Zwergschlammschnecken hat wertvolle Einblicke in die Entwicklung des Parasiten innerhalb des Zwischenwirtes und die Dynamik der Zwischenwirtinfektion

geliefert. Anhand der vorliegenden Studie konnten die Auswirkungen einer Infektion auf eine Schneckenpopulation unter Laborbedingungen untersucht werden. Diese Ergebnisse sind von großer Bedeutung und können dazu beitragen potenzielle Kontroll- und Bekämpfungsstrategien bereits auf Zwischenwirtebene zu entwickeln.

In einem weiteren Schritt wurde die Produktion und die mikroskopische Untersuchung der Larvenstadien von *C. daubneyi* innerhalb des Zwischenwirtes untersucht und lieferte entscheidende Aufschlüsse über den Entwicklungszyklus des Parasiten, sowie die Dynamik der Metacercarienproduktion. Dadurch konnte z. B. ermittelt werden, ab wann mit einem Cercarienaustritt zu rechnen ist. Die Erkenntnisse können Rückschlüsse auf die Parasit-Zwischenwirt-Dynamik in natürlichen Habitaten liefern. Die unterschiedlichen Überlebenszeiten der verschiedenen Stadien zeigten die Komplexität des Parasiten. Besonders die Metacercarien sollten in ihrer Überlebensspanne nicht unterschätzt werden (MORLEY, 2017), da sie für die Übertragung auf den Endwirt verantwortlich sind.

Mit dieser Arbeit gelang es erfolgreich, eine stabile Zwergschlammschneckenpopulation unter Laborbedingungen zu etablieren und infektiöse *C. daubneyi* Metacercarien zu produzieren. Die Metacercarienproduktion unter Laborbedingungen eröffnet neue Perspektiven für zukünftige Forschungsprojekte, denn die Möglichkeiten zur Diagnose und Therapie der Paramphistomidose sind noch immer eingeschränkt. Fehlende in-vivo-Modelle stellten bislang den begrenzenden Faktor zur weiteren Forschung dar (ATCHESON et al., 2020). Nun sind weitere Forschungen erforderlich und möglich, um experimentell die Endwirte mit variierenden Infektionsdosen von Metacercarien zu infizieren und Erkenntnisse zur Pathogenese, Präpatenz und Klinik zu erlangen. OLIVER (2021) beschrieb, dass das Wissen über die Immunologie der *C. daubneyi* Infektion ebenso begrenzt ist. In-vivo-Modelle mit den Endwirten sind auch hier notwendig, denn sie würden dieses Wissen erheblich erweitern und die Untersuchung der Immunantwort, sowohl bei chronischer als auch bei akuter Paramphistomidose ermöglichen. Wenn es gelingt, die Immunantwort des Wirts auf eine *C. daubneyi* Infektion zu erkennen, könnte nachfolgend mit der Impfstoffforschung begonnen werden. In einem weiteren Schritt sollte auch basierend auf der Studie von HUSON et al. (2021) angeknüpft werden und die Transkriptome der Larvenstadien im Zwischenwirt untersucht werden. Zukünftige

Forschungen sollten sich auf die weiterführende Untersuchung der Umweltfaktoren konzentrieren, die die Lebensräume der Zwergschlammschnecke und die Übertragung von *C. daubneyi* beeinflussen, um effektive Schutz- und Kontrollmaßnahmen zu entwickeln.

Experimentelle Co-Infektionen von *G. truncatula* mit *C. daubneyi* und *F. hepatica* unter kontrollierten Laborbedingungen und variierenden Umweltfaktoren könnten ebenfalls von hohem Interesse sein. Sie bieten die Möglichkeit zu untersuchen, inwiefern sich die Trematoden gegenseitig in ihrer Entwicklung beeinflussen und ob ihre Entwicklung sich unterscheidet.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Paramphistomidose ist eine weltweit verbreitete parasitäre Erkrankung von Wiederkäuern, welche in Europa hauptsächlich durch den Pansenegel, *Calicophoron daubneyi*, verursacht wird. Die Zwergschlammschnecke *Galba truncatula* spielt dabei als Zwischenwirt eine zentrale Rolle im Entwicklungszyklus. Die zunehmende Ausbreitung der Erkrankung in Europa in Kombination mit sehr eingeschränkten Behandlungsmöglichkeiten und unzureichendem Wissen über die Parasit-Zwischenwirt-Dynamik wirft viele Forschungsfragen auf.

Das Ziel dieser Dissertation war es, die Zucht von *Galba truncatula* unter Laborbedingungen zu etablieren, um eine Schneckenpopulation über mehrere Generationen aufzubauen. Aufgrund der amphibischen Lebensweise der Zwergschlammschnecke wurden unterschiedliche künstliche Habitats, wie ein offenes Aquarium, Glas- und Polystyrol-Petrischalen als geeignete Lebensräume unter Laborbedingungen getestet. Die Auswahl des optimalen künstlichen Habitats, die Glaspetrischale, wurde in dieser Studie anhand der Überlebensdauer, dem Wachstum und der Reproduktionsrate getroffen. Ein weiterer Schwerpunkt war die Entwicklung optimierter Umgebungsbedingungen, wie der Wasserqualität und -härte (100–250 mg/l  $\text{CaCO}_3$ ) durch den Vergleich von unterschiedlich aufbereitetem Wasser (gefiltertes, destilliertes Wasser und Leitungswasser). Besonders herausstechend waren in dieser Studie die Überlebensdauer der Schnecken im gefilterten Wasser (71,9 Tage) im Vergleich zu Schnecken im destillierten Wasser und Leitungswasser (36,6 und 29,4 Tage).

In der vorliegenden Studie wurde eine konstante Population von *Galba truncatula* unter Laborbedingungen durch die Zucht in 14 cm großen Glaspetrischalen mit 60 ml gefiltertem Wasser, vier Stängeln *Fontinalis antipyretica* und Süßgräsern etabliert. Alle Schnecken zeigten eine Nahrungspräferenz für getrockneten Salat. Die durchschnittliche Überlebensdauer lag mit 168,2 Tagen deutlich über der Lebenszeit der Schnecken in anderen künstlichen Habitats.

Der Aufbau der Schneckenpopulation unter Laborbedingungen setzte einen wichtigen Grundstein für experimentelle Infektionen mit *Calicophoron daubneyi*.

In dieser Studie wurden 243 Zwergschlammschnecken mit *Calicophoron daubneyi* Miracidien infiziert, um die Produktion von infektiösen Metacercarien unter Laborbedingungen zu etablieren. Infizierte Schnecken zeigten eine geringe Überlebensrate von 37,4 %. Durch die Entwicklung eines Durchflusssystems, das einen konstanten Wasseraustausch in den Glaspetrischalen sicherstellte, konnte diese auf 50 % erhöht werden. Bei einer Infektionsrate von 60 % schütteten nur sieben (10,3 %) von 68 Schnecken, die Tag 30 p. i. überlebten und mit zwei Miracidien infiziert worden waren, Cercarien aus. Es zeigte sich eine intermittierende Ausschüttung über mehrere Tage, die ab Tag 35 p. i. startete. Signifikant war die Reduzierung der Metacercarienzahl um durchschnittlich zehn Metacercarien pro Ausschüttung innerhalb der ersten vier Ausschüttungen. Durchschnittlich wurden 106 Metacercarien mit einer Größe von 166,4 µm pro Schnecke gewonnen. Überraschend war, dass diese nach einer Lagerung im Wasser von 13 Wochen noch nachweisbar vital und infektiös waren.

Die in dieser Studie verwendeten Pansenegeler wurden alle aus Kot von infizierten Wiederkäuern gewonnen und zur Entwicklung des Miracidiums zwölf bis 15 Tage bei 27 °C im Dunkeln inkubiert. Auch nach einem Jahr Lagerung in Leitungswasser bei 4 °C schlüpften noch 10 % der Miracidien.

Aufgrund der – verglichen mit anderen Studien – frühen Parasitenausschüttung der Schnecke und der intermittierenden Ausschüttungsdynamik wird eine schnellere Entwicklung des Parasiten im Zwischenwirt und eine damit verbundene, voranschreitende Anpassung von *Calicophoron daubneyi* an *Galba truncatula* diskutiert. Ebenso spricht die geringere Überlebenszeit infizierter Schnecken für eine hohe Infektiosität des Parasiten gegenüber dem Zwischenwirt. Das lange Überleben der Metacercarien und der Pansenegeler wird das Kontroll- und Behandlungsmanagement stark erschweren und sollte dringend beachtet werden.

Zusammenfassend hat diese Arbeit wertvolle Einblicke in die Entwicklung des Parasiten innerhalb des Zwischenwirtes und der Dynamik der Zwischenwirtinfektion geliefert. Diese Ergebnisse sind von großer Bedeutung und können dazu beitragen potenzielle Bekämpfungsstrategien bereits auf Zwischenwirtebene zu entwickeln, sowie experimentell Endwirte mit variierenden Infektionsdosen von Metacercarien zu infizieren, um Erkenntnisse zur Pathogenese, Präpatenz und Klinik im Endwirt zu erlangen.

## VII. SUMMARY

Paramphistomidosis is a globally widespread parasitic disease of ruminants, which in Europe is mainly caused by the rumen fluke, *Calicophoron daubneyi*. The dwarf mud snail *Galba truncatula* plays a central role in the lifecycle as an intermediate host. The increasing spread of the disease in Europe in combination with very limited treatment options and insufficient knowledge about the parasite-intermediate host dynamics raises many research questions.

The aim of this dissertation was to establish the breeding of *Galba truncatula* under laboratory conditions in order to build up a snail population over several generations. Due to the amphibious lifestyle of the dwarf mud snail, different artificial habitats such as an open aquarium, glass and polystyrene petri dishes were tested as suitable habitats under laboratory conditions. The selection of the optimal artificial habitat, the glass petri dish, was made on the basis of the factors survival rate, growth and reproduction rate. A second focus was the development of optimized environmental conditions, such as water quality and hardness (100–250 mg/l CaCO<sub>3</sub>) by comparing water with different treatment (filtered, distilled and tap water). Particularly striking in this study was the survival time of snails in filtered water (71.9 days) compared to snails in distilled water and tap water (36.6 and 29.4 days).

In the present study, a constant population of *Galba truncatula* was established under laboratory conditions by breeding in 14 cm glass petri dishes with 60 ml filtered water, four stems of *Fontinalis antipyretica* and sweet grasses. All snails showed a food preference for dried lettuce. The average survival time of 168.2 days was significantly longer than that of snails in other artificial habitats.

The establishment of the snail population under laboratory conditions laid an important foundation for experimental infections with *Calicophoron daubneyi*.

In this study, 243 dwarf mud snails were infected with *Calicophoron daubneyi* miracidia to establish the production of infective metacercariae under laboratory conditions. Infected snails showed a low survival rate of 37.4 %. By developing a water flow system that ensured a constant exchange in the glass petri dishes, this survival rate could be increased to 50 %. At an infection rate of 60 %, only seven (10.3 %) of 68 snails that survived day 30 p. i. and had been infected with two

miracidia shed cercariae. There was an intermittent shedding over several days, which started on day 35 p. i. Significant was the reduction in the number of metacercariae by an average of ten metacercariae per shedding within the first four sheddings. On average, 106 metacercariae with a size of 166.4  $\mu\text{m}$  were obtained per snail. Unexpectedly, these were still measurably vital and infectious after 13 weeks of storage in water.

The rumen fluke eggs used in this study were all obtained from feces of infected ruminants and incubated for 12 to 15 days at 27 °C in the dark to develop the miracidium. Even after one year of storage in tap water at 4 °C, 10 % of the miracidia still hatched.

Due to the – compared to other studies – early parasite shedding of the snail and the intermittent dynamics of shedding, a faster development of the parasite in the intermediate host and an associated progressive adaptation of *Calicophoron daubneyi* to *Galba truncatula* is discussed. The shorter survival of infected snails also suggests a high infectivity of the parasite to the intermediate host. The long survival of metacercariae and rumen fluke eggs will greatly complicate control and treatment management and should be kept in mind.

In summary, this work has provided valuable insights into the development of the parasite within the intermediate host and the dynamics of intermediate host infection. These results are of great importance and may help to develop potential control strategies, starting at the intermediate host level, as well as to experimentally infect definitive hosts with varying infective doses of metacercariae in order to gain insights into pathogenesis, prepatency and clinic in the definitive host.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

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

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. Veterinary Research 1999a; 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 1999b; 85: 765-9.

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

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.

Alstedt U, Voigt K, Jäger MC, Knubben-Schweizer G, Zablotski Y, Strube C, Wenzel C. Rumen and Liver Fluke Infections in Sheep and Goats in Northern and Southern Germany. Animals (Basel) 2022; 12: 876.

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.

Atcheson E, Skuce P, Oliver N, McNeilly T, Robinson M. *Calicophoron daubneyi*—The Path Toward Understanding Its Pathogenicity and Host Interactions. Frontiers in Veterinary Science 2020; 7: 606.

Augot D, Abrous M, Rondelaud D, Dreyfuss G. *Paramphistomum daubneyi* and *Fasciola hepatica*: the redial burden and cercarial shedding in *Lymnaea truncatula* subjected to successive unimiracidial cross-exposures. Parasitology Research 1996; 82: 623-7.

Boray JC. (1963) The ecology of *Fasciola hepatica* with particular reference to its intermediate host in Australia. Proceedings of the 17<sup>th</sup> World Veterinary Congress, Hannover: 709-15.

Boray JC. Studies on the relative susceptibility of some lymnaeids to infection with *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* and on the adaptation of *Fasciola* spp. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 1966; 60: 114-24.

Boray JC. Experimental fascioliasis in Australia. Advances in Parasitology 1969; 7: 95-210.

Bosco A, Ciuca L, Maurelli MP, Vitiello P, Cringoli G, Prada JM, Rinaldi L. Comparison of Mini-FLOTAC, Flukefinder and sedimentation techniques for detection and quantification of *Fasciola hepatica* and *Calicophoron daubneyi* eggs using spiked and naturally infected bovine faecal samples. Parasites & Vectors 2023; 16: 260.

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

Červená B, Anettová L, Nosková E, Pafčo B, Pšenková I, Javorská K, Příhodová P, Ježková J, Václavek P, Malát K, Modrý D. The winner takes it all: dominance of *Calicophoron daubneyi* (Digenea: Paramphistomidae) among flukes in Central European beef cattle. *Parasitology* 2022; 149: 612-21.

Chipev N, Vassilev I, Samnaliev P. Interactions between *Paramphistomum* c.f. *daubneyi* Dinnik, 1962 and *Fasciola hepatica* L. in successive cross-invasions of *Lymnaea (Galba) truncatula*. *Khelmintologiya* 1985; 20: 80-8.

Chryssaifidis AL, Fu Y, De Waal T, Mulcahy G. Standardisation of egg-viability assays for *Fasciola hepatica* and *Calicophoron daubneyi*: A tool for evaluating new technologies of parasite control. *Veterinary Parasitology* 2015; 210: 25-31.

Dar Y, Rondelaud D, Vignoles P, Dreyfuss G. *Pseudosuccinea columella*: age resistance to *Calicophoron daubneyi* infection in two snail populations. *Parasite* 2015; 22: 6.

De Jesús-Navarrete A, Aguilar Sanchez DJC, Ortiz-Hernández MC. Growth and shell hardness of the apple snail *Pomacea flagellata* Say, 1829, reared at three calcium concentrations. *PeerJ* 2023; 11: e14840.

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.

Del Rosario M, Periz J, Pavlou G, Lyth O, Latorre-Barragan F, Das S, Pall GS, Stortz JF, Lemgruber L, Whitelaw JA, Baum J, Tardieux I, Meissner M, 2019. Apicomplexan F-actin is required for efficient nuclear entry during host cell invasion. *EMBO Reports*; 20: e48896.

Deplazes P, Joachim A, Mathis A, Strube C, Taubert A, von Samson-Himmelstjerna G, Zahner H. Diagnostik. In: *Parasitologie für die Tiermedizin*, 4. überarbeitete Auflage ednStuttgart: Georg Thieme Verlag KG 2020a: 542-77.

Deplazes P, Joachim A, Mathis A, Strube C, Taubert A, von Samson-Himmelstjerna G, Zahner H. Parasiten und Parasitosen – Metazoa: Helminthen und Myxozoa. In: Parasitologie für die Tiermedizin, 4. überarbeitete Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG 2020b: 166-87.

Devos J, Vassiloglou B, Amenna-Bernard N, Marcotty T. Paramphistomosis in sheep; Natural infection of lambs by *Calicophoron daubneyi*. Revue de médecine vétérinaire 2013; 11: 528-35.

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 2007; 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, Abrous M, Vignoles P, Rondelaud D. *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: vertical distribution of metacercariae on plants under natural conditions. Parasitology Research 2004; 94: 70-3.

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

Dreyfuss G, Vignoles P, Rondelaud D. *Fasciola hepatica*: the infectivity of cattle-origin miracidia had increased over the past years in central France. Parasitology Research 2007; 101: 1157-60.

Dreyfuss G, Vignoles P, Rondelaud D. *Paramphistomum daubneyi*: the number of sporocysts developing in experimentally and naturally infected *Galba truncatula*. Parasitology Research 2008; 103: 345-9.

Dreyfuss G, Vignoles P, Rondelaud D, Cabaret J. (2015) The mud snail (*Galba truncatula*) Ecology, parasitism and control. Lambert Academic Publishing, Saarbrücken, Germany. 3-170.

Dreyfuss G, Vignoles P, Rondelaud D. *Galba truncatula* (OF Müller, 1774)(Gastropoda, Lymnaeidae): the colonization of new stations on acid soil by low numbers of snails. *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology* 2021; 57: 26.

Eduardo SL. The taxonomy of the family Paramphistomidae Fischoeder, 1901 with special reference to the morphology of species occurring in ruminants. III. Revision of the genus *Calicophoron* Näsmark, 1937. *Systematic Parasitology* 1983; 5: 25-79.

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.

Forbes A. Rumen fluke: past, present and future. *Livestock* 2018: 227-31.

Forstmaier T, Knubben-Schweizer G, Strube C, Zablotski Y, Wenzel C. Rumen (*Calicophoron/Paramphistomum* spp.) and Liver Flukes (*Fasciola hepatica*) in Cattle-Prevalence, Distribution, and Impact of Management Factors in Germany. *Animals (Basel)* 2021; 11: 2727.

Frömming E (1956) *Biologie der mitteleuropäischen Süßwasserschnecken*. Duncker & Humbolt, Berlin. 118-29.

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.

Gayo V, Cancela M, Acosta D. Maintenance of Life Cycle Stages of *Fasciola hepatica* in the Laboratory. *Methods in Molecular Biology* 2020; 2137: 1-14.

Georgieva K, Georgieva S, Mizinska Y, Stoitsova SR. *Fasciola hepatica* miracidia: lectin binding and stimulation of in vitro miracidium-to-sporocyst transformation. *Acta Parasitologica* 2012; 57: 46-52.

Georgieva K, Georgieva L, Mizinska-Boevska Y, Stoitsova SR. Study of surface carbohydrates in *Galba truncatula* tissues before and after infection with *Fasciola hepatica*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2016; 111: 475-83.

Georgieva K, Hristov P, Tsocheva N, Nanev V. Inhibition of *Fasciola hepatica* infection in *Galba truncatula* snails by application of monosaccharides to the aquatic environment. *Biologia* 2019; 74: 463–7.

Gold D. Growth and survival of the snail *Lymnaea truncatula*: effects of soil type, culture medium and *Fasciola hepatica* infection. *Israel Journal of Zoology* 1980; 29: 163-70.

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 LC, 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.

Hohorst W. Die Biotope der Leberegelschnecke (*Galba truncatula*) und ihre Besiedlung. 1969; 9.

Horak IG. Paramphistomiasis of domestic ruminants. *Advances in Parasitology* 1971; 9: 33-72.

Huson KM, Oliver NAM, Robinson MW. Paramphistomosis of Ruminants: An Emerging Parasitic Disease in Europe. *Trends in Parasitology* 2017; 33: 836-44.

Huson KM, Atcheson E, Oliver NAM, Best P, Barley JP, Hanna REB, McNeilly TN, Fang Y, Haldenby S, Paterson S, Robinson MW. Transcriptome and Secretome Analysis of Intra-Mammalian Life-Stages of *Calicophoron daubneyi* Reveals Adaptation to a Unique Host Environment. *Molecular & Cell Proteomics* 2021; 20: 100055.

Iglesias-Pineiro J, Gonzalez-Warleta M, Castro-Hermida JA, Cordoba M, Gonzalez-Lanza C, Manga-Gonzalez 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.

Kalbe M, Haberl B, Haas W. Snail host finding by *Fasciola hepatica* and *Trichobilharzia ocellata*: compound analysis of "miracidia-attracting glycoproteins". *Experimental Parasitology* 2000; 96: 231-42.

Kendall SB. The life-history of *Limnaea truncatula* under laboratory conditions. *Journal of Helminthology* 1953; 27: 17-28.

Knubben-Schweizer G, Jäger M, Pfister K. Die Bekämpfung des großen Leberegels beim Rind. *Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Großtiere/Nutztiere* 2011; 39: 179-85.

Knubben-Schweizer G, Torgerson PR. Bovine fasciolosis: control strategies based on the location of *Galba truncatula* habitats on farms. *Veterinary Parasitology* 2015; 208: 77-83.

Küchler AM. Untersuchung möglicher Zwischenwirte von *Calicophoron daubneyi* und *Fasciola hepatica* mittels Multiplex-PCR. Diss. med. vet. 2021. Ludwig-Maximilians-Universität München.

Kumar V (1999) Trematode Infections and Diseases of Man and Animals. Springer Science & Business Media. 300-5.

Magalhaes KG, Passos LK, Carvalho Odos S. Detection of *Lymnaea columella* infection by *Fasciola hepatica* through Multiplex-PCR. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004; 99: 421-4.

Mage C, Bourgne H, Toullieu JM, 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. Veterinary Research 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.

Martinez-Ibeas AM, Gonzalez-Warleta M, Martinez-Valladares M, Castro-Hermida JA, Gonzalez-Lanza C, Minambres B, Ferreras C, Mezo M, Manga-Gonzalez 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.

Martinez-Ibeas AM, Munita MP, Lawlor K, Sekiya M, Mulcahy G, Sayers R. Rumen fluke in Irish sheep: prevalence, risk factors and molecular identification of two paramphistome species. BMC Veterinary Research 2016; 12: 143.

Mason C, Stevenson H, Cox A, Dick I, Rodger C. Disease associated with immature paramphistome infection in sheep. Veterinary Record 2012; 170: 343-4.

Mehl S (1932) Die Lebensbedingungen der Leberegelschnecke (*Galba truncatula* Müller) Untersuchungen über Schale, Verbreitung, Lebensgeschichte, natürliche Feinde und Bekämpfungsmöglichkeiten. Verlag DR. F. P. Datterer & Cie. (Sellier), Freising-München.

Millar M, Colloff A, Scholes S. Disease associated with immature paramphistome infection. *Veterinary Record* 2012; 171: 509-10.

Moazeni M, Ahmadi A, Mootabi Alavi A. A new method for laboratory rearing of *Galba truncatula*, the intermediate host of *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 2018; 253: 12-5.

Morley NJ. Paramphistomosis of Ruminants: The Role of Free-Living Metacercariae. *Trends Parasitology* 2017; 34: 97-8.

Naranjo-Lucena A, Munita Corbalán MP, Martínez-Ibeas AM, McGrath G, Murray G, Casey M, Good B, Sayers R, Mulcahy G, Zintl A. Spatial patterns of *Fasciola hepatica* and *Calicophoron daubneyi* infections in ruminants in Ireland and modelling of *C. daubneyi* infection. *Parasites & Vectors* 2018; 11: 531.

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.

Oliver NAM. The development of the rumen fluke, *Calicophoron daubneyi*, within the mammalian host. Diss. med. vet. 2021. Queen's University Belfast, Ireland.

Ollerenshaw CB. Some observations on the epidemiology of fascioliasis in relation to the timing of molluscicide applications in the control of the disease. *Veterinary Record* 1971; 88: 152-64.

Paraud C, Gaudin C, Pors I, Chartier C. Efficacy of oxyclozanide against the rumen

fluke *Calicophoron daubneyi* in experimentally infected goats. The Veterinary Journal 2009; 180: 265-7.

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

Roberts EW. Studies on the life-cycle of *Fasciola hepatica* (Linnaeus) and of its snail host, *Limnaea (Galba) truncatula* (Müller), in the field and under controlled conditions in the laboratory. Annals of Tropical Medicine & Parasitology 1950; 44: 187-206.

Rojo-Vázquez FA, Meana A, Valcárcel F, Martínez-Valladares M. Update on trematode infections in sheep. Veterinary Parasitology 2012; 189: 15-38.

Rolfe PF, Boray JC. Chemotherapy of paramphistomosis in cattle. Australian Veterinary Journal 1987; 64: 328-32.

Rondelaud D, Denève C, Belfaiza M, Mekroud A, Abrous M, Moncef M, Dreyfuss G. Variability in the prevalence of infection and cercarial production in *Galba truncatula* raised on a high-quality diet. Parasitology Research 2004; 92: 242-5.

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, Fousi M, Vignoles P, Moncef M, Dreyfuss G. Optimization of metacercarial production for three digenean species by the use of petri dishes for raising lettuce-fed *Galba truncatula*. Parasitology Research 2007b; 100: 861-5.

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, Titi A, Vignoles P, Mekroud A, Dreyfuss G. Consequence of temperature changes on cercarial shedding from *Galba truncatula* infected with *Fasciola hepatica* or *Paramphistomum daubneyi*. *Parasite* 2013; 20: 10.

Rondelaud D, Mouzet R, Vignoles P, Dreyfuss G, Cabaret J. The production of mammalian trematode infective stages by the snail *Galba truncatula*. *Journal of Helminthology* 2014; 88: 105-11.

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, Bronsvoort BM, 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.

Schröter JS. (1779) Die Geschichte der Flußconchylien: mit vorzüglicher Rücksicht auf diejenigen, welche in den thüringischen Wassern leben. Gebauer.

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.

Sey O. Life-cycle and geographical distribution of *Paramphistomum daubneyi* Dinnik, 1962 (Trematoda: Paramphistomata). *Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae* 1977; 27: 115-30.

Sey O. Revision of the amphistomes of European ruminants. *Parasitologia hungarica* 1980; 13: 13-25.

Skuce PJ, Morgan ER, van Dijk J, Mitchell M. Animal health aspects of adaptation to climate change: beating the heat and parasites in a warming Europe. *Animal* 2013; 7: 333-45.

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 EL, Mozley A. A Culture method for *Lymnaea truncatula*. *Nature* 1948; 161: 894.

Titi A, Rondelaud D, Mekroud A, Vignoles P, Dreyfuss G. Natural light influences cercarial emergence of *Calicophoron daubneyi* but not that of *Haplometra cylindracea* from temperature-challenged *Galba truncatula*. *Parasitology Research* 2014; 113: 3557-63.

van Leeuwen CHA. Speeding up the snail's pace: bird-mediated dispersal of aquatic organisms. Chapter 7. A snail on four continents: bird-medated dispersal of a parasite vector? Diss. med. vet. 2012. Radboud University, Nijmegen, Netherlands.

Vignoles P, Dreyfuss G, Rondelaud D. Redial growth and cercarial productivity of *Fasciola hepatica* in three species of young lymnaeid snails. *Journal of Helminthology* 2002a; 76: 269-72.

Vignoles P, Dreyfuss G, Rondelaud D. Larval development of *Fasciola hepatica* in experimental infections: variations with populations of *Lymnaea truncatula*. *Journal of Helminthology* 2002b; 76: 179-83.

Vignoles P, Alarion N, Bellet V, Dreyfuss G, Rondelaud D. A 6- to 8-day

periodicity in cercarial shedding occurred in some *Galba truncatula* experimentally infected with *Fasciola hepatica*. Parasitology Research 2006; 98: 385-8.

Vignoles P, Rondelaud D, Dreyfuss G. *Paramphistomum daubneyi*: production dynamics and infectivity of metacercariae originating from snails dissected at regular intervals. Journal of Helminthology 2008; 82: 175-80.

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.

Vinarski MV, Vázquez AA (2023) The Lymnaeidae: A Handbook on Their Natural History and Parasitological Significance. Springer Nature.

Wenzel C, Küchler A, Strube C, Knubben-Schweizer G. Paramphistomidosis - an overview on epidemiology and clinical signs. Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Großtiere/Nutztiere 2019; 47: 184-91.

Wiedermann S, Harl J, Fuehrer HP, Mayr S, Schmid J, Hinney B, Rehbein S. DNA barcoding of rumen flukes (Paramphistomidae) from bovines in Germany and Austria. Parasitology Research 2021; 120: 4061-6.

Yanygina L. Mass mortality of invasive snails: Impact of nutrient release on littoral water quality. Diversity 2021; 13: 362.



## IX. ANHANG

### 1. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Entwicklungszyklus des Pansenegels Calicophoron daubneyi: .....</i>	<i>5</i>
<i>Abbildung 2: Ruminale Form der Paramphistomidose mit anhaftenden Pansenegeln an den Pansenzotten .....</i>	<i>8</i>
<i>Abbildung 3: Mikroskopische Untersuchung der Trematodeneier in einer Kotprobe: Calicophoron daubneyi Ei (links) und Fasciola hepatica Ei (rechts) .....</i>	<i>9</i>
<i>Abbildung 4: Calicophoron daubneyi Procercarie (unreife Cercarie) gewonnen durch eine Sektion einer experimentell infizierten Galba truncatula .....</i>	<i>26</i>
<i>Abbildung 5: Frisch gesammelte adulte Pansenegel aus dem Pansen einer geschlachteten Kuh.....</i>	<i>28</i>
<i>Abbildung 6: Offenes Aquarium zur Zucht von Galba truncatula modifiziert nach MOAZENI et al. (2018): a) Ansicht von oben (links), b) Ansicht von vorne (rechts) .....</i>	<i>30</i>
<i>Abbildung 7: Übergangsbecken zur Zucht von Galba truncatula um eine Einschleppung von Krankheiten zu verhindern.....</i>	<i>32</i>
<i>Abbildung 8: Gestapelte Glaspetrischalen mit einem Durchmesser von 9 cm und 14 cm zur Zucht von Galba truncatula.....</i>	<i>33</i>
<i>Abbildung 9: Glaspetrischale basierend auf DREYFUSS et al. (2015) nach Wasserentnahme .....</i>	<i>34</i>
<i>Abbildung 10: Fließsystem in Petrischalen zur Haltung von Zwergschlammschnecken..</i>	<i>35</i>
<i>Abbildung 11: Autofluoreszenz der Pansenegeler (gelbe Pfeile) .....</i>	<i>38</i>
<i>Abbildung 12: Penetration des Miracidiums (gelber Pfeil) in die a) Kopfregion oder b) Mantelregion der Schnecke .....</i>	<i>41</i>
<i>Abbildung 13: Ausschüttung von Trichobilharzia spp. (blaue Pfeile) aus einer Galba truncatula.....</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 14: Calicophoron daubneyi Cercarie aus einer experimentell infizierten Galba truncatula.....</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 15: Calicophoron daubneyi Metacercarien am Quellmoos.....</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 16: Verlaufskurve der Überlebensrate von 21 Schnecken im offenen Aquarium über einen Zeitraum von 101 Tagen.....</i>	<i>52</i>
<i>Abbildung 17: Verlaufskurven der Überlebensraten von je sieben Schnecken in drei identischen künstlichen Habitaten mit verschiedenen Wasserarten: gefiltertes Wasser, Leitungswasser und destilliertes Wasser .....</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 18: Verlaufskurve der Überlebensrate von 218 in Polystyrol-Petrischalen gehaltenen potenziell mit Calicophoron daubneyi infizierten Schnecken über einen</i>	

<i>Zeitraum von neun Wochen .....</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 19: Verlaufskurven der Überlebensrate von insgesamt 65 Schnecken aufgeteilt in fünf Glaspetrischalen mit je zehn oder 15 Schnecken .....</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 20: Größe von Zwergschlammschnecken in zwei unterschiedlichen künstlichen Habitaten unter Laborbedingungen (erstellt von Yury Zablotski) .....</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 21: Gemessene Größe von 20 Schnecken in 14 cm großen Glaspetrischalen unter Laborbedingungen innerhalb von 82 Tagen .....</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 22: Wachstumsverlauf von Zwergschlammschnecken in einem offenen Aquarium und in Petrischalen, aufgeteilt in zwei Gruppen g (<math>\geq 2</math> mm) und k (<math>&lt; 2</math> mm) je nach ihrer Anfangsgröße (erstellt von Yury Zablotski) .....</i>	<i>56</i>
<i>Abbildung 23: Durchschnittliches Wachstum von 13 Schnecken mit einer Startgröße von 1,5 mm im offenen Aquarium über 52 Tage .....</i>	<i>57</i>
<i>Abbildung 24: Wachstum von 24 Schnecken mit einer Startgröße von 1 mm in 14 cm großen Glaspetrischalen innerhalb von 15 Tagen .....</i>	<i>57</i>
<i>Abbildung 25: Zwei Laichpakete von Zwergschlammschnecken, gehalten unter Laborbedingungen am Boden einer Glaspetrischale .....</i>	<i>59</i>
<i>Abbildung 26: Zwei Tage alter Laich einer in einer Glaspetrischale gehaltenen Zwergschlammschnecke .....</i>	<i>59</i>
<i>Abbildung 27: Sieben Tage alter Laich einer in einer Glaspetrischale gehaltenen Zwergschlammschnecke .....</i>	<i>60</i>
<i>Abbildung 28: Virtuelles Gel der PCR von verendeten, experimentell infizierten Zwergschlammschnecken mit positivem Signal für Calicophoron daubneyi-DNA in Banden C1, F1, G1, H1, A2, B2 und C2 basierend auf dem Protokoll von KÜCHLER (2021).....</i>	<i>65</i>
<i>Abbildung 29: Virtuelles Gel der multiplex PCR zur Identifizierung von Calicophoron daubneyi und Fasciola hepatica-DNA basierend auf dem Protokoll von KÜCHLER (2021).....</i>	<i>70</i>
<i>Abbildung 30: Überblick der ausgeschütteten Anzahl Calicophoron daubneyi Metacercarien pro Schnecke und Tag p. i. nach experimenteller Infektion von Galba truncatula (erstellt von Yury Zablotski).....</i>	<i>73</i>
<i>Abbildung 31: Überblick der Dauer der Ausschüttung von Calicophoron daubneyi Metacercarien pro Schnecke nach experimenteller Infektion von Galba truncatula (erstellt von Yury Zablotski) .....</i>	<i>74</i>
<i>Abbildung 32: Verlaufskurve der Anzahl Calicophoron daubneyi Metacercarien pro Schnecke nach experimenteller Infektion von Galba truncatula (erstellt von Yury Zablotski) .....</i>	<i>75</i>
<i>Abbildung 33: Verlauf der Anzahl Calicophoron daubneyi Metacercarien der ersten vier Ausschüttungen pro Schnecke nach experimenteller Infektion von Galba truncatula a)</i>	

Überblick, b) lineares Regressionsmodel zur Darstellung des signifikanten Abfalls ( $p = 0,008$ ) der Metacercarienzahl (erstellt von Yury Zablotski) .....	76
Abbildung 34: Schlupfrate von Miracidien aus <i>Calicophoron daubneyi</i> Eiern (gewonnen aus Kot eines Rindes), welche über den Zeitraum eines Jahres genutzt wurden .....	77
Abbildung 35: Schlupfrate der <i>Calicophoron daubneyi</i> Miracidien bei entsprechender Inkubationszeit bei 27 °C in Dunkelheit zwischen elf und 20 Tagen nach Lichtreiz .....	78
Abbildung 36: Zwei entwickelte <i>Calicophoron daubneyi</i> Miracidien im Ei kurz vor dem Schlupf .....	78
Abbildung 37: Frisch geschlüpfte <i>Calicophoron daubneyi</i> Miracidium mit Flimmerepithel (Pfeil) .....	79
Abbildung 38: Frisch geschlüpfte <i>Calicophoron daubneyi</i> Miracidium direkt unter einem embryonierten Ei nach 14 Tagen Inkubation .....	79
Abbildung 39: Schlupf eines <i>Calicophoron daubneyi</i> Miracidiums (gelber Pfeil) innerhalb von 26 Sekunden (auch in Video 1 zu sehen) .....	80
Abbildung 40: <i>Calicophoron daubneyi</i> Cercarie nach Ausschüttung aus <i>Galba truncatula</i> , a) Cercarie mit gleichfarbiger grauer Spitze und Schwanz (blaue Pfeile), b) Metacercarie (oben), Cercarie (unten) .....	81
Abbildung 41: a, b) <i>Calicophoron daubneyi</i> Metacercarie .....	82
Abbildung 42: <i>Fasciola hepatica</i> Cercarie kurz vor dem Schwanzabwurf .....	83
Abbildung 43: <i>Fasciola hepatica</i> Metacercarien a) einzelne Metacercarie, b) Metacercarien mit abgeworfenen Schwänzen (gelbe Pfeile) .....	83
Abbildung 44: Vergleich beider Trematodenmetacercarien: <i>Calicophoron daubneyi</i> Metacercarie (links) und <i>F. hepatica</i> Metacercarie (rechts) .....	84
Abbildung 45: Quetschung beider Trematodenmetacercarien, <i>Calicophoron daubneyi</i> Metacercarie (links) und <i>Fasciola hepatica</i> Metacercarie (rechts); die Metacercarie von <i>Fasciola hepatica</i> hält dem leichten Druck stand, während diejenige von <i>Calicophoron daubneyi</i> zerbricht .....	84
Abbildung 46: Lectin-FITC markiertes <i>Calicophoron daubneyi</i> Miracidium: (a) Hellfeld, (b) Phasenkontrast, (c) Lectin-FITC Färbung detektiert im GFP Kanal .....	85
Abbildung 47: Lectin-FITC markiertes <i>Calicophoron daubneyi</i> Miracidium: (a) Hellfeld, (b) Phasenkontrast, (c) Lectin-FITC Färbung detektiert im GFP Kanal .....	86
Abbildung 48: Lectin-FITC markierte <i>Calicophoron daubneyi</i> Miracidien, im GFP Kanal detektiert .....	86
Abbildung 49: Hoechst markiertes <i>Calicophoron daubneyi</i> Miracidium: (a) Hellfeld, (b) Phasenkontrast, (c) Hoechst-Färbung detektiert im DAPI Kanal .....	87
Abbildung 50: Primärer und sekundärer Antikörper markiertes <i>Calicophoron daubneyi</i> Miracidium: (a) Phasenkontrast, (b) DAPI Kanal (c) DAPI + GFP Kanal .....	88
Abbildung 51: Primärer und sekundärer Antikörper markiertes <i>Calicophoron daubneyi</i>	

---

<i>Miracidium: (a)Phasenkontrast, (b) DAPI Kanal .....</i>	<i>89</i>
<i>Abbildung 52: Primärer und sekundärer Antikörper markiertes Calicophoron daubneyi</i>	
<i>Miracidium: (a)Phasenkontrast, (b) DAPI Kanal + GFP Kanal.....</i>	<i>89</i>
<i>Abbildung 53: Autofluoreszenzen einer Calicophoron daubneyi Metacercarie: (a) GFP</i>	
<i>Kanal, (b) TxRed Kanal, (c) DAPI Kanal.....</i>	<i>90</i>

## 2. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Künstliche Habitats und Laborbedingungen zur Zucht von Galba truncatula</i>	31
<i>Tabelle 2: Versuchsaufbau der ersten vier Infektionsversuche von Galba truncatula mit Calicophoron daubneyi Miracidien.....</i>	62
<i>Tabelle 3: Versuchsaufbau des Vergleichsversuchs der Infektion von Galba truncatula mit Calicophoron daubneyi und Fasciola hepatica Miracidien am Tag der Infektion .....</i>	63
<i>Tabelle 4: Verbleibende Schneckenanzahl an Tag 30 p. i. beim Vergleichsversuch der Infektion von Galba truncatula mit Calicophoron daubneyi und Fasciola hepatica .....</i>	64
<i>Tabelle 5: Versuchsaufbau des Vergleichsversuchs der Infektion von Galba truncatula mit Calicophoron daubneyi und Fasciola hepatica Miracidien ab Tag 30 p. i. ....</i>	64
<i>Tabelle 6: Versuchsbedingungen der unterschiedlichen elf experimentellen Infektionen von Galba truncatula mit Calicophoron daubneyi (Versuche mit erfolgreicher Metacercarienproduktion sind fett gedruckt) .....</i>	66
<i>Tabelle 7: Mittels PCR ermittelten Nachweis von Calicophoron daubneyi Infektion in Galba truncatula.....</i>	69
<i>Tabelle 8: Calicophoron daubneyi Metacercarienausschüttung dreier experimentell infizierter Schnecken (P, O und R) im August 2022 .....</i>	71
<i>Tabelle 9: Calicophoron daubneyi Metacercarienausschüttung einer experimentell infizierten Schnecke (4f) im Dezember 2022 .....</i>	71
<i>Tabelle 10: Calicophoron daubneyi Metacercarienausschüttung einer experimentell infizierten Schnecke (2) im März 2023 .....</i>	72
<i>Tabelle 11: Calicophoron daubneyi Metacercarienausschüttung einer experimentell infizierten Schnecke (1) im April 2023 .....</i>	72
<i>Tabelle 12: Calicophoron daubneyi Cercarien- und Metacercarienausschüttung einer experimentell infizierten Schnecke (8) im Juni 2023.....</i>	73
<i>Tabelle 13: Verwendete Primer-Sequenzen mit Literaturnachweise zur Speziesbestimmung und Nachweis von Calicophoron daubneyi-DNA in experimentell infizierten Zwergschlammschnecken basierend auf (KÜCHLER, 2021) .....</i>	137
<i>Tabelle 14: Schneckenidentifizierung ab Tag 30 p. i. (Schnecken mit erfolgreicher Metacercarienproduktion sind fett gedruckt) .....</i>	137

### 3. Videoverzeichnis

*Video 1: Schlupf von zwei Miracidien: Schlupf von zwei Calicophoron daubneyi Miracidien von innerhalb 18 Sekunden und 26 Sekunden nach Inkubation von 14 Tagen bei 27 °C in Dunkelheit. Einsehbar unter: [https://cast.itunes.uni-muenchen.de/clips/taUcyY9TTD/vod/high\\_quality.mp4](https://cast.itunes.uni-muenchen.de/clips/taUcyY9TTD/vod/high_quality.mp4) (letzter Zugriff: 21.03.2024)*

*Video 2: Calicophoron daubneyi Miracidiumschlupf: Schlupf eines Calicophoron daubneyi Miracidium nach Inkubation von 14 Tagen bei 27 °C in Dunkelheit. Einsehbar unter: [https://cast.itunes.uni-muenchen.de/clips/rBX0mHNcJ3/vod/high\\_quality.mp4](https://cast.itunes.uni-muenchen.de/clips/rBX0mHNcJ3/vod/high_quality.mp4) (letzter Zugriff: 21.03.2024)*

*Video 3: Calicophoron daubneyi Cercarie: ausgeschüttete Calicophoron daubneyi Cercarie nach experimenteller Infektion von Galba truncatula an Tag 54 p. i.. Einsehbar unter: [https://cast.itunes.uni-muenchen.de/clips/ROomL3jH8x/vod/high\\_quality.mp4](https://cast.itunes.uni-muenchen.de/clips/ROomL3jH8x/vod/high_quality.mp4) (letzter Zugriff: 21.03.2024)*

Alle Videos können online auf der LMUCast Plattform, Dissertation Verena Kerstin Elbert, mit folgendem Link eingesehen werden:

<https://cast.itunes.uni-muenchen.de/vod/playlists/7EPztqeMI.html>

und auf dem mitgelieferten USB-Stick.

#### 4. Tabellen des Anhangs

**Tabelle 13: Verwendete Primer-Sequenzen mit Literaturnachweise zur Speziesbestimmung und Nachweis von *Calicophoron daubneyi*-DNA in experimentell infizierten Zwergschlammschnecken basierend auf (KÜCHLER, 2021)**

Name	Spezies und Gen	Forward- und Reverse- Primer-Sequenz (5' → 3')	bp	Acc. No.	Literatur-nachweis
Cd-Cox Neu	<i>C. daubneyi</i> COX-1	for. GTTTGTGTGGTTTGCCACGG rev. CTACCCCAAGCAGCCACTAC	169	JQ815200	(JONES et al., 2015)
Fh-Cox Neu	<i>F. hepatica</i> COX-1	for. GCCAGGTCCTCAACATAATA rev. AGCACAAAATCCTGATCTTACCA	452	AF216697	Modifizierte Sequenz aus MARTÍNEZ-IBEAS et al. (2011)

**Tabelle 14: Schneckenidentifizierung ab Tag 30 p. i. (Schnecken mit erfolgreicher Metacercarienproduktion sind fett gedruckt)**

Schnecken ID ab Tag 30 p. i.	Infektionsdatum	Ursprung	Habitat der Elterngeneration
K	Jun 22	Schale 2	Sonntraten
L	Jun 22	Schale 2	Sonntraten
N	Jun 22	Schale 2	Sonntraten
<b>O</b>	<b>Jun 22</b>	<b>Schale 2</b>	<b>Sonntraten</b>
<b>P</b>	<b>Jun 22</b>	<b>Schale 2</b>	<b>Sonntraten</b>
<b>R 1-4</b>	<b>Jun 22</b>	<b>Schale 2</b>	<b>Sonntraten</b>
3a	Nov 22	Schale 4	Sonntraten
3b	Nov 22	Schale 4	Sonntraten
3c	Nov 22	Schale 4	Sonntraten
3d	Nov 22	Schale 4	Sonntraten
3e	Nov 22	Schale 8	Sonntraten
3f	Nov 22	Schale 8	Sonntraten
3g	Nov 22	Schale 8	Sonntraten
4a	Nov 22	Schale 4	Sonntraten
4b	Nov 22	Schale 4	Sonntraten
4c	Nov 22	Schale 4	Sonntraten
4d	Nov 22	Schale 4	Sonntraten
4e	Nov 22	Schale 8	Sonntraten
<b>4f</b>	<b>Nov 22</b>	<b>Schale 8</b>	<b>Sonntraten</b>

Fortsetzung Tabelle 14			
4g	Nov 22	Schale 8	Sonntraten
1	Jan 23	Schale 14	Dietramszell
<b>2</b>	<b>Jan 23</b>	<b>Schale 14</b>	<b>Dietramszell</b>
3	Jan 23	Schale 4	Sonntraten
4	Jan 23	Schale 4	Sonntraten
5	Jan 23	Schale 14	Dietramszell
6	Jan 23	Schale 14	Dietramszell
7	Jan 23	Schale 14	Dietramszell
8	Jan 23	Schale 14	Dietramszell
<b>1</b>	<b>Feb 23</b>	<b>Schale 23</b>	<b>Dietramszell</b>
2	Feb 23	Schale 23	Dietramszell
3	Feb 23	Schale 10	Sonntraten
3	Mai 23	Schale K1	Freising
7	Mai 23	Schale K1	Freising
<b>8</b>	<b>Mai 23</b>	<b>Schale K1</b>	<b>Freising</b>
10	Mai 23	Schale K1	Freising

## **X. DANKSAGUNG**

Mein größter Dank gilt Frau Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer für die Überlassung dieses spannenden Themas. Danke für das von Anfang an in mich gesetzte Vertrauen und deine herausragende Unterstützung, die weit über die fachliche Betreuung hinausging. Danke für dein immer offenes Ohr und die hilfreichen Ratschläge in allen Lebenslagen. Dank dir habe ich eine Begeisterung für die Zwergschlammschnecke entwickelt, die ich nicht mehr missen möchte. Auch danke für den lehrreichen Ausflug nach Frankreich. Vielen Dank, dass du dein Herzblut in diese Dissertation gesteckt hast, ohne dich wäre sie nicht das geworden, was sie jetzt ist.

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Dr. Frank Weber für deine Unterstützung und deine kreativen Ideen (meist zwischen Tür und Angel), ohne die das Fließsystem gar nicht entstanden wäre. Du kamst stets mit neuen Vorschlägen und hast mich motiviert nicht aufzugeben, auch wenn die Resultate manchmal nicht dankbar waren.

Weiterhin möchte ich mich beim gesamten Labor-Team bedanken. Danke schön liebe Sandra, dass du immer ein offenes Ohr für mich hattest und mich super ins „Labor 1 x 1“ eingeführt hast. Ohne deine Mithilfe wären die Versuche gar nicht zustande gekommen.

Auch euch, liebe Marina und Rebecca, danke ich von ganzem Herzen. Danke, dass ihr euch auch so für die Zwergschlammschnecken begeistern konntet und mir immer zur Seite standet. Der Aufbau der Schneckenpopulation wäre ohne euren Einsatz unmöglich gewesen.

Des Weiteren möchte ich mich bei der Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Markus Meissner und seinem ganzen Labor-Team bedanken. Danke für deine kreativen Einfälle und dass du mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standest. Auch danke Javier, für die kurze Einführung in die Fluoreszenzmikroskopie und dass du deine Nachmittage für meinen Miracidienschlupf geopfert hast.

Danke an alle Schneckensammlerinnen, die mich stets mit neuen Schnecken vom Feld unterstützt haben.

Vielen Dank auch an Dr. Yury Zablotzki für die statistische Auswertung der

„Schneckendaten“.

Ein großer Dank geht auch an meine Mitdotorandinnen und Mitdotoranden, insbesondere dir, Leah, mit deinem Projekt wird diese wichtige Forschung weitergeführt.

Danke auch an Herrn Dr. Christoph Wenzel, du hast diese Arbeit sehr wertgeschätzt und direkt eine “Verwendung” für die Metacercarien gefunden. Ich freue mich auf eine weitere Zusammenarbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Freundinnen und Freunden bedanken. Danke, dass ihr mir die ganze Zeit zur Seite standet und euch all die Jahre mein Gejammer über sterbende oder lebende Schnecke angehört habt. Insbesondere danke, Tess, für deine grenzenlose Freundschaft und deine ganze Unterstützung.

Danke Oskar, dass du mich während der ganzen Dissertation begleitet und stets für gute Laune gesorgt hast.

Zum Schluss möchte ich mich noch bei meiner Familie bedanken. Danke, Mama und Papa, dass ihr nie an mir gezweifelt habt und danke Mama für die kulinarische Unterstützung in einer stressigen Zeit. Ganz besonders danke dir, liebster Bruder, du warst immer für mich da und hattest eine Lösung für jedes Problem. Danke, dass du immer an mich geglaubt hast.