



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Bestimmung der Prävalenz von *Fascioloides magna* (BASSI 1875) und anderen digenen Trematoden in *Galba truncatula* (O.F. MÜLLER 1774) an drei ausgewählten Standorten im Bereich Orth/Donau (Niederösterreich).

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Verfasserin:	Michaela Haider
Matrikel-Nummer:	0301415
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt):	Genetik und Mikrobiologie
Betreuerin / Betreuer:	Univ.-Doz. Mag. Dr. Julia Walochnik Univ.-Prof. Dr. Christine Frank

Wien, im August 2010

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1. Die Unterklasse Digenea	1
1.1.1. Historisches	1
1.1.2. Ökologie und Verbreitung	2
1.1.2.1. Geografische Verbreitung und Expansion	4
1.1.2.2. Regulation von Ökosystemen durch digene Trematoden	5
1.1.3. Lebenszyklus und Morphologie	5
1.1.3.1. Eier	6
1.1.3.2. Mirazidien	6
1.1.3.3. Sporozysten	8
1.1.3.4. Redien	9
1.1.3.5. Zerkarien	10
1.1.3.6. Metazerkarien	11
1.1.3.7. Adulttiere	12
1.1.4. Genetische Identifizierung digener Trematoden	15
1.1.5. Phylogenie und Systematik	16
1.1.6. Digenea als Krankheitserreger	18
1.1.6.1. Humanpathogene	18
1.1.6.2. Tierpathogene	20
1.2. <i>Galba truncatula</i>	21
1.2.1. Allgemein	21
1.2.2. <i>Galba truncatula</i> als Zwischenwirt	22
1.2.3. Auswirkungen von Infektionen mit digenen Trematoden auf ihre Schneckenwirte	24
1.2.4. Identifizierung und Quantifizierung digener Trematoden in Schnecken	25
1.3. <i>Fascioloides magna</i>	27
1.3.1. Morphologische Merkmale	27
1.3.2. Phylogenie und Systematik	27
1.3.3. Geografische Verbreitung	28
1.3.4. Lebenszyklus	28
1.3.5. Wirtstiere	29
1.3.5.1. Endwirte	29
1.3.5.2. Zwischenwirte	30
1.3.6. Situation in Österreich	31
1.4. Fragestellung	31

2. Material und Methoden 33

2.1. Sammlung der Überträgerschnecken	33
2.2. Makroskopische und mikroskopische Untersuchungen an <i>Galba truncatula</i>	35
2.2.1. Vermessung der Schalenhöhe	35
2.2.2. Schneckensektion und Stichprobenentnahme	36
2.3. Molekularbiologische Untersuchungen	37
2.3.1. Primerentwicklung	37
2.3.1.1. Allgemeine Kriterien des Primerdesigns	37
2.3.1.2. Trematodenuniversal-Primerpaar	38
2.3.1.3. <i>Fascioloides magna</i> -Primerpaar	42
2.3.1.4. <i>Fasciola hepatica</i> -Primerpaar	44
2.3.2. Probenauswahl	45
2.3.2.1. Isolierte Trematodenstadien	45
2.3.2.2. Stichproben	46
2.3.3. DNA-Isolierung	49
2.3.3.1. Positivkontrollen	49
2.3.3.2. Isolierte Trematodenstadien	50
2.3.3.3. Stichproben	52
2.3.4. PCR	52
2.3.4.1. PCR-Etablierung	52
2.3.4.2. Proben-PCRs	55
2.3.5. Agarose-Gelelektrophorese	56
2.3.6. Aufreinigung der Banden	56
2.3.7. Sequenzierung	57
2.3.7.1. Etablierung der Probenaufbereitung	57
2.3.7.2. Testung der Proben	59
2.3.7.3. Datenanalyse	60

3. Ergebnisse 67

3.1. Makroskopische Untersuchungen an der Schneckenpopulation	67
3.1.1. Standortverteilung gesammelter <i>Galba truncatula</i>	67
3.1.2. Verteilung gesammelter <i>Galba truncatula</i> auf die Sammlungsmonate	70
3.1.3. Schneckendichten einzelner Untersuchungsmonate	70
3.1.4. Saisonale Größenverteilung untersuchter <i>Galba truncatula</i>	72
3.2. Mikroskopische parasitologische Untersuchungen	74
3.2.1. Mikroskopische Detektion und morphologische Bestimmung von Digenea in <i>Galba truncatula</i>	74
3.2.2. Standortverteilung infizierter <i>Galba truncatula</i>	76
3.2.3. Saisonalität des Befalls	76
3.3. Primerdesign	77

3.3.1. TremF/TremR	77
3.3.1.1. Lokale Alignments mittels BLAST	77
3.3.1.2. Globale Alignments mittels EMBOSS	79
3.3.2. MagnaF/MagnaR	80
3.3.2.1. Lokale Alignments mittels BLAST	80
3.3.2.2. Globale Alignments mittels EMBOSS	82
3.3.2.3. Vergleich der Amplikonlängen in GeneDoc	83
3.4. Molekularbiologische Untersuchungen	83
3.4.1. DNA-Isolierung	83
3.4.1.1. Positivkontrollen	83
3.4.1.2. Isolierte Trematodenstadien	84
3.4.1.3. Stichproben	84
3.4.2. Primer-Testdurchläufe	84
3.4.2.1. Spezifität der eingesetzten Primerpaare	84
3.4.2.2. Sensitivität und Robustheit der eingesetzten Primerpaare	88
3.4.3. Proben-PCRs	89
3.4.3.1. Trematodenuniversal-Primerpaar	89
3.4.3.2. <i>Fascioloides magna</i> -Primerpaar	90
3.4.3.3. <i>Fasciola hepatica</i> -Primerpaar	91
3.4.4. Sequenzierung	91
3.4.4.1. Positivkontrollen	91
3.4.4.2. Trematodenuniversal-Primerpaar	92
3.4.4.3. <i>Fascioloides magna</i> -Primerpaar	92
3.4.4.4. <i>Fasciola hepatica</i> -Primerpaar	92
3.4.5. Sequenzauswertung	93
3.4.5.1. Lokale Alignments der GenBank-Kontrollen	93
3.4.5.2. Alignments der Positivkontrollen	94
3.4.5.3. Auswertung der Probensequenzen	95
3.5. Vergleich der mikroskopischen und molekularbiologischen Bestimmungen	103
3.6. Kombinierte Ergebnisse von Mikroskopie und Molekularbiologie	104
3.6.1. Digenea allgemein	104
3.6.1.1. Prävalenz digener Trematoden in <i>Galba truncatula</i>	104
3.6.1.2. Standortverteilung infizierter <i>Galba truncatula</i>	105
3.6.1.3. Saisonalität des Befalls	106
3.6.2. <i>Fascioloides magna</i>	108
3.6.2.1. Prävalenz von <i>Fascioloides magna</i> in <i>Galba truncatula</i>	108
3.6.2.2. Standortverteilung infizierter <i>Galba truncatula</i>	108
3.6.2.3. Saisonalität des Befalls	109
4. Diskussion	110
4.1. Populationsdynamische Aspekte von <i>Galba truncatula</i>	110
4.1.1. Mengenmäßige Standortverteilung	110
4.1.2. Reproduktionszyklus	111
4.1.3. Anzahl und Dichte pro Untersuchungsmonat	113
4.2. Digenea in <i>Galba truncatula</i>	114

4.2.1. Prävalenz	114
4.2.1.1. Ordnung Echinostomida	114
4.2.1.2. Ordnungen Plagiorchiida und Strigeida	118
4.2.1.3. Andere Funde	119
4.2.2. Standortverteilung infizierter <i>Galba truncatula</i>	119
4.2.3. Saisonalität des Befalls	120
4.2.3.1. Gehäusehöhe und Infektionsrate	122
4.3. Bedeutung der Faszolidenfunde für Mensch und Tier	123
4.4. Vergleich der mikroskopischen und molekularbiologischen Methodik	125
 5. Zusammenfassung	 129
 6. Anhang	 134
6.1. Glossar	134
6.2. Abkürzungsverzeichnis	143
6.3. Literatur	145
6.4. Danksagung	160
6.5. Curriculum Vitae	161

1. Einleitung

1.1. Die Unterklasse Digenea

1.1.1. Historisches

Die vermutlich größte Gruppe an metazoischen Endoparasiten, die Digenea CARUS 1863, wurde im Vergleich zu anderen Helminthengruppen relativ spät entdeckt. So beschrieb beispielsweise schon HIPPOKRATES (ca. 460-370 v. Chr.) Bandwürmer, die erste Beobachtung eines digenen Trematoden fand aber erst im Jahre 1379 statt, als JEAN DE BRIE *Fasciola hepatica* LINNAEUS 1758 in der Leber von Schafen beobachtete. Über 400 Jahre später wurde der Name „Trematoda“ von RUDOLPHI (1808) eingeführt (ANDREWS, 1999, CRIBB et al., 2001).

Die Aufklärung des komplizierten Lebenszyklus digener Trematoden erstreckte sich über einen Zeitraum von mehr als 200 Jahren. Eine Übersicht der Meilensteine in der Trematodenforschung findet sich unter anderem in den Arbeiten von GUPTA, 1984, ANDREWS, 1999 und CRIBB et al., 2001.

Einen der ersten Beiträge zur Aufdeckung des Lebenszyklus lieferte BIDLOO (1698). Er berichtete über das Vorkommen von Leberegel in den Gallengängen verschiedener Tierarten und auch im Menschen, war allerdings der Auffassung, dass juvenile Würmer über das Blut in die Leber einwandern. Die tatsächliche Wanderroute von *F. hepatica* wurde erst über 200 Jahre später von SINITSIN (1914) aufgedeckt.

Zum damaligen Zeitpunkt wurde bereits vermutet, dass bestimmte Trematodenstadien im Wasser leben. Fünfundsiebzig Jahre nach BIDLOOS Beobachtungen beschrieb MÜLLER (1773) erstmals Zerkarien, er hielt die Larvenstadien allerdings für eigenständige Adulttiere.

Zur Erkenntnis, dass Zerkarien Larvenstadien digener Trematoden sind, trug BOJANUS im Jahr 1818 einen entscheidenden Anteil bei. So bemerkte er, dass einige der von ihm sezierten Schnecken Redien beherbergten, aus welchen nach einiger Zeit Zerkarien schlüpften. In der Originalarbeit beschrieb BOJANUS die beobachteten Redien als „royal-gelbe-Würmer“. Erst im Jahre 1855 erhielt das Stadium seinen heutigen Namen, zur Ehre von FRANCESCO REDI, welcher unter anderem 1668 die erste Zeichnung von *F. hepatica* anfertigte (AMICI, 2001).

MEHLIS berichtete 1831 von der Entwicklung „zilienbesetzter Embryos“ aus Trematodeneiern, welche sich freischwimmend im Wasser fortbewegen konnten. Das beobachtete Trematodenstadium wurde im Jahre 1892 von BRAUN „Mirazidium“ benannt. Schon ein Jahr nach MEHLIS Beobachtung schlug NORDMAN (1832) vor, dass Mirazidien aktiv ihre Wirtstiere jagen und Endwirte deshalb durch eine orale Aufnahme von Trematodeneiern nicht infiziert werden können. Die letztere Annahme wurde 30 Jahre später durch ein Experiment von SIMONDS (1880) mit Schafen und Leberegeleiern bestätigt.

Das Wissen über die Existenz und die Eigenschaften einzelner Trematodenstadien musste nun noch zu einem Gesamtbild zusammengefügt werden. Mitte des 19. Jahrhunderts war LEUCKART (1852 in TAYLOR, 1937) wahrscheinlich der erste, der eine konkrete Verbindung zwischen bestimmten Zerkarien und adulten Trematoden herstellen konnte. Nachdem NITZSCH bereits im Jahre 1807 erstmals von der zerkariellen Enzystierung berichtete, gelang es knapp 50 Jahre später LA VALETTE ST GEORGE (1855) durch die Verfütterung von enzystierten Zerkarien an Vögel adulte Digenea aus diesen zu gewinnen.

Nahezu zeitgleich wurde auch die Theorie anerkannt, dass digene Trematoden zusätzliche Zwischenwirte für ihren Entwicklungszyklus brauchen (KÜCHENMEISTER, 1852). Nachdem BOJANUS bereits knapp 40 Jahre zuvor (1818) die Freisetzung von Zerkarien aus Redien beschrieb, gelang nun auch die Beobachtung der Entwicklung von Mirazidien zu Redien in ihren Schneckenwirten (WAGENER, 1857). WAGENER (1857) berichtete zudem erstmals von der Penetration der Schneckenwirte durch Mirazidien.

LEUCKART (1881, 1882) und THOMAS (1881, 1882) gelang schließlich die Rekonstruktion des Lebenszyklus eines digenen Trematoden – nämlich von *F. hepatica*.

1.1.2. Ökologie und Verbreitung

Alle Parasiten sind hinsichtlich ihrer Überlebensfähigkeit, ihrer Reproduktion und ihrer Transmission direkt und/oder indirekt auf geeignete Umweltbedingungen angewiesen (OLSEN, 1974). Der hochkomplexe Lebenszyklus digener Trematoden umfasst üblicherweise sowohl freilebende Parasitenstadien, als auch Stadien

innerhalb von Wirtstieren und ist deshalb in unterschiedlicher Weise von bestimmten Voraussetzungen der externen und internen Umgebung abhängig.

Ein wichtiger externer Umweltfaktor im Lebenszyklus digener Trematoden ist die Verfügbarkeit von Gewässern bzw. Feuchtigkeit. Ein Grund hierfür ist unter anderem, dass selbst Eier alpiner Trematodenarten kurze Austrocknungsperioden nicht überstehen. Digene Trematoden können sich deshalb ausschließlich in Habitaten reproduzieren, welche ein Mindestmaß an Feuchtigkeit aufweisen (GALAKTIONOV & DOBROVLSKIJ, 2003). Neben Gewässern spielen auch die Lichtintensität und Lufttemperatur eine wichtige Rolle im Lebenszyklus digener Trematoden. Es kann beispielsweise der Mirazidienschlupf von *F. hepatica* durch eine hohe Lichtintensität stimuliert werden (ROBERTS, 1950 [zit. in GALAKTIONOV & DOBROVLSKIJ, 2003]). Eine Regulation des Schlüpfmechanismus durch Umweltfaktoren oder ihren Fluktuationen kann eine relativ synchrone Freisetzung von Larven im Biotop, und damit eine temporäre Erhöhung der Mirazidienkonzentration bewirken (GALAKTIONOV & DOBROVLSKIJ, 2003). Auch die Lufttemperatur beeinflusst eine grundlegende Schlüsselkomponente des Transmissionserfolgs digener Trematoden. So führt ein Anstieg der Lufttemperatur innerhalb des für Parasiten und Wirtstier tolerierbaren Temperaturbereichs beinahe immer zu einer Erhöhung der Zerkarienproduktion im ersten Zwischenwirt (z.B. SHOSTAK & ESCH, 1990, LO & LEE, 1996 [zit. in POULIN, 2006], UMADEVI & MADHAVI, 1997). Die Zerkarienqualität bleibt hierbei, zumindest bei Vertretern der Familie Echinostomatidae LOOSS, 1899, durch ein gegenläufiges Wechselspiel von Infektiosität und Überlebensfähigkeit der Zerkarien innerhalb eines Temperaturbereichs von 15-30°C nahezu konstant (EVANS, 1985, MCCARTHY, 1999 [zit. in POULIN, 2006]).

Die Bedeutung externer ökologischer Charakteristika für verschiedene digene Trematodenarten kann man auch an der erfolgreichen Entwicklung sogenannter Remote sensing (RS) und geografischer Informationssysteme (GIS) sehen. In einer GIS-basierten Risikoanalyse über den Amerikanischen Riesenleberegel *Fascioloides magna* (BASSI 1875) im Bereich der Donau-Auen östlich von Wien wurden beispielsweise feuchte Wiesen im Nahbereich von dynamischen Gewässern mit hohen Wilddichten als potentiell hochinfektiöse Weidegründe postuliert

(RECKENDORFER & GROISS, 2006), und einige Risikogebiete durch parasitologische Untersuchungen als solche bestätigt (SATTMANN & HÖRWEIG, 2006). Auch die jährliche Inzidenz von Fasziole in den Endwirten ist von ökologischen Charakteristika abhängig. So beeinflussen im Fall von *F. hepatica* die Lufttemperatur, die Niederschlagsmenge und/oder die potentielle Evapotranspiration sowohl die Populationsdynamik der Zwischenwirtschnecken, als auch die Parasitenpopulation auf Niveau der freilebenden Parasitenstadien, sowie der Stadien innerhalb des Schneckenwirts (MAS-COMA et al., 2009).

1.1.2.1. Geografische Verbreitung und Expansion

Digene Trematoden sind ubiquitär vorkommende Parasiten (CRIBB et al., 2001). Die Ausbreitung einzelner Digenea-Arten ist unter anderem von der Anpassungsfähigkeit an neue Umweltbedingungen und Wirtstiere abhängig.

Die physiologische und physikalische Umwelt geeigneter Wirtstiere kann deren Parasiten Stimuli für den Eischlupf und das Wachstum von Larvenstadien, sowie Nahrung und ein Habitat bieten, welches ihre Reproduktion begünstigt. Andererseits kann ein potentielles Wirtstier auf die Präsenz von Parasiten mit einer Antigenproduktion reagieren, die den Parasiten davon abhalten kann, sich anzusiedeln und zu reproduzieren (OLSEN, 1974). Fehlwirte können zudem frühzeitig versterben, was unter anderem auf eine mangelhafte Anpassung des Parasiten an sein Wirtstier zurückgeführt werden kann (BAYNE & LOKER, 1987 [zit. in SORENSEN & MINCHELLA, 2001]). Eine erfolgreiche Reproduktion und Transmission des Parasiten ist deshalb nur möglich, wenn adäquate Bedingungen in externer und interner Umwelt vorliegen (OLSEN, 1974).

Ein Beispiel hierfür ist die Ausbreitung des ursprünglich in Nordamerika beheimateten Amerikanischen Riesenleberegels *F. magna* in zahlreichen europäischen Ländern (RAJKOVIĆ-JANJE et al., 2008). Die dafür notwendigen Adaptionsprozesse an neue Wirtstierarten, sowie an unterschiedliche klimatische Verhältnisse und Vegetation, verzögerten allerdings die Ausbreitung des Parasiten innerhalb Europas (KOTRLY & KOTRLÁ, 1980).

Eine geografische Expansion der ursprünglichen Zwischen- und/oder Endwirte kann deshalb eine Neubesiedlung von Gebieten erleichtern. So ist beispielsweise die

Expansion von *F. hepatica* von Europa auf andere Kontinente unter anderem auf die geografische Expansion der europäischen Hauptzwischenwirtsschnecke *Galba truncatula* (O. F. MÜLLER 1774) zurückzuführen (MAS-COMA et al., 2005).

1.1.2.2. Regulation von Ökosystemen durch digene Trematoden

Neben der Abhängigkeit von bestimmten Umweltbedingungen vermögen digene Trematoden auch selbst wichtige Funktionen von Ökosystemen zu beeinflussen. Manche Arten können unter bestimmten Umständen die Abundanz natürlicher Tierpopulationen (JENSEN & MOURITSEN, 1992, FREDENSBORG et al., 2004), sowie die Abundanz, Zusammensetzung und Struktur von natürlichen Tiergemeinschaften (MOURITSEN & POULIN, 2002) regulieren. Es gibt zudem Hinweise, dass auch interspezifische Konkurrenz von Wirtstierarten (CALVO-UGARTEBURU & McQUAID, 1998) und die Interaktionen zwischen Räubern und Beute (MOURITSEN & POULIN, 2002) durch digene Trematoden modifiziert werden können.

1.1.3. Lebenszyklus und Morphologie

Der komplexe Entwicklungszyklus digener Trematoden umfasst einen Generationswechsel, welcher mit einem obligaten Wechsel zwischen Endwirt und meist zwei Zwischenwirten verbunden ist. Der erste Zwischenwirt ist nahezu immer ein Mollusk (meist ein Gastropod), die Rolle des zweiten Zwischenwirtes können verschiedene Vertebraten und Evertrebraten übernehmen, als Endwirt dient üblicherweise ein Vertebrat. Digenea parasitieren in allen fünf Vertebratengruppen (Fische, Amphibien, Reptilien, Vögel, Säugetiere), wobei 99 Familien (67%) jeweils ausschließlich in einer einzigen Vertebratengruppe parasitieren (BRAY, 2008a).

Der Lebenszyklus einzelner Digenea-Arten kann stark variieren. Neben der unterschiedlichen Anzahl und Art der Wirtstiere unterscheiden sich die Zyklen auch in ihrer Kombination der vorkommenden Trematodenstadien. Detaillierte Beschreibungen verschiedener Lebenszyklen, sowie der einzelnen Parasitenstadien finden sich unter anderem in CHENG, 1986, ANDREWS, 1999 (*F. hepatica*), GRACZYK & FRIED, 1999 (*F. hepatica*), MEHLHORN & PIEKARSKI, 2002, LOOS-FRANK & GOTTSTEIN, 2006, sowie ECKERT et al., 2008.

1.1.3.1. Eier

Die mit einer äußerst widerstandsfähigen, harten Schale versehenen Eier verschiedener Digenea-Arten können unterschiedliche Größen, Farben und Formen aufweisen und auf verschiedenen Wegen von den Endwirten in die Umwelt entlassen werden. Dabei können die Eier entweder bereits vollständig embryoniert freigesetzt werden (z.B. *Trichobilharzia* sp.), oder die Embryonierung des fertilisierten Ovums muss erst durch verschiedene Umweltfaktoren, wie beispielsweise durch Temperatur, Feuchtigkeit oder Lichtintensität, stimuliert werden (z.B. *Fasciola* sp.).

Üblicherweise von ovoidförmiger Gestalt, sind die meisten Eier mit einer deckelartigen Kappe, dem sogenannten Operculum, versehen. Wird dieser Deckel abgestoßen, kann das erste Larvenstadium, das sogenannte Mirazidium, das Ei verlassen. Mirazidien von *F. hepatica* verfügen beispielsweise über apikale Drüsen, welche nach Lichtstimulation proteolytische Enzyme sekretieren, wodurch ein Teil der Eischale verdaut wird (BUZZELL, 1983 [zit. in GRACZYK & FRIED, 1999]). Das fertig entwickelte Mirazidium wird anschließend durch den osmotischen Druckunterschied zwischen Innen- und Außenseite des Eies freigesetzt.

1.1.3.2. Mirazidien

Aus den Eiern schlüpfen ca. 30-200 µm große Mirazidien, auch als „Wimpernlarven“ bezeichnet, welche das erste Larvenstadium darstellen. Die Larven sind von länglich-ovaler Gestalt und mit einer artspezifisch variablen Anzahl an abgeflachten, zilienbesetzten Epidermalplatten bedeckt.

Bereits intrauterin embryonierte Eier müssen intakt vom ersten Zwischenwirt (meist Schnecken) oral aufgenommen werden, die Mirazidien schlüpfen nachfolgend in dessen Darm (z.B. *Dicrocoelium dendriticum* [RUDOLPHI 1819]). Findet hingegen die Embryonierung des Eies in der Umwelt statt, schlüpfen die Larven in der Außenwelt und können sich durch ihre zilienbesetzte Epidermis schwimmend im Wasser fortbewegen (z.B. *F. hepatica*). Die Zilien sind in regelmäßigen, longitudinalen Reihen auf den Epidermalplatten angeordnet (KØIE et al., 1976), unter welchen sich eine zirkuläre, sowie longitudinale Muskulatur befindet.

Mirazidien verfügen über eine Reihe verschiedener Sinnesorgane, wie Augenflecken und sensorische Papillen, welche Informationen über Nervenfasern an ein großes zephalisches Ganglion weiterleiten. Mithilfe von Photo-, Chemo-, Tango- und Statorezeption kann sich das Mirazidium im Biotop orientieren und seinen ersten Zwischenwirt, vermutlich auf chemotaktische Weise, finden.

Als Beispiel zur Orientierungsfähigkeit und Wirtsfindung dieser Larvenstadien soll nachfolgend der Vergleich zwischen Mirazidien von *F. hepatica* und dessen nahem Verwandten *Fasciola gigantica* COBBOLD 1855 angeführt werden. So ist bekannt, dass Mirazidien von *F. hepatica* eine positive Phototaxis aufweisen. Diese Affinität zum Licht bewirkt, dass sich die Mirazidien nicht am Grund von Gewässern aufhalten. Somit ist eine höhere Wahrscheinlichkeit gegeben, dass die Mirazidien auf ihre Zwischenwirtschnecke *G. truncatula* treffen, da sich diese amphibisch lebende Schnecke normalerweise nicht am Gewässergrund aufhält. Im Gegensatz dazu verhalten sich Mirazidien von *F. gigantica* aus Afrika photophob, was sie mit einer höheren Wahrscheinlichkeit zu ihrem Hauptzwischenwirt *Lymnaea natalensis* KRAUSS 1848, einer Schnecke die den Gewässergrund besiedelt, führt (TAYLOR, 1964 [zit. in ANDREWS, 1999]).

Im Lebenszyklus digener Trematoden ist es essentiell, dass das Mirazidium so schnell wie möglich einen geeigneten Zwischenwirt findet, in welchem eine asexuelle Vermehrung stattfindet. Stirbt die Larve bevor ein geeignetes Wirtstier gefunden wurde, ist der Lebenszyklus unterbrochen. So verenden beispielsweise Mirazidien von *F. hepatica* innerhalb von 24 Stunden, wenn kein geeignetes Wirtstier gefunden wurde (HOPE CAWDERY et al., 1978, THOMAS, 1883a, 1883b [zit. in Andrews, 1999]). Die Lebensspanne von Mirazidien ist von den Umweltbedingungen abhängig und durch die begrenzten Energiereserven limitiert. Die einzige Energiequelle von Mirazidien ist ein in den Epithelialplatten konzentrierter Vorrat an Glykogen, welcher für das Schlüpfen, die schwimmende Fortbewegung und die Penetration der Schnecken benötigt wird (GINETSINSKAYA, 1988 [zit. in GRACZYK & FRIED, 1999]). Das exkretorische System von Mirazidien besteht aus Protonephridien, Abfallstoffe werden durch zwei laterale Exkretionsporen in die Außenwelt befördert.

Nachdem das Mirazidium ein geeignetes Wirtstier gefunden hat, dient ein Drüsensystem der aktiven Penetration der Epidermis des Wirtstieres und der Verankerung in dessen Gewebe. Am anterioren Körperende von Mirazidien befindet sich eine Apikaldrüse, welche sich durch eine mobile, einstülpbare, muskuläre Apikalpapille (Terebratorium) entleert. Neben den Sekreten der Apikaldrüse unterstützen auch die Sekrete von Lateraldrüsen, welche durch Kanäle mit der Spitze des Terebratoriums in Verbindung stehen (BUZZELL, 1983 [zit. in GRACZYK & FRIED, 1999]), den Penetrationsprozess. Während des Einbohrens in den Zwischenwirt streifen die Mirazidien vieler Trematodenarten ihre Zilien ab.

Nach Penetration und Migration zur Lokalisierungsstelle (GINETSINSKAYA, 1988, CHIPEV, 1993 [zit. in GRACZYK & FRIED, 1999]), beginnt sich die nächste Generation aus den meist posterior im Mirazidium positionierten Keimballen, vermutlich ein Konglomerat an omnipotenten Stammzellen, zu entwickeln.

1.1.3.3. Sporozysten

Im Schneckenwirt wächst das Mirazidium meist zu einer verzweigten oder unverzweigten, sack-, wurstförmigen oder ovoiden Muttersporozyste heran. Der Transformationsprozess vom Mirazidium zur Muttersporozyste dauert bei *F. hepatica* unter optimalen Temperaturbedingungen ungefähr 12 Stunden (GINETSINSKAYA, 1988 [zit. in GRACZYK & FRIED, 1999]).

Sporozysten können sich unmittelbar an der Eintrittsstelle entwickeln, oder in andere Körperteile der Schnecke, hauptsächlich in die Verdauungsdrüsen, einwandern. So migrieren beispielsweise junge Sporozysten von *F. hepatica* bevorzugt in die Mitteldarmdrüse, wo sie zu wachsen beginnen. Die Migration und Lokalisierung der Muttersporozysten ist unter anderem von der Penetrationsstelle des Mirazidiums abhängig.

Wie alle nachfolgenden Digenea-Stadien sind Sporozysten durch ein synzytiales Tegument umschlossen. Da dieses Parasitenstadium keinen Darm aufweist, ist das Tegument mit Microvilli versehen, welche durch eine Vergrößerung der Körperoberfläche die Nährstoffabsorption verbessern. Das Exkretionssystem besteht aus Protonephridien.

Unterhalb des Teguments befindet sich eine Schicht von Basallamellen, gefolgt von zirkulär angeordneten Muskeln, sowie einer Innenschicht parenchymaler Zellen. Auch ein Nervensystem kann präsent sein (THÉRON & FOURNIER, 1982 [zit. in CHENG, 1986]). Im flüssigkeitsgefüllten Innenraum der Muttersporozysten (auch als „Brutkammer“ bezeichnet) liegt eine festgelegte Anzahl von Keimballen, welche sich – je nach Digenea-Art – in Tochtorsporozysten, Redien, oder direkt in Zerkarien differenzieren können.

Junge Sporozysten von *F. hepatica* bestehen anfänglich aus einem kleinen Ballen dicht gepackter Keimzellen. Jede Keimzelle entwickelt sich zu einem neuen Keimballen, aus welchem die nächsten Generation heranreift. Diese kann durch eine sogenannte „Geburtspore“ entlassen werden (z.B. *Gorgoderia amplicava* Looss 1899 [OLSEN, 1974]), oder die Sporozystenwand zerreißen (z.B. *F. hepatica*) (GINETSINSKAYA, 1988 [zit. in GRACZYK & FRIED, 1999]).

1.1.3.4. Redien

Redien sind zylindrisch geformte, längliche Larvenstadien (1-3 mm Körperlänge bei *F. hepatica*), und können sich aus Sporozysten oder direkt aus den Mirazidien entwickeln. Mithilfe mehrerer knospenähnlicher Fortsätze und Körperkontraktionen können sich die Parasitenstadien im Wirtsgewebe fortbewegen. Ähnlich den Sporozysten befinden sich auch Redien häufig in der Mitteldarmdrüse, wo sie – vor allem bei schweren Infektionen – unter anderem durch ihre Bewegungen zu schweren Gewebeschädigungen oder den Tod ihrer Wirtstiere führen können. Zudem verfügen Redien über eine Mundöffnung, sowie einen Verdauungstrakt und ernähren sich von Wirtszellen.

Die meisten Redien besitzen Protonephridien, sowie ein paarig angelegtes zephalisches Ganglion. Ihre Körperwand ist ident zu jener von Sporozysten.

Analog zu Mirazidien und Sporozysten, befinden sich auch im Körper von Redien Keimballen, aus denen die nächste Generation hervorgeht. Die vollentwickelten Tochterredien oder Zerkarien werden üblicherweise durch eine „Geburtspore“ entlassen.

1.1.3.5. Zerkarien

Die meisten der ausschließlich bei den Digenea vorkommenden Zerkarien bestehen aus einem scheibenförmigen Kopfteil (250-350 µm Länge bei *F. hepatica*) und einem langen, gegabelten oder ungegabelten Schwimmschwanz .

Die im Wasser freibeweglichen Zerkarien verlassen meist aktiv ihren Schneckenwirt, um nachfolgend den nächsten Zwischen- oder Endwirt zu penetrieren (z.B. *Schistosoma mansoni* SAMBON 1907). Dieser Vorgang wird durch abgesonderte Sekrete ermöglicht, welche das aktive Verlassen des ersten Zwischenwirtes und das Anhaften am nächsten Wirt ermöglichen.

Es ist auch möglich, dass sich die Zerkarien mithilfe ihres Bauchsaugnapfes an Wasserpflanzen anhaften und sich an ihnen enzystieren, um oral vom Endwirt aufgenommen zu werden (z.B. *F. hepatica*, *F. magna*), oder sie vom ersten Zwischenwirt ausgeschieden und vom zweiten Zwischenwirt oral aufgenommen werden (z.B. *D. dendriticum*).

In den Zerkarien sind bereits mehrere Organe der Adulttiere angelegt, wie beispielsweise Saugnapfe, ein muskulöser Pharynx und ein Verdauungssystem mit gegabeltem Darm. Zusätzlich können Augenflecken oder einfache Linsenaugen auftreten, welche in endoparasitischen Stadien nicht vorkommen. Darüber hinaus ist bereits in diesem Larvenstadium ein genitales Primordium angelegt, welches sich vermutlich in die Gonaden der Adulttiere entwickelt.

Ähnlich den vorangegangenen Larvenstadien verfügen auch Zerkarien über ein protonephritisches exkretorisches/osmoregulatorisches System. Bei den Zerkarien tritt erstmalig ein posterior platziertes exkretorisches Vesikel auf, welches sich durch eine oder mehrere exkretorische Poren in die Außenwelt entleert. Das embryonale Entwicklungsmuster des exkretorischen Systems wurde in der Vergangenheit dazu verwendet die Digenea zu klassifizieren. Zudem ist das Flammenzellenmuster in Zerkarien üblicherweise ident mit dem von Adulttieren, weshalb es dazu verwendet werden kann, Zerkarien zu bestimmen.

Darüber hinaus besitzen Zerkarien verschiedene Typen von Drüsen, welche unterschiedliche Aufgaben übernehmen können. So verfügen die meisten Zerkarien über spezialisierte Penetrationsdrüsen, welche unter anderem lytische Enzyme sekretieren können, um die Penetration des nächsten Wirtes zu erleichtern. Zum

Schutz vor diesen lytischen Enzymen und anderen schädlichen Substanzen verfügen viele Zerkarien zudem über mukoide Drüsen, welche einen Schutzfilm auf der Zerkarie absondern. Der mukoide Film erleichtert außerdem die Fortbewegung auf dem Substrat und dient als Gleitfilm während der Penetration des nächsten Wirtstieres. Oftmals kommen zudem verschiedene Typen an zytogenen Drüsen vor, welche für die Bildung der mehrschichtigen Zystenwand im Verlauf des Enzystierungsprozesses verantwortlich sind. Die Bildung und Struktur der Zysten ist deshalb, je nach Typ, Lage und Anzahl der Drüsen, artspezifisch variabel.

Der Entwicklungsschritt innerhalb des Schneckenwirtes stellt bei allen digenen Trematoden einen wesentlichen Bestandteil des Übertragungserfolges dar, da nach der Infektion eines einzelnen Mirazidiums bis zu 100.000 Zerkarien aus einer Schnecke austreten können.

1.1.3.6. Metazerkarien

Im Lebenszyklus digener Trematoden tritt üblicherweise ein äußerst widerstandsfähiges Ruhe- oder Dauerstadium, die Metazerkarie, auf. Als Metazerkarien bezeichnet man mit einer Zystenhülle umschlossene Zerkarien, welche nach einer Reifungs- und Differenzierungsphase infektiös für den Endwirt werden. Der Prozess der Enzystierung kann sowohl in der Umwelt (z.B. *F. hepatica*), als auch im zweiten Zwischenwirt, in welchem sich mit der Zeit infektiöse Stadien stark anreichern können, stattfinden (z.B. *D. dendriticum*).

Im Fall von *F. hepatica* beginnt der Enzystierungsprozess mit der Einstülpung des Zerkarienkörpers, wodurch die vorgebildete äußere Schicht der Zyste freigesetzt wird. Während das embryonale Epithelium abgestoßen wird und sich die äußere Zystenschicht ausbildet, wird auch der Schwanz abgeworfen. Im Verlauf der Metamorphose zur Metazerkarie verlieren die Parasiten zerkarielle Strukturen wie Penetrations-, zytogene und mukoide Drüsen, sowie die Augenflecken. Metazerkarien stellen generell ein juveniles Replikat der Adulttiere dar, da die Histologie und Feinstruktur verschiedener metazerkarieller Strukturen jener von Adulttieren entspricht.

Die anfänglich weißliche Zyste von *F. hepatica*, welche sich zunehmend verdunkelt und aushärtet, ist beinahe unmittelbar infektiös für den Endwirt. Metazerkarien von

F. hepatica weisen eine starke Adhäsion an die Vegetation auf und können, obwohl keine Nahrungsaufnahme erfolgt, über ein Jahr an ihr überleben, auch wenn die Infektiosität wahrscheinlich allmählich abnimmt (SOULSBY, 1965 [zit. in ANDREWS, 1999]).

Die metazerkarielle Zystenwand ist aus mehreren Schichten aufgebaut. Bei Digenea-Arten, welche sich innerhalb von Wirtstieren enzystieren, können die Bestandteile teilweise vom Wirtstier stammen (z.B. *Himasthla quissetensis* [MILLER & NORTHUP 1926] [CHENG et al., 1966 [zit. in CHENG, 1986]]). Die Zystenwand der Metazerkarien von *F. hepatica* besteht aus einer inneren und einer äußeren Lage, welche wiederum in mehrere Schichten unterteilt sind. Während die innere Zystenwand vermutlich die wichtigere Rolle beim Überleben der Metazerkarien spielt, stellt die äußere Zystenwand möglicherweise eine Barriere gegen bakterielle und Pilzinfektionen dar, und unterstützt zudem die Anhaftung an das Substrat.

1.1.3.7. Adulttiere

Nach oraler Aufnahme der Metazerkarien durch Verzehr des zweiten Zwischenwirtes oder befallener Wasserpflanzen wird im Magen-Darm-System des Endwirtes die Zystenwand verdaut. Daraufhin können die juvenilen Digenea in verschiedene Organe einwandern und zu geschlechtsreifen Würmern heranwachsen. Adulttiere sind meist im Verdauungstrakt, vor allem im Dünndarm, lokalisiert. Es können aber auch die Leber (z.B. *Fasciola* spp.), das Atmungssystem (*Paragonimus* spp.), die Blutgefäße (z.B. *Schistosoma* spp.), oder andere Organe befallen werden (LUCIUS & LOOS-FRANK, 2008).

1.1.3.7.1. Körperform und -bedeckung

Die meisten Trematodenarten verfügen über eine dorsoventral abgeflachte, ovale bis lanzettförmige Gestalt. Gemeinsam mit den Bandwürmern und den Hakensaugwürmern gehören Trematoden zu den Neodermata (EHLERS 1985), da sie über eine synzytiale sekundäre Körperbedeckung (Tegument, Neodermis) verfügen. Über dieses Tegument, welches mit Dornen oder Papillen versehen sein kann, wird ein Großteil der Nahrung resorbiert. Zudem dient eine wirtsspezifisch variabel

zusammengesetzte Mukopolysaccharidschicht auf der Außenseite des Teguments der makromolekularen Mimikry des Parasiten.

1.1.3.7.2. Saugnäpfe

Das morphologisch wohl auffälligste Merkmal von Saugwürmern sind ihre meist zweifach vorhandenen Halteapparate (normalerweise Saugnäpfe), welche üblicherweise anterior und ventral oder posterior positioniert sind. Der Bau und die Anordnung der Saugnäpfe werden in der Praxis häufig zur ersten Unterscheidung von Adulttieren verwendet (**Tab. 1**).

Tab. 1

Einteilung von Typen adulter Digenea nach Bau und Anordnung der Saugnäpfe

Bezeichnung	Merkmale
Gasterostom	sackförmiger, unverzweigter, nicht apikal beginnender Darm
Monostom	ein Saugnapf ist reduziert
Distom	Bauchsaugnapf liegt ventral zwischen vorderem und hinterem Pol
Amphistom	zweiter Saugnapf liegt am hinteren Pol
Echinostom	Hakenkranz um Mundsaugnapf
Holostom	zusätzliches tribozytisches Halteorgan
Schistosom	Männchen umschließt Weibchen, meist lebenslange Verhaukung

Modifiziert nach MEHLHORN & PIEKARSKI, 2002.

Der ventrale Saugnapf der Digenea ist zudem ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal zur Unterklasse Aspidogastrea FAUST & TANG 1936. Im Gegensatz zu den Digenea bedeckt das ventrale Anhaftungsorgan der Aspidogastrea den Großteil der ventralen Körperoberfläche. Zudem wird das Anhaftungsorgan der Aspidogastrea durch Gruppierungen von Loculi, oder selten in longitudinale Reihen von separaten Saugnäpfen unterteilt (GIBSON, 1996).

1.1.3.7.3. Verdauungs- und Exkretionssystem

Der Mundsaugnapf von Trematoden umgibt eine Mundöffnung, welche mit einem muskulären Pharynx, sowie einem üblicherweise blind endenden, gegabelten Darm in Verbindung steht. Zur Osmoregulation und Exkretion verfügen digene Trematoden über Protonephridien, welche, getrieben anhand einer

„Wimpernflamme“, Gewebsflüssigkeit filtrieren. Das Filtrat wird über Tubuli in eine posterior platzierte Blase geleitet, deren Genese ein Unterscheidungsmerkmal der Unterordnungen der Digenea darstellt. Auch die Anordnung der protonephridialen Terminalzelle, auch als Cyrtocyte oder Reusengeißelzelle bezeichnet, wird seit FAUST (1919) zur systematischen Bestimmung herangezogen.

1.1.3.7.4. Nervensystem

Das Nervensystem der Digenea weist eine Kopfbildung auf. Im vorderen Körperdrittel befinden sich zwei Zerebralganglien, von denen jeweils ein dorsaler und ein ventraler Nervenstrang an das hintere Körperende ziehen. Diese Nervenstränge sind durch eine artspezifisch variable Anzahl an Kommissuren miteinander verbunden.

1.1.3.7.5. Fortpflanzungssystem

Bei den Digenea reifen die männlichen Geschlechtsprodukte vor den weiblichen (sie werden deshalb auch als protandrische Zwitter bezeichnet), weshalb sich die Parasiten in der Regel durch Fremdbefruchtung fortpflanzen. Die meist paarig angelegten Hoden vereinigen sich über zwei Vasa efferentia in einen Vas deferens, welcher wiederum in einen Cirrusbeutel mündet. Bei der Kopulation werden die Spermien durch einen vorstülpbaren Cirrus („Penis“) übertragen und im Weibchen in einer Samentasche, dem sogenannten Receptaculum seminis, gelagert.

Das weibliche Geschlechtssystem besteht aus einem Oogenotop, in welchem die Eier gebildet werden, und einem ausleitenden Uterus, in dem die endgültige Ausbildung der äußerst widerstandsfähigen Eischale einsetzt. Der Oogenotop umfasst einen unpaaren Eierstock, von welchem immer jeweils eine Eizelle über einen Eileiter entlassen wird, sowie zwei Dotterstöcke, die über jeweils einen Dottergang Dotterzellen abgeben. Über einen Eidottergang gelangen Ei- und Dotterzellen in einen Hohlraum, der als Ootyp bezeichnet wird. Im Ootyp findet die Befruchtung aus der Samentasche statt. Darüber hinaus sondern im Ootyp sogenannte Schalendrüsen, welche auch als Mehlissche Drüsen bezeichnet werden, Sekrete ab, welche die Bildung einer dünnen Eihülle stimulieren. Der Ootyp, die

Mehlischen Drüsen, sowie das Receptaculum seminis werden ebenfalls zum Oogenotop gezählt.

1.1.4. Genetische Identifizierung digener Trematoden

Die Identifizierung nahverwandter Arten anhand morphologischer Merkmale kann schwierig oder sogar unmöglich sein. In vielen Fällen können genetische Analysen unterschiedlicher Sequenzabschnitte helfen, morphologisch schwer oder nicht unterscheidbare Trematodenarten voneinander zu differenzieren. Zur genetischen Identifizierung von Trematoden werden heutzutage meistens die intern transkribierten Spacer-Regionen der ribosomalen DNA (ITS rDNA) verwendet (z.B. TANDON et al., 2007, PRASAD et al., 2008). Die hoch repetitive rDNA kodiert für strukturelle Komponenten der Ribosomen und enthält neben den artspezifisch variablen, nicht-kodierenden ITS-Regionen auch konservierte kodierende Regionen, welche die ITS1 und ITS2 rDNA flankieren (LONG & DAWID, 1980).

In eukaryotischen rRNA-Genen sind die ITS rDNA-Regionen zwischen den 18S und 5,8S rRNA- (ITS1), sowie zwischen den 5,8S und 28S rRNA-kodierenden Regionen (ITS2) lokalisiert (LONG & DAWID, 1980). Da die ITS-Sequenzen von konservierten Regionen flankiert werden, können ITS1-/ITS2-spezifische Primer von bekannten Sequenzen über Artengrenzen hinweg designt werden. Innerhalb der ITS-Sequenzabschnitte sind intraspezifische Variationen gering oder gar nicht vorhanden (NOLAN & CRIBB, 2005). Es ist jedoch möglich, dass auch nahverwandte Arten nur geringe Sequenzunterschiede aufweisen, oder die Sequenzen sogar ident sind (NIEWIADOMSKA & LASKOWSKI, 2002).

Eine weitere geeignete, bisher weniger häufig verwendete DNA-Region zur Identifikation von Trematodenarten ist beispielsweise das mitochondriale Cytochrom-c-Oxidase I (COX1)-Gen, welches eine Untereinheit des Enzyms Cytochrom-c-Oxidase (COX) der mitochondrialen Atmungskette kodiert. Auch dieser artspezifisch variable Sequenzabschnitt kann alleine (CUCHER et al., 2006) oder in Kombination mit den ITS rDNA-Regionen (FARJALLAH et al., 2009) zur artspezifischen Identifikation herangezogen werden. Da COX1-Gensequenzen üblicherweise noch variabler als ITS rDNA-Sequenzen sind, kann diese Sequenz im Vergleich zur ITS

rDNA sogar eine höhere Auflösung bei Trematodenarten liefern (z.B. VILAS et al., 2005, LOCKE et al., 2010).

1.1.5. Phylogenie und Systematik

Die Klasse Trematoda bildet zusammen mit den Klassen Cestoda RUDOLPHI, 1808 und Monogenea CARUS, 1863 die Neodermata innerhalb des Phylums Plathelminthes (CRIBB et al., 2003). Innerhalb der monophyletischen Klasse Trematoda befindet sich die Unterklasse Digenea, welche ihrerseits die Schwestergruppe zur zweiten Unterklasse, den Aspidogastrea, darstellt (LITTLEWOOD et al., 1999, ROHDE, 2001).

Es gibt verschiedenste Ansätze zur Klassifizierung und Aufdeckung der Phylogenie innerhalb der Unterklasse Digenea. Dazu gehören neben morphologischen Untersuchungen an Adulttieren, Zerkarien, Sporozysten und Redien auch molekularbiologische Analysen und die Betrachtung von Lebenszyklus-Charakteristika. Die dadurch erhaltenen Daten stimmen nicht immer überein, was taxonomische und phylogenetische Bestimmungen innerhalb der Digenea erschweren kann (GIBSON et al., 2002).

VAN BENEDEN unterteilte im Jahr 1858 erstmals Trematoden anhand Lebenszyklus-Charakteristika in die Gruppen „Monogénèses“ und „Digénèses“. Die heutige Schreibweise der zweiten Gruppe, „Digenea“, ist auf CARUS (1863) zurückzuführen. Er beschrieb digene Trematoden als Parasiten mit einem Generationswechsel, welcher Larvenstadien in Mollusken und sexuelle Vermehrung in Vertebraten umfasst. Es bleibt anzumerken, dass die zahlreichen Varianten dieses Lebenszyklus es ermöglichen, phylogenetische Verwandtschaftsverhältnisse auch innerhalb der Digenea aufzuzeigen (CRIBB et al., 2001).

Einen Meilenstein in der wissenschaftlichen Arbeit über die Lebenszyklen digener Trematoden stellten die Berichte von LEUCKART (1881, 1882) und THOMAS (1881, 1882) dar, die erstmalig den vollständigen Lebenszyklus eines digenen Trematoden beschrieben. Im Jahre 1975 reviewte YAMAGUTI bereits über 1.700 Studien über Lebenszyklen digener Trematoden, welche zeitlich nach den genannten Publikationen von LEUCKART und THOMAS verfasst wurden (CRIBB et al., 2001).

Andere Ansätze der Klassifikation basierten auf der Morphologie verschiedener Larvenstadien, wie Zerkarien (z.B. LA RUE, 1957 [zit. in GIBSON et al., 2002]),

Tochtersporozysten, oder Redien (z.B. ODENING, 1961 [zit. in GIBSON et al., 2002]). Eine einfache Klassifikation von GIBSON & BRAY (1994) und GIBSON (1996) unterteilt die Digenea in die Ordnungen Strigeida LA RUE 1957, Echinostomida LA RUE 1957 und Plagiorchiida LA RUE 1957. Die Unterteilung wurde im Wesentlichen anhand zweier zerkarieller Eigenschaften vorgenommen: die Morphologie des Schwimmschwanzes und die Enzystierungsgewohnheiten. Ein Problem in der praktischen Anwendung dieser Klassifikationsschemata besteht jedoch darin, dass larvale Eigenschaften und Lebenszyklus-Charakteristika nur schwer zur Identifikation von Adulttieren herangezogen werden können.

Weitere frühe Versuche der Klassifikation digener Trematoden basierten deshalb beispielsweise auf der Anordnung der Saugnäpfe von Adulttieren. Dies führte zu einer Unterteilung in Gruppen wie die Monostoma ZEDER 1800, welche später als nicht monophyletisch aufgezeigt wurden, und Distoma RETZIUS 1786, die den Großteil der Gruppe darstellten (GIBSON et al., 2002).

Eines der neuesten und umfangreichsten Klassifikationsschemata der Trematoden wurde in dem Werk „Keys to the Trematoda, Vol.1 - Vol.3“ (GIBSON et al., 2002, JONES et al., 2005, BRAY et al., 2008) dargestellt. In diesem Standardwerk wurden anhand morphologischer Eigenschaften von Adulttieren beide Unterklassen der Trematoda direkt auf dem Niveau von Überfamilien klassifiziert. Dabei wurden zusätzlich die beschriebenen Überfamilien in das zuvor genannte System von GIBSON & BRAY (1994) und GIBSON (1996) eingeordnet.

Neben der Forschung an Lebenszyklen und Morphologie digener Trematoden nahm in den letzten Jahrzehnten die Anzahl molekularbiologischer Studien zur Bestimmung phylogenetischer Verwandtschaftsverhältnisse stark (z.B. TKACH et al., 2000) oder weitläufig verwandter Taxa (z.B. OLSON et al., 2003) rasant zu. Dabei wird häufig kodierende und/oder nicht kodierende ribosomale DNA analysiert (CRIBB et al., 2001), welche auch kombiniert mit morphologischen Daten (z.B. CRIBB et al., 2001) oder Informationen über Lebenszyklen (z.B. CRIBB et al., 2003) ausgewertet werden kann.

Die molekularbiologischen Ergebnisse stimmen aber nicht immer mit morphologischen Klassifikationen oder Lebenszyklus-Charakteristika überein. So wurde von CRIBB et al. (2001) und OLSON et al. (2003) aufgrund neuer molekular-

phylogenetischer, sowie morphologischer Erkenntnisse eine Korrektur des Klassifikationssystems von GIBSON & BRAY (1994) und GIBSON (1996) vorgeschlagen. Nach OLSON et al. (2003) ist die traditionelle Ordnung Echinostomida eine polyphyletische Zusammenstellung, während die traditionellen Ordnungen Plagiorchiida und Strigeida paraphyletisch sind.

Nach JONES (2005b) handelt es sich bei dem Werk „Keys to the Trematoda, Vol.1 - Vol.3“ um einen auf morphologischen Eigenschaften von Adulttieren basierenden Identifikationsschlüssel für Trematoden. Aus diesem Grund wurden bei der Erstellung des Werks im Konfliktfall morphologische Eigenschaften etwaigen molekularbiologischen Ergebnissen vorgezogen, zumal es nach JONES (2005b) derzeit unvermeidbar ist, dass auf Morphologie basierende Klassifikationen mit Klassifikationen, welche auf molekularer Phylogenie basieren, parallel koexistieren müssen.

Die Digenea umfassen nach BRAY et al. (2008) derzeit 25 Überfamilien, 148 Familien, fast 2.800 nominale Genera und rund 18.000 nominale Arten.

1.1.6. Digenea als Krankheitserreger

Die Unterklasse Digenea beinhaltet zahlreiche medizinische und veterinärmedizinische Pathogene von großer Bedeutung.

1.1.6.1. Humanpathogene

Eine Vielzahl humanpathogener Digenea kann den Menschen durch die orale Aufnahme von infektiösen Metazerkarien befallen. Zu den durch Nahrungsmittel übertragenen Trematoden, welche signifikante Probleme in der Volksgesundheit und Wirtschaft verursachen können, zählen unter anderem die Lungenegel *Paragonimus* spp. Mitglieder der Familie Paragonimidae DOLLFUS 1939 kommen endemisch in Asien, Afrika und südamerikanischen Ländern vor (KEISER & UTZINGER, 2005, 2007). Die Symptome einer pulmonären Paragonimose, welche wochen- bis jahrelang persistieren kann (SHIM et al., 1991 [zit. in JEON et al., 2005]), sind ähnlich der Tuberkulose (JEON et al., 2005). Neben der Lunge können die Tiere unter anderem auch das Abdomen, die Lymphknoten und – besonders häufig (HUANG, 2000 [zit. in LIU et al., 2008]) – das Gehirn befallen (LIU et al., 2008).

Eine weitere wichtige durch Nahrungsmittel übertragene Trematodose ist die Fasziole oder tropische Fasziole, eine Infektion des hepatobiliären Systems, welche durch den Großen Leberegel *F. hepatica* oder den Riesenleberegel *F. gigantica* verursacht wird (ESTEBAN et al., 2003). Nach Exzystierung der Metazerkarien im Dünndarm durchdringen die Leberegellarven die Darmwand, penetrieren die Glisson-Kapsel und wandern als unreife Würmer im Lebergewebe umher, wodurch beträchtliche Gewebeschäden entstehen können (TAKEYAMA et al., 1986, HAN et al., 1993 [zit. in LIM et al., 2007]). Die Fasziole stellt besonders in Teilen Asiens, Afrikas, Südamerikas und Westeuropas ein bedeutendes Problem der öffentlichen Gesundheit dar (KEISER & UTZINGER, 2005, 2007).

Eine chronische Infektion mit den ebenfalls durch Nahrungsmittel übertragenen Katzenleberegel *Opisthorchis viverrini* (POIRIER 1886) oder *Opisthorchis felinus* (RIVOLTA 1884), oder mit dem chinesischen Leberegel *Clonorchis sinensis* (COBBOLD 1875), wird als Opisthorchose bzw. Clonorchose bezeichnet (LIM et al., 2007). Eine Infektion mit *O. viverrini* ist mit der Entwicklung von Gallengangskarzinomen assoziiert, *O. felinus* und *C. sinensis* stehen ebenfalls in Verdacht karzinogen zu sein (IARC, 1994a). Diese drei Leberegelarten sind vor allem in Asien und Osteuropa verbreitet (KEISER & UTZINGER, 2005, 2007).

Neben *O. viverrini* ist auch eine Infektion mit *Schistosoma haematobium* (BILHARZ 1852) erwiesenermaßen karzinogen für den Menschen. *S. haematobium* ist Erreger der Blasenschistosomose (Synonym: Blasenbilharziose), eine Infektion die mit der Entstehung von Blasenkrebs assoziiert ist (IARC, 1994b). Neben *S. haematobium* können vier weitere Schistosoma-Arten Verursacher der menschlichen Schistosomose sein (McMANUS & LOUKAS, 2008). Die Erkrankung stellt vor allem in tropischen und subtropischen Gebieten Afrikas, Südamerikas und Asiens ein Problem dar (DOUMENGE & MOTT, 1984, GRYSEELS et al., 2006).

Infektionen mit Pärchenegel (*Schistosoma* spp.) werden durch das Eindringen von freischwimmenden Zerkarien in die Haut erworben. Eine große Anzahl tierspezifischer Schistosomen (z.B. *Trichobilharzia* spp.) kann ebenfalls die menschliche Haut penetrieren. Diese im Menschen nicht überlebensfähigen Parasiten können allergische Reaktionen der Haut auslösen, was auch als Zerkariendermatitis bezeichnet wird (McMANUS & LOUKAS, 2008).

1.1.6.2. Tierpathogene

Einige Vertreter der Familie Fasciolidae RAILLIET 1895 vermögen auch bei Wildtieren und Nutzvieh ernstzunehmende Parasitosen herbeizuführen. Eine besondere Bedeutung kommt den Leberegel *F. hepatica* und *F. gigantica* nicht nur als Verursacher der menschlichen Fasziole zu, sondern auch als wichtige Pathogene wildlebender und domestizierter Wiederkäuer. Fasziole bei Rindern, Schafen und anderen Wiederkäuern verursacht in vielen Ländern beträchtliche produktions- und ökonomische Verluste (DEL CAMPILLO & VÁZQUEZ, 1999 [zit. in RIVERA et al., 2004]). Während *F. hepatica* global vorkommt (MAS-COMA et al., 2005), stellen Infektionen mit *F. gigantica* die wichtigsten Infektionen von Wiederkäuern in Asien und Afrika dar (SPITHILL et al., 1999). *F. magna* ist ein in diesem Zusammenhang weiterer wichtiger Vertreter der Familie Fasciolidae. Infektionen mit diesem Parasiten, sogenannte Faszioleiden, enden in Fehlwirten wie Schafen, Ziegen (FOREYT & TODD, 1976, FOREYT & LEATHERS, 1980 [zit. in Foreyt, 1996]) oder auch Rehwild (ERHARDOVÁ-KOTRLÁ & KOTRLY, 1968) üblicherweise tödlich. Dienen in Enzootiegebieten Wildtiere als Reservoir für *F. magna*, können somit große ökonomische Verluste entstehen, speziell in der Rinder- (BALBO et al., 1989 [zit. in RAJKOVIĆ-JANJE et al., 2008]), Schaf- und Ziegenwirtschaft (PYBUS, 2001).

Eine weitere weit verbreitete Parasitose von Nutzvieh ist die Paramphistomose, verursacht durch Pansenegel (*Paramphistomum* spp.) (MAGE et al., 2002). Akute Paramphistomose wird vor allem bei jungen Tieren durch einen massiven Befall mit juvenilen Würmern im Dünndarm verursacht (HORAK, 1971 [zit. in BOUVRY & RAU, 1984]), was mit einer hohen Morbidität und Mortalität assoziiert ist (PANDA, 1985). In Europa wurden Infektionen mit *Paramphistomum* spp. in Nutztieren bisher in Rindern (SZMIDT-ADJIDÉA et al., 2000), Schafen (CRINGOLI et al., 2004, BIGGERI et al., 2007) und Ziegen (SILVESTRE et al., 2000) nachgewiesen (PARAUD et al., 2009).

1.2. *Galba truncatula*

1.2.1. Allgemein

Die amphibisch lebende *Galba* (Synonym: *Lymnaea*) *truncatula* (Gastropoda: Pulmonata: Lymnaeidae) ist eine Süßwasserschnecke mit einem kegelförmigen, rechtsgewundenen, hornfarbigen Gehäuse (YILDIRIM et al., 2006). Ihr Vorkommen erstreckt sich über den Transkaukasus, Kaukasus, Ukraine, West- und Ost-Sibirien, Mittelasien (ZHADIN, 1965 [zit. in YILDIRIM et al., 2006], SCHÜTT, 1983), bis nach Europa und Nordamerika (GLÖER & MEIER-BROOK, 1998; PFLEGER, 1999 [zit. in YILDIRIM et al., 2006], GLÖER, 2002). Auch im österreichischen Nationalpark Donau-Auen und anliegenden Gebieten ist *G. truncatula* weit verbreitet. In einer Untersuchung von 2006 konnte an 38 von 109 untersuchten Standorten *G. truncatula* nachgewiesen werden, mit Schneckendichten von bis zu knapp 39 von Hand gesammelten Tieren pro Minute (SATTMANN & HÖRWEG, 2006).

G. truncatula besiedelt sowohl permanente, als auch temporäre Wasserhabitate. Untersuchungen im Bereich der Donau-Auen östlich von Wien wiesen *G. truncatula* vor allem als Bewohner dynamischer Augewässer aus (RECKENDORFER & SCHAEFER, 2003, SATTMANN & HÖRWEG, 2006). Diese Habitate wiesen ein sandiges Sediment mit einem hohen Anteil an Schluff und Ton auf. Obwohl die Tiere häufig das Wasser verlassen (RECKENDORFER & SCHAEFER, 2003) und Adulttiere sogar monatelange Trockenperioden überstehen können (PETERS, 1938, KENDALL, 1949 [zit. in CHAPUIS et al., 2007]), wurde *G. truncatula* in einer Untersuchung von SATTMANN & HÖRWEG (2006) nur sporadisch in temporären Habitaten nachgewiesen.

Die sich meist zu über 90% durch Selbstbefruchtung fortpflanzende Schnecke (TROUVÉ et al., 2003 [zit. in CHAPUIS et al., 2007], 2005) legt ihre Eier an Plätzen mit hoher Feuchtigkeit ab (KENDALL, 1953 [zit. in CHAPUIS et al., 2007]), wobei üblicherweise zwei Perioden der Eiablage im Frühling und im Herbst stattfinden (MOREL-VAREILLE, 1973, FRETTER & PEAKE, 1975 [zit. in CHAPUIS et al., 2007]). Schnecken der herbstgeborenen Generation können überwintern und dadurch zur Brutsaison im Frühling des nächsten Jahres beitragen. Bei der im Frühjahr geborenen Generation findet die Eiablage im Herbst statt (MEKROUD et al., 2002).

Bis zur siebten Lebenswoche beträgt das Wachstum von Jungtieren etwa einen Millimeter pro Woche, danach verläuft es langsamer. Voll ausgewachsen können die Tiere – abhängig vom Lebensraum – eine Schalenhöhe von ungefähr 12 mm erreichen (MOREL-VAREILLE, 1973 [zit. in MEKROUD et al., 2002]). Die Geschlechtsreife tritt ab einem Lebensalter von etwa zwei Monaten ein, was einer Schalenhöhe von ca. 4 mm entspricht (SMITH, 1981).

1.2.2. *Galba truncatula* als Zwischenwirt

Viele Lymnaeidae sind Zwischenwirte für medizinisch und veterinärmedizinisch wichtige Digenea. Welche Trematodenarten von bestimmten Schnecken übertragen werden können hängt hierbei hauptsächlich von der Parasit-Wirt-Spezifität ab (BARGUES et al., 2001). Die Parasit-Wirt-Spezifität umfasst unter anderem das Finden und Erkennen geeigneter Wirtstiere, sowie deren Empfänglichkeit und Kompatibilität bzw. deren Widerstandsfähigkeit und Immunität bezüglich des Parasiten (YOSHINO & VASTA, 1996 [zit. in BARGUES et al., 2001], ADEMA & LOKER, 1997; HAAS & HABERL, 1997, SAPP & LOKER, 2000a, 2000b [zit. in BARGUES et al., 2001]).

Eine besondere Bedeutung kommt *G. truncatula* in Europa unter anderem als Hauptzwischenwirtsschnecke von *F. hepatica* (GRAKZYK & FRIED, 1999) und *F. magna* (ERHARDOVÁ-KOTRLÁ, 1968; 1971 [zit. in FALTÝNKOVÁ et al., 2006]) zu. Global gesehen fungiert *G. truncatula* als natürlicher oder/und experimenteller Zwischenwirt von mindestens 15 verschiedenen Digenea-Arten aller drei traditionellen Ordnungen (**Tab. 2**). Bis auf *Echinostoma cinetorchis* ANDO AND OZAKI 1923 und *F. gigantica* wurden von allen in **Tab. 2** aufgelisteten Arten natürliche Infektionen von End- oder/und Zwischenwirten in Europa nachgewiesen (KAMBUROV & OSIKOVSKI, 1976; KANEV et al., 1987 [zit. in MANGA-GONZÁLEZ et al., 1994], MANGA-GONZÁLEZ et al., 1994, DREYFUSS et al., 2005, SATTMANN & HÖRWEIG, 2006, KAVETSKA et al., 2008).

Tab. 2

Auflistung von Arten digener Trematoden, für welche *G. truncatula* als Zwischenwirt fungieren kann

Ordnung	Überfamilie	Art	(Beispiel-) Literatur
Echinostomida	Echinostomatoidea	<i>Echinostoma revolutum</i>	SKOVRONSKII, 1985 ¹⁾
		<i>Echinostoma cinetorchis</i>	CHUNG et al., 2001
		<i>Echinostoma echinatum</i>	KANEV et al., 1987 ¹⁾
		<i>Echinoparyphium recurvatum</i>	KANEV, 1985 ¹⁾
		<i>Hypoderaeum conoideum</i>	SKOVRONSKII, 1985 ¹⁾
		<i>Fascioloides magna</i>	RONDELAUD et al., 2006
		<i>Fasciola hepatica</i>	DREYFUSS et al., 2005
		<i>Fasciola gigantica</i>	DAR et al., 2003
	Paramphistomoidea	<i>Paramphistomum microbothrium</i>	SAMNALIEV & VASSILEV, 1981 ¹⁾
		<i>Paramphistomum daubneyi</i>	DREYFUSS et al., 2005
	Pronocephaloidea	<i>Notocotylus neyrai</i>	MANGA-GONZALEZ et al., 1994
Strigeida	Diplostomoidea	<i>Tylodelphys</i> sp.	SATTMANN & HÖRWEIG, 2006
Plagiorchiida	Plagiorchioidea	<i>Haplometra cylindracea</i>	RONDELAUD et al., 2001
		<i>Opisthioglyphe ranae</i>	MANGA-GONZALEZ et al., 1994
		<i>Plagiorchis elegans</i>	MANGA-GONZALEZ et al., 1994

(Tabelle ohne Anspruch auf Vollständigkeit.) ¹⁾ zit. in MANGA-GONZÁLEZ et al., 1994.

In Österreich wurde in den Jahren 2004/2005 eine umfassende Studie über Digenea in *G. truncatula* durchgeführt. In dieser Arbeit von SATTMANN & HÖRWEIG (2006) wurden über zehntausend *G. truncatula* im Gebiet des Nationalpark Donau-Auen, sowie in Fischamend, Markthof und Marchegg gesammelt und mikroskopisch und zum Teil molekularbiologisch untersucht. Dabei wurden Digenea aller drei traditionellen Ordnungen mit Prävalenzen von 0,01-1,59% gefunden. Im Detail konnten die Arten *F. magna*, *F. hepatica* und *Haplometra cylindracea* (ZEDER 1800) bestimmt werden. Darüber hinaus wurden Vertreter der Gattungen *Paramphistomum* FISCHÖDER 1901, *Tylodelphys* DIESING 1850 und *Notocotylus* DIESING 1839, sowie der Familie Echinostomatidae gefunden.

1.2.3. Auswirkungen von Infektionen mit digenen Trematoden auf ihre Schneckenwirte

Trematodeninfektionen können verschiedene Effekte auf ihren Schneckenwirt haben, wie beispielsweise eine Veränderung der Wirtsfruchtbarkeit. Der Begriff „parasitäre Kastration“ beschreibt hierbei die Reduktion oder komplette Einstellung der Fortpflanzungsfähigkeit der Wirtstiere (EBERT et al., 2004). Durch die Verminderung des Energieaufwands, welcher normalerweise der Reproduktion dienen würde, kann der Parasit die Lebenserwartung seines Wirtstieres verlängern (BAUDOIN, 1975, OBREBSKI, 1975 [zit. in EBERT et al., 2004]). Zudem können Parasiten, welche die nährstoff- und energiereichen Reproduktionsgewebe ihrer Wirtstiere vertilgen, ihre eigene Reproduktionsleistung direkt erhöhen (JOKELA et al., 1993 [zit. in EBERT et al., 2004]). Parasitäre Kastration kann auch indirekt verursacht werden, indem der Parasit die für die Gonadenentwicklung benötigte Energie weglenkt, oder durch die Sekretion von sogenannten „Kastrationshormonen“ (BAUDOIN, 1975, COUSTAU et al., 1991, SCHALLIG et al., 1991 [zit. in POULIN, 1998]).

Ein weiterer Effekt, welcher vermutlich mit der parasitären Kastration in Zusammenhang steht (EBERT et al., 2004, POULIN, 2006), ist eine Veränderung im somatischen Wachstum der Wirtstiere, was auch als Gigantismus bzw. Wachstumshemmung bezeichnet wird. Ein Gigantismus der Wirtstiere scheint dem Parasiten Vorteile zu gewähren, was unter anderem an vermehrt verfügbaren Ressourcen für den Parasiten liegen könnte (EBERT et al., 2004). Gigantismus und parasitäre Kastration sind unter anderem bei mit *F. hepatica* infizierten *G. truncatula* weit verbreitete Phänomene (SORENSEN & MINCHELLA, 2001).

Digenea können auch regulierend auf die immunologische Aktivität ihrer Wirtstiere einwirken. Im Fall des *Lymnaea stagnalis* (LINNAEUS 1758)-*Trichobilharzia ocellata* (LA VALETTE 1855)-Systems könnten beispielsweise vom Parasiten sekretierte Neuropeptide oder neuropeptidartige Substanzen die Hämozytenaktivität der Schnecke unterdrücken (DE JONG-BRINK et al., 2001). Andererseits können Wirtsschnecken möglicherweise partielle Resistenzen an ihre Nachkommen weitervererben. So wiesen Schnecken, die von zuvor *F. hepatica* exponierten Schnecken geboren wurden, eine signifikant geringere Prävalenz von *F. hepatica*-

Infektionen und eine geringere Zerkarienproduktion als vergleichbare Kontrollschnecken auf (VIGNOLES et al., 2003).

Parasiten können auch die Lebenserwartung ihrer Wirtstiere beeinträchtigen. Dabei ist zwischen Mortalität, welche früh nach der Exposition auftritt, und späterer Mortalität zu unterscheiden. Die erste Form kann Kompatibilitätsprobleme betreffen, ein später beobachteter Tod liegt oftmals an exzessiven Energieanforderungen oder Gewebeschädigungen durch den Parasiten (BAYNE & LOKER, 1987 [zit. in SORENSEN & MINCHELLA, 2001]). So können beispielsweise mit *F. hepatica* infizierte *G. truncatula* verschiedene Arten von Gewebeschädigungen in unterschiedlichen Organen aufweisen (DIAWARA et al., 2003). Um eine erfolgreiche Reproduktion des Parasiten zu gewährleisten, sollte der Wirt dennoch lange genug überleben, um den Parasiten die Reifung und Transmission auf den folgenden Wirt zu gewährleisten. Dass dies nicht immer optimal gelingt, zeigt beispielsweise der Tod von vielen mit *F. magna* infizierten *G. truncatula* vor der Zerkarienfreisetzung (VIGNOLES et al., 2006).

1.2.4. Identifizierung und Quantifizierung digener Trematoden in Schnecken

Heutzutage werden verschiedene mikroskopische und molekularbiologische Methoden zur Detektion von Trematodeninfektionen in Schnecken eingesetzt. Die in dieser Diplomarbeit verwendeten Methoden, das Zerdrücken von Schnecken, die Schneckensektion und die klassische PCR, werden in diesem Kapitel näher erläutert. CARON et al. (2008) beschreibt das Zerdrücken der Schnecken als älteste und einfachste Methode um Infektionen mit digenen Trematoden nachzuweisen. Dabei wird das Schneckengehäuse mit einer feinen Pinzette in einer wassergefüllten Petrischale zerdrückt, lebende larvale Formen können somit zwischen den Fragmenten von Schale und Eingeweide detektiert werden. Wird nach Zerstörung der Schale zusätzlich eine Sektion des Eingeweidesacks durchgeführt, spricht man von einer Schneckensektion. Mittels dieser Methoden können vor allem Redien und Zerkarien detektiert und deren Anzahl bestimmt werden. Die Dokumentation der gefundenen Trematodenstadien kann beispielsweise durch Herstellung von

Mikropräparaten, Fotografie oder das Anfertigen von Zeichnungen erfolgen (SATTMANN & HÖRWEG, 2006).

Weitere mikroskopische Methoden umfassen das Monitoring des Zerkarienausstoßes und histologische Untersuchungen. Heutzutage werden zudem vermehrt molekularbiologische Analysen eingesetzt, welche PCR-basierte Methoden (klassische PCR, Multiplex-PCR, Real-time PCR) und RNA- oder DNA-basiertes Blotting beinhalten (CARON et al., 2008).

Die klassische PCR (Polymerase-Kettenreaktion) ist eine Methode zur Amplifikation von geringen DNA-Mengen. Diese Technik macht sich die Eigenschaften von Enzymen, sogenannten Polymerasen, zu nutze, welche genetisches Material amplifizieren. Zu den Voraussetzungen einer PCR-Reaktion zählen unter anderem eine Template-DNA, welche üblicherweise durch einen vorangehenden DNA-Isolierungsschritt erhalten wird, sowie zwei Oligonukleotidsequenzen (sogenannte „Primer“), welche spezifisch an die Zielsequenz binden können. In jedem Zyklus einer PCR-Reaktion gibt es drei grundsätzliche Schritte: Zunächst muss die Ziel-DNA durch Erhitzen denaturiert werden, danach folgt ein Hybridisierungs- oder Annealingschritt, in welchem die Primer an die komplementären Basen der Ziel-DNA binden. Anschließend wird die Ziel-DNA von den Primern beginnend, üblicherweise mittels einer hitzestabilen *Taq*-Polymerase, amplifiziert (POWLEDGE, 2004).

Nach der Amplifikation können die Produkte einer klassischen PCR, die sogenannten Amplikons, unter anderem durch eine Agarose-Gelelektrophorese ausgewertet werden. Dabei werden die PCR-Produkte ihrer Größe nach in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Zum Anfärben der Nukleinsäuren wird häufig Ethidiumbromid (EtBr) verwendet, welches zwischen die Basen von DNA oder RNA interkaliert. Durch Anregung mit ultraviolettem Licht fluoresziert EtBr, wodurch die Lage der DNA- oder RNA-Banden im Agarosegel sicht- und dokumentierbar (z.B. durch Fotografie) wird (VOYTAS, 2003).

1.3. *Fascioloides magna*

1.3.1. Morphologische Merkmale

Voll ausgewachsen ist *F. magna* ungefähr 7-10 cm lang und 2-3 cm breit und verfügt über einen dicken, breit-ovalförmigen, an Vorder- und Hinterende stumpf abgerundeten Körper (**Abb. 1**). Damit kann der Amerikanische Riesenleberegel doppelt so groß wie der lorbeerblattförmige Leberegel *F. hepatica* werden. Das Tegument von *F. magna* ist bestachelt und verfügt an den ventrolateralen Körperrändern über Reihen von vergrößerten Stacheln. Der Parasit besitzt einen Mund- und Bauchsaugnapf, wobei der Mundsaugnapf leicht subterminal liegt und kleiner als der Bauchsaugnapf ist (JONES, 2005a, ECKERT et al., 2008).



Abb. 1.
F. magna aus der Leber eines befallenen Rothirsches

1.3.2. Phylogenie und Systematik

Die Überfamilie Echinostomatoidea umfasst nach LA RUE (1957 [zit. in KOSTADINOVA & JONES, 2005]) neun Familien, unter anderem auch die Familie Fasciolidae, zu welcher *F. magna* gezählt wird. Die kosmopolitisch vorkommende Familie Fasciolidae (Syn. Fasciolopsidae ODHNER 1926) enthält vor allem Gattungen, welche gemeinhin als „Leberegel“ bezeichnet werden. Alle Vertreter verfügen in ihrem Lebenszyklus über Zerkarien, welche sich in der Umwelt (meist an Wasserpflanzen) enzystieren. Nach oraler Aufnahme der infektiösen Metazerkarien durch den Endwirt (vor allem herbivore Säugetiere), besiedeln die großen Würmer die Leber und Gallengänge oder die Eingeweide ihrer Wirtstiere. Einige Arten können auch omnivore Säugetiere befallen, manchmal auch den Menschen (z.B. *F. hepatica*). Da die Tiere häufig auch bei domestizierten Säugetieren vorkommen, wird die Familie

Fasciolidae zu den veterinärmedizinisch wichtigsten Digeneafamilien gezählt (JONES, 2005a).

Die Familie Fasciolidae gliedert sich in die drei Unterfamilien Fasciolinae RAILLIET 1895, Fasciolopsinae ODHNER 1910, sowie Protofasciolinae SKRJABIN 1948, auf. *F. magna* wird zur Unterfamilie Fasciolinae gezählt, welche im Gegensatz zu den beiden anderen Unterfamilien verzweigte Caeca aufweist. Vertreter der Unterfamilie Fasciolinae verfügen üblicherweise über einen blattförmigen Körper mit bestacheltem Tegument. Die Hoden können symmetrisch oder hintereinander angelegt sein. Liegt der erste Fall vor, handelt es sich um die Gattung *Fascioloides* WARD 1917, eine von derzeit sechs Gattungen der Familie Fasciolidae. Die Gattung *Fascioloides* ist monotypisch, das heißt, sie umfasst nur eine einzige Art – nämlich den Amerikanischen Riesenleberegel *F. magna* (JONES, 2005a).

1.3.3. Geografische Verbreitung

Rezent kommt *F. magna* in Teilen Nordamerikas und Europas enzootisch vor. In seiner ursprünglichen Heimat Nordamerika ist der Parasit heutzutage hauptsächlich in den folgenden Gebieten aufzufinden: Great Lakes-Region, Golfküste, unterer Mississippi und Südatlantikküste, Nordpazifikküste, Rocky Mountain-Graben, Nordquebec und Labrador (PYBUS, 2001). In der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts wurde *F. magna* nach Europa eingeschleppt, wo der Parasit zunächst in Italien (BASSI, 1875), der Tschechischen Republik (ULLRICH, 1930), Deutschland (SALOMON, 1932) und Polen (ŚLUSARSKY, 1955) nachgewiesen werden konnte. Danach breitete sich der Parasit nach Österreich (PFEIFFER, 1983), der Slowakei (RAJSKÝ et al., 1994), Ungarn (MAJOROS & SZTOJKOV, 1994) und Kroatien (MARINCULIĆ et al., 2002, JANICKI et al., 2005) aus (FALTÝNKOVÁ et al., 2006). Heutzutage kommt *F. magna* vor allem in der Tschechischen Republik, der Slowakei, Österreich, Ungarn und Kroatien bei Reh-, Rot- und Damwild regional enzootisch vor (ECKERT et al., 2008).

1.3.4. Lebenszyklus

Der Lebenszyklus von *F. magna* ist dem von *F. hepatica* ähnlich und beinhaltet sowohl freilebende Parasitenstadien (Eier, Mirazidien, Zerkarien, Metazerkarien),

als auch endoparasitische Stadien (Sporozysten, Redien, Adulttiere). Eine Beschreibung des Lebenszyklus, sowie der Merkmale einzelner Parasitenstadien, findet sich unter anderem in PYBUS (2001).

Adulttiere leben in fibrösen Kapsel im Leberparenchym ihres Endwirtes und geben ihre Eier in dessen Gallengänge ab. Diese gelangen mit der Gallenflüssigkeit in den Dünndarm und werden nachfolgend unentwickelt ausgeschieden. Nach einer mehrwöchigen externen Embryonierungsphase (SWALES, 1935 [zit. in PYBUS, 2001]) schlüpfen freischwimmende Mirazidien, welche aktiv Zwischenwirtschnecken der Familie Lymnaeidae RAFINESQUE 1815 penetrieren. Die Entwicklung innerhalb der Schnecken dauert, abhängig von Temperatur und Schneckenart, etwa 40-58 Tage (SWALES, 1935, ERHARDOVÁ, 1961) und umfasst sackförmige Sporozysten, zwei mit Saugnapf und Darm ausgestattete Rediengenerationen, sowie ein Zerkarienstadium.

Die mit Schwimmschwänzen versehenen Zerkarien verlassen aktiv den Schneckenwirt und haften sich an Strukturen, meist Wasserpflanzen, an. Dort enzystieren sie sich und werden zu äußerst widerstandsfähigen Metazerkarien, welche oral vom Endwirt aufgenommen werden. Die Metazerkarien exzystieren sich im Magen-Darm-Trakt des Wirtstieres und die juvenilen Leberegel penetrieren nach Migration durch die Bauchhöhle die Glisson-Kapsel der Leber. Nach einer Wanderungsphase im Lebergewebe umschließen sich die jungen Egel mit fibrösen Kapseln, in denen sie ihre Entwicklung komplettieren und mit der Eiablage beginnen. Abhängig von der Wirtstierart variiert die Präpatenzzeit zwischen 3-7 Monaten (ERHARDOVÁ-KOTRLÁ, 1971, FOREYT & TODD, 1976 [zit. in PYBUS, 2001]). Adulte *F. magna* können in der Leber ihrer Endwirte mindestens fünf Jahre lang überleben (ERHARDOVÁ-KOTRLÁ, 1971 [zit. in PYBUS, 2001]).

1.3.5. Wirtstiere

1.3.5.1. Endwirte

Die typischen Endwirte des Amerikanischen Riesenleberegels, in welchen patente Infektionen etabliert werden können, sind in Nordamerika das Wapiti (*Cervus canadensis* ERXLEBEN 1777), der Weißwedelhirsch (*Odocoileus virginianus* [ZIMMERMANN 1780]) und das Karibu (*Rangifer tarandus* [LINNAEUS 1758]) (PYBUS,

2001). Als europäische Endwirte dienen vor allem Rotwild (*Cervus elaphus* LINNAEUS 1758) und Damwild (*Dama dama* [LINNAEUS 1758]) (ERHARDOVÁ-KOTRLÁ & KOTRLY, 1968).

Der Amerikanische Riesenleberegel kann auch domestizierte Wiederkäuer befallen, welche als Fehlwirte gelten, da keine patenten Infektionen etabliert werden können. In manchen Fehlwirten, wie Schafen, Ziegen, oder auch Rehwild („aberrant hosts“), kann es durch permanente Wanderungen juveniler Egel im Lebergewebe zu schweren Leberschädigungen kommen, woran die Wirtstiere oftmals frühzeitig versterben. In anderen Fehlwirten, wie Rindern und Lamas („dead-end hosts“), werden die Egel vollständig in dickwandige Kapseln eingeschlossen und erreichen selten die Geschlechtsreife. Zudem können die Parasiteneier nicht in den Dünndarm abgegeben werden, wodurch es zu keiner Eiausscheidung kommt. Infektionen beim Menschen wurden bisher nicht nachgewiesen (SWALES, 1935 [zit. in PYBUS, 2001], FOREYT, 1996, PYBUS, 2001).

1.3.5.2. Zwischenwirte

In Europa wurden bislang die beiden Schneckenarten *G. truncatula* (ERHARDOVÁ-KOTRLÁ, 1968; 1971 [zit. in FALTÝNKOVÁ et al., 2006]) und *Radix peregra* (O. F. MÜLLER 1774) (FALTÝNKOVÁ et al., 2006) als natürliche Zwischenwirte von *F. magna* bestätigt. Während *G. truncatula* schon seit mehreren Jahrzehnten als natürlicher Zwischenwirt von *F. magna* in Europa beobachtet werden konnte, ist *R. peregra* in diesem Zusammenhang erst seit kurzem bekannt. Experimentelle Infektionen von *R. peregra* und *Radix peregra ovata* (DRAPARNAUD 1805) wurden zwar bereits im Jahre 1968 von ERHARDOVÁ-KOTRLÁ durchgeführt, allerdings wurde zu diesem Zeitpunkt nur über die Entwicklung von Mutterredien berichtet. Knapp 40 Jahre später konnte bei experimentellen Infektionen von *R. peregra* hingegen die komplette Entwicklung von *F. magna*-Zerkarien beobachtet werden. Dies könnte darauf hindeuten, dass das Zwischenwirtsspektrum aktuell in Europa erweitert wird (FALTÝNKOVÁ et al., 2006), zumal in Nordamerika mindestens 10 Schneckenarten aus der Familie Lymnaeidae als natürliche und/oder experimentelle Zwischenwirte von *F. magna* bekannt sind (DUNKEL et al., 1996).

1.3.6. Situation in Österreich

Im Jahr 1983 berichtete Pfeiffer erstmals von *F. magna* bei Damwild aus einem Wildgatter in Österreich. In freier Wildbahn wurden erstmals im Herbst des Jahres 2000 infizierte Cerviden in der Gegend von Fischamend gefunden (WINKELMAYER & PROSL, 2001). In den darauffolgenden Jahren breitete sich *F. magna* in freilebendem Rot- und Rehwild in den Auegebieten östlich von Wien aus, insbesondere nahe Fischamend, Regelsbrunn, Orth und Mannswörth (WINKELMAYER & PROSL, 2001, URSPRUNG, 2002).

Um weitere Gebiete mit hohem Infektionsrisiko zu identifizieren, wurden in einer GIS-basierten Risikoanalyse potentiell hochinfektiöse Weideflächen im Bereich der Donau-Auen östlich von Wien kartiert. Dabei wurde vor allem rund um Fischamend und Orth/Donau eine Verschneidung mehrerer Risikofaktoren aufgezeigt (RECKENDORFER & GROISS, 2006).

F. magna-Infektionen der in Österreich betroffenen Cerviden können schwerwiegende Folgen mit sich ziehen. So kapseln sich die juvenilen Leberegel in Rehwild nicht ein und es kommt durch permanente Wanderungen zu starken Leberschäden und einem oftmals frühzeitigen Tod der Tiere. Die Lebern von Rotwild zeigen hingegen chronische Veränderungen, die Tiere werden je nach Intensität des Befalls geschwächt oder können ohne auffällige Symptome spontan verenden (ERHARDOVÁ-KOTRLÁ & KOTRLY, 1968).

Bereits ein Jahr nach der Erstentdeckung in freier Wildbahn, im Jahr 2001, wurde deshalb ein Untersuchungs- und Bekämpfungsprogramm gestartet. Infolge wiederholter Behandlungen der Endwirte mit Triclabendazol war ein starker Rückgang der Prävalenz beim Wild (URSPRUNG et al., 2006), sowie 2004/2005 eine vermutlich auch daraus resultierende sehr niedrige Prävalenz (0,03%) von *F. magna* in *G. truncatula* zu beobachten (SATTMANN & HÖRWEIG, 2006). Bis dato gelang jedoch keine Eradikation von *F. magna* in Österreich.

1.4. Fragestellung

Diese Diplomarbeit sollte die aktuelle Infektionslast der europäischen Zwischenwirtschnecke *G. truncatula* mit *F. magna* im Bereich Orth/Donau

(Niederösterreich) darstellen. Diese Untersuchung könnte dazu beitragen, die Wirksamkeit vorangegangener Maßnahmen zur Eindämmung der Infektion zu beurteilen und eventuell notwendige weiterführende Strategien zu entwickeln.

Hierzu wurden anhand eines Monitorings von *G. truncatula* im Zeitraum April bis Oktober 2008 an drei ausgewählten Standorten im Bereich Orth/Donau (Entenhausen, Märchenteich und Neubruchwiese) fünf Fragestellungen bearbeitet:

Erstens sollten populationsdynamische Aspekte der Überträgerschnecken in den Donau-Auen eruiert werden. Dies umfasste die Feststellung der räumlichen und zeitlichen Verteilung von *G. truncatula* an den untersuchten Standorten, sowie die Rekonstruktion des Entwicklungszyklus der Schnecken. Dazu sollten mindestens 1000 Schnecken pro Standort untersucht werden.

Zweitens sollte die Prävalenz digener Trematoden in den aufgesammelten Schnecken mikroskopisch bestimmt werden. Gefundene Trematodenstadien sollten isoliert und konserviert aufbewahrt werden. Zudem sollten wichtige Funde fotografisch dokumentiert werden, und es sollte eine grobe Klassifizierung gefundener Digenea anhand der Morphologie der Parasitenstadien vorgenommen werden.

Drittens sollten molekularbiologische Verfahren zum Nachweis digener Trematoden generell, sowie *F. magna* speziell entwickelt werden. Für die dafür geplanten PCRs sollten zwei passende Primerpaare designt werden, mit welchen ausgewählte Proben überprüft werden sollten.

Viertens sollte anhand Stichprobenuntersuchungen und den erhaltenen mikroskopischen und molekularbiologischen Ergebnissen ein Vergleich zwischen den verschiedenen Untersuchungsmethoden durchgeführt werden.

Fünftens sollte untersucht werden, ob Auffälligkeiten in der Standortverteilung infizierter Schnecken vorhanden waren, und/oder ob eine Saisonalität des Befalls feststellbar war.

2. Material und Methoden

Die Sammlungen des Probenmaterials, die Entwicklung der Primerpaare MagnaF/MagnaR und TremF/TremR, sowie Teile der PCR-Etablierung wurden in Zusammenarbeit mit Frau Kerstin Liesinger (LIESINGER, 2010) durchgeführt.

2.1. Sammlung der Überträgerschnecken

Die Sammlungen der untersuchten *G. truncatula* wurden hauptsächlich an drei ausgewählten Standorten im Bereich Orth/Donau durchgeführt. Es handelte sich hierbei um die Standorte Entenhafen, Märchenteich und Neubruchwiese. Wie in **Abb. 2** ersichtlich, befindet sich Standort 1 (Entenhafen) im Mündungsbereich der großen Binn. Die als Standort 2 eingezeichnete „Tierbodentraverse“ unterteilt zusammen mit anderen Traversen die kleine Binn in mehrere Becken (RECKENDORFER, 2000). Der an Standort 3 beprobte Flussabschnitt der kleine Binn von der Tierbodentraverse bis zum Zusammenfluss mit dem Rohrhafenarm weist bei Hochwasser mit bis zu 2 m/s die höchste Strömungsgeschwindigkeit der untersuchten Hauptstandorte auf (RECKENDORFER, 2000). Zusätzlich wurde noch jeweils eine Beprobung in Haslau, Regelsbrunn und Fischamend (Südufer der Fischa) an gut zugänglichen Plätzen in der Nähe von Gewässern durchgeführt (**Tab. 3**).



Abb. 2

Schematische Darstellung der Gewässervernetzung und Hauptstandorte im Untersuchungsgebiet Orth/Donau

Kartengrundlage: SCHABUSS & RECKENDORFER (2006); 1 = Standort 1 (Entenhafen); 2 = Standort 2 (Märchenteich); 3 = Standort 3 (Neubruchwiese); BwT = Badwandltraverse; TbT = Tierbodentraverse.

Tab. 3*Standorte für Sammlungen von G. truncatula.*

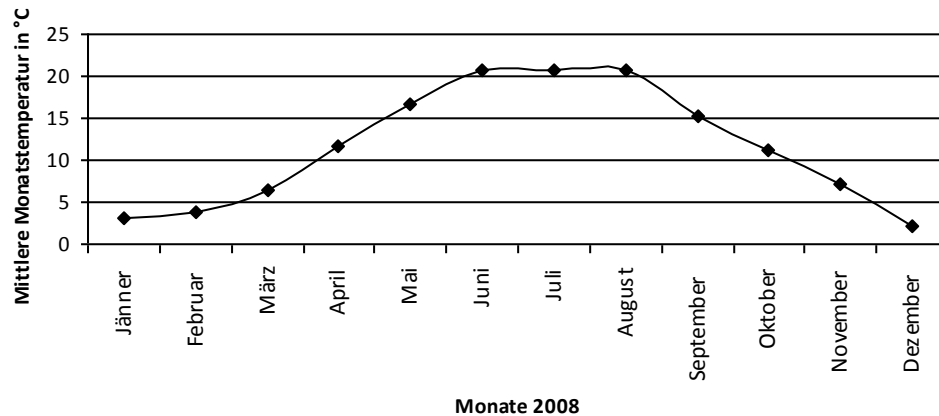
Standort		Koordinaten		Höhe
Standort 1: Entenhafen		48°07'25.74"N	16°42'11.01"E	151 m
Standort 2: Märchenteich		48°07'46.72"N	16°41'46.11"E	154 m
Standort 3: Neubruchwiese		48°07'51.45"N	16°40'46.99"E	148 m
Sonstige Standorte	Haslau	48°07'18.15"N	16°43'01.81"E	150 m
	Regelsbrunn	48°06'53.66"N	16°46'48.15"E	143 m
	Fischamend	48°06'51.52"N	16°39'45.59"E	157 m

Die Koordinaten wurden aus Google Earth™ (Google Incorporated, USA) entnommen.
Referenzsystem: WGS84.

Die Sammlungen erfolgten, abhängig von den Wetterbedingungen, alle 6 bis 24 Tage (Durchschnitt 14 Tage), und wurden von 1-4 Personen durchgeführt. Eine vollständige Begehung aller drei Hauptstandorte dauerte ca. einen halben Tag, die reine Sammelzeit pro Standort betrug 10-70 min/Person.

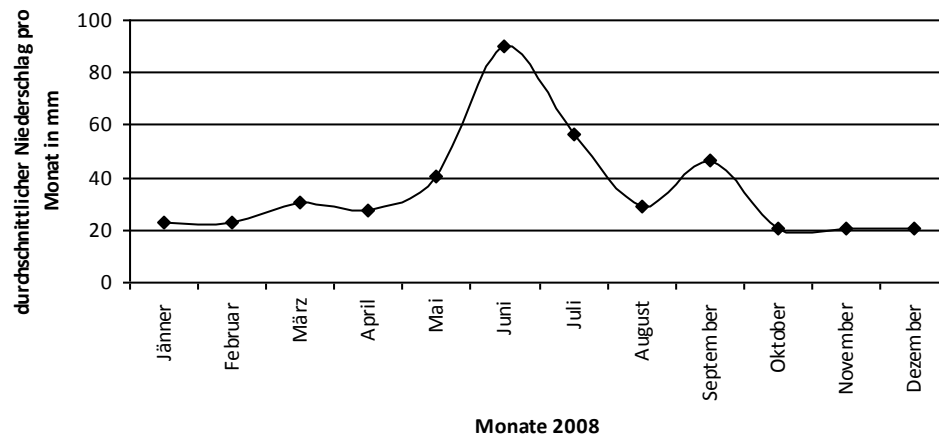
Die Schnecken wurden per Hand aufgesammelt und in Glasbehältern mit wenig Wasser untergebracht. Direkt nach der Sammlung wurden die Gläser in Kühlbehältern in das Untersuchungslabor transportiert. Dort wurden die Behälter im Kühlschrank bei 8°C gelagert, wo die Schnecken einige Tage bis zu 1 ½ Wochen überleben konnten. Für darüber hinausgehende Lagerung wurden die Schnecken in einem Sieb unter fließendem Wasser gewaschen und bis zur Untersuchung in 75% Ethanol (EtOH) bei Raumtemperatur konserviert.

Die Anzahl der gesammelten Schnecken pro Zeiteinheit pro Person vermittelte einen Eindruck von der Dichte und Größe der jeweiligen Population. Dies diente auch zur Eruierung der Abhängigkeit des Zwischenwirtvorkommens von den jeweiligen Umweltbedingungen, welche schriftlich und fotografisch an den Standorten dokumentiert wurden. Die mittleren Monatstemperaturen und durchschnittlichen Niederschlagswerte im Jahr 2008 sind den **Abb. 3** und **4** zu entnehmen.

**Abb. 3**

Mittlere Monatstemperaturen im Jahr 2008.

Daten übernommen von Wiesl's Wetterstation, Wien, Penzing.

**Abb. 4**

Durchschnittliche Niederschlagswerte pro Monat im Jahr 2008.

Daten übernommen von Wiesl's Wetterstation, Wien, Penzing.

2.2. Makroskopische und mikroskopische

Untersuchungen an *Galba truncatula*

2.2.1. Vermessung der Schalenhöhe

Jede Schnecke wurde vor der Sektion mit einem Lineal in ihrer Schalenhöhe vermessen, um eine mögliche Korrelation des Parasitenbefalls mit dem Alter/der

Größe der Zwischenwirte zu bestimmen. Die Schnecken wurden nachfolgend in 12 Größenklassen von jeweils 1 mm eingeteilt ($>1\text{-}\leq 2\text{ mm}$ bis $>11\text{-}\leq 12\text{ mm}$).

2.2.2. Schneckensektion und Stichprobenentnahme

Zur Sektion wurden die Schnecken einzeln in mit Wasser befüllte Sezierschalen gelegt und unter einem Wild/Leica M3Z-Stereomikroskop (Leica Mikrosysteme, Österreich) mit einer Pinzette am Gehäuse fixiert. Bei noch lebenden Schnecken wurde danach mit einer weiteren Pinzette der Kopf vom Körper abgetrennt und das Gehäuse zerbrochen. Waren die Schnecken bereits tot, wurde, wenn möglich, der gesamte Weichkörper in einem Stück aus der Schale gezogen.

Zur Sektion wurde der Weichkörper, insbesondere die Verdauungsorgane, in kleine Stücke zerteilt. Der zähe Schneckenfuß wurde in gröbere Stücke zergliedert. Schnecken, welche als Stichproben dienten (ca. 10% der Gesamtanzahl), wurden nicht zerteilt. Bei diesen Tieren wurde das Gehäuse entfernt und die Weichteiloberfläche, sowie das Sektionswasser inspiziert. Konnten so keine Trematoden gefunden werden, wurden sie in einem Stück in Eppendorfgläser überführt, fortlaufend alphanumerisch gekennzeichnet und mit Wasser, 75% EtOH, oder ohne Flüssigkeit eingefroren.

Die Stereomikroskop-Vergrößerungen variierten von 60,5-fach (Aufbrechen des Gehäuses) bis 400-fach (Untersuchung der Innereien und des Sektionswassers). Gefundene Digenea wurden mittels einer Einwegpipette mitsamt etwas Sektionswasser und sich darin befindenden Schneckenteilen in ein Eppendorfglas transferiert und auf -20°C eingefroren. Bei einem Teil der gefundenen Trematoden erfolgte eine Vermessung und eine fotografische Dokumentation unter einem Axioskop-Durchlichtmikroskop (Carl Zeiss, Österreich) (Vergrößerung 40 bis 1000-fach). Mit dem Stereomikroskop nicht eindeutig bestimmbare Digenea wurden ebenfalls weiterfolgend mit dem Durchlichtmikroskop untersucht.

Befanden sich die Parasiten noch im Schneckengewebe (meist Mitteldarmdrüse), wurde dieses mit einer sterilen Pinzette aufgenommen und ebenfalls in ein Eppendorfglas überführt und auf -20°C eingefroren. Für etwaige spätere weiterführende morphologische Untersuchungen und Fotografien wurde ein Teil

der Trematoden in 75% Ethanol konserviert. Je nach Sektionsergebnis war pro Schnecke mit einem Zeitaufwand von etwa 2-20 min zu rechnen.

2.3. Molekularbiologische Untersuchungen

2.3.1. Primerentwicklung

Alle manuellen multiplen Alignments dieses und der folgenden Arbeitsschritte wurden mithilfe der Computerprogramme ClustalX 1.8 (THOMPSON et al., 1997) und GeneDoc 2.7.000 (NICHOLAS & NICHOLAS, 1997) durchgeführt. Lokale Alignments wurden mittels BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) durchgeführt. Globale Alignments wurden mit EMBOSS (European Molecular Biology Open Software Suite, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/index.html>) angefertigt.

2.3.1.1. Allgemeine Kriterien des Primerdesigns

Die Primerregionen wurden so ausgewählt, dass die Primer günstige Eigenschaften aufwiesen. So sollten Forward- und Reverse-Primer beispielsweise eine ähnliche Schmelztemperatur aufweisen, um während der PCR eine beständige Leistungsfähigkeit beider Primer zu gewährleisten. Zudem wurde auf Eigenschaften wie einen optimalen GC-Gehalt, die Primerlänge und Komplementaritäten geachtet (BURPO, 2001).

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primerpaare wurden gegen Sequenzen verschiedener Kontrollarten der NCBI-GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) geBLASTet, um unerwünschte Kreuzreaktionen im Vorhinein auszuschließen. Dies beinhaltete den Vergleich mit Arten des Stammes Plathelminthes, Arten der Familien Lymnaeidae und Cervidae GOLDFUSS 1820, sowie möglichen Umweltkontaminanten (**Tab. 4**).

Tab. 4

Durch BLAST mit den Primerpaaren verglichene Phyla, (Unter-)Klassen, Familien und Arten.

Vergleichsgruppe/-art	GenBank-Taxidnummer
Unterklasse Digenea	6179
Unterklasse Aspidogastrea	27867
Phylum Nematoda	6231
Klasse Cestoda	6199
<i>Escherichia coli</i>	562
Phylum Ascomycota	4890
Familie Cervidae	9850
Familie Lymnaeidae	6521

Alle Primer wurden mittels Internetauftrag bei der Firma MWG Biotech AG unter der Adresse <https://ecom.mwgdna.com> bestellt.

2.3.1.2. Trematodenuniversal-Primerpaar

Es wurde ein Trematodenuniversal-Primerpaar (TremF/TremR) entwickelt. Dieses Primerpaar sollte es ermöglichen, spezifisch Vertreter der Klasse Trematoda in den untersuchten *G. truncatula* zu detektieren. Als geeignete Primerbereiche für das Trematoden-Primerpaar erschienen innerhalb der Klasse Trematoda konservierte 18S rDNA-Regionen. Zur Bestimmung geeigneter Primerregionen wurde ein multiples Alignment von 18S rDNA-Sequenzen aus der GenBank mittels ClustalX und GeneDoc durchgeführt. Unter den alignnten Arten befanden sich sieben Vertreter der Unterklasse Digenea, sowie ein Vertreter der Unterklasse Aspidogastrea (**Tab. 5**).

Tab. 5

Alignnte Sequenzen der Klasse Trematoda zum Primerdesign von TremF/TremR.

Unterklasse	Art	GenBanknummer
Unterklasse Digenea	<i>Fascioloides magna</i>	EF051080.1
	<i>Bivitellobilharzia nairi</i>	AY829261.1
	<i>Drepanocephalus spathans</i>	AY245762.1
	<i>Heronimus mollis</i>	L14486.1

Fortsetzung

Unterklasse	Art	GenBanknummer
Unterklasse Digenea	<i>Monostephanostomum nolani</i>	EF506762.1
	<i>Stephanostomum</i> sp.	EF506760.1
	<i>Tetracerasta blepta</i>	L06670.1
Unterklasse Aspidogastrea	<i>Aspidogaster conchicola</i>	AJ287478.1

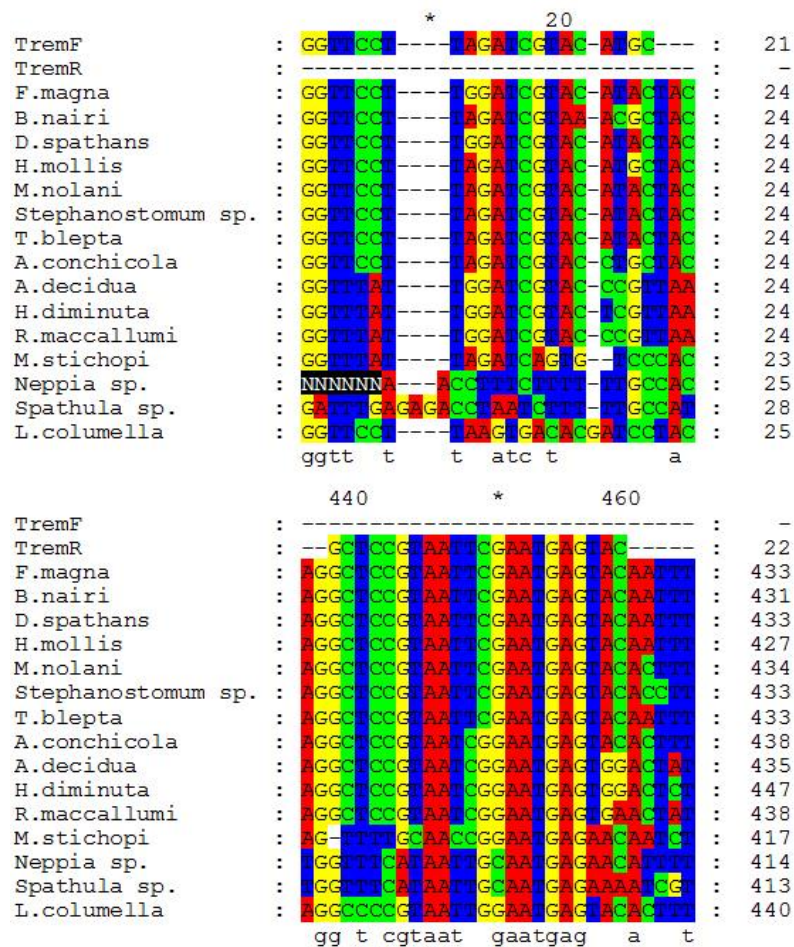
Um auszuschließen, dass die Primer auch DNA anderer Plathelminthes-Klassen oder Arten der Familie Lymnaeidae amplifizieren können, wurden weitere Kontrollsequenzen aligniert. Es wurden drei Zestodenarten, drei Vertreter der Klasse Turbellaria EHRENBERG 1831, sowie eine Art der Familie Lymnaeidae aus der GenBank ausgewählt und aligniert (**Tab. 6**).

Tab. 6

Alignierte Sequenzen der Klassen Cestoda und Turbellaria, sowie der Familie Lymnaeidae zum Primerdesign von TremF/TremR.

Klasse/Familie	Art	GenBanknummer
Klasse Cestoda	<i>Amurotaenia decida</i>	AF124474.1
	<i>Hymenolepis diminuta</i>	AF124475.1
	<i>Rhinebothrium maccallumi</i>	AF124476.1
Klasse Turbellaria	<i>Meara stichopi</i>	AF119085.1
	<i>Neppia</i> sp.	DQ665999.1
	<i>Spathula</i> sp.	DQ666007.1
Familie Lymnaeidae	<i>Lymnaea columella</i>	EU241866.1

Nach Vergleich der alignierten 18S rDNA-Sequenzen wurde das Primerpaar TremF 5'-GGTTCCTTAGATCGTACATGC-3' und TremR 5'-GTACTCATTCGATTACGGAGC-3' entwickelt (**Abb. 5**). Zur artspezifischen Differenzierung mittels Sequenzierung wurde zudem darauf geachtet, dass sich innerhalb des ca. 450 bp großen Amplikons speziesspezifisch variable Sequenzbereiche befanden.

**Abb. 5**

Trematodenuniversal-Primerpaar TremF/TremR

2.3.1.2.1. Globale Alignments mittels EMBOSS

Anhand von globalen Alignments mittels EMBOSS wurde die Bindungsfähigkeit beider Trem-Primer an 15 weitere Digenea-Arten überprüft. Dafür wurden 18S-Sequenzen von jeweils drei Arten pro Ordnung bzw. Überfamilie, welche in *G. truncatula* vorkommen können, aus der GenBank entnommen (**Tab. 7**) und an TremF und TremR alignt. Priorität bei der Auswahl der Kontrollarten hatten tatsächlich in *G. truncatula* vorkommende Digenea-Arten. Waren diese nicht in der GenBank verfügbar, wurde auf nähere Verwandte dieser Arten zurückgegriffen.

Tab. 7

Mittels EMBOSS an TremF/TremR alignte Sequenzen der Unterklasse Digenea.

Überfamilie/Ordnung	Art	GenBanknummer
Überfamilie Echinostomatoidea	<i>Fascioloides magna</i>	EF534989.1
	<i>Fasciola hepatica</i>	AJ004969.1
	<i>Echinostoma revolutum</i>	AY222132.1
Überfamilie Paramphistomoidea	<i>Calicophoron calicophorum</i>	L06566.1
	<i>Stichorchis subtriquetrus</i>	AY245769.1
	<i>Indosolenorchis hirudinaceus</i>	AY222110.1
Überfamilie Pronocephaloidea	<i>Notocotylus pacifera</i>	AY245765.1
	<i>Catantropis indicus</i>	AY222114.1
	<i>Notocotylus</i> sp.	AJ287547.1
Ordnung Strigeida	<i>Apharyngostrigea pipientis</i>	AY245757.1
	<i>Diplostomum phoxini</i>	AY222090.1
	<i>Bolbophorus damnicus</i>	AF490574.1
Ordnung Plagiorchiida	<i>Tetracerasta blepta</i>	L06670.1
	<i>Koseiria xishaense</i>	AY222125.1
	<i>Opisthioglyphe ranae</i>	AY222157.1

Zudem wurde mittels EMBOSS die Bindungsfähigkeit der Primer an die Ordnung Strongylida RAILLIET & HENRY 1913 (Nematoda [DIESING 1861]) überprüft. Es ist bekannt, dass *Muellerius capillaris* (MUELLER 1889) (Nematoda: Strongylida) ebenfalls in *G. truncatula* vorkommt (HOURDIN et al., 1992). Es wurden globale TremF/TremR-Alignments mit fünf 18S-Sequenzen von Vertretern der Ordnung Strongylida durchgeführt (**Tab. 8**).

Tab. 8

Mittels EMBOSS an TremF/TremR alignte Sequenzen der Ordnung Strongylida.

Art	GenBanknummer
<i>Muellerius capillaris</i>	AY295810.1
<i>Hypodontus macropi</i>	AJ920339.2
<i>Parelaphostrongylus odocoilei</i>	AY295815.1
<i>Protostrongylus rufescens</i>	AJ920364.2
<i>Stenurus minor</i>	AY295817.1

2.3.1.3. *Fascioloides magna*-Primerpaar

Es wurde das Primerpaar MagnaF/MagnaR zur speziesspezifischen Amplifikation von *F. magna*-DNA entwickelt. Mit diesem Primerpaar sollte eine Detektion von *F. magna* in den untersuchten *G. truncatula* ermöglicht werden.

Dazu wurde zunächst ein Vergleich der speziesspezifisch variablen ITS-Regionen (NOLAN & CRIBB, 2005) von *F. magna* und dessen nahen Verwandten *F. hepatica* durchgeführt. Da diese beiden Arten der Unterfamilie Fasciolinae angehören (JONES, 2005a), weisen sie auch in diesen Sequenzbereichen einen hohen Grad an Homologie auf (**Kapitel 3.4.5.1.**).

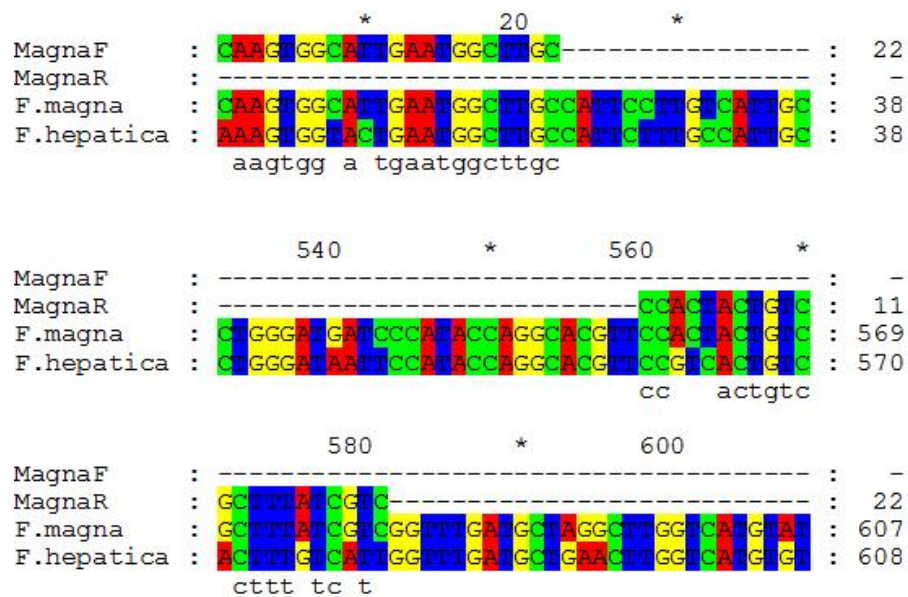
Es wurden drei Kontrollsequenzen der ITS1/5,8S/ITS2 rDNA-Region von *F. hepatica* (**Tab. 9**) mittels GeneDoc aneinander align und zu einer langen Sequenz zusammengefügt. Die zusammengefügte *F. hepatica*-Sequenz wurde an eine Sequenz von *F. magna* (**Tab. 9**) align.

Tab. 9

Align Sequenzen von *F. hepatica* und *F. magna* zum Primerdesign von MagnaF/MagnaR.

Art	GenBanknummer
<i>Fasciola hepatica</i>	AB477352.1
	AM900370.1
	AB207148.1
<i>Fascioloides magna</i>	EF051080.1

Nach Vergleich dieser Sequenzen wurden zwei Primerregionen in Bereichen der ITS1- und ITS2-Regionen ausgewählt, in welchen sich *F. magna* von *F. hepatica* unterschied. In der ITS1-Region befindet sich der Forward-Primer MagnaF 5'-CAAGTGGCATTGAATGGCTTGC-3', in der ITS2-Region der Reverse-Primer MagnaR 5'-GACGATAAAGCGACAGTAGTGG-3' (**Abb. 6**). Das ca. 600 bp lange Amplikon umfasst die gesamte 5,8S rDNA und enthält ausreichend Sequenzdivergenzen zwischen *F. magna* und *F. hepatica*, um *F. magna* eindeutig durch Sequenzierung identifizieren zu können.

**Abb. 6**

F. magna-Primerpaar MagnaF/MagnaR

2.3.1.3.1. Globale Alignments mittels EMBOSS

Um sicherzustellen, dass es sich bei allen Proben, welche mit MagnaF/MagnaR ein positives (und mit FASC_f/FASC_r ein negatives) Ergebnis aufwiesen, um *F. magna* handelt, wurde die Bindungsfähigkeit des Primerpaares an weitere in *G. truncatula* vorkommenden digene Trematoden überprüft.

Die Primerbindungsfähigkeit wurden durch globale Alignments mittels EMBOSS an neun Referenzsequenzen bewertet. Als Referenzsequenzen wurden fünf in Europa vorkommende, *G. truncatula* parasitierende Vertreter der Überfamilie Echinostomatoidea und jeweils 1-2 Vertreter der vier anderen untersuchten Überfamilien bzw. Ordnungen aus der GenBank ausgewählt (**Tab. 10**). Von der Art *Echinostoma echinatum* (ZEDER 1803) war keine 18S-Sequenz in der GenBank verfügbar.

Tab. 10

Mittels EMBOSS an MagnaF/MagnaR alignte Sequenzen der Unterklasse Digenea.

Vergleichsgruppe	Art	GenBanknummer
Überfamilie Echinostomatoidea	<i>Fascioloides magna</i>	EF051080.1
	<i>Fasciola hepatica</i>	AM900370.1
	<i>Echinostoma revolutum</i>	AF067850.1
	<i>Hypoderaeum conoideum</i>	AJ564385.1
	<i>Echinoparyphium recurvatum</i>	AY168931.1
Überfamilie Paramphistomoidea	<i>Calicophoron daubneyi</i>	AY790883.1
	<i>Gastrodiscoides hominis</i>	EU887294.1
Überfamilie Pronocephaloidea	<i>Ogmocotyle capricorni</i>	AB367788.1
Ordnung Strigeida	<i>Tylodelphys scheuringi</i>	FJ469596.1
Ordnung Plagiorchiida	<i>Plagiorchis elegans</i>	AF151952.1

2.3.1.3.2. Vergleich der Amplikonlängen in GeneDoc

Zudem wurden die potentiellen Amplikonlängen verschiedener in *G. truncatula* vorkommender Vertreter der Überfamilie Echinostomatoidea miteinander verglichen. Dazu wurden die Primer mittels GeneDoc an fünf aus der GenBank entnommene Echinostomatoidea-Sequenzen (**Tab. 11**) alignt.

Tab. 11

Vertreter der Überfamilie Echinostomatoidea zum Vergleich der MagnaF/MagnaR-Amplikonlängen.

Art	GenBanknummer
<i>Fascioloides magna</i>	EF051080.1
<i>Fasciola hepatica</i>	AM900370.1
<i>Echinostoma revolutum</i>	AF067850.1
<i>Hypoderaeum conoideum</i>	AJ564385.1
<i>Echinoparyphium recurvatum</i>	AY168931.1

2.3.1.4. *Fasciola hepatica*-Primerpaar

Zur Detektion von *F. hepatica* erwies sich ein Primerpaar aus der Literatur als geeignet. Es handelte sich hierbei um die Primer FASC_f: 5'-ATTACCCATTTCTGTTAGTCC-3' und FASC_r: 5'-ACTAGGCTTAAACGGCGTCC-3' (KAPLAN et al., 1995).

Laut Literatur (KAPLAN et al., 1995) binden diese Primer ausschließlich an DNA von *F. hepatica*, aber zum Beispiel nicht an DNA von *F. magna* oder *Paramphistomum liorchis* FISCHÖDER 1901.

Das *F. hepatica*-Genom enthält eine große Familie von 124 bp-Repeats (ca. 15% des Gesamtgenoms), welche untereinander zwar nicht identisch sind, aber über ein hohes Maß an Sequenzidentität verfügen. Die Primer FASC_f/FASC_r binden spezifisch an diese 124 bp-Repeats, welche ausschließlich in *F. hepatica* vorkommen und somit die Spezifität gewährleisten sollen (KAPLAN et al., 1995).

2.3.2. Probenauswahl

2.3.2.1. Isolierte Trematodenstadien

Es wurden 30 mikroskopisch detektierte isolierte Trematodenstadien mit den Primerpaaren TremF/TremR, MagnaF/MagnaR und FASC_f/FASC_r getestet. Dies sollte eine Überprüfung der mikroskopischen Bestimmungen, sowie eine nähere Identifikation von mikroskopisch nicht näher bestimmbaren (Digenea-)Funden ermöglichen.

Die Auswahl der molekularbiologisch untersuchten Trematodenstadien enthielt Verdachtsfälle auf Echinostomatoidea-, Paramphistomoidea FISCHÖDER 1901- und Mischinfektionen, sowie nicht näher zugeordnete Trematoden- und Helminthenfunde (**Tab. 12**).

Tab. 12

Molekularbiologisch untersuchte isolierte Trematodenstadien.

Probennummer	Mikroskopische Bestimmung
4	Paramphistomoidea
7	Paramphistomoidea
10	Paramphistomoidea
14	Paramphistomoidea
15	Echinostomatoidea
18	unbestimmte Sporozysten
24	Echinostomatoidea
26	Echinostomatoidea
33	Mischinfektion: Paramphistomoidea und Echinostomatoidea

Fortsetzung

Probennummer	Mikroskopische Bestimmung
48	Paramphistomoidea
50	Mischinfektion: Paramphistomoidea und Echinostomatoidea
82	Echinostomatoidea
85	Echinostomatoidea
86	Mischinfektion: Paramphistomoidea und Echinostomatoidea
120	Echinostomatoidea
124	Echinostomatoidea
127	Echinostomatoidea
129	Echinostomatoidea
132	unbestimmte Helminthen
135	Paramphistomoidea
136	Paramphistomoidea
137	Paramphistomoidea
143	Paramphistomoidea
147	unbestimmte Helminthen
153	unbestimmte Redien
154	unbestimmte Sporozysten
157	Paramphistomoidea
160	Paramphistomoidea
164	Mischinfektion: Paramphistomoidea und unbestimmte Trematoden
166	unbestimmte Redien

2.3.2.2. Stichproben

Es wurden 68 *G. truncatula*-Stichproben molekularbiologisch untersucht (**Tab. 13**). Die Auswahl dieser Stichproben orientierte sich an den Eigenschaften der untersuchten Gesamtpopulation. Bei der Auswahl der molekularbiologisch zu untersuchenden Stichproben galt es insbesondere drei Anforderungen gerecht zu werden: pro Sammlungsmonat sollten 10 Schnecken untersucht werden, um eine gleichmäßige Verteilung der untersuchten Stichproben über die Sammlungsperiode von sieben Monaten zu gewährleisten. Im Sammlungsmonat April wurden die angestrebten 10 Stichproben nicht erreicht, da insgesamt zu wenige Schnecken gefunden wurden, aus diesem Monat wurden nur acht *G. truncatula* molekularbiologisch getestet. Die insgesamt 68 ausgewählten Stichproben sollten zudem sowohl die Gehäusegrößenverteilung, als auch die mengenmäßige

Standortverteilung der untersuchten Gesamtpopulation widerspiegeln (**Tab. 14 und 15**).

Tab. 13
Molekularbiologisch untersuchte Stichproben.

PN	SD	SG	SO	PN	SD	SG	SO
C	02.07.08	6-7 mm	1	5E	20.06.08	>4-≤5 mm	1
E	02.07.08	>4-≤5 mm	1	5K	03.09.08	>4-≤5 mm	2
O	02.07.08	>4-≤5 mm	1	5L	03.09.08	>5-≤6 mm	2
P	02.07.08	>4-≤5 mm	1	5O	20.06.08	>4-≤5 mm	1
R	02.07.08	>4-≤5 mm	2	5P	20.06.08	>4-≤5 mm	1
(C)	02.07.08	>4-≤5 mm	2	5Q	20.06.08	>5-≤6 mm	1
(I)	08.07.08	>4-≤5 mm	H	5R	20.06.08	>5-≤6 mm	1
(N)	08.07.08	>6-≤7 mm	H	6H	12.09.08	>4-≤5 mm	1
(P)	08.07.08	>5-≤6 mm	H	6I	17.09.08	>5-≤6 mm	1
(T)	08.07.08	>5-≤6 mm	H	6K	20.06.08	>2-≤3 mm	2
(Z)	21.04.08	>8-≤9 mm	1	6L	20.06.08	>3-≤4 mm	2
1A	21.04.08	>8-≤9 mm	1	6M	20.06.08	>4-≤5 mm	2
1B	21.04.08	>7-≤8 mm	1	6N	20.06.08	>4-≤5 mm	2
1C	21.04.08	>6-≤7 mm	1	6Q	20.06.08	>3-≤4 mm	2
1D	21.04.08	>7-≤8 mm	1	6X	22.08.08	>4-≤5 mm	F
1E	21.04.08	>9-≤10 mm	1	6Y	22.08.08	>5-≤6 mm	F
1F	21.04.08	>6-≤7 mm	1	7F	22.08.08	>4-≤5 mm	F
1G	21.04.08	>7-≤8 mm	3	8F	24.10.08	>3-≤4 mm	1
1J	15.05.08	>7-≤8 mm	3	8J	24.10.08	>2-≤3 mm	1
1M	27.05.08	>4-≤5 mm	1	8K	24.10.08	>1-≤2 mm	2
1O	27.05.08	>5-≤6 mm	1	8L	24.10.08	>2-≤3 mm	2
1P	27.05.08	>5-≤6 mm	1	8N	24.10.08	>2-≤3 mm	2
1R	27.05.08	>5-≤6 mm	1	8O	24.10.08	>1-≤2 mm	2
1Z	27.05.08	>6-≤7 mm	1	8R	24.10.08	>2-≤3 mm	2
2B	27.05.08	>5-≤6 mm	1	9H	31.10.08	>3-≤4 mm	2
2E	27.05.08	>4-≤5 mm	1	9M	31.10.08	>4-≤5 mm	2
2F	27.05.08	>5-≤6 mm	1	10K	31.10.08	>6-≤7 mm	2
2G	27.05.08	>4-≤5 mm	1	10Q	07.08.08	>5-≤6 mm	1

Fortsetzung

PN	SD	SG	SO	PN	SD	SG	SO
2L	07.08.08	>3-≤4 mm	2	11C	03.09.08	>4-≤5 mm	2
2M	07.08.08	>3-≤4 mm	2	11M	03.09.08	>3-≤4 mm	2
2Z	07.08.08	>2-≤3 mm	1	11X	03.09.08	>3-≤4 mm	2
3D	07.08.08	>4-≤5 mm	1	12F	03.09.08	>3-≤4 mm	2
3I	07.08.08	>1-≤2 mm	1	12G	03.09.08	>2-≤3 mm	2
3U	22.08.08	>4-≤5 mm	1	13O	03.09.08	>6-≤7 mm	1

PN = Probennummer. SD = Sammeldatum. SG = Schneckengröße. SO = Standort. H = Haslau. F = Fischamend.

Tab. 14

Mengenmäßige Gehäusegrößenverteilung der ausgewählten Stichproben und der untersuchten G. truncatula-Gesamtpopulation.

Gehäusehöhe	ausgewählte Stichproben		Gesamtpopulation	
	n	%	n	%
>1-≤2 mm	3	4,4	178	4,6
>2-≤3 mm	7	10,3	427	11,0
>3-≤4 mm	12	17,6	706	18,2
>4-≤5 mm	21	30,9	1.282	33,1
>5-≤6 mm	13	19,1	832	21,5
>6-≤7 mm	5	7,4	351	9,1
>7-≤8 mm	4	5,9	66	1,7
>8-≤9 mm	2	2,9	17	0,4
>9-≤10 mm	1	1,5	8	0,2
>10-≤11 mm	0	0,0	4	0,1
>11-≤12 mm	0	0,0	0	0,0
Gesamtanzahl	68	100	3.871	100

Tab. 15

Mengenmäßige Standortverteilung der ausgewählten Stichproben und der untersuchten G. truncatula-Gesamtpopulation.

Standort	ausgewählte Stichproben		Gesamtpopulation	
	n	%	n	%
Standort 1	35	51,5	1.975	51,0
Standort 2	24	35,3	1.347	34,8

Fortsetzung

Standort	ausgewählte Stichproben		Gesamtpopulation	
	n	%	n	%
Standort 3	2	2,9	122	3,2
sonstige Standorte	7	10,3	427	11,0
Gesamtanzahl	68	100	3.871	100

2.3.3. DNA-Isolierung

2.3.3.1. Positivkontrollen

Zur Extraktion von DNA der Positivkontrollen wurde zunächst Gewebe von fünf Trematoden- und zwei Zestodenarten mit einem Skalpell auf sterilen Plastikpetrischalen in kleine Stücke geschnitten. Bei den Gewebeproben handelte es sich um 20 mg *F. magna*, 20 mg *F. hepatica*, 10 mg *Aspidogaster limacoides* DIESING 1835, 10 mg *Paramphistomum* sp., 10 mg *Diplostomum* sp., 20 mg *Taenia saginata* GOEZE 1782 und <10 mg *Proteocephalus longicollis* (ZEDER 1800) (zuwenig Material zur Gewichtsbestimmung). Darüber hinaus wurde die DNA von Eiern der Zestodenarten *T. saginata* und *Diphyllbothrium latum* (LINNAEUS 1758) isoliert. Die Proben wurden vom Naturhistorischen Museum Wien und vom Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin, Medizinische Universität Wien, bereitgestellt. Zusätzlich wurde DNA von einer mikroskopisch Trematoden-negativen *G. truncatula* (Stichprobe 3D) isoliert.

Die DNA-Isolierung der Gewebeproben wurde anhand eines QiAmp® DNA Mini Kits (Qiagen, Deutschland) gemäß Protokoll durchgeführt. Zum Verdau wurden 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K-Lösung den Gewebestücken zugegeben, durch vortexen gemischt und über Nacht in einem Thermomixer comfort (Eppendorf, Deutschland) (56°C, 300 rpm) inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Proben kurz gevortext und abzentrifugiert (10 s, 2.500 rpm), 200 µl AL-Puffer zugegeben, 15 s gevortext und 10 min inkubiert (70°C, 300 rpm). Nach kurzem Abzentrifugieren bei 2.500 rpm wurde 200 µl 100% Ethanol zugefügt und wieder 15 s gevortext. Die Lösung wurde in QIAamp Spinsäulen in 2 ml Collection-Tubes überführt und zentrifugiert (1 min, 8.000 rpm).

Danach folgten zwei Waschschrte. Die Collection-Tubes wurden ausgetauscht, 500 µl AW1-Puffer zugegeben und wieder zentrifugiert (1 min, 8.000 rpm). Die

Collection-Tubes wurden verworfen, 500 µl AW2-Puffer zugegeben und zentrifugiert (3 min, 14.000 rpm). Um die letzten Waschpuffer-Rückstände zu entfernen, wurden die Spinsäulen in neue Collection-Tubes überführt und noch einmal zentrifugiert (1 min, 14.000 rpm).

Danach wurden die Spinsäulen in Eppendorfgefäße gesteckt. Eluiert wurde durch Zugabe von 200 µl AE-Puffer mit 1-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation (1 min, 8.000 rpm).

Nach der Elution wurde der DNA-Gehalt der Proben mittels eines NanoDrop 1000 Spektrophotometers (Thermo Fisher Scientific, USA) gemessen. Als Referenz diente AE-Puffer. Jede Probe wurde mindestens 2x bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Dazu wurden jeweils 2 µl Probe auf das Messgerät aufgetragen. Nach den Messungen wurden die Proben eingefroren und die Mittelwerte der positiven Messwerte berechnet.

Die DNA-Isolierung der Eier von *T. saginata* und *D. latum* begann mit einem Homogenisierungsschritt. Dazu wurde eine kleine Menge der Eier in Precellys® Glas-Kit 0,5 mm Röhrchen (PeqLab Biotechnologie, Deutschland) überführt, mit 0,9% NaCl-Lösung aufgefüllt und mittels eines Precellys® 24 Homogenisators (PeqLab Biotechnologie, Deutschland) homogenisiert. Dazu wurde folgendes Programm verwendet: 3 x 30 s Rüttelphase mit 30 s Pause, 6.200 rpm. Danach wurde mit 200 µl Probenmaterial die DNA-Isolierung mittels eines QiAmp® DNA Mini Kits (Qiagen, Deutschland) gemäß Protokoll vorgenommen. Dieser Schritt und die DNA-Messung erfolgten analog zu den Gewebeproben.

2.3.3.2. Isolierte Trematodenstadien

Die 30 ausgewählten Proben wurden zentrifugiert (10 s, 2.500 rpm), um die Parasiten auf den Boden sinken zu lassen. Danach wurden 1,3-1,8 ml Überstand abgenommen, sodass noch 200 µl der Proben in den Eppendorfgefäßen verblieben. Zusätzlich wurde eine einzelne *Paramphistomum* sp.-Redie unter einem Eclipse TE200-Invertmikroskop (Nikon, Österreich) separiert und nachfolgend die DNA extrahiert.

Die DNA-Isolierung wurde, wie vorher beschrieben, anhand eines QiAmp® DNA Mini Kits (Qiagen, Deutschland) gemäß Protokoll mit 200 µl Proben-Material

durchgeführt. Eluiert wurde durch Zugabe von 200 µl AE-Puffer mit 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und nachfolgender Zentrifugation (1 min, 8.000 rpm). Anschließend wurde der DNA-Gehalt der Proben (Referenz AE-Puffer) zweimalig mittels eines NanoDrop 1000 Spektrophotometers (Thermo Fisher Scientific, USA) gemessen.

Zusätzlich wurde ein Testdurchlauf mit einem Ethanolreinigungs-Zwischenschritt an acht Proben von Verdachtsfällen auf Echinostomatoidea durchgeführt, um eine Inhibierung der Proteinase K durch Ethanol auszuschließen. Die isolierten Redien und Zerkarien der getesteten Proben wurden direkt nach Sektion der Schnecken in Wasser eingefroren aufbewahrt, weshalb vier der acht Proben zum Testzeitpunkt bereits lysiert waren. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden die Proben aufgetaut und mit 70% Ethanol versetzt.

Zur Isolation der DNA wurden die lysierten Proben (Probennr. 24, 26, 82 und 85) durch kippen durchmischt und 1 ml der Lösung in neue Eppendorfgefäße transferiert. Die nicht lysierten Proben (Probennr. 15, 33, 50 und 86) wurden zentrifugiert (1 min, 1.000 rpm) und der Überstand bis auf 200 µl Probenmaterial abgehoben. Alle Überstände dieses und der folgenden Arbeitsschritte wurden für spätere Untersuchungen eingefroren. Danach wurden die Proben vom Ethanol gereinigt. Dazu wurden alle Proben zentrifugiert (15 min, 12.000 rpm, 4°C), der Überstand vollständig abgenommen und 200 µl 0,9% NaCl-Lösung den Pellets zugegeben. Danach wurde wieder zentrifugiert (15 min, 12.000 rpm, 4°C), die Überstände entfernt und die Pellets durch Vortexen in 200 µl 0,9% NaCl-Lösung gelöst.

Die DNA-Isolierung wurde, wie bereits beschrieben, mit einem QiAmp® DNA Mini Kit (Qiagen, Deutschland) gemäß Protokoll vorgenommen. Da sich die Proben bereits in einer Lösung befanden und es sich nicht um festes Gewebe handelte, wurde bei diesem Testdurchlauf auf ATL-Puffer verzichtet. Eluiert wurde durch Zugabe von 200 µl AE-Puffer mit 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation (1 min, 8.000 rpm).

2.3.3.3. Stichproben

Die Schnecken wurden nach der mikroskopischen Untersuchung in Wasser, Alkohol oder ohne Flüssigkeit tiefgefroren aufbewahrt. Zur DNA-Isolierung wurden die Stichproben aufgetaut, die Flüssigkeiten abpipettiert und die Weichkörper abgewogen.

Die DNA-Isolierung wurde wieder mittels eines QiAmp® DNA Mini Kits (Qiagen, Deutschland) gemäß Protokoll durchgeführt. Drei Schnecken wurden vor der DNA-Isolierung mit einer Pinzette zerrieben. Die DNA von 24 Schnecken wurde mit den angegebenen Reagenzien-Standardmengen laut Protokoll isoliert, bei 44 Schnecken wurden die Reagenzienmengen von ATL-Puffer, Proteinase K, AL-Puffer und 100% EtOH dem Schneckengewicht angepasst.

Eluiert wurde durch Zugabe von 200 µl AE-Puffer mit 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation (1 min, 8.000 rpm). Anschließend wurde der DNA-Gehalt der Proben (Referenz AE-Puffer) zweimalig mittels eines NanoDrop 1000 Spektrophotometers (Thermo Fisher Scientific, USA) gemessen.

2.3.4. PCR

2.3.4.1. PCR-Etablierung

2.3.4.1.1. Reaktionsansatz

Alle Primerpaare wurden mit einer Konzentration von 10 pmol/µl in den PCRs eingesetzt. Der Master-Mix wurde wie folgt erstellt: pro Probe wurden 5 µl PCR-Puffer (Solis BioDyne, Litauen), 5 µl MgCl₂ (Solis BioDyne, Litauen), 1 µl dNTP-Mix (20 mM each, Solis BioDyne, Litauen), 11 µl steriles ddH₂O, 5 µl Forward-Primer, 5 µl Reverse-Primer und 0,25 µl HOT FIREPol® DNA-Polymerase (5 U/µl, Solis BioDyne, Litauen) verwendet. Die Mengen der jeweiligen Reagenzien wurden für den gesamten Master-Mix mit der Probenanzahl+1 multipliziert, Wasser wurde mit der Probenanzahl multipliziert. Alle Reagenzien, sowie der fertige Mastermix, wurden vor Verwendung gevortext, die DNA-Isolate wurden durch kippen durchmischt. Die gesamten Pipettier-Vorgänge fanden in einer Hera Safe Sterilbank (Heraeus, Deutschland) statt.

Der Reaktionsansatz pro Probe bestand aus jeweils 31,25 µl Master-Mix, 1-15 µl DNA-Isolat und wurde mit sterilem ddH₂O auf 50 µl Reaktionsvolumen aufgefüllt. Die fertigen Reaktionsansätze wurden mit einer Pipette durchmischt. Vor PCR-Start wurden Luftbläschen aus den Reaktionsansätzen entfernt und die Ansätze kurz abzentrifugiert (10 s, 2.500 rpm).

2.3.4.1.2. PCR-Programme

2.3.4.1.2.1. TremF/TremR, MagnaF/MagnaR

Alle Testdurchläufe der Primerpaare TremF/TremR und MagnaF/MagnaR wurden mit jeweils drei leicht modifizierten PCR-Programmen nach GAST et al. (1996) (GastB52, GastB54, GastB56) durchgeführt. Diese PCR-Programme unterschieden sich lediglich durch verschiedene Temperaturen in der Hybridisierungsphase der Primer.

Da eine „Hot-Start“ Polymerase eingesetzt wurde, begannen alle drei verwendeten PCR-Programme mit einer 15-minütigen Inkubation bei 95°C. Die 30 drauffolgenden Zyklen enthielten jeweils eine DNA-Denaturierungsphase von 1 min auf 95°C, eine Primer-Hybridisierungsphase von 2 min auf 52°C (GastB52) bzw. 54°C (GastB54) bzw. 56°C (GastB56), und eine Elongationsphase von 3 min auf 72°C. Danach folgte ein finaler Extensionsschritt von 7 min auf 72°C.

2.3.4.1.2.2. FASC f/FASC r

Die PCRs wurden leicht modifiziert nach VELUSAMY et al. (2004) mit folgendem Programm durchgeführt: Initiale Denaturierungstemperatur 15 min auf 95°C („Hot-Start“); 35 Zyklen: Denaturierung 1 min auf 94°C, Annealing 1 min auf 65°C, Extension 1 min auf 72°C; mit einer finalen Extension von 10 min auf 72°C.

Für alle Amplifizierungen wurden die Cyclor Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Deutschland), Primus Authorized Thermal Cyclor for PCR (MWG-Biotech, Deutschland) und Mastercycler ep gradient (Eppendorf, Deutschland) verwendet.

2.3.4.1.3. Primer-Testdurchläufe

Es wurden jeweils zwei sukzessive molekularbiologische Analysen durchgeführt, welche sowohl die Spezifität, die Sensitivität, als auch die Robustheit der eingesetzten Primerpaare gegenüber DNA von *G. truncatula* überprüfen sollten.

Die ersten Testdurchläufe sollten die Spezifität der eingesetzten Primerpaare TremF/TremR, MagnaF/MagnaR und FASC_f/FASC_r bezüglich Trematoden allgemein, *F. magna* bzw. *F. hepatica* nachweisen. Dafür wurden alle drei Primerpaare mittels Gewebe-Positivkontrollen von *F. magna*, *F. hepatica*, *Paramphistomum* sp., sowie einer mikroskopisch parasitenfreien *G. truncatula* getestet.

Das Trematodenuniversal-Primerpaar wurde zusätzlich mit Positivkontrollen von *T. saginata* (Gewebe, Eier) und *D. latum* (Eier) untersucht. Das *F. magna*-Primerpaar wurde zusätzlich mit einer Gewebe-Positivkontrolle von *T. saginata* getestet. Das *F. hepatica*-Primerpaar wurde zusätzlich mittels Gewebe-Positivkontrollen von *A. limacoides*, *P. longicollis*, sowie *Diplostomum* sp. überprüft.

Die Positivkontrollen wurden entsprechend ihrer DNA-Konzentration in mindestens zwei unterschiedlichen Mengen in der PCR eingesetzt (1 µl, 3 µl, 5 µl bzw. 10 µl).

Alle Testdurchläufe für TremF/TremR und MagnaF/MagnaR wurden mit dem PCR-Programm GastB56 durchgeführt. Zusätzlich wurden für diese beiden Primerpaare die Testdurchläufe von *G. truncatula*, *F. magna*, *F. hepatica*, *Paramphistomum* sp. und *T. saginata* (Gewebe) mit GastB52 und GastB54 durchgeführt.

Die zweite Untersuchung sollte mittels gespikter Proben die Sensitivität und Robustheit des *F. magna*- und Trematoden-Primerpaares nachweisen. Dafür wurden verschiedene Mengen an DNA von *G. truncatula* (2.390 ng, 4.780 ng bzw. 8.485 ng) mit einer konstanten Menge *F. magna*-DNA (1,4 ng) versetzt. Es wurde somit ein Verhältnis der Parasiten-DNA zur Schnecken-DNA von 1:1.707, 1:3.414 bzw. 1:6.060 erreicht. Zusätzlich wurde in jedem Durchlauf 1,4 ng reine *F. magna*-DNA mitgeführt. Alle Testdurchläufe wurden mit den PCR-Programmen GastB52, GastB54 und GastB56 durchgeführt.

Die Parasiten-DNA-Menge von 1,4 ng wurde zuvor durch die DNA-Isolierung einer einzelnen *Paramphistomum* sp.-Redie ermittelt. Die DNA-Extraktion ergab bei 200 µl Eluat einen DNA-Gehalt von 1,4 ng/µl. Es sollte sichergestellt werden, dass die

beiden Primerpaare die Detektion der DNA-Menge in 1 µl DNA-Isolat einer einzelnen Redie ermöglichen.

2.3.4.2. Proben-PCRs

2.3.4.2.1. Isolierte Trematodenstadien

Alle isolierten Trematodenstadien wurden zunächst mittels TremF/TremR mit 10 µl und ggf. 5 µl DNA-Isolat mit GastB56 getestet. Proben, welche ein negatives Testergebnis ergaben, wurden mit jeweils 10 µl mit GastB52, GastB54 und GastB56 getestet. Waren noch Überstände der negativen Proben von der DNA-Isolierung vorhanden, wurde auch aus den Überständen die DNA isoliert und das Isolat mit 10 µl mit GastB52, GastB54 und GastB56 getestet. Neunzehn positiv getestete isolierte Trematodenstadien wurden nochmals mit 5 µl mit GastB52 getestet, um stärkere Banden für die anschließende DNA-Sequenzierung zu erhalten.

Alle isolierten Trematodenstadien wurden mit 5 µl, 10 µl und 15 µl mit GastB52 mittels MagnaF/MagnaR auf *F. magna* getestet. Zudem wurden alle isolierten Trematodenstadien mit 10 µl DNA-Isolat anhand von FASC_f/FASC_r auf *F. hepatica* getestet. Probennr. 10 wurde hierbei zusätzlich mit 15 µl getestet. Bei unklaren Ergebnissen wurde der Testdurchlauf wiederholt.

2.3.4.2.2. Stichproben

Die 68 ausgewählten Stichproben wurden mittels dem Trematodenuniversal-Primerpaar auf das Vorhandensein von Trematoden getestet. Proben, in denen mittels dieser Testdurchläufe Trematoden detektiert werden konnten, wurden weiterführend mit den beiden anderen Primerpaaren MagnaF/MagnaR auf *F. magna* und FASC_f/FASC_r auf *F. hepatica* untersucht.

Zehn Stichproben wurden mit TremF/TremR mit GastB56 getestet. Die in der PCR eingesetzte Menge an DNA-Isolat war vom DNA-Gehalt der Proben abhängig. Bei ≥ 400 ng/µl DNA-Gehalt wurden 3 µl und 5 µl DNA-Isolat eingesetzt, bei < 400 ng/µl 5 µl und 10 µl. Die restlichen 59 Stichproben wurden mit GastB52 getestet. Bei einem DNA-Gehalt von ≥ 450 ng/µl wurden 5 µl und 7 µl DNA-Isolat in der PCR eingesetzt, bei < 450 ng/µl 7 µl und 10 µl.

Stichproben, welche ein positives Testergebnis in der Trematoden-PCR ergaben, wurden zusätzlich mittels MagnaF/MagnaR mit GastB52 auf *F. magna* untersucht. Zudem wurden Trematoden-positive Stichproben mit FASC_f/FASC_r auf *F. hepatica* getestet. Da alle Trematoden-positiv getesteten Stichproben einen DNA-Gehalt von <450 ng/µl aufwiesen, wurden in diesen PCRs standardmäßig 7 µl und 10 µl DNA-Isolat eingesetzt.

2.3.5. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse der PCR-Produkte wurden 2%ige Agarosegele unterschiedlicher Größe hergestellt. Hierzu wurden 1,4 g bzw. 2 g Agarose in 70 ml bzw. 100 ml 1x TAE-Puffer (0,04 M Trisacetat, 0,001 M EDTA) unter ständigem Rühren aufgekocht. Nach einer kurzen Abkühlung durch Schwenken unter fließendem Wasser wurden 7 µl bzw. 10 µl Ethidiumbromid (1%-ige Lösung in Wasser, Merk, Österreich) zugegeben und durch weiteres Rühren vermischt. Das warme Gel wurde in einen Geltrog gegossen, Luftblasen ausgestrichen, mit einem Gelkamm (15-20 Slots) versetzt und 45 min lichtgeschützt aushärten gelassen.

Die Gele wurden in trockenem Zustand mit den Proben beladen. Die PCR-Produkte wurden im Verhältnis 10:1 mit einem Ladepuffer (Farbmarker Bromphenolblau) auf 20 µl bzw. 30 µl gemischt. Die Gele hatten bei 70-90 V eine Laufzeit von 45-90 min. Als Marker wurde eine DirectLoad™ Step Ladder, 50 bp (Sigma-Aldrich) verwendet. Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht (365 nm). Alle Gele wurden fotografiert. Probenbanden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten, in Eppendorfgefäße transferiert und eingefroren oder gleich weiterverarbeitet.

2.3.6. Aufreinigung der Banden

Für die nachfolgende Sequenzierung wurde die DNA mittels eines Xact DNA GEL Extraction Kits (genXpress, Österreich) gemäß der Anleitung aufgereinigt.

Dazu wurden die Banden abgewogen, 40 µl Binding Buffer II pro 10 mg Gel zugefügt und nach kurzem Vortexen mindestens 10 min lang im Heizblock (60°C, 300 rpm) inkubiert. Währenddessen wurden die Proben immer wieder gevortext und gekippt, bis das Gel ganz aufgelöst war. Danach wurde der gesamte Inhalt auf Xact columns

transferiert, 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und zentrifugiert (2 min, 10.000 rpm). Der Durchfluss wurde verworfen, 500 µl Wash Solution auf die Xact columns pipettiert und wieder zentrifugiert (2 min, 10.000 rpm). Der Durchfluss wurde erneut verworfen und die Xact columns wurden nochmals zentrifugiert, um Waschpufferreste zu entfernen (2 min, 10.000 rpm). Danach wurden die Xact columns in EppendorfgeläÙe gesteckt, eine den Bandenstärken entsprechende Menge Elution Buffer zentral auf die Filter aufgetropft (25-50 µl), 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und zentrifugiert (2 min, 10.000 rpm). Bei schwachen Banden wurde der Elutionsschritt zweifach ausgeführt, mit jeweils einem 15 µl und einem 10 µl Elution Buffer-Schritt. Anschließend wurde der DNA-Gehalt der purifizierten DNA (Referenz Elution Buffer) zweimalig mittels eines NanoDrop 1000 Spektrophotometers (Thermo Scientific) gemessen, die Mittelwerte berechnet und die aufgereinigte DNA eingefroren.

2.3.7. Sequenzierung

2.3.7.1. Etablierung der Probenaufbereitung

2.3.7.1.1. Ansetzen der Sequenzier-PCR

Der Sequenzieransatz bestand aus jeweils 1 µl Primer (10 pmol), 2 µl Big Dye (Applied Biosystems, Österreich), 1 µl bzw. 3 µl aufgereinigtem PCR-Produkt (verdünnt auf ca. 3 ng DNA/µl) und wurde mit sterilem ddH₂O auf 10 µl aufgefüllt. Vor der PCR wurden Luftblasen entfernt und die Proben kurz abzentrifugiert (10 s, 2.500 rpm).

Anschließend wurde die Sequenzier-PCR nach folgendem Schema durchgeführt: 30 s bei 96°C; 3 Zyklen von jeweils 10 s bei 96°C; 5 s bei 50°C; 4 min bei 60°C.

2.3.7.1.2. Aufreinigen des Sequenzier-PCR-Produkts

Nach der Sequenzier-PCR wurden die Proben kurz abzentrifugiert (10 s, 2.500 rpm), in mittelgroÙe EppendorfgeläÙe (0,6 ml Vol.) überführt und mit jeweils 1 µl 3M NaAC und 33 µl 100% EtOH mindestens 17 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proben wieder zentrifugiert (30 min, 12.000 rpm, 4°C), der Überstand verworfen und die Pellets mit 70 µl 70% EtOH gewaschen. Die Proben wurden in diesem Stadium eingefroren oder sofort weiterverarbeitet. Vorher eingefrorene Proben

wurden im nächsten Arbeitsschritt 30 min bei 12.000 rpm, 4°C zentrifugiert, sofort weiterverarbeitete Proben 10 min bei 12.000 rpm, 4°C. Anschließend wurde der Überstand vollständig abpipettiert und die Pellets 5 min lufttrocknen gelassen. Zwanzig Mikroliter Sequenzierreagens Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems, Österreich) wurden zugegeben und die Pellets wieder 5 min luftgetrocknet. Die Proben wurden anschließend im Wasserbad inkubiert (5 min, 95°C, 0 rpm), abzentrifugiert (10 s, 2.500 rpm, 4°C), 5 min auf Eis gelagert und danach sequenziert.

Zur Sequenzierung wurden die Deckel der Eppendorfgefäße abgeschnitten und die Proben in das Sequenziergerät eingestellt. Die Sequenzierung wurde mittels eines ABI Prism® 310^R Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems, Langen, Deutschland) auf Basis Fluoreszenzfarbstoff-markierter ddNTPs durchgeführt. Die Sequenzierung der Proben fand nach erfolgreichem Farbtest bei 4-6 Ampere und 50°C Geltemperatur statt.

2.3.7.1.3. Testdurchläufe

Zur Überprüfung der Amplikons wurden folgende von den Positivkontrollen erhaltenen Banden mit jeweils 1 µl und 3 µl DNA-Einsatz (DNA-Gehalt unbekannt), sowie Forward- und Reverseprimer sequenziert: *F. magna* 450 bp-Bande (TremF/TremR); *F. magna* 600 bp-Bande (MagnaF/MagnaR); *F. hepatica* 450 bp-Bande (TremF/TremR); *F. hepatica* 124 bp-Bande (FASC_f/FASC_r); *F. hepatica* 248 bp-Bande (FASC_f/FASC_r); *Paramphistomum* sp. 450 bp-Bande (TremF/TremR).

Zusätzlich wurden zwei Banden im Verhältnis von *F. magna*-DNA:*G. truncatula*-DNA 1:3414 gespikter Proben sequenziert, mit jeweils ca. 3 ng und 9 ng DNA als Mengeneinsatz: Bande „T3“ 450 bp-Bande (TremF); Bande „M3“ 600 bp-Bande (MagnaF/MagnaR).

Um zu bestimmen, welche DNA-Menge und welcher Primer (Forward bzw. Reverse) für die Sequenzierung mit dem TremF/TremR-Primerpaar am geeignetsten ist, wurde ein Probedurchlauf mit beiden Primern bei verschiedenen Mengen an Proben-DNA durchgeführt. Die eingesetzten DNA-Mengen einer Bande des isolierten Trematodenstadiums Probennr. 129 betrugen 3,2 ng, 9,6 ng, 29 ng, 87 ng

und 145 ng. Jede DNA-Menge wurde sowohl mit TremF, als auch mit TremR sequenziert.

Für das Primerpaar MagnaF/MagnaR wurden zur Etablierung eines Standards zusätzlich bei zwei Probenbanden (Proben Nr. 4 und Nr.132) ca. 3 ng und 9 ng Proben-DNA, sowie Forward- und Reverse-Primer eingesetzt.

2.3.7.2. Testung der Proben

2.3.7.2.1. TremF/TremR

Es wurden 24 jeweils etwa 450 bp-große Probenbanden isolierter Trematodenstadien mittels TremF getestet (Probennr. 4, 7, 10, 14, 15, 18, 26, 33, 48, 50, 86, 124, 129, 132, 135, 136, 137, 143, 153, 154, 157, 160, 164, 166). Bei 10 Proben gelang die Sequenzierung mit TremF nicht, diese wurden deshalb noch einmal mit TremR getestet (Probennr. 10, 14, 33, 50, 86, 135, 136, 153, 154, 166). Der DNA-Mengeneinsatz betrug in jedem Durchgang jeweils ca. 3 ng und 9 ng DNA. Es wurden 7 Stichprobenbanden mit einer Größe von 450 bp sequenziert (3U, 8L, 8O, 11C, 11X, 12F, 12G). Alle Stichprobenbanden wurden sowohl mit TremF, also auch mit TremR getestet mit einem DNA-Einsatz von 9 ng, fünf Proben zusätzlich mit 3 ng (11C, 11X, 3U, 8L, 8O).

2.3.7.2.2. MagnaF/MagnaR

Es wurden 11 jeweils etwa 600 bp-große Probenbanden isolierter Trematodenstadien getestet (Probennr. 4, 7, 18, 26, 33, 50, 86, 129, 132, 157, 164). Hierbei wurden standardmäßig ca. 9 ng DNA und MagnaR eingesetzt. Gelang die Sequenzierung nicht, wurde nochmals mit MagnaF und ca. 9 ng DNA getestet. Schlug die Sequenzierung nochmals fehl, galt die Probe als nicht sequenzierbar. Nach dem gleichen Schema wurden zusätzlich drei fragmentierte Probenbanden (Probennr. 143 mit 1.000 bp, 2 Banden von Probennr. 48 mit 800 bp bzw. 1.200 bp) getestet.

Es wurde zudem eine Stichprobenbande mit einer Größe von 600 bp mit MagnaF und MagnaR mit 9,0 ng getestet (Stichprobe 3U).

2.3.7.2.3. *FASC_f/FASC_r*

Mit *FASC_f/FASC_r* wurde eine fragmentierte Probenbande des isolierten Trematodenstadiums Probennr. 10 mit einer Größe von ca. 110 bp getestet. Dabei wurden 2,5 ng und 7,5 ng DNA, sowie Forward- und Reverseprimer eingesetzt.

2.3.7.3. Datenanalyse

2.3.7.3.1. *Probensequenzen*

Die Auswahl geeigneter Sequenzbereiche der Sequenzierungsergebnisse für weitere Analysen wurde anhand der Sequenzierchromatogramme vorgenommen. Die zur Weiterverarbeitung geeigneten Sequenzabschnitte lagen teilweise in unterschiedlichen Bereichen und waren verschieden lang. Die Probensequenzen konnten deshalb nicht untereinander verglichen werden. Danach wurden die Probensequenzen teilweise manuell nachbearbeitet. Ein Großteil der Sequenzierfehler konnte durch Alignments mehrerer Sequenzierdurchgänge einzelner Proben korrigiert werden. Alle Sequenzierfehler wurden in den nachfolgenden Auswertungen als Fehler in der Übereinstimmung gewertet.

2.3.7.3.2. *Lokale Alignments durch BLAST*

Alle Probensequenzen wurden gegen sämtliche in der GenBank enthaltenen Sequenzen digener Trematoden (GenBanktaxidnr.: 6.178) geBLASTet. Dies sollte ermöglichen, die Trematodenart(en) mit maximaler Sequenzidentität zu identifizieren.

Die fünf (**Tab. 11**) bzw. 15 (**Tab. 7**) ausgewählten GenBank-Referenzsequenzen wurden durch BLAST untereinander verglichen. Dazu wurden nur jene Sequenzabschnitte verwendet, welche theoretisch mittels der Primer amplifiziert werden. Die lokale Alignmentmethode wurde gewählt, um speziell die Unterschiede zwischen den ähnlichsten Sequenzabschnitten zu vergleichen. Dies könnte wichtig sein, falls in diesem Bereich eine Probensequenz liegt.

Im Fall der GenBank-Kontrollen für das Trematodenuniversal-Primerpaar (**Tab. 7**) wurden die Mittelwerte der Sequenzidentitäten innerhalb einer Vergleichsgruppe und deren Standardabweichung berechnet. Diese Mittelwerte wurden dazu verwendet, um die durchschnittlichen Sequenzunterschiede von Vergleichsgruppe

zu Vergleichsgruppe zu ermitteln. Die GenBank-Sequenz von *Calicophoron calicophorum* (FISCHÖDER 1901) wies 4 Sequenzierfehler im verglichenen Sequenzabschnitt auf. Dennoch wurde diese Sequenz verwendet, da sie in der GenBank die einzig verfügbare 18S-Sequenz dieser Vergleichsart darstellte.

2.3.7.3.3. Globale Alignments durch EMBOSS

Die gesamten amplifizierten Probensequenzen wurden mit den jeweiligen GenBank-Referenzsequenzen (**Tab. 7 und 11**) verglichen, um das Maß an Sequenzidentität der Proben mit den Kontrollen zu bestimmen. Dazu wurde das Programm EMBOSS verwendet, welches Sequenzidentitäten automatisch berechnet. Teilweise war ein manuelles Nachalignment und eine anschließende Neuberechnung der Sequenzidentitäten notwendig.

Da nicht von jeder in *G. truncatula* vorkommenden Digenea-Art geeignete Sequenzen vorhanden waren, wurde im Fall des Trematodenuniversal-Primerpaares keine Zuordnung auf Speziesebene, sondern eine Zuordnung auf Ebene der Ordnungen bzw. Überfamilien angestrebt. Deshalb wurden wieder die Mittelwerte der einzelnen Vergleichsgruppen berechnet.

2.3.7.3.4. SNP-Vergleich

Um Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs, Single nucleotide polymorphisms) zwischen den fünf TremF/TremR-Vergleichsgruppen Überfamilie Echinostomatoidea, Überfamilie Paramphistomoidea, Überfamilie Pronocephaloidea Looss 1899, Ordnung Strigeida und Ordnung Plagiorchiida bestimmen zu können, wurden die Kontrollsequenzen (**Tab. 7**) und das Primerpaar TremF/TremR mittels ClustalX und GeneDoc aneinander alignt. Die Sequenzen wurden daraufhin in GeneDoc auf die theoretisch amplifizierbaren Sequenzbereiche gekürzt. Zudem wurden immer die drei Kontrollarten, welche aus der selben Überfamilie bzw. Ordnung stammen, untereinander angeordnet. Danach wurde nach einzelnen Basen oder Sequenzabschnitten gesucht, in denen sich die fünf Vergleichsgruppen voneinander unterscheiden, innerhalb einer Gruppe aber möglichst gleich sind. Das potentielle Amplikon der Kontrollsequenzen wurde dafür jeweils ab 50 bp nach dem Forward- und 50 bp vor den Reverseprimer bewertet. So

wurden im Fall der TremF/TremR-Kontrollsequenzen 15 einzelne Basen (SNPs) bestimmt, welche für eine Differenzierung zwischen den Kontrollgruppen herangezogen werden konnten (**Tab. 16**).

Tab. 16

Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) in mit TremF/TremR amplifizierbaren Sequenzbereichen.

Nr.	Position	EC	PA	PR	ST	PL
1	125	G	T	A	G	T
2	129	G	G	A	G	G
3	139	G	A	G	G	G
4	141	C/T	G	G	C/T	T
5	148	G	G	A	G	G
6	150	A	A	G	A	A
7	151	T	C	C	C	C
8	175	C	T	T	T	C/T
9	233	T	T	T	C	T
10	235	T	G	G	T	T
11	266	C	A	A	A	A
12	328	T	T	T	A	T
13	331	C	T	T	C	C
14	348	A	A	A	G	A
15	351	C	C	C	A	C

PO = Position. EC = Echinostomatoidea. PA = Paramphistomoidea. PR = Pronocephaloidea. ST = Strigeida. PL = Plagiorchiida.

Für das MagnaF/MagnaR-Primerpaar wurden jeweils vier GenBank-Sequenzen von *F. hepatica* und *F. magna* (**Tab. 17**) nach demselben Schema verglichen.

Tab. 17

Sequenzen für den SNP-Vergleich von mit MagnaF/MagnaR amplifizierbaren Sequenzbereichen.

Art	GenBanknummer
<i>Fascioloides magna</i>	EF051080.1
	EF534995.1
	EF534993.1
	EF612475.1
<i>Fasciola hepatica</i>	AM900370.1
	AM709621.1
	AM709619.1
	AM709649.1

Hierbei wurden im verglichenen Sequenzbereich 10 SNPs zwischen *F. hepatica* und *F. magna* gefunden (**Tab. 18**).

Tab. 18

Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) in mit MagnaF/MagnaR amplifizierbaren Sequenzbereichen.

Nr.	Position	<i>Fascioloides magna</i>	<i>Fasciola hepatica</i>
1	146	G	A
2	296	C	T
3	318	T	A
4	347	G	T
5	369	A	T
6	370	-	G
7	424	C	T
8	432	G	A
9	448	G	A
10	472	A	T

Nach Bestimmung der SNPs wurden die Probensequenzen an die jeweiligen Kontrollsequenzen aligniert und je nach Sequenzlänge und Position mit verschiedenen SNPs verglichen. Die Anzahl der verglichenen SNPs betrug 3-15 Positionen (TremF/TremR) bzw. 8-10 Positionen (MagnaF/MagnaR). Danach wurde der SNP-

Übereinstimmungsgrad mit den jeweiligen Vergleichsgruppen bzw. Arten berechnet.

2.3.7.3.5. Cluster-Analyse

Cluster-Analysen dienen zur Einteilung von Studienobjekten in Gruppen oder „Cluster“, welche bestimmte empirisch gemessene Ähnlichkeitsverhältnisse darstellen. Hierarchisch agglomeratives Clustering beschreibt dabei das sukzessive Gruppieren der ähnlichsten Studienobjekte (Sequenzen) in neue Cluster, bis am Ende alle Gruppierungen zu einem einzigen Cluster zusammengefügt wurden (JOHNSON, 1967).

Die Probensequenzen sollten mithilfe einer Cluster-Analyse bestimmten GenBank-Sequenzen zugeordnet werden. Hierzu wurden vorab zwei multiple Alignments mit den Programmen ClustalX und GeneDoc erstellt. Es wurden einerseits für das TremF/TremR-Primerpaar die 15 GenBank-Kontrollen aus **Tab. 7**, alle TremF/TremR-Probensequenzen, sowie drei Aspidogastrea-Arten (*Aspidogaster conchicola* VON BAER 1827 [GenBanknr.: DQ482608.1], *Cotylogaster basiri* SIDDIQI & CABLE 1960 [GenBanknr.: AY222082.1], *Multicotyle purvisi* DAWES 1941 [GenBanknr.: AJ228785.1] als Outgroup align. Im Fall des MagnaF/MagnaR-Primerpaars wurden alle MagnaF/MagnaR-Probensequenzen, eine *F. magna*-Sequenz (**Tab. 11**), eine *F. hepatica*-Sequenz (**Tab. 11**) und *Echinostoma revolutum* (FROELICH 1802) (**Tab. 11**) als Outgroup align.

Danach wurde eine Bootstrap-Analyse durchgeführt. Bootstrapping beinhaltet die Neuordnung der Positionen des originalen Alignments, um eine Reihe von replizierten Bootstrap-Datensätzen zu generieren. Dies umfasst auch die Substitution einzelner Positionen (Basen) durch andere Positionen (Basen) dieses Datensatzes (WILKINSON, 1996). Hierzu wurde das Programm Seqboot aus dem PHYLIP- (Phylogeny Inference Package) Programmpaket (FELSENSTEIN, 1993) verwendet. Die Analyse wurde im regulären Bootstrap für molekulare Sequenzen ohne Gewichtung durchgeführt. Es wurden 1.000 replizierte Bootstrap-Datensätze generiert. Diese Datensätze, welche die selbe Anzahl von Positionen wie der Originaldatensatz umfassten (WILKINSON, 1996), wurden danach phylogenetischen Analysen unterworfen, was eine Reihe von Bootstrap-Bäumen hervorbrachte.

Hierzu wurden die Datensätze anhand der Neighbor-Joining (NJ)-Methode mittels der PHYLIP-Programme Dnadist und Neighbor weiterverarbeitet. Das Grundprinzip der NJ-Methode ist es, Paare von operationalen taxonomischen Einheiten (OTUs [=neighbors]) zu finden, welche die Gesamtlänge eines Zweiges in jedem Stadium des Cluster-Vorganges minimieren (SAITOU & NEI, 1987). Die Bäume werden von einer Matrix paarweiser evolutionärer Distanzen gebildet. NJ wählt wiederholt ein Taxonpaar aus, bildet einen neuen Unterbaum und gruppiert das Paar von ausgewählten Taxa, um das Taxonset um eins zu reduzieren. Die Distanz der Sequenzdaten kann dabei durch verschiedene Ansätze ermittelt werden (GASCUEL & STEEL, 2006). Das Programm Dnadist berechnet Distanzmatrizen zwischen den verschiedenen Sequenzen, das Programm Neighbor dient der Baumerstellung auf Basis dieser Datensätze.

Für das Programm Dnadist wurde der Kimura 2-Parameter mit einer ungewichteten, gleichmäßig verteilten Transitions-/Transversions-Rate von 2,0 verwendet. Der Kimura 2-Parameter dient zur Schätzung von evolutionären Distanzen, indem zwei Arten von Nukleotidsubstitutionen berücksichtigt werden. Weisen homologe Stellen verschiedene Nukleotide auf, aber beide sind entweder Purine oder Pyrimidine, wird die Differenz Typ I (oder „Transitions“ Typ) genannt. Ist hingegen eine der beiden Basen ein Purin und die andere Base ein Pyrimidin, wird die Differenz Typ II (oder „Transversions“ Typ) genannt (KIMURA, 1980). Es wurden 1.000 Datensätze generiert.

Für das Programm Neighbor wurden die Programmeinstellungen ohne Wurzelung, oberer/unterer dreieckiger Matrix oder Subreplikaten verwendet. Die Eingabereihenfolge der Sequenzen wurde zufällig gewählt (Durchmischungsanzahl=7) und es wurden 1.000 verschiedene Stammbäume generiert.

Danach wurden die erhaltenen Resultate mit dem PHYLIP-Programm Consense in einem ungewurzelten Majority rule Konsensusbaum (MARGUSH & McMORRIS, 1981) zusammengefasst.

Dieser Stammbaum wurde danach im Programm Treeview (PAGE, 1996) mit der entsprechenden Outgroup gewurzelt. Mit diesem Programm wurden auch die Bootstrap-Verhältnisse angezeigt. Bootstrap-Verhältnisse beschreiben die Frequenz

mit welcher eine Komponente, Klade oder ein Teilbereich in ungewurzelten Bäumen in den analysierten Bootstrapbäumen auftrat (WILKINSON, 1996). Durch Bootstrap können somit statistische Schlussfolgerungen aus Datensammlungen gezogen werden (HENDERSON, 2005). Es ist generell anerkannt, dass Bootstrap-Werte über 70% eine statistisch signifikante Verzweigung aufzeigen (STORCH et al., 2007).

Nicht eindeutig zuordenbare Probensequenzen wurde erneut mit relevanten Kontrollsequenzen alignet und nochmals durch Bootstrap, Neighbor-Joining und einem Konsensus-Baum analysiert. Stammbäume auf Basis von Maximum-Likelihood (FELSENSTEIN, 1981) und Maximum-Parsimony (FITCH, 1971) brachten allgemein niedrigere Bootstrap-Verhältnisse und wurden somit nicht in die Analysen inkludiert.

3. Ergebnisse

3.1. Makroskopische Untersuchungen an der Schneckenpopulation

3.1.1. Standortverteilung gesammelter *Galba truncatula*

Insgesamt 3.871 *G. truncatula* wurden im Zeitraum vom 21. April 2008 bis 31. Oktober 2008 gesammelt, vermessen und untersucht. Wie in **Abb. 7** ersichtlich, wurden die meisten Schnecken an Standort 1 (Entenhausen) gesammelt. Die Tiere hielten sich meist auf Schlammflächen auf, wodurch vor allem leicht angetrocknete Schnecken durch ihre helle Gehäusefarbe gut sichtbar waren (**Abb. 8**).

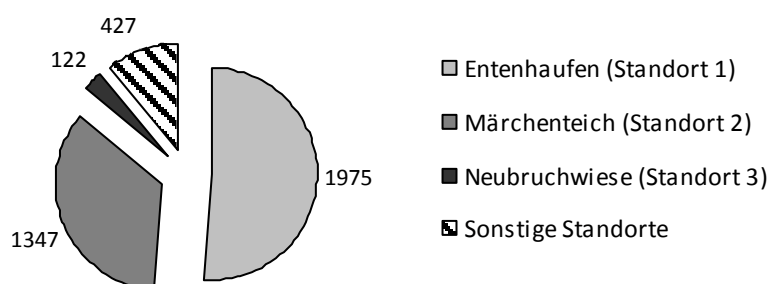


Abb. 7

Standortverteilung der gesammelten *G. truncatula*

Sonstige Standorte: Haslau (n = 181), Regelsbrunn (n = 4) und Fischamend (n = 242).



Abb. 8

Standort 1 (Entenhausen)

Beprobungsdatum: 22.08.2008. Gute Zugänglichkeit und zahlreiche Sammlungsufer zeichneten diesen Standort aus (links). *G. truncatula* auf schlammigem Untergrund (rechts).

Auch an Standort 2 (Märchenteich) konnten viele *G. truncatula* aufgesammelt werden (**Abb. 7**). Der Abstieg von der Tierbodentraverse zu den Sammlungsufern gestaltete sich einfach. Oftmals konnte nur eine kleine Stelle ($<1 \text{ m}^2$) am Westufer beprobt werden, da das Ufer der Ostseite während der meisten Beprobungen überschwemmt war (**Abb. 9**).



Abb. 9

Standort 2 (Märchenteich)

Westufer am 07.08.2008 (links); Ostufer am 03.09.2008 (rechts)

Standort 3 (Neubruchwiese) wies die schwierigsten Sammlungsbedingungen, sowie ungünstige Lebensbedingungen für *G. truncatula* auf. Die wenigen gesammelten Schnecken (**Abb. 7**) wurden vorwiegend auf temporär freigelegten, mit Kies bedeckten Erhebungen in der kleinen Binn gefunden (**Abb. 10**). Für die Sammlungen zugängliche Uferländer waren kaum vorhanden. Zudem waren die kleinen, hornfarbenen Tiere auf steinigem Untergrund nur schwer auffindbar. Der Zugang zu den Sammlungsplätzen gestaltete sich an Standort 3 äußerst schwierig, weshalb vergleichsweise weniger erfolgreiche Aufsammlungen an diesem Standort durchgeführt werden konnten und die angestrebten 1000 Schnecken/Standort an diesem Standort nicht erreicht wurden (**Tab. 19**).

**Abb. 10***Standort 3 (Neubruchwiese)*

Ufer der kleinen Binn am 07.08.2008 (links); Sammlungsplatz am 03.09.2008 (rechts)

Tab. 19*Gesammelte Schnecken und nicht begehbare Standorte.*

Sammlungsdatum	Standort 1	Standort 2	Standort 3
21.04.2008	72	0 *	17
15.05.2008	0	12	13
27.05.2008	229	2	9
06.06.2008	0	0	0
20.06.2008	208	94	n.b. ^{a)}
02.07.2008	161	177	1
24.07.2008	n.b. ^{b)}	n.b. ^{b)}	n.b. ^{b)}
07.08.2008	518	86	n.b. ^{a)}
22.08.2008	276	63	77
03.09.2008	355	388	4
17.09.2008	84	0	n.b. ^{a)}
03.10.2008	4	3	1
24.10.2008	68	163	0
31.10.2008	0	359	0
Anzahl Sammlungen	13	13	10
Anzahl <i>G. truncatula</i>	1.975	1.347	122

* = Begehung des ursprünglichen Standorts Märchenteich ohne Sammlung an der Tierbodentraverse. n.b. = nicht begehbarer Standort. ^{a)} = nicht zugänglicher Standort wegen Vegetation. ^{b)} = nicht zugänglicher Standort wegen Hochwasser.

Bei den jeweils einmaligen Beprobungen in Haslau, Regelsbrunn und Fischamend konnten insgesamt 427 *G. truncatula* aufgesammelt werden (**Abb. 7**). Darunter befanden sich 181 Tiere von Haslau, 4 von Regelsbrunn und 242 von Fischamend.

3.1.2. Verteilung gesammelter *Galba truncatula* auf die Sammlungsmonate

Wie in **Abb. 11** ersichtlich, wurde ein Großteil der untersuchten *G. truncatula* in den Monaten August und September gesammelt. Der Monat April war der Sammlungsmonat mit den wenigsten Schneckenfunden.

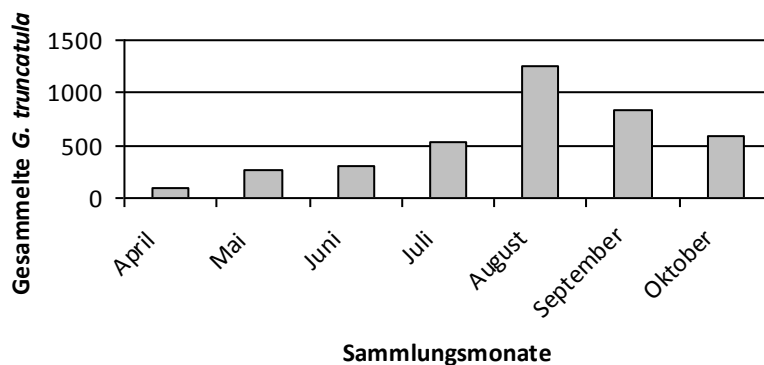
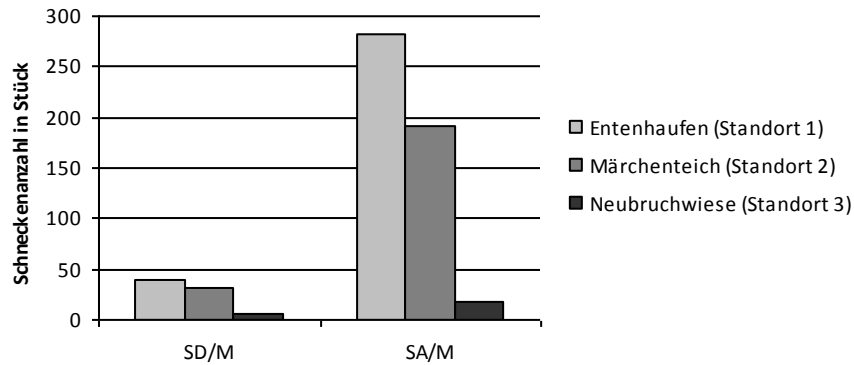


Abb. 11

Verteilung der gesammelten *G. truncatula* über die Sammlungsmonate

3.1.3. Schneekendichten einzelner Untersuchungsmonate

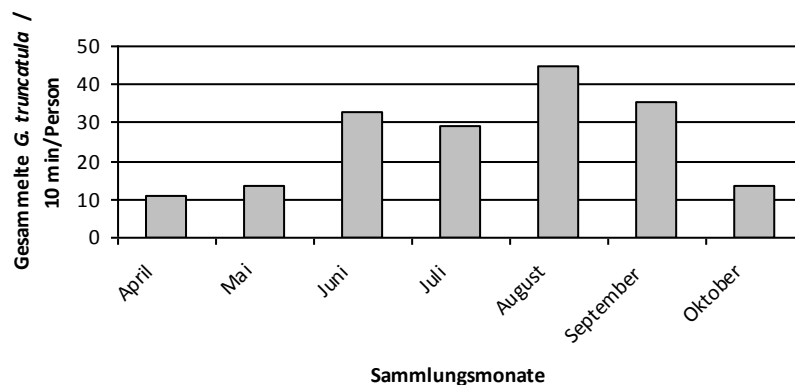
Die Dichte der *G. truncatula*-Population wurde als Anzahl der gesammelten Schnecken pro 10 Minuten Sammlungszeit pro Person definiert. Standorte, welche zum Zeitpunkt der Sammlung nicht zugänglich waren, wurden in die Berechnungen nicht miteinbezogen. Konnten keine Schnecken gefunden werden, wurde die Schneekendichte als Null definiert. Ein Vergleich der durchschnittlichen Schneekendichte/Monat zur durchschnittlich gesammelten Schneckenanzahl/Monat ist in **Abb. 12** dargestellt.

**Abb. 12**

Vergleich der durchschnittlichen Schneckendichte/Monat mit der durchschnittlich gesammelten Schneckenanzahl/Monat

SD/M = durchschnittliche Schneckendichte/Monat. SA/M = durchschnittlich gesammelte Schneckenanzahl/Monat.

An den drei Hauptstandorten wurde die höchste durchschnittliche Populationsdichte im August/September 2008 mit 45 bzw. 36 Schnecken/10 min/Person festgestellt (**Abb. 13**).

**Abb. 13**

Monatliche Verteilung der an den drei Hauptstandorten durchschnittlich gesammelten G. truncatula/10 min/Person

Betrachtet man die Schneckendichte einzelner Standorte im Detail (**Abb. 14**), kann man an Standort 1 eine Zunahme der Schneckendichte von April-Juni feststellen. Der Standort Entenhausen wies im Vergleich zu den anderen Standorten die durchschnittlich höchste Schneckendichte auf, wobei die maximale Populationsdichte im August vorgefunden wurde. An Standort 2 wurde die

maximale Schneckendichte im Juli gefunden. In diesem Sammlungsmonat, sowie im Oktober, wurden an Standort 2 mehr Schnecken gefunden als an Standort 1. Der Standort Neubruchwiese wies insgesamt gesehen die geringste Schneckendichte auf. Lediglich im August war die an Standort 3 vorgefundene Schneckendichte gleich hoch wie an Standort 2.

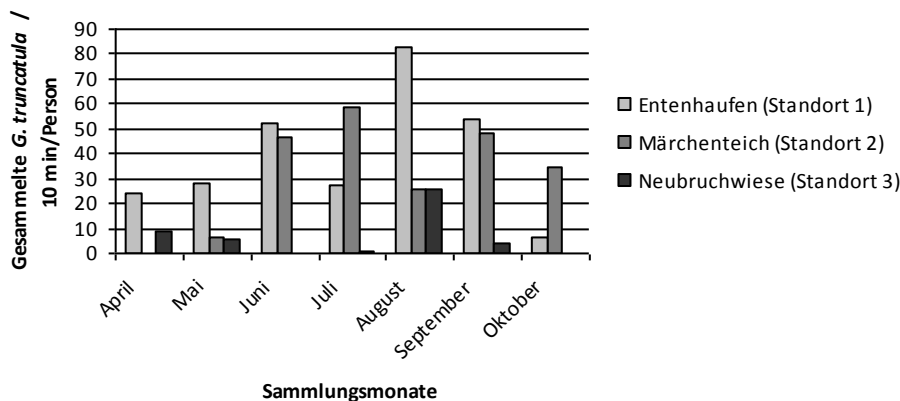
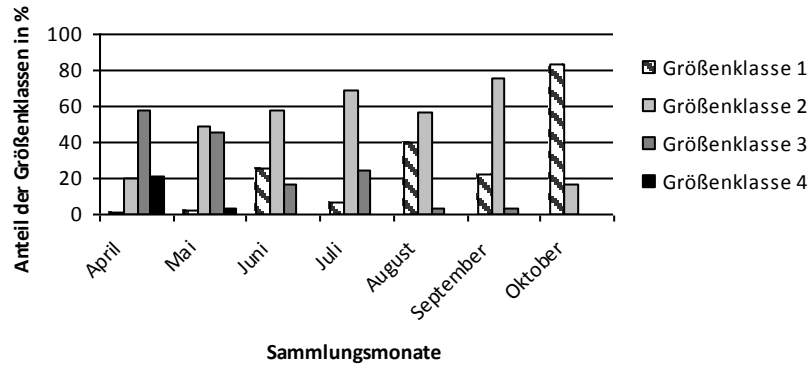


Abb. 14

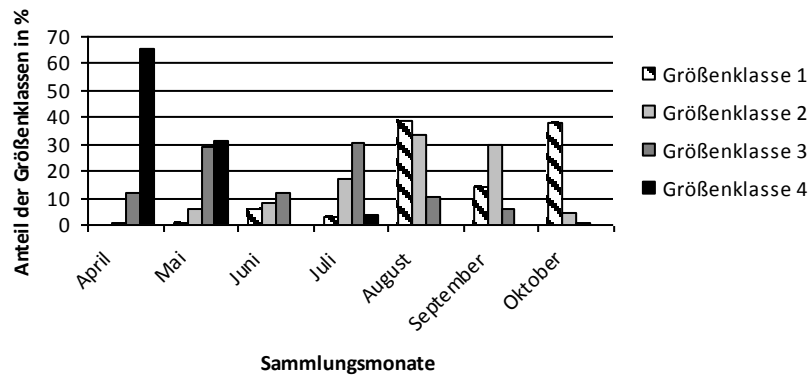
Monatliche Verteilung der durchschnittlich gesammelten *G. truncatula*/10 min/Person bezogen auf die einzelnen Hauptstandorte

3.1.4. Saisonale Größenverteilung untersuchter *Galba truncatula*

Die Verteilung der Gehäusehöhen der 3.871 untersuchten Schnecken auf die jeweiligen Untersuchungsmonate ist in den **Abb. 15** und **16** dargestellt. Schnecken der Größenklasse 1 (≤ 4 mm Gehäusehöhe) wurden am häufigsten im August und Oktober gefunden. *G. truncatula* dieser Größenklasse wurden beinahe über die gesamten Sammlungsmonate hinweg gefunden, mit einer Häufung in den Sommermonaten. Es war eine stetige prozentuale Zunahme der Größenklasse 2 ($>4\text{--}\leq 6$ mm) von April bis Juli feststellbar. Die verhältnismäßig meisten Schnecken dieser Größenklasse wurden im August bzw. September gefunden. Die Größenklassen 3 ($>6\text{--}\leq 8$ mm) und 4 (>8 mm) wurden verhältnismäßig am häufigsten im April gefunden. Diese beiden Größenklassen nahmen im jahreszeitlichen Verlauf ab, *G. truncatula* mit einer Gehäusehöhe >8 mm wurden ausschließlich im April, Mai und Juli gefunden.

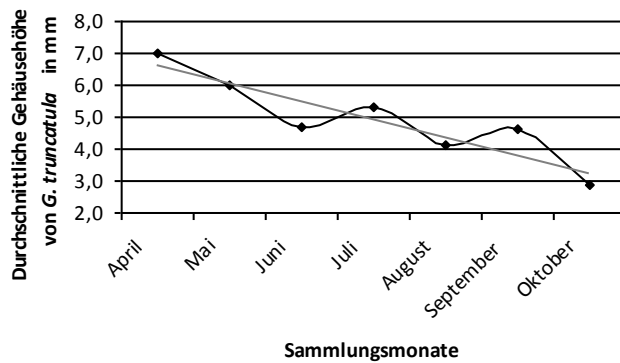
**Abb. 15**

Prozentuale Verteilung der Gehäusehöhe gesammelter *G. truncatula* pro Sammlungsmonat
 Größenklasse 1 = ≤ 4 mm Gehäusehöhe. Größenklasse 2 = $>4-\leq 6$ mm. Größenklasse 3 = $>6-\leq 8$ mm.
 Größenklasse 4 = >8 mm.

**Abb. 16**

Prozentuale Verteilung des Gesamtanteils verschiedener Größenklassen von *G. truncatula* auf den gesamten Untersuchungszeitraum
 Größenklasse 1 = ≤ 4 mm Gehäusehöhe. Größenklasse 2 = $>4-\leq 6$ mm. Größenklasse 3 = $>6-\leq 8$ mm.
 Größenklasse 4 = >8 mm.

Insgesamt gesehen verringerte sich die durchschnittliche Gehäusehöhe der gesammelten *G. truncatula* im Verlauf der Sammlungsperiode, mit einem Maximum von 7,0 mm im April und einem Minimum von 2,9 mm im Oktober (**Abb. 17**).

**Abb. 17**

Durchschnittliche Gehäusehöhe der gesammelten *G. truncatula* über die Sammlungsmonate

3.2. Mikroskopische parasitologische Untersuchungen

3.2.1. Mikroskopische Detektion und morphologische Bestimmung

von Digenea in *Galba truncatula*

Neunzig der mikroskopisch untersuchten *G. truncatula* (2,32%) waren mit Vertretern der Unterklasse Digenea oder Digenea-ähnlichen infiziert.

Es wurden insgesamt 75 mit Vertretern der Überfamilie Paramphistomoidea infizierte *G. truncatula* (1,94%) gefunden (**Abb. 18**). Bei 12 Schnecken konnte eine Infektion mit Vertretern der Überfamilie Echinostomatoidea (0,31%) festgestellt werden (**Abb. 18**). Darunter befanden sich vier Mischinfektionen (0,10%). Es handelte sich in 3 der 4 Fälle um Mischinfektionen von Paramphistomoidea und Echinostomatoidea, in einem Fall waren Vertreter der Paramphistomoidea und „andere Helminthen“ mikroskopisch detektierbar.

Insgesamt sieben Infektionen konnten morphologisch nicht näher zugeordnet werden (**Abb. 18**). Darunter befand sich die Mischinfektion mit Paramphistomoidea und „anderen Helminthen“. Zudem wurden zwei Infektionen mit unbestimmbaren Redien und zwei Infektionen mit nicht näher zuordenbaren Sporozysten gefunden. Darüber hinaus wurden zwei Einzelinfektionen mit Helminthen gefunden, welche nicht näher bestimmbar waren.

Zusätzlich wurden (vermutlich parasitische) Nematoden, Dipterenlarven und mehrmals Vertreter der Gattung *Chaetogaster* (Oligochaeta) gefunden.

Einige Beispiele der fotografischen Dokumentation sind in **Abb. 19** dargestellt.

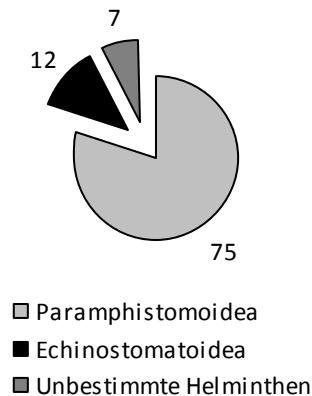


Abb. 18

Mikroskopische Bestimmung der Helminthenfunde in G. truncatula

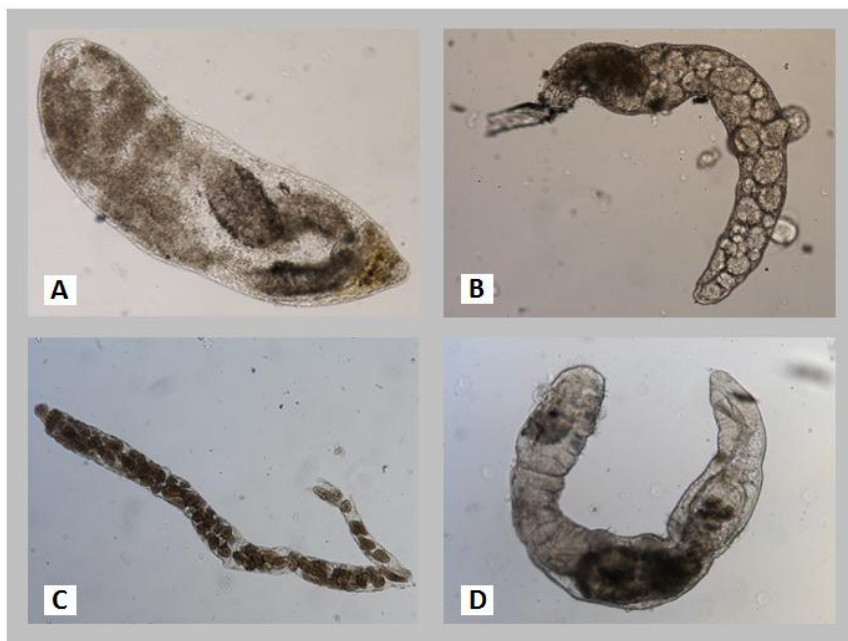


Abb. 19

Mikroskopisch detektierte und isolierte Helminthenfunde

A) Probennr. 20: Redie aus der Überfamilie Paramphistomoidea (ca. 900,29 μm x 274,40 μm). Extrahiert aus *G. truncatula* mit einer Gehäusehöhe von >5-≤6 mm vom 08.07.2008, Standort Regelsbrunn. Die Zerkarie innerhalb des vorderen Bereichs der Redie besitzt zwei sichtbare Augen. Die Redie verfügt über einen charakteristischen Saugnapf und einen eher kurzen Darm. B) Probennr. 129: Redie aus der Überfamilie Echinostomatoidea (ca. 1.342,6 μm x 168,30 μm). Extrahiert aus *G. truncatula* mit einer Gehäusehöhe von >3-≤4 mm vom 17.09.2008, Standort 1. C) Probennr. 154: Sporozyste einer unbestimmten Trematodenart (ca. 1.460 μm x 92 μm). Extrahiert aus *G. truncatula* mit einer Gehäusehöhe von >4-≤5 mm vom 03.09.2008, Standort 2. D) Probennr. 148: *Chaetogaster* sp. (ca. 1.286 μm x 172,30 μm). Extrahiert aus *G. truncatula* mit einer Gehäusehöhe von >5-≤6 mm vom 24.10.2008, Standort 1.

3.2.2. Standortverteilung infizierter *Galba truncatula*

Standort 2 wies mit 53 infizierten Schnecken (3,9%) die höchste Infektionslast auf. Darunter befanden sich 48 Infektionen mit Paramphistomoidea, fünf Infektionen mit Echinostomatoidea, sowie drei unbestimmbare Infektionen (1x Redien, 1x Sporozysten, 1x Helminthen-Mischinfektion mit Paramphistomoidea). Bei zwei Infektionen handelte es sich um Mischinfektionen von Paramphistomoidea und Echinostomatoidea. An den sonstigen Standorten wurden 13 befallene *G. truncatula* gefunden (3,0%). Darunter befanden sich 11 Paramphistomoidea und zwei nicht bestimmbare Infektionen (1x Helminthen, 1x Sporozysten). Standort 1 wies mit 24 infizierten Schnecken eine Infektionslast von 1,2% auf. Darunter befanden sich 16 Infektionen mit Paramphistomoidea, sieben Infektionen mit Echinostomatoidea und zwei unbestimmbare Infektionen (1x Redien, 1x Helminthen). Bei einer Infektion handelte es sich um eine Mischinfektion von Paramphistomoidea und Echinostomatoidea. An Standort 3 wurden keine infizierten *G. truncatula* gefunden.

3.2.3. Saisonalität des Befalls

Im Juni wurden drei befallene Schnecken (1,0% der im Juni untersuchten *G. truncatula*) gefunden. Darunter befand sich eine Infektion mit Paramphistomoidea (0,3%), sowie zwei Infektionen mit Echinostomatoidea (0,7%). Im Juli wurden 53 befallene Schnecken (10,1%) gefunden. Insgesamt 49 Schnecken waren mit Paramphistomoidea (9,4%), fünf Schnecken mit Echinostomatoidea (1,0%), sowie eine Schnecke mit nicht näher bestimmbaren Sporozysten (0,2%) infiziert. Bei zwei Schnecken wurde eine Mischinfektion von Paramphistomoidea und Echinostomatoidea nachgewiesen. Von den im August gesammelten *G. truncatula* waren 18 Tiere (1,43%) mit Helminthen befallen. Bei 14 Infektionen handelte es sich um Paramphistomoidea (1,1%), bei drei Infektionen um Echinostomatoidea (0,2%). Darunter befand sich eine Mischinfektion von Paramphistomoidea und Echinostomatoidea. Bei zwei Infektionen handelte es sich um nicht näher bestimmbare Helminthen (0,2%). Im September wurden 16 (1,03%) befallene

Schnecken gefunden, wobei es sich um 11 Infektionen mit Paramphistomoidea (1,3%), zwei Infektionen mit Echinostomatoidea (0,2%) und vier unbestimmte Infektionen (2x Redien, 1x Sporozysten, 1x Helminthen-Mischinfektion mit Paramphistomoidea) (0,5%) handelte. In den Untersuchungsmonaten April, Mai und Oktober wurden keine befallenen Schnecken festgestellt.

3.3. Primerdesign

3.3.1. TremF/TremR

Das Primerpaar TremF/TremR sollte eine spezifische Detektion von digenen Trematoden in *G. truncatula* ermöglichen.

3.3.1.1. Lokale Alignments mittels BLAST

Einige Vertreter der Klasse Cestoda und des Phylums Ascomycota BERKELEY 1857, *Escherichia coli* (MIGULA 1895) CASTELLANI & CHALMERS 1919, sowie der Familien Lymnaeidae und Cervidae wiesen mit TremF vergleichsweise niedrige Übereinstimmungswerte von 11-15 bp auf. Teilweise wurden diese Übereinstimmungen in Genen außerhalb der rDNA gefunden. Einige Arten des Phylums Nematoda, sowie der Unterklassen Digenea und Aspidogastrea wiesen im Bereich der 18S rDNA höhere Übereinstimmungsgrade mit TremF auf (**Tab. 20**). Im Falle von TremR wiesen Vertreter des Phylums Nematoda, sowie *E. coli* niedrige Übereinstimmungswerte von 14-15 bp auf. Die restlichen überprüften Vergleichsgruppen zeigten höhere Übereinstimmungsgrade (**Tab. 20**).

Tab. 20

Maximale Übereinstimmungswerte der durch BLAST mit TremF/TremR verglichenen Phyla, (Unter-) Klassen, Familien und Arten

Vergleichsgruppe	TremF	TremR
Unterklasse Digenea	21/21 (100%) ^{a)} <i>Posthodiplostomum</i> sp., 18S rDNA (GenBanknr.: FJ469590.1)	22/22 (100%) ^{a)} <i>Schistosoma mansoni</i> , Supercontig Smp_scaff008964 (GenBanknr.: FN366255.1)

Fortsetzung

Vergleichsgruppe	TremF	TremR
Unterklasse	21/21 (100%)	20/22 (90,91%)^{a)}
Aspidogastrea	<i>Multicalyx elegans</i> , 18S rDNA (GenBanknr.: DQ482610.1)	<i>Multicalyx elegans</i> , 18S rDNA (GenBanknr.: DQ482610.1)
Phylum Nematoda	18/21 (85,71%) unkultivierte Nematode, 18S rDNA (GenBanknr.: AF530550.1)	15/22 (68,18%)^{a)} <i>Caenorhabditis brenneri</i> , Contig JD18 (GenBanknr.: FJ362370.1)
Klasse Cestoda	11/21 (52,38%)^{a)} <i>Taenia solium</i> , SCAR Marker AD16 genomische Sequenz (GenBanknr.: EF053054.1)	20/22 (90,91%)^{a)} <i>Gyrocotyle</i> sp., 18S rDNA (GenBanknr.: EU343741.1)
<i>E. coli</i>	13/21 (61,90%)^{b)} <i>E. coli</i> , mehrere Gene (GenBanknr.: CP001665.1)	14/22 (63,64%) <i>E. coli</i> , Wzx-Gen (GenBanknr.: AF172324.1)
Phylum Ascomycota	15/21 (71,43%)^{a)} <i>Talaromyces stipitatus</i> , Chs7- mRNA (GenBanknr.: XM_002484758.1)	18/22 (81,82%)^{a)} <i>Megalohypha aqua-dulces</i> , 18S rDNA (GenBanknr.: EF175646.1)
Familie Cervidae	12/21 (57,14%)^{a)} <i>Cervus elaphus</i> , BMPR2-mRNA (GenBanknr.: DQ239788.1)	16/22 (72,73%) <i>Rangifer tarandus</i> , 18S rDNA (GenBanknr.: AY145527.1)
Familie Lymnaeidae	12/21 (57,14%)^{a)} <i>G. truncatula</i> , 18S rDNA (GenBanknr.: EU728668.1)	18/22 (81,82%)^{a)} <i>G. truncatula</i> , 18S rDNA (GenBanknr.: EU728668.1)

Alle Alignmentergebnisse wiesen 0 Gaps auf. Die Anzahl der Basenübereinstimmungen wurde aus den BLAST-Ergebnissen übernommen. Die prozentualen Übereinstimmungswerte bezogen auf die gesamte Primerlänge wurden manuell berechnet und sind theoretisch zu betrachten, da mögliche weitere Übereinstimmungen in den restlichen Primerbereichen nicht miteinbezogen wurden.

^{a)} = es wurden mehrere Arten mit diesem Übereinstimmungsgrad gefunden. ^{b)} = es wurden mehrere GenBank-Einträge der angegebenen Art mit diesem Übereinstimmungsgrad gefunden.

3.3.1.2. Globale Alignments mittels EMBOSS

TremF wies mit allen Trematoden-Vergleichsgruppen Übereinstimmungswerte von mindestens 85,71% (18/21 bp) auf. Bei TremR lag der minimale Übereinstimmungsgrad bei 95,45% (21/22 bp). Die vergleichsweise niedrigsten Übereinstimmungswerte wurden bei beiden Primern mit der Überfamilie Pronocephaloidea erzielt (**Tab. 21**).

Tab. 21

Maximale Übereinstimmungen anhand EMBOSS an TremF/TremR alignter Arten der Unterklasse Digenea

Überfamilie/Ordnung	Art	TremF	TremR
Überfamilie	<i>F. magna</i>	19/21 (90,48%)	22/22 (100%)
Echinostomatoidea	<i>F. hepatica</i>	19/21 (90,48%)	22/22 (100%)
	<i>E. revolutum</i>	18/21 (85,71%)	22/22 (100%)
Überfamilie	<i>C. calicophorum</i>	19/21 (90,48%)	22/22 (100%)
Paramphistomoidea	<i>S. subtriquetrus</i>	19/21 (90,48%)	22/22 (100%)
	<i>I. hirudinaceus</i>	19/21 (90,48%)	22/22 (100%)
Überfamilie	<i>N. pacifera</i>	18/21 (85,71%)	21/22 (95,45%)
Pronocephaloidea	<i>C. indicus</i>	18/21 (85,71%)	21/22 (95,45%)
	<i>Notocotylus</i> sp.	18/21 (85,71%)	21/22 (95,45%)
Ordnung Strigeida	<i>A. pipientis</i>	21/21 (100%)	22/22 (100%)
	<i>D. phoxini</i>	20/21 (95,24%)	22/22 (100%)
	<i>B. damnificus</i>	20/21 (95,24%)	21/22 (95,45%)
Ordnung Plagiorchiida	<i>T. blepta</i>	20/21 (95,24%)	22/22 (100%)
	<i>K. xishaense</i>	19/21 (90,48%)	22/22 (100%)
	<i>O. ranae</i>	20/21 (95,24%)	22/22 (100%)

Alle Alignmenttergebnisse wiesen 0 Gaps auf.

Alle an TremF/TremR alignte Arten des Phylums Nematoda wiesen mit TremF eine Sequenzidentität von 65,2% mit jeweils zwei Gaps auf. Bei TremR variierte die Sequenzübereinstimmung von 40,5-59,1% mit 0-20 Gaps (**Tab. 22**).

Tab. 22

Maximale Übereinstimmungen anhand EMBOSS an TremF/TremR alignter Arten des Phylums Nematoda

Art	TremF	TremR
<i>M. capillaris</i>	15/23 (65,2%)	17/42 (40,5%)
	Gaps: 2/23 (8,7%)	Gaps: 20/42 (47,6%)
<i>H. macropi</i>	15/23 (65,2%)	13/22 (59,1%)
	Gaps: 2/23 (8,7%)	Gaps: 0/22 (0,0%)
<i>P. odocoilei</i>	15/23 (65,2%)	17/42 (40,5%)
	Gaps: 2/23 (8,7%)	Gaps: 20/42 (47,6%)
<i>P. rufescens</i>	15/23 (65,2%)	17/42 (40,5%)
	Gaps: 2/23 (8,7%)	Gaps: 20/42 (47,6%)
<i>S. minor</i>	15/23 (65,2%)	17/42 (40,5%)
	Gaps: 2/23 (8,7%)	Gaps: 20/42 (47,6%)

3.3.2. MagnaF/MagnaR

Mithilfe des neu entwickelten Primerpaares MagnaF/MagnaR sollte eine spezifische Detektion von *F. magna* in den untersuchten *G. truncatula* ermöglicht werden.

3.3.2.1. Lokale Alignments mittels BLAST

Die Unterklasse Aspidogastrea, die Klasse Cestoda, *E. coli* und die Familien Cervidae und Lymnaeidae wiesen mit MagnaF niedrige Übereinstimmungsgrade von 9-15 bp auf. Arten der Phyla Nematoda, sowie Ascomycota und der Unterklasse Digenea wiesen höhere Übereinstimmungswerte von 16-22 bp auf. Die Übereinstimmungen wurden teilweise in Genen außerhalb der rDNA gefunden (**Tab. 23**). Die Unterklasse Aspidogastrea, die Klasse Cestoda und die Familien Cervidae und Lymnaeidae zeigten mit MagnaR Übereinstimmungswerte von 10-12 bp. Arten der anderen verglichenen Gruppen zeigten einen Übereinstimmungsgrad von 16-22 bp (**Tab. 23**).

Tab. 23

Maximale Übereinstimmungswerte der durch BLAST mit MagnaF/MagnaR verglichenen Phyla, (Unter-)Klassen, Familien und Arten

Vergleichsgruppe	MagnaF	MagnaR
Unterklasse Digenea	22/22 (100%)^{b)} <i>F. magna</i> , ITS1 rDNA (GenBanknr.: EF612475.1)	22/22 (100%)^{b)} <i>F. magna</i> , ITS2 rDNA (GenBanknr.: EF612487.1)
Unterklasse Aspidogastrea	9/22 (40,91%)^{a)} <i>M. elegans</i> , 18S rDNA (Genbanknr.: DQ482610.1)	11/22 (50%)^{a)} <i>Lobatostoma manteri</i> , 28S rDNA (GenBanknr.: AY157177.1)
Phylum Nematoda	16/22 (72,73%) <i>Caenorhabditis briggsae</i> , Hypoth. Protein BG07713-mRNA (GenBanknr.: XM_001677663.1)	17/22 (77,27%) <i>C. briggsae</i> , Cosmid G45N09 (GenBanknr.: AC090003.1)
Klasse Cestoda	13/22 (59,09%) <i>Taenia asiatica</i> , OSBP1-mRNA (GenBanknr.: EF420468.1)	12/22 (54,55%) <i>Pseudanthobothrium hansenii</i> , 28S rDNA (GenBanknr.: EF207934.1)
<i>E. coli</i>	15/22 (68,18%)^{b)} <i>E. coli</i> , mehrere Gene (GenBanknr.: CP001665.1)	17/22 (77,27%)^{b)} <i>E. coli</i> (GenBanknr.: CU928161.2)
Phylum Ascomycota	19/22 (86,36%) <i>Penicillium chrysogenum</i> , Contig Pc00c13 (GenBanknr.: AM920428.1)	16/22 (72,73%)^{a)} <i>Ashbya gossypii</i> , Chromosom IV (GenBanknr.: AE016817.4)
Familie Cervidae	14/22 (63,64%) <i>Cervus nippon</i> , FGF10-mRNA (GenBanknr.: AY487246.1)	11/22 (50%)^{a)} <i>Blastoceros dichotomus</i> , Cyt-b-Gen (GenBanknr.: AY607038.1)
Familie Lymnaeidae	12/22 (54,55%) <i>Lymnaea stagnalis</i> , FaNaC-mRNA (GenBanknr.: AF335548.1)	10/22 (45,45%)^{b)} <i>L. stagnalis</i> , Fur1-mRNA (GenBanknr.: AF140361.1)

Alle Alignmentergebnisse wiesen 0 Gaps auf. Die Anzahl der Basenübereinstimmungen wurde aus den BLAST-Ergebnissen übernommen. Die prozentualen Übereinstimmungswerte bezogen auf die gesamte Primerlänge wurden manuell berechnet und sind theoretisch zu betrachten, da mögliche weitere Übereinstimmungen in den restlichen Primerbereichen nicht miteinbezogen wurden.

^{a)} = es wurden mehrere Arten mit diesem Übereinstimmungsgrad gefunden. ^{b)} = es wurden mehrere GenBank-Einträge der angegebenen Art mit diesem Übereinstimmungsgrad gefunden.

3.3.2.2. Globale Alignments mittels EMBOSS

Wie in **Tab. 24** dargestellt, lagen die Sequenzübereinstimmungen beider Primer im Fall der Überfamilien Paramphistomoidea und Pronocephaloidea, sowie der Ordnungen Strigeida und Plagiorchiida bei 43,6-68,2%. Auch innerhalb der Überfamilie Echinostomatoidea wiesen die Arten *E. revolutum*, *Hypoderaeum conoideum* (BLOCH 1782) und *Echinoparyphium recurvatum* (LINSTOW 1873) vergleichsweise niedrige Übereinstimmungswerte von auf. Ausschließlich *F. magna* erreichte mit beiden Primern eine Sequenzübereinstimmung von 100%, gefolgt von *F. hepatica* mit Werten von 68,2-86,4%. Insgesamt gesehen wies MagnaR niedrigere Übereinstimmungswerte mit den Vergleichssequenzen als MagnaF auf.

Tab. 24

Maximale Übereinstimmungen anhand EMBOSS an MagnaF/MagnaR alignter Arten der Unterklasse Digenea

Vergleichsgruppe	Art	MagnaF	MagnaR
Überfamilie	<i>F. magna</i>	22/22 (100,0%)	22/22 (100,0%)
Echinostomatoidea		Gaps: 0/22 (0,0%)	Gaps: 0/22 (0,0%)
	<i>F. hepatica</i>	19/22 (86,4%)	15/22 (68,2%)
		Gaps: 0/22 (0,0%)	Gaps: 0/22 (0,0%)
	<i>E. revolutum</i>	16/22 (72,7%)	17/39 (43,6%)
		Gaps: 0/22 (0,0%)	Gaps: 17/39 (43,6%)
	<i>H. conoideum</i>	15/24 (62,5%)	17/39 (43,6%)
		Gaps: 2/24 (8,3%)	Gaps: 17/39 (43,6%)
	<i>E. recurvatum</i>	18/24 (75,0%)	17/39 (43,6%)
		Gaps: 4/24 (16,7%)	Gaps: 17/39 (43,6%)
Überfamilie	<i>C. daubneyi</i>	nicht verfügbar	17/39 (43,6%)
Paramphistomoidea			Gaps: 17/39 (43,6%)
	<i>G. hominis</i>	15/22 (68,2%)	13/22 (59,1%)
		Gaps: 0/22 (0,0%)	Gaps: 0/22 (0,0%)
Überfamilie	<i>O. capricorni</i>	16/25 (64,0%)	17/39 (43,6%)
Pronocephaloidea		Gaps: 3/25 (12,0%)	Gaps: 17/39 (43,6%)
Ordnung Strigeida	<i>T. scheuringi</i>	15/24 (62,5%)	16/32 (50,0%)
		Gaps: 2/22 (9,1%)	Gaps: 10/32 (31,2%)
Ordnung Plagiorchiida	<i>P. elegans</i>	16/24 (66,7%)	18/38 (47,4%)
		Gaps: 2/24 (8,3%)	Gaps: 16/38 (42,1%)

3.3.2.3. Vergleich der Amplikonlängen in GeneDoc

Bei einem Alignment der ITS1-5,8S-ITS2-Regionen von fünf Vertretern der Überfamilie Echinostomatoidea zeigte sich, dass die Arten *E. revolutum*, *E. recurvatum* und *H. conoideum* ein um etwa 70 bp längeres Amplikon als *F. magna* und *F. hepatica* ergeben würden. Der Sequenzabschnitt von Base 449 bis Base 521 des potentiellen Amplikons dieser drei Arten ist bei *F. magna* und *F. hepatica* nicht vorhanden (Abb. 20).

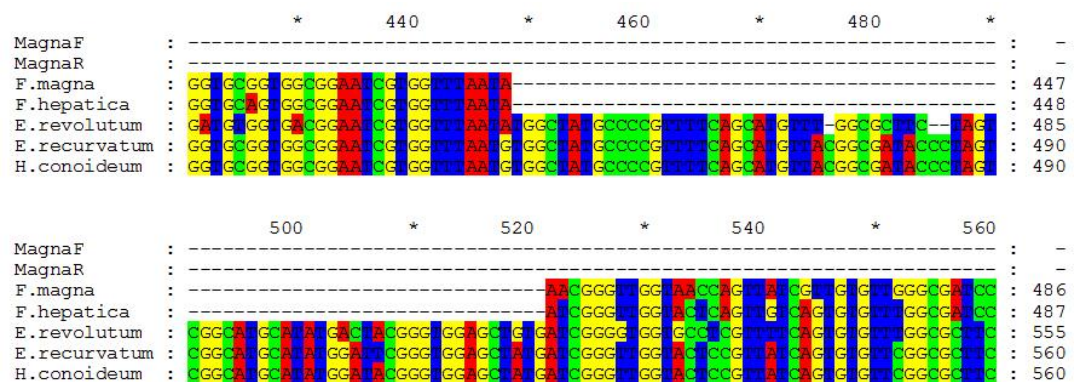


Abb. 20

Teil des potentiellen MagnaF/MagnaR-PCR-Amplikons von fünf Vertretern der Überfamilie Echinostomatoidea

3.4. Molekularbiologische Untersuchungen

3.4.1. DNA-Isolierung

3.4.1.1. Positivkontrollen

Im Fall der Gewebeproben von *A. limacoides*, *P. longicollis*, sowie *Diplostomum* sp. lag der DNA-Gehalt unter der Nachweisbarkeitsgrenze des Messgerätes. Der durchschnittliche DNA-Gehalt der Eiproben war mit 0,81 ng/μl deutlich geringer als jener der messbaren Gewebeproben (162,92 ng). Die Positivkontrollen von *F. hepatica* und *F. magna* wurden für den PCR-Einsatz auf einen DNA-Gehalt von 73,56 ng/μl bzw. 68,34 ng/μl verdünnt.

3.4.1.2. Isolierte Trematodenstadien

Nach erfolgter DNA-Extraktion konnten Unterschiede im DNA-Gehalt verschieden aufbewahrter Proben (Wasser oder 75% EtOH) festgestellt werden. In 75% EtOH aufbewahrte Funde wiesen einen durchschnittlichen DNA-Gehalt von 24,50 ng/μl auf (n = 15), ursprünglich in Wasser aufbewahrte Funde durchschnittlich 7,02 ng/μl (n = 15). Acht der 15 in Wasser aufbewahrten Funde wurden nach einigen Wochen Tiefkühlung aufgetaut, das Wasser abpipettiert und in 75% EtOH konserviert. Im Vergleich zu den ausschließlich in Wasser aufbewahrten Funden mit einem durchschnittlichen DNA-Gehalt von 7,68 ng/μl (n = 7), wiesen diese Proben einen durchschnittlichen DNA-Gehalt von 6,45 ng/μl auf.

3.4.1.3. Stichproben

Die 44 Schnecken-Stichproben, bei denen die Reagenzienmengen in der DNA-Isolierung dem Schneckengewicht angepasst wurden, wiesen einen durchschnittlichen DNA-Gehalt von 29,5 ng/μl/mm Schalenhöhe auf. Die DNA von 24 Stichproben von *G. truncatula* wurde mit den Standardmengen laut Protokoll isoliert. Der durchschnittliche DNA-Gehalt betrug 26,3 ng/μl/mm Schalenhöhe. Der unterschiedliche DNA-Gehalt der in Wasser, 75% EtOH oder ohne Flüssigkeit tiefgefroren aufbewahrter *G. truncatula* kann **Tab. 25** entnommen werden.

Tab. 25

Durchschnittlicher DNA-Gehalt in Wasser, 75% EtOH oder ohne Flüssigkeit tiefgefroren aufbewahrter *G. truncatula*

DNA-Isolierung	Wasser	75% EtOH	ohne Flüssigkeit
Gewichtsangepasst	20,0 ng/μl/mm (n = 26)	23,9 ng/μl/mm (n = 2)	45,6 ng/μl/mm (n = 16)
Standard	15,5 ng/μl/mm (n = 4)	20,6 ng/μl/mm (n = 3)	29,9 ng/μl/mm (n = 17)

3.4.2. Primer-Testdurchläufe

3.4.2.1. Spezifität der eingesetzten Primerpaare

Der Testdurchlauf mit dem Primerpaar TremF/TremR brachte mit allen drei PCR-Programmen ein positives Ergebnis der Kontrollen von *F. magna*, *F. hepatica* und *Paramphistomum* sp. hervor. Die Kontrollen von *T. saginata* (Gewebe, Eier), *D.*

latum (Eier) (**Abb. 21**), sowie von *G. truncatula* (**Abb. 25, Kapitel 3.4.2.2.**) wurden nicht amplifiziert.

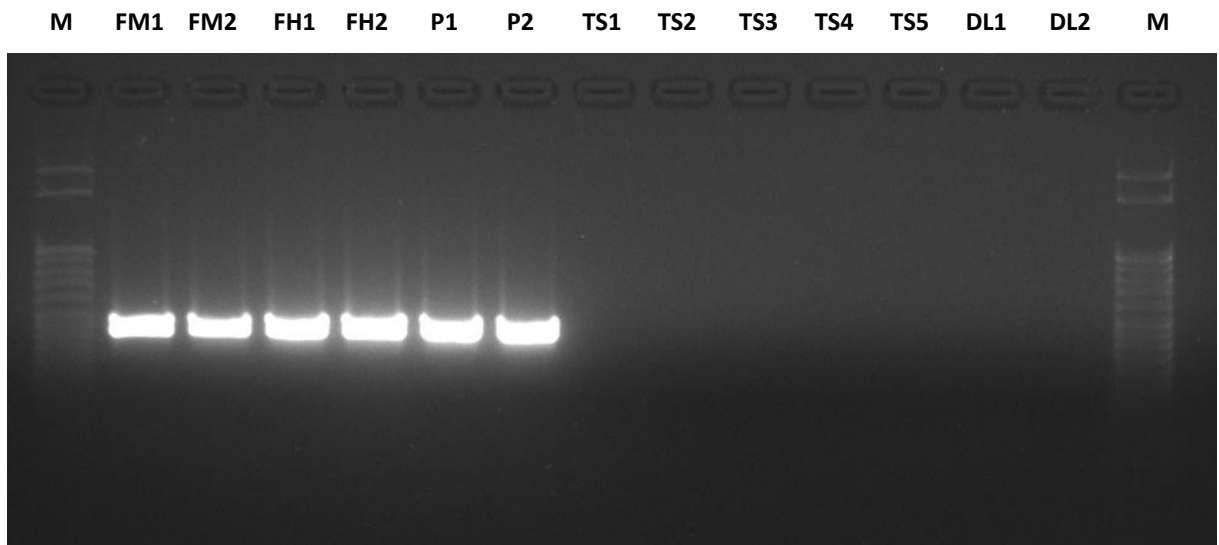


Abb. 21

PCR-Testdurchlauf mit dem PCR-Programm *GastB56* zur Überprüfung der Spezifität des *TremF/TremR*-Primerpaars

M = Marker (DirectLoad™ Step Ladder, 50 bp); FM1 = *F. magna* (Probentyp: Gewebe, 68,34 ng DNA-Einsatz); FM2 = *F. magna* (Gewebe, 205,02 ng); FH1 = *F. hepatica* (Gewebe, 73,56 ng); FH2 = *F. hepatica* (Gewebe, 220,68 ng); P1 = *Paramphistomum* sp. (Gewebe, 85,9 ng); P2 = *Paramphistomum* sp. (Gewebe, 257,7 ng); TS1 = *T. saginata* (Gewebe, 68,57 ng); TS2 = *T. saginata* (Gewebe, 205,71 ng); TS3 = *T. saginata* (Gewebe, 342,85 ng); TS4 = *T. saginata* (Eier, 4,40 ng); TS5 = *T. saginata* (Eier, 8,80 ng); DL1 = *D. latum* (Eier, 3,70 ng); DL2 = *D. latum* (Eier, 7,40 ng); M = Marker (DirectLoad™ Step Ladder, 50 bp).

Mittels MagnaF/MagnaR gelang eine Amplifikation von *F. magna*- und *F. hepatica*-DNA. Die Kontrollen von *Paramphistomum* sp., *T. saginata* (Gewebe) (**Abb. 22**), sowie von *G. truncatula* (**Abb. 26, Kapitel 3.4.2.2.**) wiesen mit allen drei PCR-Programmen ein negatives Testergebnis auf.

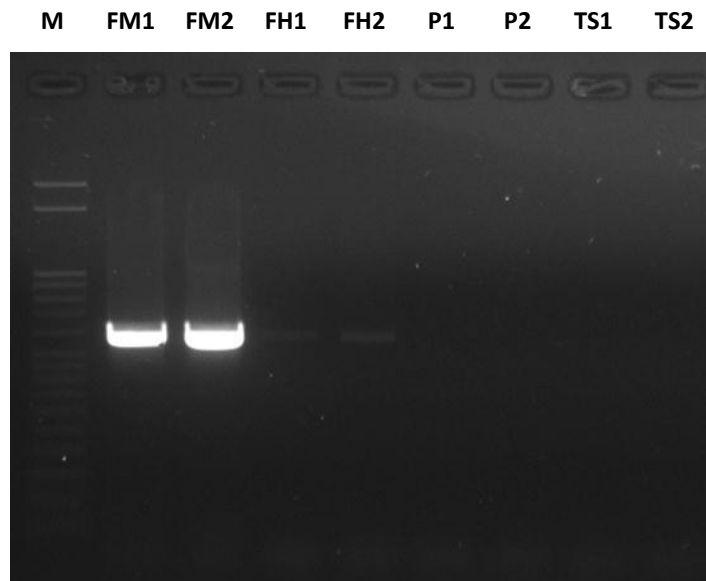
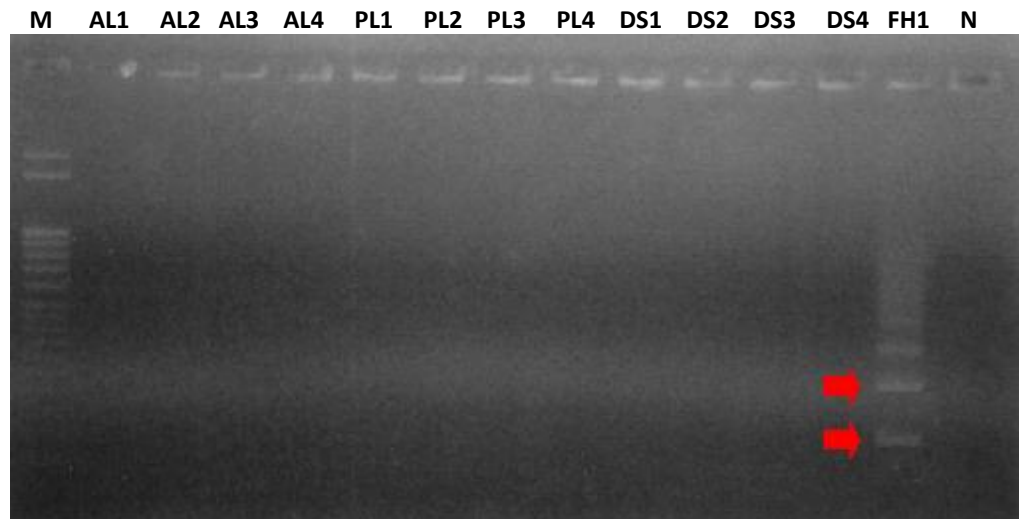


Abb. 22

PCR-Testdurchlauf mit dem PCR-Programm GastB56 zur Überprüfung der Spezifität des MagnaF/MagnaR-Primerpaars

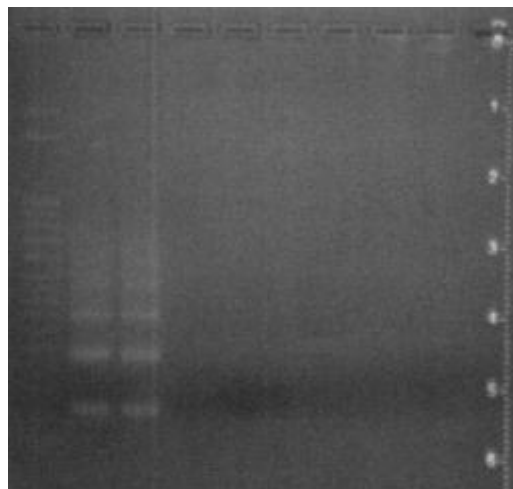
M = Marker (DirectLoad™ Step Ladder, 50 bp); FM1 = *F. magna* (Probentyp: Gewebe, 68,34 ng DNA-Einsatz); FM2 = *F. magna* (Gewebe, 205,02 ng); FH1 = *F. hepatica* (Gewebe, 73,56 ng); FH2 = *F. hepatica* (Gewebe, 220,68 ng); P1 = *Paramphistomum* sp. (Gewebe, 85,90 ng); P2 = *Paramphistomum* sp. (Gewebe, 257,70 ng); TS1 = *T. saginata* (Gewebe, 68,57 ng); TS2 = *T. saginata* (Gewebe, 205,71 ng).

Der Testdurchlauf mit FASC_f/FASC_r brachte mit *F. hepatica*-DNA unter anderem ein etwa 124 bp, sowie ein vermutlich 248 bp langes Amplikon hervor. Kontrollen von *F. magna*, *Paramphistomum* sp., *A. limacoides*, *P. longicollis*, *Diplostomum* sp. (**Abb. 23** und **24**), sowie von *G. truncatula* wurden nicht amplifiziert.

**Abb. 23***PCR-Testdurchlauf zur Überprüfung der Spezifität des FASC_f/FASC_r-Primerpaars*

M = Marker (DirectLoad™ Step Ladder, 50 bp); AL1 = *A. limacoides* (Probentyp: Gewebe, 1 µl DNA-Isolat-Einsatz); AL2 = *A. limacoides* (Gewebe, 3 µl); AL3 = *A. limacoides* (Gewebe, 5 µl); AL4 = *A. limacoides* (Gewebe, 10 µl); PL1 = *P. longicollis* (Gewebe, 1 µl); PL2 = *P. longicollis* (Gewebe, 3 µl); PL3 = *P. longicollis* (Gewebe, 5 µl); PL4 = *P. longicollis* (Gewebe, 10 µl); DS1 = *Diplostomum* sp. (Gewebe, 1 µl); DS2 = *Diplostomum* sp. (Gewebe, 3 µl); DS3 = *Diplostomum* sp. (Gewebe, 5 µl); DS4 = *Diplostomum* sp. (Gewebe, 10 µl); FH1 = *F. hepatica* (Gewebe, 73,56 ng DNA-Einsatz); N = Negativkontrolle. Die Pfeile markieren das im Originalpaper von KAPLAN et al. (1995) angegebene etwa 124 bp-große Amplifikat, sowie ein vermutlich 248 bp-großes Amplifikat.

M FH1 FH2 FM1 FM2 FM3 P1 P2 P3 N

**Abb. 24***PCR-Testdurchlauf zur Überprüfung der Spezifität des FASC_f/FASC_r-Primerpaars*

M = Marker (DirectLoad™ Step Ladder, 50 bp); FH1 = *F. hepatica* (Probentyp: Gewebe, 220,68 ng DNA-Einsatz); FH2 = *F. hepatica* (Gewebe, 367,80 ng); FM1 = *F. magna* (Gewebe, 68,34 ng); FM2 = *F. magna* (Gewebe, 220,68 ng); FM3 = *F. magna* (Gewebe, 341,70 ng); P1 = *Paramphistomum* sp. (Gewebe, 85,9 ng); P2 = *Paramphistomum* sp. (Gewebe, 257,70 ng); P3 = *Paramphistomum* sp. (Gewebe, 429,50 ng); N = Negativkontrolle.

3.4.2.2. Sensitivität und Robustheit der eingesetzten Primerpaare

Sowohl mit dem Trem-, also auch mit dem Magna-Primerpaar gelang eine Amplifikation der im Verhältnis 1:1.701 und 1:3.414 (*F. magna*-DNA:*G. truncatula*-DNA) gespickten Proben mit GastB52 und GastB56. Die beiden Primerpaare konnten sowohl 1,4 ng reine *F. magna*-DNA, als auch 1,4 ng *F. magna*-DNA vermisch mit bis zu 4.780 ng *G. truncatula*-DNA amplifizieren (**Abb. 25** und **26**). Mit dem PCR-Programm GastB54 ergab sich bei TremF/TremR nur die 1:1.701 gespickte Probe, sowie die 1,4 ng reine *F. magna*-DNA als positiv (**Abb. 25**).

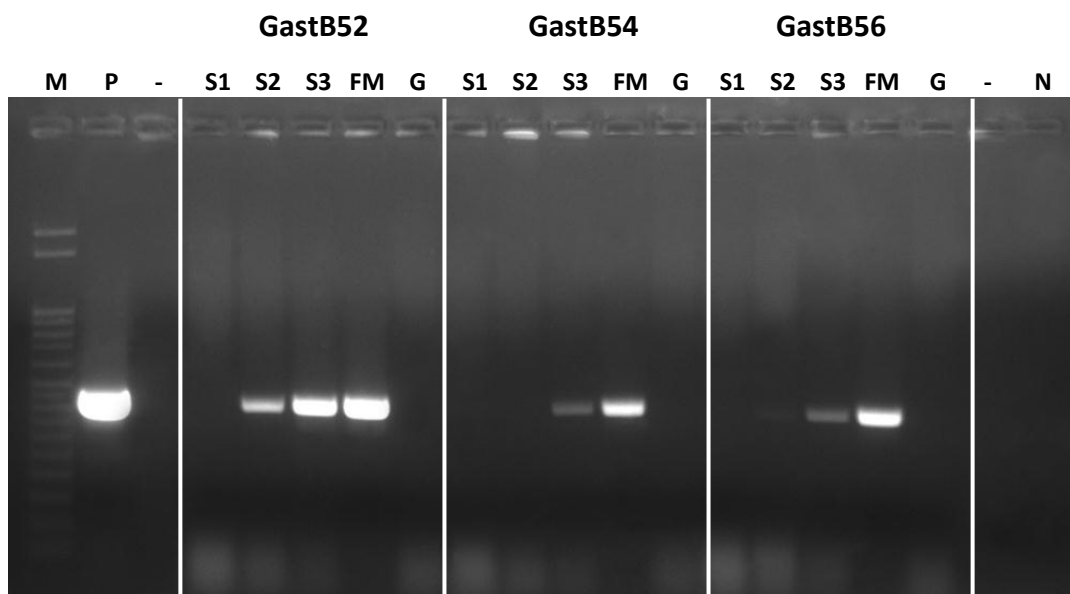
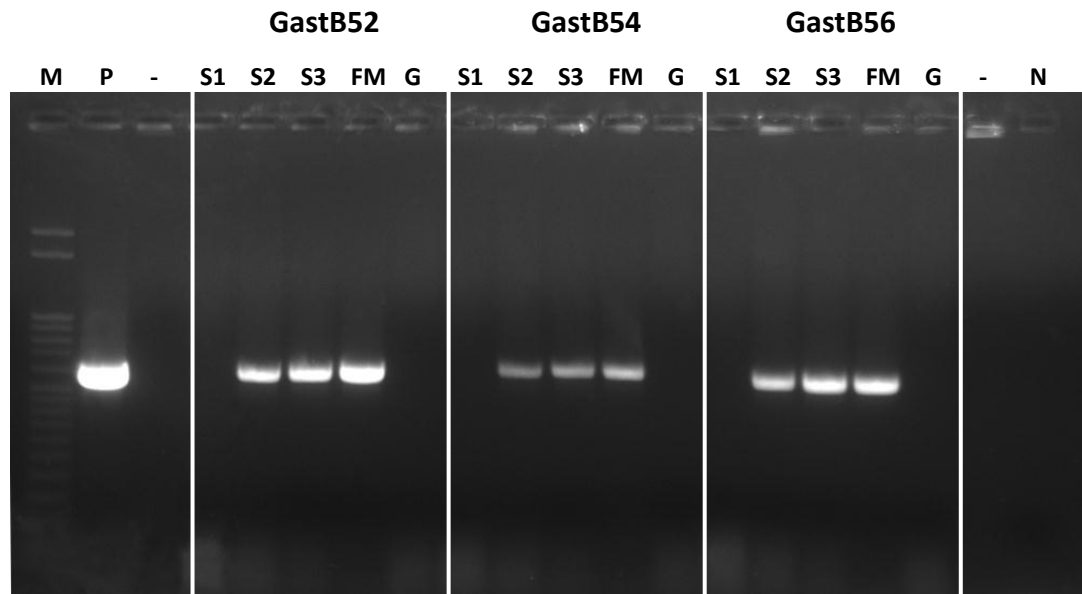


Abb. 25

PCR-Testdurchläufe zur Überprüfung der Sensitivität und Robustheit des TremF/TremR-Primerpaars

M = Marker (DirectLoad™ Step Ladder, 50 bp); P = Positivkontrolle *F. magna* (Probentyp: Gewebe, 68,34 ng DNA-Einsatz, PCR-Programm GastB52); S1 = Gespickte Probe 1:6.060; S2 = Gespickte Probe 1:3.414; S3 = Gespickte Probe 1:1.707; FM = *F. magna* (Gewebe, 1,4 ng); G = *G. truncatula* (Gewebe, 4.680 ng); N = Negativkontrolle (GastB52).

Mit MagnaF/MagnaR konnten mit GastB54 die gespickten Proben im Verhältnis von 1:701 und 1:314, sowie die reine *F. magna* DNA amplifiziert werden. Hierbei ergab sich allerdings eine leichte Abweichung der Amplikonlängen im Vergleich zu GastB52 und GastB56 (**Abb. 26**). Die gespickte Probe im Verhältnis von 1:6.060 konnte mit keinem der beiden Primerpaare amplifiziert werden. Auch die reine *G. truncatula*-Kontrolle wurde mit keinem Primerpaar amplifiziert (**Abb. 25** und **26**).

**Abb. 26**

PCR-Testdurchläufe zur Überprüfung der Sensitivität und Robustheit des MagnaF/MagnaR-Primerpaars

M = Marker (DirectLoad™ Step Ladder, 50 bp); P = Positivkontrolle *F. magna* (Probentyp: Gewebe, 68,34 ng DNA-Einsatz, PCR-Programm GastB52); S1 = Gespikte Probe 1:6.060; S2 = Gespikte Probe 1:3.414; S3 = Gespikte Probe 1:1.707; FM = *F. magna* (Gewebe, 1,4 ng); G = *G. truncatula* (Gewebe, 4.680 ng); N = Negativkontrolle (GastB52).

3.4.3. Proben-PCRs

3.4.3.1. Trematodenuniversal-Primerpaar

Von den 30 molekularbiologisch untersuchten isolierten Trematodenstadien ergaben 24 Proben (80,0%) ein positives Ergebnis mit dem Trematodenuniversal-Primerpaar. Als positives Testergebnis wurde eine einzelne, etwa 450 bp-große Bande gewertet. Es wurden keine fragmentierten Probenbanden erhalten. Die Probennr. 24, 82, 85, 120, 127 und 147 waren mit allen drei PCR-Programmen Trematoden-negativ. Die Überstände der Probennr. 24, 82, 85, 120 und 127 ergaben ebenfalls mit allen drei PCR-Programmen ein negatives Testergebnis, von Probennr. 147 waren keine Überstände vorhanden. Sieben der 68 (10,29%) untersuchten Stichproben wurden Trematoden-positiv getestet (**Tab. 26**).

Tab. 26*Trematoden-positiv getestete Stichproben*

Probennummer	Sammeldatum	Schneckengröße	Standort
3U	22.08.2008	>4-≤5 mm	1
8L	24.10.2008	>2-≤3 mm	2
8O	24.10.2008	>1-≤2 mm	2
11C	03.09.2008	>4-≤5 mm	2
11X	03.09.2008	>3-≤4 mm	2
12F	03.09.2008	>3-≤4 mm	2
12G	03.09.2008	>2-≤3 mm	2

3.4.3.2. *Fascioloides magna*-Primerpaar

Zehn Proben isolierter Trematodenstadien (30,00%) lieferten das in der PCR erwartete Amplikon von etwa 600 bp. Die Trematoden-positiv getestete Stichprobe 3U ergab auch mit dem *F. magna*-Primerpaar ein positives Testergebnis (**Tab. 27**).

Tab. 27*F. magna-positiv getestete isolierte Trematodenstadien und Stichproben*

Probennummer	Sammeldatum	Schneckengröße	Standort
4	02.07.2008	>4-≤5 mm	1
7	02.07.2008	>6-≤7 mm	1
18	08.07.2008	>6-≤7 mm	Regelsbrunn
26	02.07.2008	>6-≤7 mm	2
33	02.07.2008	>5-≤6 mm	2
50	02.07.2008	>5-≤6 mm	2
86	07.08.2008	>5-≤6 mm	1
129	17.09.2008	>3-≤4 mm	1
132	22.08.2008	>6-≤7 mm	Fischamend
164	03.09.2008	>4-≤5 mm	2
3U	22.08.2008	>4-≤5 mm	1

Drei Proben isolierter Trematodenstadien brachten bei wiederholten Versuchen unübliche Bandenmuster hervor und wurden deshalb als *F. magna*-negativ gewertet. Bei diesen Proben handelte es sich um Probennr. 48 mit etwa 800 bp und 1.200 bp-großen Amplikons; Probennr. 143 mit etwa 600 bp, 1.000 bp, 1.400 bp

und 2.000 bp-großen Amplikons; sowie Probennr. 157 mit einem etwa 150 bp-großen Amplikon (**Abb. 27**).

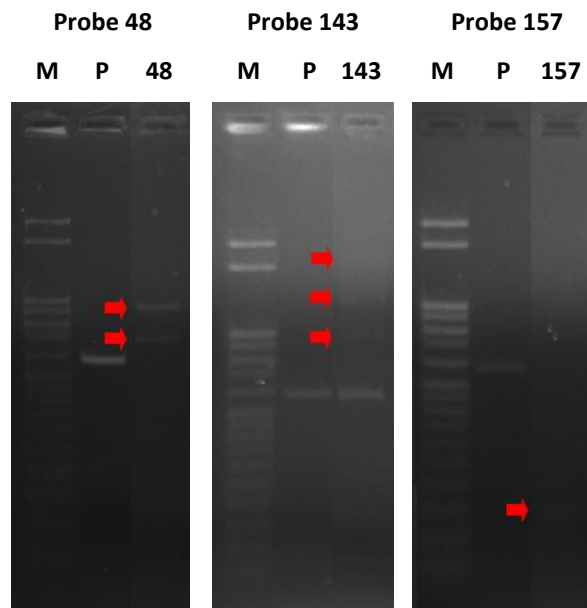


Abb. 27

Fragmentierte MagnaF/MagnaR-Probenbanden

M = Marker (DirectLoad™ Step Ladder, 50 bp); P = Positivkontrolle *F. magna* (Probentyp: Gewebe, 1,4 ng DNA-Einsatz); 48 = Probennr. 48; 143 = Probennr. 143; 157 = Probennr. 157. Die Probennr. 143 und 157 wurden mit GastB52 amplifiziert, die Probennr. 48 mit GastB56. Die fragmentierten Probenbanden sind mit Pfeilen markiert. Die Originalbilder wurden in einem Bildbearbeitungsprogramm zugeschnitten.

3.4.3.3. *Fasciola hepatica*-Primerpaar

Probennr. 129 wies das für den *F. hepatica*-Primer typische Bandenmuster auf. Probennr. 10 wies eine einzelne Bande mit einer Größe von etwa 120 bp auf. Diese Probe wurde als *F. hepatica*-negativ gewertet. Keine der sieben Trematoden-positiv getesteten Stichproben wurde positiv auf *F. hepatica* getestet.

3.4.4. Sequenzierung

3.4.4.1. Positivkontrollen

Es konnten alle sechs Positivkontrollen, sowie die beiden gespickten Proben „M3“ und „T3“ erfolgreich sequenziert werden. Fünf Proben konnten sowohl mit dem entsprechenden Forward-, als auch mit dem Reverse-Primer sequenziert werden. Die etwa 124 bp-große Bande von *F. hepatica* konnte nur mit FASC_f sequenziert

werden. Die durchschnittliche zur EMBL/BLAST-Identifikation verwendete Sequenzlänge betrug 313 bp (n = 8). Der TremF/TremR-Testdurchlauf mit Probennr. 129 ergab nur bei den DNA-Mengen 3,2 ng und 9,6 ng mit TremF und TremR ein positives Sequenzierungsergebnis. Die MagnaF/MagnaR-Sequenzierung von Probennr. 132 gelang mit keinem der beiden Primer. Probennr. 4 konnte mit 9,0 ng und MagnaR erfolgreich sequenziert werden.

3.4.4.2. Trematodenuniversal-Primerpaar

Von den 24 jeweils etwa 450 bp-großen TremF/TremR-Probenbanden der isolierten Trematodenstadien konnten 21 Banden erfolgreich sequenziert werden. Darunter befanden sich acht Probenbanden, welche mit TremF erfolgreich sequenziert wurden, sieben Probenbanden, bei denen die Sequenzierung mit TremR gelang und sechs Probenbanden, welche mit beiden Primern sequenziert werden konnten. Die durchschnittlich erhaltene Sequenzlänge, welche zum Vergleich mit den GenBank-Sequenzen herangezogen wurde, betrug 201 bp (n = 21). Die sieben jeweils etwa 450 bp-großen TremF/TremR-Banden der Stichproben konnten weder mit TremF, noch mit TremR sequenziert werden.

3.4.4.3. *Fascioloides magna*-Primerpaar

Es konnten 3 von 10 jeweils etwa 600 bp-großen MagnaF/MagnaR-Probenbanden der isolierten Trematodenstadien sequenziert werden. Es handelte sich hierbei um die Probennr. 4, 26 und 129. Die etwa 600 bp-große MagnaF/MagnaR-Probenbande der Stichprobe 3U konnte ebenfalls erfolgreich sequenziert werden. Hierbei konnten zwei Banden mit MagnaR und zwei Banden mit beiden Primern sequenziert werden. Die durchschnittlich verwendbare Sequenzlänge betrug 268 bp (n = 4). Von den fragmentierten Probenbanden konnte keine Bande erfolgreich sequenziert werden.

3.4.4.4. *Fasciola hepatica*-Primerpaar

Die Sequenzierung der einzelnen etwa 120 bp-großen Bande von Probennr. 10 gelang nicht.

3.4.5. Sequenzauswertung

3.4.5.1. Lokale Alignments der GenBank-Kontrollen

Die jeweils drei durch BLAST verglichenen 18S-Sequenzbereiche der TremF/TremR-Kontrollarten innerhalb einer Überfamilie bzw. Ordnung wiesen durchschnittliche Sequenzübereinstimmungen von M = 98,51%, SD = 2,19% (Plagiorchiida) bis zu M = 99,47%, SD = 0,65% (Pronocephaloidea) auf. Die durchschnittlichen Sequenzübereinstimmungen der einzelnen Überfamilien bzw. Ordnungen zueinander reichten von M = 90,04%, SD = 0,38% (Strigeida/Pronocephaloidea) bis zu M = 95,81%, SD = 0,55% (Plagiorchiida/ Echinostomatoidea) (**Tab. 28**).

Tab. 28

Ergebnisse der lokalen Alignments der TremF/TremR-Referenzsequenzen untereinander (in %).

Ü/O	PR		PA		EC		ST		PL	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
PR	99,47	0,65	90,71	0,68	90,77	0,50	90,04	0,38	91,11	0,42
Gaps	0,00	0,00	3,54	0,34	3,54	0,57	4,73	0,45	3,62	0,25
PA	-	-	98,66	1,61	94,41	0,79	93,76	0,88	95,05	0,78
Gaps	-	-	0,00	0,00	1,22	0,25	1,68	0,23	1,24	0,53
EC	-	-	-	-	99,31	0,83	95,65	0,44	95,81	0,55
Gaps	-	-	-	-	0,00	0,00	0,35	0,37	1,06	0,01
ST	-	-	-	-	-	-	98,83	1,29	94,69	0,39
Gaps	-	-	-	-	-	-	0,67	1,63	1,12	0,32
PL	-	-	-	-	-	-	-	-	98,51	2,19
Gaps	-	-	-	-	-	-	-	-	0,52	0,87

Ü/O = Überfamilie/Ordnung. M = durchschnittliche Übereinstimmungswerte. SD = Standardabweichung. PR. = Pronocephaloidea. PA. = Paramphistomoidea. EC. = Echinostomatoidea. ST = Strigeida. PL = Plagiorchiida.

Die durch BLAST verglichenen ITS1-5,8S-ITS2-Sequenzbereiche der fünf MagnaF/MagnaR-Kontrollarten wiesen zueinander Sequenzidentitäten von 92,48% (*F. magna*/*E. revolutum*) bis zu 95,92% (*F. magna*/*F. hepatica*) auf (**Tab. 29**).

Tab. 29

Ergebnisse der lokalen Alignments der MagnaF/MagnaR-Referenzsequenzen untereinander

Art	<i>F. magna</i>	<i>F. hepatica</i>	<i>E. revolutum</i>	<i>H. conoideum</i>	<i>E. recurvatum</i>
<i>F. magna</i>	536/536 (100%) G: 0/536 (0%)	517/539 (95,92%) G: 5/539 (0%)	406/439 (92,48%) G: 5/439 (1%)	415/437 (94,97%) G: 1/437 (0%)	416/437 (95,19%) G: 1/437 (0,23%)
<i>F. hepatica</i>	-	537/537 (100%) G: 0/537 (0%)	413/441 (93,65%) G: 4/441 (0%)	457/492 (92,89%) G: 7/492 (1%)	458/492 (93,09%) G: 7/492 (1,42%)
<i>E. revol.</i>	-	-	603/603 (100%) G: 0/603 (0%)	575/611 (94,11%) G: 11/611 (1%)	574/612 (93,79%) G: 13/612 (2,12%)
<i>H. con.</i>	-	-	-	608/608 (100%) G: 0/608 (0%)	604/608 (99,34%) G: 0/608 (0%)
<i>E. recur.</i>	-	-	-	-	608/608 (100%) G: 0/608 (0%)

G = Gaps. *E. revol.* = *E. revolutum*. *H. con.* = *H. conoideum*. *E. recur.* = *E. recurvatum*.

3.4.5.2. Alignments der Positivkontrollen

Mittels der globalen Alignments mit EMBOSS bzw. den lokalen Alignments mit BLAST konnten alle Positivkontrollen bis auf die vermutlich 248 bp-große Bande von *F. hepatica* (FASC_f/FASC_r) den entsprechenden Digenea zugeordnet werden (**Tab. 30-32**).

Tab. 30

Ergebnisse der globalen Alignments (EMBOSS) mit TremF/TremR amplifizierter und sequenzierter Positivkontrollen

Positivkontrolle	<i>F. magna</i>	<i>F. hepatica</i>	<i>S. subtriquetrus</i>
<i>F. magna</i>	305/305 (100%) ^{a)} Gaps: 0/305 (0%)	303/305 (99,34%) Gaps: 0/305 (0%)	287/306 (93,79%) Gaps: 2/306 (0,65%)
<i>F. hepatica</i>	353/356 (99,16%) Gaps: 0/356 (0%)	356/356 (100%) ^{a)} Gaps: 0/356 (0%)	335/357 (93,84%) Gaps: 2/357 (0,6%)
<i>Paramphistomum</i> sp.	365/385 (94,81%) Gaps: 0/385 (0%)	366/385 (95,1%) Gaps: 0/385 (0%)	378/386 (97,93%) ^{a)} Gaps: 2/386 (0,52%)
T3 (<i>F. magna</i>)	297/297 (100%) ^{a)} Gaps: 0/297 (0%)	294/297 (99,0%) Gaps: 0/297 (0,0%)	283/298 (94,97%) Gaps: 2/298 (0,67%)

^{a)} = die den jeweiligen Positivkontrollen zugeordneten GenBank-Sequenzen.

Tab. 31

Ergebnisse der globalen Alignments (EMBOSS) mit MagnaF/MagnaR amplifizierter und sequenzierter Positivkontrollen.

Positivkontrolle	<i>F. magna</i>	<i>F. hepatica</i>
<i>F. magna</i>	342/342 (100%) ^{a)} Gaps: 0/342 (0%)	334/343 (97,38%) Gaps: 1/343 (0,29%)
M3 (<i>F. magna</i>)	474/474 (100%) ^{a)} Gaps: 0/474 (0%)	455/475 (95,79%) Gaps: 1/475 (0,21%)

^{a)} = die den jeweiligen Positivkontrollen zugeordneten GenBank-Sequenzen.

Tab. 32

Ergebnisse der lokalen Alignments (BLAST) der mit FASC_f/FASC_r amplifizierten und sequenzierten Probenbanden von *F. hepatica*

Positivkontrolle	BLAST-Ergebnis
<i>F. hepatica</i> 124 bp-Bande	108/116 (93,10%), Gaps = 3/116 (2,59%) <i>F. hepatica</i> , Genomic repeat sequence 1 (Genbanknr.: U11819.1) 105/116 (90,52%), Gaps = 3/116 (2,59%) <i>F. hepatica</i> , Genomic repeat sequence 2 (Genbanknr.: U11818.1)
<i>F. hepatica</i> 248 bp-Bande	Keine signifikante Ähnlichkeit gefunden.

3.4.5.3. Auswertung der Probensequenzen

3.4.5.3.1. Globale Alignments mittels EMBOSS

Die Probensequenzen wiesen zu den GenBank-Referenzgruppen durchschnittliche Übereinstimmungswerte von $M = 92,27$, $SD = 4,8$ (Probennr. 160/Paramphistomoidea) bis zu $M = 99,67$, $SD = 0,6$ (Probennr. 166/Plagiorchiida) auf. Die Probennr. 18, 124, 153, 154, 157, 160 und 164 enthielten jeweils 1-2 Sequenzierfehler, weshalb die maximal möglichen Übereinstimmungswerte bezogen auf die Sequenzlängen berechnet wurden (**Tab. 33**).

Probennr. 26 wies eine 100% Übereinstimmung (202/202 bp) mit *Apharyngostrigea pipientis* (FAUST 1918) auf. Probennr. 129 zeigte eine 100% Übereinstimmung (385/385 bp) mit *F. hepatica*. Probennr. 166 war zu 100% ident (102/102 bp) mit den GenBank-Sequenzen von *Koseiria xishaense* GU & SHEN 1983 und *Tetracerasta*

blepta WATSON 1984. Die maximal erreichbare Amplikonlänge mit dem Primerpaar TremF/TremR betrug etwa 450 bp.

Tab. 33

Durchschnittliche Übereinstimmungswerte der globalen Alignments der TremF/TremR-Probensequenzen mit den GenBank-Kontrollen (in %). Die maximal erreichbare Amplikonlänge mit TremF/TremR beträgt ca. 450 bp.

Probennr.	Pronoceph.		Paramph.		Echinostom.		Strigeida		Plagiorchiida		SL	N	Max
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD			
4	92,10	0,8	97,82	1,6	93,25	0,5	91,96	0,5	93,25	0,2	305	0	100
Gaps	2,27	1,1	0,22	0,4	0,65	0,0	1,09	0,4	1,31	0,0			
7	91,19	2,1	96,67	1,9	90,94	0,8	90,69	0,9	93,49	0,4	260	0	100
Gaps	3,63	3,0	0,26	0,4	3,77	0,0	3,77	0,7	1,53	0,0			
14	91,24	0,4	97,56	2,2	93,43	0,7	92,70	0,8	94,29	0,2	273	0	100
Gaps	0,36	0,0	0,24	0,4	0,73	0,0	0,73	0,7	1,46	0,0			
15	91,24	0,5	91,71	0,5	98,12	0,7	94,08	1,7	94,81	0,4	231	0	100
Gaps	2,12	0,0	0,84	1,5	0,00	0,0	0,00	0,0	0,43	0,7			
18	94,64	0,6	94,14	1,5	94,64	0,6	98,32	0,3	95,64	0,3	199	2	98,99
Gaps	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0			
26	96,20	0,6	95,71	1,4	96,70	0,6	99,50	0,5	97,69	0,8	202	0	100
Gaps	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0			
33	94,89	0,8	95,56	0,4	94,44	1,0	99,33	0,0	95,33	1,2	105	0	100
Gaps	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0			
48	91,44	0,5	96,69	2,5	91,44	0,9	91,89	0,9	93,25	0,5	221	0	100
Gaps	1,35	0,0	0,30	0,5	0,90	0,0	0,90	0,9	1,80	0,0			
124	96,71	0,7	95,74	0,3	98,64	0,7	96,32	0,3	97,87	0,9	172	1	99,42
Gaps	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0			
129	90,91	0,4	94,03	0,5	99,22	0,8	95,58	0,3	94,89	0,5	385	0	100
Gaps	2,86	0,0	0,17	0,3	0,00	0,0	0,00	0,0	0,35	0,6			
132	89,73	0,5	90,23	0,6	97,90	0,7	94,17	1,7	93,85	0,7	206	0	100
Gaps	2,37	0,0	0,94	1,6	0,00	0,0	0,00	0,0	0,49	0,8			
135	98,04	0,8	99,02	0,4	96,08	1,1	94,85	0,0	97,30	0,8	136	0	100
Gaps	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0			
136	97,16	0,9	98,19	0,4	95,09	1,2	93,80	0,0	96,38	0,9	129	0	100
Gaps	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0			
137	92,53	0,3	97,83	1,6	93,29	0,5	91,99	0,5	93,51	0,3	307	0	100
Gaps	0,97	0,0	0,22	0,4	0,65	0,0	0,65	0,6	1,30	0,0			

Fortsetzung

Probennr.	Pronoceph.		Paramph.		Echinostom.		Strigeida		Plagiorchiida		SL	N	Max
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD			
143	90,78	0,7	97,86	1,7	93,68	0,5	92,47	0,5	93,48	0,2	326	0	100
Gaps	2,12	1,0	0,20	0,4	0,61	0,0	1,02	0,4	1,22	0,0			
153	96,41	1,1	97,71	0,6	97,06	1,0	98,04	0,0	98,69	0,6	102	1	99,02
Gaps	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0			
154	92,56	1,7	92,94	2,7	95,26	0,3	98,62	0,8	96,02	0,3	218	1	99,54
Gaps	2,36	2,0	1,18	2,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,31	0,3			
157	88,84	1,3	95,51	3,0	89,78	1,1	90,89	1,1	91,59	0,3	185	2	98,92
Gaps	3,71	1,8	0,36	0,6	1,08	0,0	1,78	0,6	2,15	0,0			
160	81,47	2,4	92,27	4,8	84,94	0,6	85,67	1,9	86,26	0,7	103	2	98,06
Gaps	6,57	3,1	0,64	1,1	1,92	0,0	3,18	1,1	3,83	0,0			
164	70,84	4,1	92,65	4,9	78,18	0,0	79,04	2,8	81,90	2,2	54	1	98,15
Gaps	12,17	5,6	1,21	2,1	3,64	0,0	5,97	2,0	7,23	0,2			
166	97,39	1,1	98,69	0,6	98,04	1,0	99,02	0,0	99,67	0,6	102	0	100
Gaps	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0			

M = durchschnittliche Übereinstimmungswerte. SD = Standardabweichung. Pronoceph. = Pronocephaloidea. Paramph. = Paramphistomoidea. Echinostom. = Echinostomatoidea. SL = Länge der Probensequenzen. N = Anzahl der Sequenzierfehler in den Probensequenzen. Max = Maximal erreichbare Übereinstimmungswerte mit Berücksichtigung der Sequenzierfehler in den Probensequenzen.

Die vier MagnaF/MagnaR-Probensequenzen wiesen maximale Sequenzidentitäten von 86,47% (Probennr. 129/*F. hepatica*) bis 100% (Probennr. 3U und 4/*F. magna*) auf. Die Sequenzen der Probennr. 4 und 129 enthielten jeweils 6-7 Sequenzierfehler, weshalb wieder die maximal möglichen Übereinstimmungswerte bezogen auf die Sequenzlängen berechnet wurden (**Tab. 34**).

Tab. 34

Übereinstimmungswerte der globalen Alignments der MagnaF/MagnaR-Probensequenzen mit den GenBank-Kontrollen (in %). Die maximal erreichbare Amplikonlänge mit MagnaF/MagnaR beträgt ca. 600 bp.

Probennr.	<i>F. magna</i>	<i>F. hepatica</i>	<i>E. revolutum</i>	<i>H. conoideum</i>	<i>E. recurvatum</i>	SL	N	Max
Probe 3U	100,00	97,43	92,29	94,57	94,86	349	0	100
Gaps	0,00	0,29	0,29	0,29	0,29			

Fortsetzung

Probennr.	<i>F. magna</i>	<i>F. hepatica</i>	<i>E. revolutum</i>	<i>H. conoideum</i>	<i>E. recurvatum</i>	SL	N	Max
Probe 4	94,27	90,79	85,09	88,16	88,60	225	7	96,89
Gaps	0,88	1,32	1,32	1,32	1,32			
Probe 26	100,00	96,97	92,42	94,55	94,85	329	0	100
Gaps	0,00	0,30	0,30	0,30	0,30			
Probe 129	84,12	86,47	80,59	83,53	84,12	167	6	96,41
Gaps	2,35	1,76	1,76	1,76	1,76			

SL = Länge der Probensequenzen. N = Anzahl der Sequenzierfehler in den Probensequenzen. Max = Maximal erreichbare Übereinstimmungswerte mit Berücksichtigung der Sequenzierfehler in den Probensequenzen.

3.4.5.3.2. SNP-Vergleich

Im Fall der TremF/TremR-Probensequenzen wurden jeweils 2-15 SNP-Positionen mit den GenBank-Referenzsequenzen verglichen. Die Probennr. 33, 135 und 136 wiesen mit jeweils zwei Überfamilien bzw. Ordnungen maximale Übereinstimmungswerte auf (**Tab. 35**).

Tab. 35

Übereinstimmungswerte der SNP-Vergleiche der TremF/TremR-Probensequenzen mit den GenBank-Referenzsequenzen.

Probe	Pron.	Para.	Echino.	Strigeida	Plagiorchiida
4	10/15 (67%)	15/15 (100%)	7/15 (47%)	6/15 (40%)	11/15 (73%)
7	10/15 (67%)	15/15 (100%)	7/15 (47%)	6/15 (40%)	11/15 (73%)
14	10/15 (67%)	15/15 (100%)	7/15 (47%)	6/15 (40%)	11/15 (73%)
15	5/14 (36%)	7/14 (50%)	13/14 (93%)	7/14 (50%)	12/14 (86%)
18	2/4 (50%)	2/4 (50%)	1/4 (25%)	4/4 (100%)	3/4 (75%)
26	3/9 (33%)	5/9 (56%)	4/9 (44%)	9/9 (100%)	7/9 (78%)
33	1/2 (50%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)
48	7/12 (58%)	12/12 (100%)	5/12 (42%)	6/12 (50%)	9/12 (75%)
124	2/6 (33%)	2/6 (33%)	6/6 (100%)	2/6 (33%)	5/6 (83%)
129	5/15 (33%)	7/15 (47%)	15/15 (100%)	8/15 (53%)	11/15 (73%)
132	3/12 (25%)	5/12 (42%)	11/12 (92%)	7/12 (58%)	10/12 (83%)
135	7/7 (100%)	7/7 (100%)	4/7 (57%)	1/7 (14%)	5/7 (71%)
136	7/7 (100%)	7/7 (100%)	4/7 (57%)	1/7 (14%)	5/7 (71%)
137	10/15 (67%)	15/15 (100%)	7/15 (47%)	6/15 (40%)	11/15 (73%)

Fortsetzung

Probe	Pron.	Para.	Echino.	Strigeida	Plagiorchiida
143	10/15 (67%)	15/15 (100%)	7/15 (47%)	6/15 (40%)	11/15 (73%)
153	2/3 (67%)	2/3 (67%)	2/3 (67%)	2/3 (67%)	3/3 (100%)
154	3/12 (25%)	5/12 (42%)	5/12 (42%)	12/12 (100%)	8/12 (67%)
157	6/11 (55%)	11/11 (100%)	4/11 (36%)	6/11 55%)	8/11 (73%)
160	3/8 (38%)	8/8 (100%)	3/8 (38%)	5/8 (63%)	6/8 (75%)
164	2/7 (29%)	7/7 (100%)	3/7 (43%)	4/7 (57%)	5/7 (71%)
166	2/3 (67%)	2/3 (67%)	2/3 (67%)	2/3 (67%)	3/3 (100%)

Pron. = Pronocephaloidea. Para. = Paramphistomoidea. Echino. = Echinostomatoidea.

Die MagnaF/MagnaR-Probensequenzen wurden jeweils mit 8-10 SNP-Positionen verglichen. Alle Sequenzen konnten einer Art zugeordnet werden (**Tab. 36**).

Tab. 36

Übereinstimmungswerte der SNP-Vergleiche der MagnaF/Magna-Probensequenzen mit den GenBank-Referenzsequenzen von F. magna und F. hepatica.

Probe	<i>F. magna</i>	<i>F. hepatica</i>
3U	9/9 (100%)	0/9 (0%)
4	8/8 (100%)	0/8 (0%)
26	10/10 (100%)	0/10 (0%)
129	2/8 (25%)	6/8 (75%)

3.4.5.3.3. Vergleich der EMBOSS und SNP-Analysen zur molekularbiologischen Endbestimmung

Die jeweiligen Überfamilien bzw. Ordnungen mit maximaler EMBOSS-Übereinstimmung und maximaler SNP-Übereinstimmung waren bei allen TremF/TremR- (**Tab. 37**) und MagnaF/MagnaR-Probensequenzen (**Tab. 38**) ident. Anhand dieser Ergebnisse wurde die molekularbiologische Endbestimmung vorgenommen. Die mit TremF/TremR amplifizierten und sequenzierten Probensequenzen konnten 11x den Paramphistomoidea, 4x den Echinostomatoidea, 4x den Strigeida und 2x den Plagiorchiida zugeordnet werden. Die Überfamilie Pronocephaloidea wurde nicht gefunden (**Tab. 37**).

Von den vier mit MagnaF/MagnaR amplifizierten und sequenzierten Proben konnten drei Proben *F. magna* und eine Probe *F. hepatica* zugeordnet werden (**Tab.**

38). Die sieben mit MagnaF/MagnaR nicht sequenzierbaren Probenr. 7, 18, 33, 50, 86, 132 und 164, welche in der PCR mit MagnaF/MagnaR ein positives, und mit FASC_f/FASC_r ein negatives Testergebnis ergaben, wurden als *F. magna*-positiv gewertet.

Tab. 37

Zusammenfassung der maximalen Übereinstimmungen der TremF/TremR-Probensequenzen mit den GenBank-Referenzsequenzen mittels EMBOSS und SNP-Vergleich, sowie der daraus erfolgten Endbestimmung.

Probenr.	Maximale EMBOSS - Übereinstimmung	Maximale SNP- Übereinstimmung	Molekularbiologische Endbestimmung
4	Paramphistomoidea	Paramphistomoidea	Paramphistomoidea
7	Paramphistomoidea	Paramphistomoidea	Paramphistomoidea
14	Paramphistomoidea	Paramphistomoidea	Paramphistomoidea
15	Echinostomatoidea	Echinostomatoidea	Echinostomatoidea
18	Strigeida	Strigeida	Strigeida
26	Strigeida	Strigeida	Strigeida
33	Strigeida	Plagiorchiida, Strigeida	Strigeida
48	Paramphistomoidea	Paramphistomoidea	Paramphistomoidea
124	Echinostomatoidea	Echinostomatoidea	Echinostomatoidea
129	Echinostomatoidea	Echinostomatoidea	Echinostomatoidea
132	Echinostomatoidea	Echinostomatoidea	Echinostomatoidea
135	Paramphistomoidea	Paramphistomoidea, Pronocephaloidea	Paramphistomoidea
136	Paramphistomoidea	Paramphistomoidea, Pronocephaloidea	Paramphistomoidea
137	Paramphistomoidea	Paramphistomoidea	Paramphistomoidea
143	Paramphistomoidea	Paramphistomoidea	Paramphistomoidea
153	Plagiorchiida	Plagiorchiida	Plagiorchiida
154	Strigeida	Strigeida	Strigeida
157	Paramphistomoidea	Paramphistomoidea	Paramphistomoidea
160	Paramphistomoidea	Paramphistomoidea	Paramphistomoidea
164	Paramphistomoidea	Paramphistomoidea	Paramphistomoidea
166	Plagiorchiida	Plagiorchiida	Plagiorchiida

Tab. 38

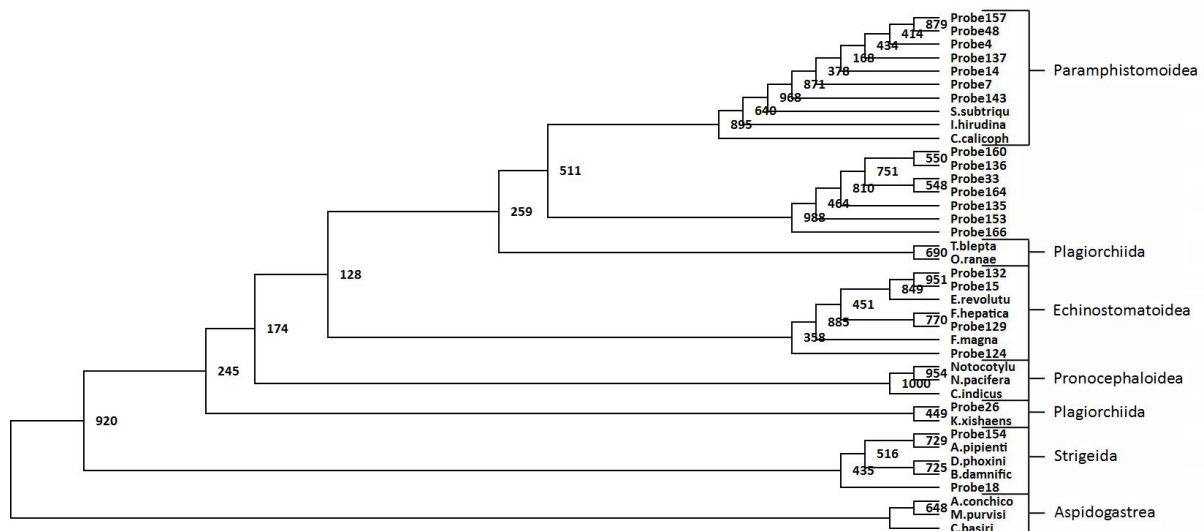
Zusammenfassung der maximalen Übereinstimmungen der MagnaF/MagnaR-Probensequenzen mit den GenBank-Referenzsequenzen mittels EMBOSS und SNP-Vergleich, sowie der daraus erfolgten Endbestimmung.

Probennr.	Maximale EMBOSS - Übereinstimmung	Maximale SNP- Übereinstimmung	Molekularbiologische Endbestimmung
3U	<i>F. magna</i>	<i>F. magna</i>	<i>F. magna</i>
4	<i>F. magna</i>	<i>F. magna</i>	<i>F. magna</i>
26	<i>F. magna</i>	<i>F. magna</i>	<i>F. magna</i>
129	<i>F. hepatica</i>	<i>F. hepatica</i>	<i>F. hepatica</i>

3.4.5.3.4. Cluster-Analyse

3.4.5.3.4.1. TremF/TremR-Probensequenzen

Die mittels EMBOSS und SNP-Analyse den Echinostomatoidea zugeordneten Proben (**Tab. 37**) zeigten auch in der Cluster-Analyse (**Abb. 28**) eine Anordnung im Bereich der entsprechenden GenBank-Kontrollen. Probennr. 129 konnte mit einem Bootstrap-Wert von 77,0% *F. hepatica* zugeordnet werden. Die Probennr. 15 und 132 zeigten eine Gruppierung mit *E. revolutum*. Da diese beiden Proben mit einem Bootstrap-Wert von 95,1% aneinander geclustert waren, könnte es sich um die gleiche Art handeln. Probennr. 124 befand sich in der Nähe des Echinostomatoidea-Clusters, konnte aber keine relevante Clusterung zu einer der Kontrollarten aufzeigen. Die Probennr. 33, 135, 136, 153, 160, 164 und 166 bildeten einen eigenständigen Cluster und konnten somit nicht den GenBank-Kontrollen zugeordnet werden. Die Probennr. 4, 7, 14, 48, 137, 143 und 157 befanden sich innerhalb des Paramphistomoidea-Clusters. Diese Proben wurden per EMBOSS und SNP-Analyse ebenfalls der Überfamilie Paramphistomoidea zugeordnet (**Tab. 37**). Die als Strigeida bestimmte Probennr. 26 (**Tab. 37**) clusterte mit *K. xishaense* (Bootstrap-Wert: 44,9%). Probennr. 154 wies mit einem Bootstrap-Wert von 72,9% eine Clusterung mit *A. pipientis* auf. Probennr. 18 war ebenfalls in der Nähe des Strigeida-Clusters angeordnet.

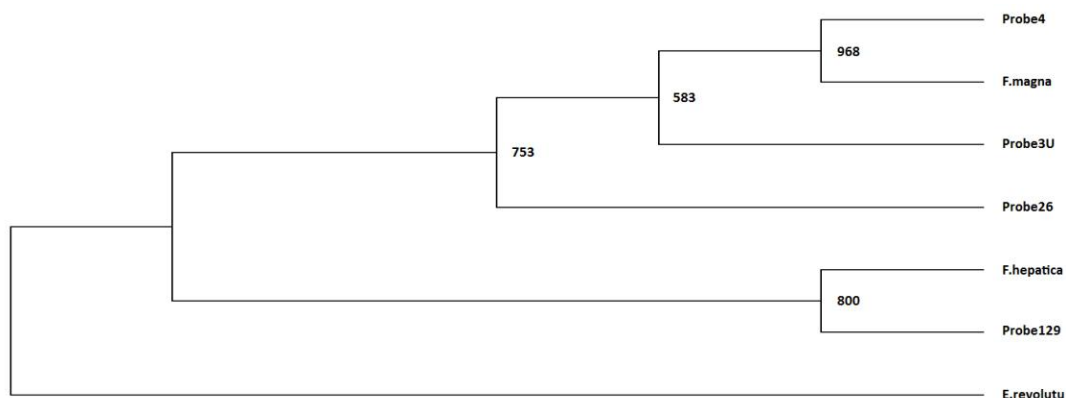
**Abb. 28**

Cluster-Analyse der TremF/TremR-Probensequenzen und der entsprechenden GenBank-Referenzsequenzen.

S.subtriqu = *S. subtriquetrus*; I.hirudina = *I. hirudinaceus*; C.calicoph = *C. calicophorum*; E.revolutu = *E. revolutum*; Notocotylu = *Notocotylus* sp.; K.xishaens = *K. xishaense*; A.pipienti = *A. pipientis*; B.damnific = *B. damnificus*; A.conchico = *A. conchicola*. Die Zuordnung zu Überfamilien/Ordnungen wurde nachträglich eingezeichnet.

3.4.5.3.4.2. MagnaF/MagnaR-Probensequenzen

Probenr. 129 konnte mit einem Bootstrap-Wert von 80,0% *F. hepatica* zugeordnet werden. Die Probenr. 4, 26 und 3U befanden sich im Bereich von *F. magna* (**Abb. 29**). Diese Cluster-Anordnungen stimmten mit den Ergebnissen der EMBOSS- und SNP-Analysen überein (**Tab. 38**).

**Abb. 29**

Cluster-Analyse der MagnaF/MagnaR-Probensequenzen und der entsprechenden GenBank-Referenzsequenzen.

E.revolutu = *E. revolutum*

3.5. Vergleich der mikroskopischen und molekularbiologischen Bestimmungen

Zehn der 11 mikroskopisch detektierten und molekularbiologisch untersuchten Paramphistomoidea-Infektionen konnten molekularbiologisch durch Sequenzierung näher bestimmt werden. Bei Probennr. 10 schlug die Sequenzierung fehl, diese Probe wurde aufgrund der mikroskopischen Bestimmungen als Paramphistomoidea-positiv gewertet. In 8 von 10 Fällen wurde molekularbiologisch eine Einzelinfektionen von Vertretern der Überfamilie Paramphistomoidea (Probennr. 14, 48, 135, 136, 137, 143, 157, 160) festgestellt. In zwei Fällen (Probennr. 4 und 7) wurde eine Mischinfektion von Paramphistomoidea und *F. magna* detektiert.

Fünf der neun mikroskopisch als Echinostomatoidea-Einzelinfektionen bestimmten Verdachtsfälle konnten nicht per PCR amplifiziert und somit molekularbiologisch nicht näher bestimmt werden (Probennr. 24, 82, 85, 120 und 127). Diese Proben wurden aufgrund der mikroskopischen Untersuchungen als Echinostomatoidea-positiv gewertet. Die vier anderen Proben konnten per PCR überprüft und nachfolgend sequenziert werden. Zwei der Proben wurden als Einzelinfektion mit Echinostomatoidea bestätigt (Probennr. 15, 124), wobei hierbei *F. magna* und *F. hepatica* ausgeschlossen werden konnten. Bei einer Probe wurde eine Mischinfektion von *F. magna* und Strigeida festgestellt (Probennr. 26). Bei einer Infektion handelte es sich um eine Einzelinfektion mit *F. hepatica* (Probennr. 129).

Eine Probe, bei welcher mikroskopisch eine Mischinfektion von Paramphistomoidea und Echinostomatoidea bestimmt wurde, konnte molekularbiologisch als Mischinfektion von *F. magna* und Strigeida identifiziert werden (Probennr. 33). Eine Mischinfektion von Paramphistomoidea und unbestimmten Helminthen wurde molekularbiologisch als Mischinfektion von Paramphistomoidea und *F. magna* identifiziert (Probennr. 164). Bei zwei mikroskopisch als Paramphistomoidea und Echinostomatoidea bestimmten Mischinfektionen konnte molekularbiologisch nur eine Infektion von *F. magna* bestimmt werden (Probennr. 50 und 86). Die Sequenzierung mit dem TremF/TremR-Primerpaar schlug fehl. Aufgrund der

mikroskopischen Ergebnisse wurden diese beiden Infektionen als Mischinfektionen von Paramphistomoidea und *F. magna* gewertet.

Die zwei mikroskopisch nicht identifizierbaren Redienfunde konnten durch Sequenzierung als Vertreter der Ordnung Plagiorchiida bestimmt werden (Probenr. 153, 166). Ein Sporozystenfund konnte als Vertreter der Ordnung Strigeida bestimmt werden (Probenr. 154), bei einer Sporozysteninfektion (Probenr. 18) handelte es sich um eine Co-Infektion von Strigeida und *F. magna*. Bei den beiden unbestimmten Helminthenfunden konnte eine Infektion als Digenea-negativ (Probenr. 147), und eine Infektion als Einzelinfektion von *F. magna* (Probenr. 132) bestimmt werden.

Zusammenfassend konnten 12 der 24 (50%) molekularbiologisch bestimmten Digenea-Funde in ihrer mikroskopischen Identifikation bestätigt werden. Acht Proben konnten molekularbiologisch nicht vollständig geklärt werden (33,33%), bei ihnen wurden die mikroskopischen Bestimmungen zur Endbestimmung miteinbezogen. Bei vier Proben (16,67%) stimmten die molekularbiologischen Ergebnisse nicht vollständig mit den mikroskopischen Ergebnissen überein.

3.6. Kombinierte Ergebnisse von Mikroskopie und Molekularbiologie

3.6.1. Digenea allgemein

3.6.1.1. Prävalenz digener Trematoden in *Galba truncatula*

In den insgesamt 3.871 untersuchten *G. truncatula* wurden 96 Trematodeninfektionen detektiert (Prävalenz 2,48%). Acht dieser Tiere wiesen eine Mischinfektion von *F. magna* und Paramphistomoidea oder Strigeida auf (0,21%). Mit insgesamt 74 Funden und einer Prävalenz von 1,91% stellten Vertreter der Überfamilie Paramphistomoidea die am häufigsten detektierten Trematoden dar. In 18 Fällen der infizierten Schnecken handelte es sich um Vertreter der Überfamilie Echinostomatoidea (0,46%). Es wurden zwei mit Plagiorchiida (0,05%) und vier mit Strigeida (0,10%) infizierte Schnecken gefunden. Sechs Trematodeninfektionen der

Stichproben konnten nicht näher bestimmt werden. Eine Infektion mit *F. magna* oder *F. hepatica* konnte jedoch ausgeschlossen werden (**Abb. 30**).

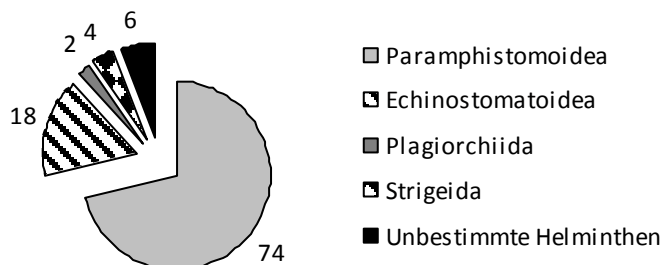


Abb. 30

Anzahl der Funde digener Trematoden in *G. truncatula*.

3.6.1.2. Standortverteilung infizierter *Galba truncatula*

Standort 2 wies mit 4,38% infizierten Schnecken die höchste Infektionslast auf. Bei insgesamt 59 der 1.347 von Standort 2 (Märchenteich) untersuchten *G. truncatula* lag eine Infektion mit Trematoden vor. Darauf folgten die sonstigen Standorte Haslau/Regelsbrunn/Fischamend mit 13 (3,04%) und Standort 1 (Entenhausen) mit 24 (1,22%) infizierten Schnecken. An Standort 3 wurden keine infizierten Schnecken gefunden (**Abb. 31**).

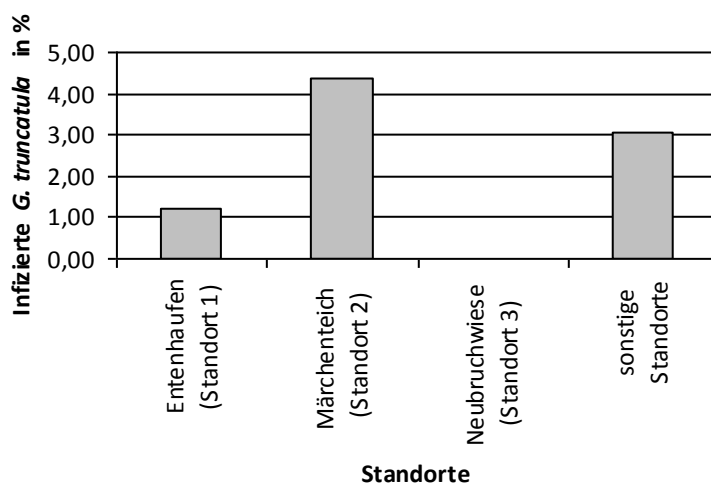


Abb. 31

Standortverteilung mit digenen Trematoden infizierter *G. truncatula*.

Die Standortverteilung einzelner Überfamilien und Ordnungen ist in **Abb. 32** dargestellt. An Standort 1 wiesen 16 *G. truncatula* eine Infektion mit Paramphistomoidea, 10 *G. truncatula* eine Infektion mit Echinostomatoidea, und eine Schnecke eine Infektion mit Plagiorchiida auf. Darunter befanden sich drei Mischinfektionen von Paramphistomoidea und *F. magna*. An Standort 2 wurden 47 mit Paramphistomoidea infizierte Schnecken gefunden, sechs Schnecken mit Echinostomatoidea-Infektionen, sechs nicht näher bestimmte Trematodeninfektionen von Stichproben, drei Infektionen mit Strigeida und eine Infektion mit Plagiorchiida. Bei zwei Infektionen handelte es sich um Mischinfektionen von Paramphistomoidea und *F. magna*, bei zwei Infektionen um Mischinfektionen von Strigeida und *F. magna*. Elf Schnecken der sonstigen Standorte wiesen Infektionen mit Paramphistomoidea auf, zwei Schnecken mit Echinostomatoidea und eine Schnecke mit Strigeida. Darunter befand sich eine Mischinfektion von Strigeida und *F. magna*.

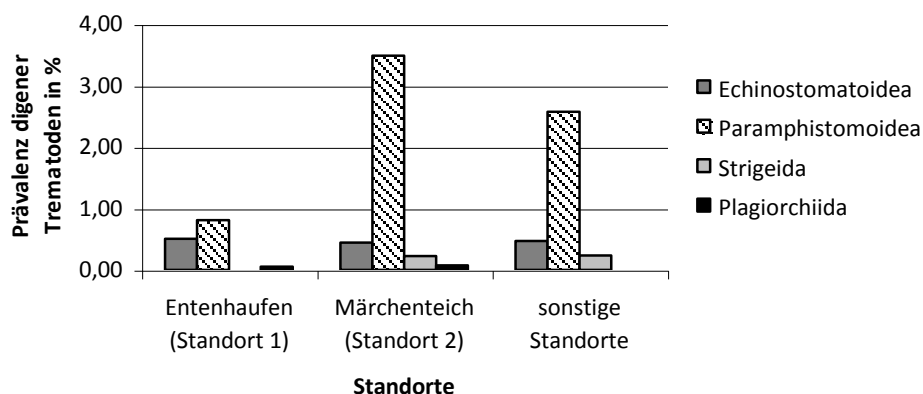


Abb. 32

Standortverteilung einzelner Überfamilien und Ordnungen.

3.6.1.3. Saisonalität des Befalls

Wie in **Abb. 33** und **Tab. 39** ersichtlich, waren deutliche saisonale Unterschiede in der Häufigkeit des Trematodenbefalls von *G. truncatula* sichtbar. Im April und Mai wurden keine infizierten Schnecken gefunden. Im Juni stieg die Infektionsrate auf 0,99% (n = 302) an, der Höhepunkt der Infektionsrate wurde mit 10,11% (n = 524) infizierten Schnecken im Juli erreicht. Im August fiel die Infektionsrate auf 1,43% (n = 1262) ab, stieg im weiteren Verlauf mit 2,41% (n = 831) im September aber wieder

leicht an. Unter den 20 Infektionen im September befanden sich vier nicht näher bestimmte Stichprobenfunde. Im Oktober sank mit zwei infizierten Schnecken die Infektionsrate auf 0,33% (n = 598). Diese beiden Infektionen wurden mittels der molekulargenetischen Untersuchung der Stichproben festgestellt und konnten nicht näher bestimmt werden.

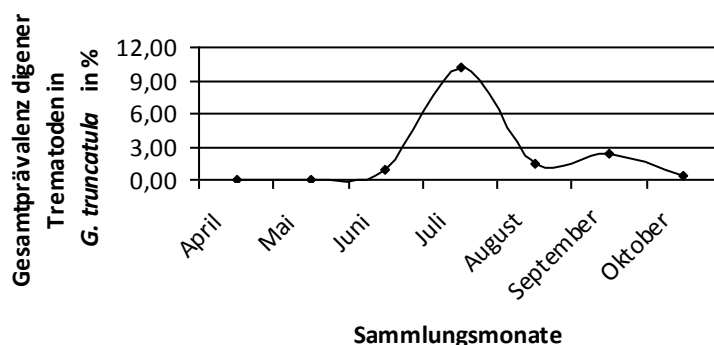


Abb. 33

Saisonalität der Trematoden-Gesamtinfektionsrate von G. truncatula.

In Hinsicht auf die untersuchten Ordnungen und Überfamilien wiesen die Paramphistomoidea, die Echinostomatoidea und die Strigeida ihren saisonalen Prävalenzhöhepunkt im Juli auf. In diesem Monat waren 9,16% (n = 524) der untersuchten Schnecken mit Paramphistomoidea, 1,53% mit Echinostomatoidea und 0,57% mit Strigeida infiziert. Die Ordnung Plagiorchiida wurde mit einer Prävalenz von 0,24% (n = 831) ausschließlich im September gefunden (**Tab. 39**).

Tab. 39

Saisonale Verteilung der Infektionsraten der untersuchten Ordnungen und Überfamilien

	April		Mai		Juni		Juli		August		September		Oktober	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Paramphistomoidea	0	0,00	0	0,00	1	0,33	48	9,16	14	1,11	11	1,32	0	0,00
Echinostomatoidea	0	0,00	0	0,00	2	0,66	8	1,53	5	0,40	3	0,36	0	0,00
Plagiorchiida	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	0,24	0	0,00
Strigeida	0	0,00	0	0,00	0	0,00	3	0,57	0	0,00	1	0,12	0	0,00
untersuchte Schnecken	89	-	265	-	302	-	524	-	1.262	-	831	-	598	-

Bei Schnecken mit einer Gehäusehöhe von >5 mm wurden mikroskopisch häufiger Infektionen mit Helminthen detektiert. Von den 90 mikroskopisch detektierten infizierten *G. truncatula* wiesen 39 Schnecken (43,3%) eine Schalenhöhe von ≤5 mm, und 51 (56,7%) eine Schalenhöhe von >5 mm auf.

Mittels der molekularbiologischen Untersuchungen konnten zusätzlich sieben infizierte Stichproben-Schnecken mit einer Schalenhöhe von ≤5 mm festgestellt werden (**Tab. 26**). Bei einer mikroskopisch detektierten Helmintheninfektion einer Schnecke von >5 mm konnten Trematoden hingegen ausgeschlossen werden (Probennr. 147). Somit verschob sich das Verhältnis der insgesamt 96 infizierten *G. truncatula* auf 46 mit einer Gehäusehöhe von ≤5 mm (47,9%) und 50 infizierte *G. truncatula* mit einer Gehäusehöhe von >5 mm (52,1%).

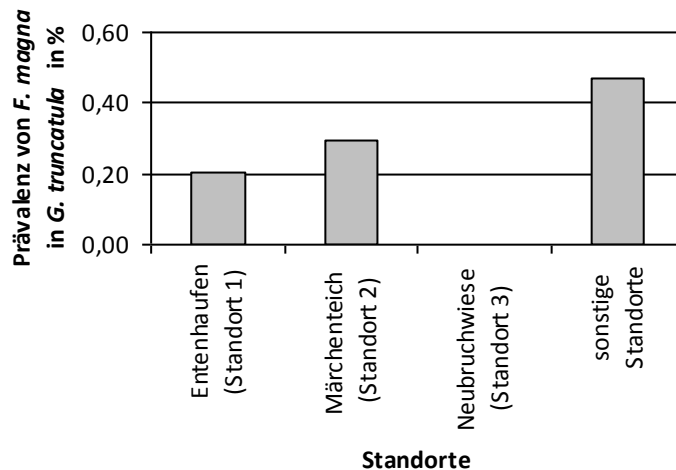
3.6.2. *Fascioloides magna*

3.6.2.1. Prävalenz von *Fascioloides magna* in *Galba truncatula*

Bei 10 der 18 Echinostomatoidea-Infektionen handelte es sich um Infektionen mit *F. magna* (Prävalenz 0,26%, n = 3.871). Eine Infektion konnte als Einzelinfektion mit *F. hepatica* (0,03%) identifiziert werden. Sieben der Echinostomatoidea-Infektionen konnten molekularbiologisch nicht näher bestimmt werden, wobei bei zwei dieser Infektionen *F. magna* und *F. hepatica* sicher ausgeschlossen werden konnten. Bei einer der 10 detektierten *F. magna*-Infektionen handelte es um eine Einzelinfektion. Im Fall der *F. magna*-Infektion der Stichprobe 3U konnte nicht näher bestimmt werden, ob es sich um eine Einzel- oder Co-Infektion handelte. In fünf Fällen lag eine Co-Infektion von Paramphistomoidea und *F. magna*, in drei Fällen eine Co-Infektion von Strigeida und *F. magna* vor.

3.6.2.2. Standortverteilung infizierter *Galba truncatula*

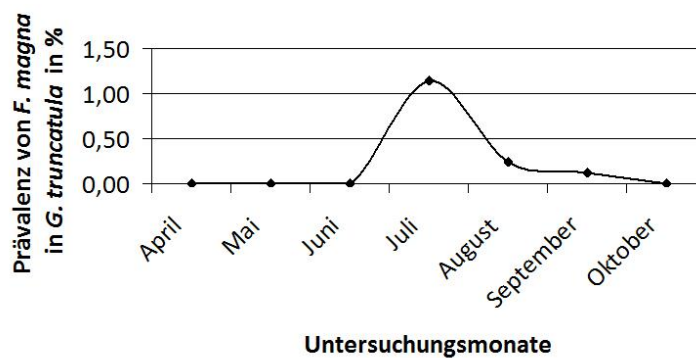
An den sonstigen Standorten Haslau, Regelsbrunn und Fischamend wurde mit 0,47% (n = 427) infizierten Schnecken die höchste Prävalenz von *F. magna* gefunden. Dies beinhaltete jeweils einen Fund in Regelsbrunn und Fischamend. Darauf folgte Standort 2 mit einer Prävalenz von 0,30% (n = 1.347) und Standort 1 mit 0,20% (n = 1.975). An Standort 3 wurde keine Infektion mit *F. magna* nachgewiesen (**Abb. 34**).

**Abb. 34**

Standortverteilung der mit *F. magna*-infizierten *G. truncatula*

3.6.2.3. Saisonalität des Befalls

Im April, Mai und Juni wurden keine mit *F. magna* infizierten Schnecken gefunden. Im Juli wiesen 1,15% (n = 524) der untersuchten *G. truncatula* eine Infektion mit *F. magna* auf. Die Infektionsrate fiel danach im August mit drei *F. magna*-Infektionen (0,24%, n = 1.262) und September mit einer *F. magna*-Infektion (0,12%, n = 831) ab. Im Oktober wurden keine Infektionen mit *F. magna* gefunden (**Abb. 35**).

**Abb. 35**

Saisonalität der *F. magna*-Infektionen

Drei der 10 (30,00%) mit *F. magna* infizierten Schnecken wiesen eine Gehäusehöhe von ≤ 5 mm auf, sieben *G. truncatula* (70,00%) wiesen eine Gehäusehöhe von > 5 mm auf.

4. Diskussion

4.1. Populationsdynamische Aspekte von *Galba truncatula*

4.1.1. Mengenmäßige Standortverteilung

Die Schwankungen der pro Standort gesammelten *G. truncatula* lagen, neben dem Vorhandensein von geeigneten Sammlungsufern, sowie der Zugänglichkeit zu diesen, vor allem an unterschiedlich geeigneten Lebensbedingungen für *G. truncatula*.

RECKENDORFER & SCHAEFER (2003) beschreiben in einer Studie an *G. truncatula* aus dem Gebiet Nationalpark Donau-Auen den bevorzugten Lebensraum der Schnecken als sandig-schlammige Habitats, welche periodisch überflutet sind, sowie dynamisch angebundene Fließgewässer. Besagte Beobachtungen konnten in dieser Diplomarbeit bestätigt werden. Besonders an Standort 1 (Entenhafen) boten mehrere Sammlungsinseln mit großflächigen, regelmäßig überfluteten sandig-schlammigen Ufern den Tieren ideale Lebensbedingungen, wie an der hohen Anzahl der gefundenen Tiere ersichtlich ist. Zudem wurde durch die flachen Flussufer, niedrige Vegetation und eine Fülle an verschiedenen Sammlungsinseln, welche zu keinem beobachteten Zeitpunkt vollständig überschwemmt waren, eine optimale Zugänglichkeit zu diesem Standort gewährleistet.

Der ursprünglich zur Beprobung ausgewählte Standort Märchenteich umfasste hingegen ein temporäres Habitat auf einer Wiese, welches keine direkte Anbindung an Fließgewässer aufwies. Die Verteilung von Schnecken der Familie Lymnaeidae innerhalb eines bestimmten Gebietes kann ungleichmäßig sein und Häufungen an sehr feuchten Stellen, wie beispielsweise flüssigkeitsgefüllten Gräben, aufweisen (KENDALL & PARFITT, 1975 [zit. in TORGERSON & CLAXTON, 1999]). Dennoch wurden bei mehreren durchgeführten Begehungen dieses Standorts keine Schnecken gefunden. Dichte Vegetation erschwerte zudem die Zugänglichkeit zu diesem Sammlungsplatz erheblich. Eine ähnliche Habitatsverteilung von *G. truncatula* im Untersuchungsbereich wurde auch in Studien von RECKENDORFER & SCHAEFER (2003), sowie SATTMANN & HÖRWEIG (2006) nachgewiesen, in welchen die Schnecken nur

vereinzelt in temporären Habitaten gefunden wurden. Aus diesen Gründen wurden nachfolgend Beprobungen der einfach zugänglichen Tierbodentraverse in der Nähe des ursprünglichen Untersuchungsgebietes durchgeführt. Da die Sammlungsflächen an diesem Standort vergleichsweise klein waren, könnte es sein, dass zumindest ein Teil der gefundenen Schnecken von stromaufwärts gelegenen Gebieten in Brückennähe ans Ufer geschwemmt wurde. Passiver Transport in Fließgewässern stellt den häufigsten Verbreitungsweg von *G. truncatula* dar, da die Tiere aktiv nur sehr kurze Distanzen wandern (ECKERT et al., 2008).

Die steinigen Sammlungsgebiete, sowie die sehr hohen Strömungsgeschwindigkeiten bei Hochwasser (RECKENDORFER, 2000) an Standort 3 boten suboptimale Lebensbedingungen für *G. truncatula* (BORAY, 1964, RECKENDORFER & SCHAEFER, 2003), was anhand der wenigen gefundenen Schnecken belegt wurde. Die meterhohe Vegetation des Ufergebietes erschwerte zudem nicht nur die Zugänglichkeit erheblich, sondern könnte auch die Schneekendichte negativ beeinflusst haben. Durch die dicht bewachsenen Ufer könnte es sein, dass an diesem Standort, verglichen mit den eher freigelegenen Sammlungsorten der anderen Standorte, weniger direkte Sonneneinstrahlung auf die Sammlungsplätze vorhanden war. Es ist bekannt, dass geringe Sonneneinstrahlung einen negativen Effekt auf das Vorkommen von *G. truncatula* hat, da dann die Algen, von denen sich *G. truncatula* unter anderem ernährt, nur unzureichend wachsen können (PETZOLD, 1989 [zit. in RAPSCH et al., 2008]).

4.1.2. Reproduktionszyklus

Die saisonale Größenverteilung der im Zeitraum April bis Oktober 2008 gesammelten Schnecken lässt auf einen 2-gipfeligen Reproduktionszyklus schließen. Die Spitzen des Reproduktionszyklus lagen dabei vermutlich im Frühjahr/Frühsummer und Spätsommer/Herbst. Ähnliche saisonale Größenverteilungen von *G. truncatula* im Gebiet der Donau-Auen wurden bereits in früheren Untersuchungen festgestellt (URSPRUNG, 2005 [zit. in SATTMANN & HÖRWEIG, 2006], SATTMANN & HÖRWEIG, 2006). Aufgrund des relativ kurzen Untersuchungszeitraumes von sieben Monaten können allerdings nur Tendenzen aufgezeigt werden. Zusätzlich ist anzumerken, dass möglicherweise unbewusst

bevorzugt die größten vorhandenen Schnecken aufgesammelt wurden, da diese bei Sammlungen per Hand naturgemäß leichter zu finden sind.

Ausgehend von der Frühjahrsgeneration konnte man im Zeitraum April bis August 2008 eine tendenzielle Zunahme des prozentualen Anteils von Schnecken der Größenklasse 2 ($>4\text{--}\leq 6\text{ mm}$ Gehäusehöhe) beobachten. Bei einem Größenwachstum von 1 mm pro Woche auf 20°C (GOLD, 1980 [zit. in VIGNOLES et al., 2003]) entspricht dies, mit Berücksichtigung der mittleren Monatstemperaturen, einem Alter von etwa einem bis zwei Monaten.

Da bereits im April Schnecken über 4 mm Schalenhöhe aufgesammelt werden konnten, fiel die erste Eiablage überwinternder Altschnecken im Jahr 2008 nicht in den Untersuchungszeitraum. Zudem waren im Untersuchungsmonat Mai bereits viele Schnecken der Größenklasse 3 ($>6\text{--}\leq 8\text{ mm}$ Gehäusehöhe) vorhanden, wobei es wahrscheinlich ist, dass es sich hierbei zumindest zum Teil auch um überwinterte Altschnecken gehandelt hat. Ein Indiz dafür könnte die teilweise erhebliche Schwankung der Anzahl an Tieren der Größenklasse 3 sein. Dies deutet darauf hin, dass viele Tiere dieser Größenklasse im Verlauf des Untersuchungszeitraumes verstarben, zumal ab August keine Schnecken der Größenklasse 4 ($>8\text{ mm}$ Gehäusehöhe) mehr gefunden wurden.

Schnecken der Größenklasse 2 sind bereits als geschlechtsreif zu erachten (SMITH, 1981). Die Tiere dieser Größenklasse, welche in den ersten Untersuchungsmonaten großteils von der steigenden Anzahl der heranwachsenden Frühjahrsgeneration dargestellt wurden, waren infolge für den zweiten Reproduktionsgipfel verantwortlich.

Die Herbstgeneration vom Vorjahr, welche im Frühjahr von überwinterten Altschnecken der Größenklasse 4 und vermutlich teilweise von Tieren der Größenklasse 3 dargestellt wurde, nahm tendenziell von April bis Oktober ab. Besonders deutlich wird dies an Größenklasse 4 ersichtlich, welche – bis auf ein einzelnes Tier im Juli – ausschließlich im April und Mai gefunden wurde. Dies wird auch anhand der durchschnittlichen Schalenhöhe belegt, welche von April bis Oktober tendenziell abfiel (von 7,0 mm auf 2,9 mm).

Der zweite Gipfel der Eiablage im Jahr 2008 fand vermutlich im Spätsommer/Herbst statt. Zu diesem Zeitpunkt war bereits der Großteil der Frühjahrsgeneration

geschlechtsreif. Besonders in den Monaten August und Oktober war der prozentuale Anteil von Schnecken der Größenklasse 1 (≤ 4 mm Gehäusehöhe) sehr hoch, was darauf schließen lässt, dass in diesem Zeitraum viele Jungschnecken schlüpfen.

4.1.3. Anzahl und Dichte pro Untersuchungsmonat

Im Sammlungsmonat August wurde mit 45 Tieren/10 min/Person die höchste Schneckendichte, sowie die meisten Schnecken insgesamt gefunden. Der sprunghafte Anstieg der Schneckendichte, sowie der Gesamtanzahl von Schnecken im Vergleich zum Vormonat, unterstützt die Annahme, dass in diesem Zeitraum der zweite Reproduktionsgipfel von *G. truncatula* lag. Auch im Monat Juni wurde eine hohe Schneckendichte vorgefunden. Dies könnte daran liegen, dass in diesem Monat die Frühjahrsgeneration bereits häufig vorhanden war, und gleichzeitig überwinterte Altschnecken noch in größerer Anzahl gefunden werden konnten.

Betrachtet man die drei Hauptstandorte über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg, verhielt sich die durchschnittliche Schneckendichte/Standort analog zur durchschnittlichen Anzahl der gesammelten Schnecken/Standort. In einzelnen Sammlungsmonaten kam es jedoch zu Abweichungen von dieser Reihenfolge. Eine Interpretation dieser Schwankungen ist schwierig, da ein Großteil der Schnecken von Standort 2 vermutlich aus stromaufwärts gelegenen, nicht begangenen Gebieten in Brückennähe angeschwemmt wurde. Deshalb können die ökologischen Gegebenheiten dieses Standortes im jahreszeitlichen Verlauf nicht mit jenen der direkt beprobten Standorte 1 und 3 verglichen werden.

Es ist aber wahrscheinlich, dass die durchschnittlichen monatlichen Niederschlagswerte das Vorkommen und die Aufsammlung von Schnecken an einzelnen Standorten unterschiedlich beeinflussen. So ist es beispielsweise vorstellbar, dass wenig Niederschlag einerseits den Transport zu Wasser in Richtung Standort 2 hemmt, andererseits werden bei niedrigen Wasserstand zusätzliche, weitläufige Sammlungsflächen am Ostufer der Tierbodentraverse frei. Vom Westufer waren zumindest Teilbereiche bei jeder durchgeführten Begehung zugänglich. Auch konnten bei allen Begehungen an Standort 1 ausreichend

Sammlungsflächen gefunden werden. Im Gegensatz dazu wurden an Standort 3 teilweise gar keine Sammlungsplätze vorgefunden. Das Vorkommen von *G. truncatula* wird an diesem Standort wegen der hohen Strömungsgeschwindigkeiten bei Hochwasser (RECKENDORFER, 2000) vermutlich noch zusätzlich durch geringe Wasserstände begünstigt.

4.2. Digenea in *Galba truncatula*

4.2.1. Prävalenz

Bis zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Diplomarbeit war die rezenteste Untersuchung an digenen Trematoden in *G. truncatula* aus Österreich eine Arbeit von SATTMANN & HÖRWEG (2006). Die in der Studie von SATTMANN & HÖRWEG (2006) vorgefundene Gesamtprävalenz digener Trematoden in über zehntausend untersuchten Schnecken von Untersuchungsgebieten in den Bereichen Nationalpark Donau-Auen, Fischamend, Markthof sowie Marchegg, entsprach beinahe jener, welche in dieser Diplomarbeit ermittelt wurde (2,43% bzw. 2,48%). Dies deutet darauf hin, dass die Gesamtinfektionsrate in den gemeinsam beprobten Gebieten im Verlauf der Jahre 2004/2005 bis 2008 relativ konstant blieb. Die Gewichtung des Spektrums an gefundenen Trematoden unterschied sich jedoch teilweise erheblich, wie in den folgenden Ausführungen näher erläutert wird.

4.2.1.1. Ordnung Echinostomida

4.2.1.1.1. Überfamilie Paramphistomoidea

Analog zur Untersuchung von SATTMANN & HÖRWEG (2006) wurden Vertreter der Familie Paramphistomidae FISCHOEDER 1901 am häufigsten gefunden, die Prävalenz lag in dieser Diplomarbeit allerdings um 0,32% höher. Ein Vergleich mit den Studien von MAGE et al. (2002) und DREYFUSS et al. (2005) zeigt auf, dass diese gefundene Abweichung nicht zwangsläufig eine Tendenz aufzeigen muss. So wurden beispielsweise in der Studie von MAGE et al. (2002) jährliche Schwankungen der Prävalenz von *Paramphistomum daubneyi* DINNIK 1962 in *G. truncatula* von bis zu

2,8% gefunden. Zudem wurden in dieser Diplomarbeit im Vergleich zur Studie von SATTMANN & HÖRWEG (2006) nicht exakt die gleichen Standorte beprobt.

DREYFUSS et al. (2005) stellten in einer längeren Untersuchungsperiode (1990-2004) an *G. truncatula* von natürlichen Wasserkressebetten aus Zentralfrankreich eine ähnliche durchschnittliche Prävalenz von *P. daubneyi* fest (1,7%), wobei die Prävalenz im Verlauf des Untersuchungszeitraumes signifikant anstieg. Um mögliche Tendenzen auch im Gebiet Nationalpark Donau-Auen aufzeigen zu können, ist ein länger anhaltendes Monitoring notwendig.

4.2.1.1.2. Überfamilie Echinostomatoidea

Nach den Paramphistomiden wurden Vertreter der Überfamilie Echinostomatoidea am zweithäufigsten nachgewiesen. Die Infektionsrate erwies sich in dieser Diplomarbeit als identisch zu jener der Studie von SATTMANN & HÖRWEG (2006) (0,46%), die Prävalenzen der einzelnen Arten wiesen jedoch Abweichungen auf.

4.2.1.1.2.1. Fascioloides magna

Die Infektionsrate von *G. truncatula* mit *F. magna* war in dieser Diplomarbeit beinahe neunmal so hoch wie jene im Bericht von SATTMANN & HÖRWEG (2006) (0,26% bzw. 0,03%). Interessanterweise deckt sich diese Beobachtung gut mit Untersuchungen an Rot- und Rehwildlosungen im weitestgehend selben Untersuchungsgebiet. So wurde nach wiederholten Triclabendazol-Behandlungen der Endwirte im Jahr 2001 eine Prävalenz von *F. magna* in Rotwildlosungen aus Fischamend von unter 1% (01/2005) festgestellt, im gesamten Untersuchungsgebiet entlang der Donau betrug die Prävalenz 1,5% (04/2002, URSPRUNG et al., 2006). Im Vergleich dazu konnte in einer Studie aus dem Jahr 2008 in 28 von 158 untersuchten Rot- und Rehwildlosungen (17,72%) verschiedener Standorte (inklusive Entenhafen, Märchenteich und Neubruchwiese) *F. magna* nachgewiesen werden (LIESINGER, 2010).

Obwohl die Prävalenz von *F. magna* in den letzten Jahren sowohl in den End-, als auch in den Zwischenwirten stark angestiegen ist, ist die aktuelle Infektionsrate im Vergleich zu anderen europäischen Ländern als relativ gering zu erachten.

So wurde beispielsweise anhand Untersuchungen an Kotproben von Rotwild in Kroatien eine *F. magna*-Prävalenz von 54,1% (JANICKI et al., 2005) nachgewiesen. NOVOBILSKÝ et al. (2007) zeigte in der angrenzenden Tschechischen Republik anhand koprologischen Untersuchungen an Rot- und Damwild sogar lokale Prävalenzen von bis zu 95% auf. Die Ausbreitung von *F. magna* auf neue Foci innerhalb der Tschechischen Republik deutete zudem auf ein Ausbreitungspotential nach Deutschland hin.

Trotz der derzeit im Europavergleich niedrigen Infektionsraten deutet die starke Zunahme an *F. magna*-Infektionen innerhalb der letzten Jahre auf eine Erholung der Parasitenpopulation hin. Die Prävalenz von *F. magna* in Losungen von Rothirschen betrug vor der Triclabendazol-Behandlung rund 70% in hoch enzootischen Gebieten (URSPRUNG et al., 2006). Es ist deshalb zu erwarten, dass die Prävalenz ohne weitere Medikation in den nächsten Jahren weiterhin ansteigen wird.

4.2.1.1.2.1.1. Mischinfektionen

Auffällig in dieser Diplomarbeit war der hohe Anteil an Funden von *F. magna*-Mischinfektionen. Dies könnte unter anderem mit den angewendeten Nachweismethoden zusammenhängen. Die *F. magna*- bzw. *F. hepatica*-spezifischen Primerpaare ermöglichten die molekularbiologische Detektion dieser Arten in mikroskopisch *F. magna* bzw. *F. hepatica*-negativen Proben. Alle anderen Trematodenarten wurden ausschließlich anhand des Trematodenuniversal-Primerpaars erfasst, wodurch mögliche Mischinfektionen anderer Arten molekularbiologisch nicht detektiert oder weiter differenziert werden konnten.

Die Exposition gegenüber mehreren verschiedenen Trematodenarten kann zudem, je nach Trematoden- und Wirtstierart, die Infektionsrate von Schneckenwirten und die larvale Entwicklung der Parasitenstadien unterschiedlich beeinflussen. Es ist beispielsweise bekannt, dass sukzessive Infektionen von präadulten *Omphiscola glabra* (O. F. MÜLLER 1774) mit *P. daubneyi* und *F. hepatica* die larvale Entwicklung von *F. hepatica* in dieser Schneckenart begünstigen (ABROUS et al. 1996 [zit. in DREYFUSS et al., 2005]). Dieses Phänomen wurde auch in *G. truncatula* beobachtet (AUGOT et al., 1996). AUGOT et al. (1996) fanden zudem höhere Infektionsraten in sukzessiv zu *P. daubneyi* und *F. hepatica* exponierten *G. truncatula*, als in

Schnecken, welche nur einer Trematodenart ausgesetzt waren. Auf der anderen Seite wurden bereits bei verschiedenen Trematodenarten Antagonismusphänomene in *G. truncatula* beobachtet (MANGA-GONZÁLEZ et al., 1994). So fanden beispielsweise GOUMGHAR et al. (2000) eine signifikante Verringerung der Prävalenz von *F. hepatica* in Schnecken von Bereichen, an denen auch *H. cylindracea*-Infektionen vorkamen. Dies ist vermutlich auf eine erhöhte Mortalität von dualinfizierten Schnecken zurückzuführen (GOUMGHAR et al., 2000). Hinsichtlich aller untersuchter *G. truncatula* war die vorgefundene Rate von 0,21% dualinfizierten Schnecken im Vergleich zu früheren Studien als durchschnittlich hoch zu erachten. So fanden MANGA-GONZÁLEZ et al. (1994) beispielsweise in 0,4% der untersuchten *G. truncatula* Mischinfektionen mit digenen Trematoden vor, FALTÝNKOVÁ et al. (2007) stellten in einer Untersuchung an *L. stagnalis* in 0,39% der Schnecken Doppelinfektionen mit digenen Trematoden fest. DREYFUSS et al. (2005) fanden hingegen in nur sieben von über neunzehntausend untersuchten *G. truncatula* Co-Infektionen von *F. hepatica* und *P. daubneyi*.

4.2.1.1.2.2. *Fasciola hepatica*

Auch die Prävalenz von *F. hepatica* in *G. truncatula* stieg im Vergleich zur Studie von SATTMANN & HÖRWEIG (2006) leicht an (von 0,01% auf 0,03%). Trotz dieses Anstiegs ist die derzeitige Befallsrate von *G. truncatula* mit *F. hepatica* im Untersuchungsbereich Orth/Donau als sehr gering zu erachten. So stellten DREYFUSS et al. (2005) in Wasserkressebetten in Zentralfrankreich eine durchschnittliche Prävalenz von *F. hepatica* in *G. truncatula* von 1,7% (Untersuchungszeitraum 1990-2004), sowie RONDELAUD et al. (2001) im Jahr 1999 eine Prävalenz von 1,1% fest. Auch in Endwirten des Untersuchungsbereichs ist die derzeitige Prävalenz sehr gering. In Rot- und Rehwildlosungen aus dem Gebiet Nationalpark Donau-Auen wurden im Jahr 2008 keine *F. hepatica*-Infektionen nachgewiesen (LIESINGER, 2010). Dennoch kommt *F. hepatica* in Österreich lokal mit hohen Prävalenzen vor, wie beispielsweise eine rezente Studie an Milchkühen von Kärntner Bauernhöfen aufzeigt. Hierbei wurden in koproskopischen Untersuchungen 17,82% *F. hepatica*-positive Tiere festgestellt (DUSCHER et al., 2009).

4.2.1.1.2.3. Echinostomatidae

Echinostomatidae waren in dieser Diplomarbeit mit einer Prävalenz von 0,17% vertreten, SATTMANN & HÖRWEG (2006) stellten hingegen eine Prävalenz von 0,42% fest. Möglicherweise stehen verschiedene Arten der Überfamilie Echinostomatoidea in Konkurrenz zueinander, was durch den starken Anstieg der Prävalenz von *F. magna* die Verschiebung des Artenspektrums erklären könnte. Da jedoch bei keiner der beiden genannten Studien die vorgefundenen Echinostomatidae auf Artniveau differenziert werden konnten, ist diese Vermutung anhand dieser Arbeiten nicht näher überprüfbar.

4.2.1.1.3. Überfamilie Pronocephaloidea

Im Gegensatz zu der Studie von SATTMANN & HÖRWEG (2006) wurden in dieser Arbeit keine Pronocephaloidea nachgewiesen. In besagter Untersuchung von SATTMANN & HÖRWEG (2006) waren 0,01% der untersuchten Schnecken mit *Notocotylus* sp. infiziert, was, im Vergleich zu anderen europäischen Ländern, niedrig ist. So wiesen MANGA-GONZÁLEZ et al. (1994) 2,6% mit *Notocotylus neyrai* CASTRO 1945 infizierte *G. truncatula* in Spanien nach, in Frankreich wurde *Notocotylus* sp. mit einer Prävalenz von bis zu 1,6% in *G. truncatula* gefunden (ABROUS et al., 1999).

4.2.1.2. Ordnungen Plagiorchiida und Strigeida

Die Ordnungen Plagiorchiida und Strigeida wurden in dieser Diplomarbeit mit Prävalenzen von 0,05% bzw. 0,10% gefunden. Damit lagen die Infektionsraten höher als jene der Studie von SATTMANN & HÖRWEG (2006) (Prävalenzen jeweils 0,01%). Die Arten der gefundenen Plagiorchiida und Strigeida konnten in dieser Arbeit nicht eindeutig bestimmt werden, in der Studie von SATTMANN & HÖRWEG (2006) handelte es sich um die Arten *H. cylindracea* (Plagiorchiida) und *Tylodelphys* sp. (Strigeida). MANGA-GONZÁLEZ et al. (1994) stellten in einer Untersuchung an 6.291 *G. truncatula* aus NW-Spanien eine Prävalenz von Plagiorchiida von 3,1% fest (2,8% *Plagiorchis elegans* [RUDOLPHI 1802], 0,3% *Opisthioglyphe ranae* [FROELICH 1791]). Darüber hinaus wurde *H. cylindracea* in *G. truncatula* aus der Tschechischen Republik (Prävalenz 2,1%, HORÁČKOVÁ & NOVOBILSKÝ, 2005), sowie aus Frankreich (Prävalenz bis zu 0,7%, ABROUS et al., 1999; 0,57%, RONDELAUD et al., 2001)

nachgewiesen. Die Prävalenzen dieser beiden Ordnungen stiegen also an, sind im Europavergleich aber als niedrig zu erachten.

4.2.1.3. Andere Funde

Besonders interessant waren die Funde von mehreren Vertretern der Gattung *Chaetogaster*. Der Art *Chaetogaster limnaei* BAER 1827 wird ein protektiver Effekt bezüglich Infektionen mit digenen Trematoden zugeschrieben (RODGERS et al., 2005, IBRAHIM, 2007). Tatsächlich wurde keine einzige Schnecke mit einer Co-Infektion von *Chaetogaster* spp. und digenen Trematoden gefunden.

4.2.2. Standortverteilung infizierter *Galba truncatula*

Die hohe Prävalenz von digenen Trematoden in *G. truncatula* von Standort 2 ist aus zwei Gründen ein interessanter Aspekt: (i) dieser Standort wurde im Vergleich zu den Standorten 1 und 3 seltener von Wildtieren frequentiert, was sich anhand weniger gefundenen Kotproben und Wildspuren zeigte (LIESINGER, 2010); (ii) aufgrund des kleinflächigen (<1 m²) Hauptsammlungsufers an der Westseite ist es zudem eher unwahrscheinlich, dass alle an der Tierbodentraverse gesammelten Schnecken ihren gesamten Entwicklungszyklus direkt an den Sammlungspunkten vollenden konnten. Eine Erklärung für die hohe Infektionslast könnte sein, dass die Tierbodentraverse als eine Art Sammelstelle für (infizierte) Schnecken und/oder infektiösen Kot bzw. Trematodeneier fungiert. Unmittelbar an der Tierbodentraverse erreicht der durchschnittliche Pegelstand der kleinen Binn einen sehr niedrigen Wert (RECKENDORFER, 2000). Es ist deshalb denkbar, dass zu Wasser transportierte Schnecken (ECKERT et al., 2008) oder Fäzesteile mit Trematodeneiern in Brückennähe verlanden.

Da allerdings nur wenige Hinweise auf Wildtiere an der Brücke gefunden wurden, und ein Transport von Metazerkarien zu Wasser uneffektiv ist (RONDELAUD et al., 2004), kann das tatsächliche Infektionsrisiko für die Endwirte unmittelbar an der Tierbodentraverse, sowie an stromabwärts angrenzenden Gebieten als vergleichsweise niedrig angesehen werden.

Im Gegensatz dazu wiesen häufige Sichtungen von Wildspuren und Fäzes (LIESINGER, 2010) den Standort Entenhaufen als einen Wildwechsel aus. Die in **Kapitel 4.1.1.**

erläuterten idealen Lebensbedingungen für *G. truncatula*, hohe Trematodenprävalenzen, sowie Funde von Kotproben unmittelbar an den Sammlungsplätzen dieser Schnecken (LIESINGER, 2010), zeigen ein hohes tatsächliches Infektionsrisiko an diesem Standort auf.

Von den an Standort 3 gesammelten Schnecken wies kein Tier eine Infektion mit digenen Trematoden auf. Es ist vorstellbar, dass durch die schwere Zugänglichkeit der Sammlungsufer Wildtiere diese Sammlungsplätze ebenso seltener passierten. Zwar wurden relativ viele Kotproben und Wildspuren gefunden (LIESINGER, 2010), diese befanden sich jedoch beinahe ausschließlich auf einer Wiese mehrere Höhenmeter oberhalb der Uferregion. RAPSCH et al. (2008) teilen das Risiko von *F. hepatica*-Infektionen für *G. truncatula* abhängig von der Bodenbeschaffenheit in vier Kategorien ein. Der Standort 3 ist dabei aufgrund der steinigen Sammlungsflächen, sowie vernachlässigbarer Vegetation auf diesen in die Kategorie mit dem geringsten Infektionsrisiko einzuordnen. Aufgrund der sehr ähnlichen Lebenszyklen von *F. hepatica* und *F. magna* (PYBUS, 2001) ist es wahrscheinlich, dass für diese beiden Trematodenarten ähnliche Übertragungsbedingungen gelten.

4.2.3. Saisonalität des Befalls

Die Entwicklung von der Mirazidieninfektion bis zur ersten Freisetzung von Zerkarien dauert bei digenen Trematoden mindestens einen Monat (CRIBB, 1988, KIRK & LEWIS, 1993). Im Fall von beispielsweise mit *F. hepatica* infizierten *G. truncatula* beginnt die Zerkarienfreisetzung frühestens sieben Wochen nach Infektion, wobei aus infizierten Schnecken wochen- bis monatelang Zerkarien austreten können (ECKERT et al., 2008). Bei Infektionen mit *P. daubneyi* sind 9-10 Wochen auf 20°C notwendig, um die erste Zerkarienfreisetzung zu erreichen (RONDELAUD et al., 2007).

Interessanterweise wurden alle Zerkarien von Paramphistomoidea in Schnecken, welche Anfang September (03.09.08) gesammelt wurden, detektiert. Auch die Zerkarien von einer nicht näher bestimmten Art der Ordnung Plagiorchiida wurden im September gefunden.

Dies deckt sich – im Fall von *P. elegans* (Plagiorchiida) – mit einer Studie an *G. truncatula* aus Spanien (MANGA-GONZÁLEZ et al., 1994), in welcher der Höhepunkt der

Zerkarienfreisetzung aus den Sporozysten von *P. elegans* im August und September nachgewiesen wurde. Im Gegensatz dazu konnte die Freisetzung von Zerkarien aus Sporozysten von *O. ranae*, einer anderen Spezies der Ordnung Plagiorchiida, in besagter Studie ausschließlich im Mai beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass unterschiedliche Arten der Ordnung Plagiorchiida möglicherweise verschiedene Temperaturoptima in ihrem Entwicklungszyklus aufweisen.

Betrachtet man nun die Zerkarienfunde im September, sowie den sprunghaften Anstieg an (Redien-)funden im Juli, kann man davon ausgehen, dass ein Großteil an Infektionen im Jahr 2008 im Zeitraum Juni/Juli stattfanden. Die ersten Parasitenstadien innerhalb der Schnecke, die Sporozysten, können aufgrund ihrer Lokalisierung innerhalb der Schnecke meist nur schwer mit den in dieser Diplomarbeit angewandten mikroskopischen Methoden erfasst werden (CARON et al., 2008). Geht man davon aus, dass ab Juni die erste große Infektionswelle stattfand, und sich in diesem Monat Sporozysten entwickelten, könnte dies die geringe mikroskopisch erfasste Infektionslast im Juni, sowie den sprunghaften Anstieg der (Redien-)funde im Juli erklären.

Dieser Infektionszeitpunkt ist zudem durch verschiedene ökologische Gegebenheiten wahrscheinlich. Es ist zunächst anzumerken, dass der Monat Juni mit großem Abstand die höchste durchschnittliche Niederschlagsmenge im Untersuchungszeitraum aufwies. Moderater Niederschlag begünstigt Infektionen von Schnecken erheblich, da Wasser, bis zu einem gewissen Grad, positive Effekte auf freilebende Parasitenstadien, sowie den Zwischenwirt hat. Das maximale Infektionsrisiko von *F. hepatica* für *G. truncatula* ist bei einem durchschnittlichen Niederschlagswert von ungefähr 90 mm gegeben (RAPSCH et al., 2008), was dem im Juni gemessenen durchschnittlichen Niederschlagswert entspricht.

Darüber hinaus liegt das Temperaturoptimum für Infektionen dieses Parasit-Wirt-Systems zwischen 22°C und 25°C (RAPSCH et al., 2008). Die maximalen mittleren Monatstemperaturen im Jahr 2008 wurden mit 20,6-20,8°C von Juni bis August erreicht, was Infektionen in diesem Zeitraum begünstigt haben könnte. Unter 10°C finden keine Infektionen statt, da sich weder die Trematodeneier, noch Schnecken bei diesen Temperaturen entwickeln können (RAPSCH et al., 2008). Die mittlere Monatstemperatur lag mit 11,6 °C im April nahe dieser Untergrenze. Im März und

Februar fielen die mittleren Monatstemperaturen deutlich darunter, wodurch Infektionen vor April unwahrscheinlich sind. Bei Temperaturen von 12-16°C, was in etwa den mittleren Monatstemperaturen von April und Mai entsprach, dauert zudem die Entwicklung des Mirazidiums von *F. hepatica* ungefähr 2-3 Monate (THOMAS, 1883b [zit. in RAPSCH et al., 2008]), was zusätzlich einen Mirazidienschlupf im Juni/Juli wahrscheinlich macht. Es bleibt anzumerken, dass ein Sporozystenfund im September darauf hindeutet, dass auch in anderen Untersuchungsmonaten Infektionen stattfanden.

4.2.3.1. Gehäusehöhe und Infektionsrate

Die mikroskopischen Untersuchungen zeigten einen Zusammenhang von Infektionslast und Schalenhöhe auf (Schalenhöhe ≤ 5 mm 43,3% und >5 mm 56,7%). Dies ist nicht ungewöhnlich, da Infektionen mit digenen Trematoden bei ihren Wirtstieren zu Gigantismus führen können (SORENSEN & MINCHELLA, 2001). Deswegen geht man grundsätzlich davon aus, dass Tiere mit größerer Gehäusehöhe, verglichen mit anderen Mitgliedern ihrer Population oder Kohorte, eine höhere Infektionsrate aufweisen. Verlangt ein Studienaufbau eine möglichst hohe Ausbeute an Parasitenstadien, sollten demnach bevorzugt größere Schnecken aufgesammelt und untersucht werden.

Infektionen bei kleineren Schnecken sind zudem mikroskopisch schwerer zu detektieren. Dies wird durch die molekularbiologischen Ergebnisse unterstrichen, da alle molekularbiologisch detektierten Stichprobeninfektionen bei Schnecken mit einer Gehäusehöhe von ≤ 5 mm gefunden wurden. Daraus lässt sich schließen, dass es ratsam ist, insbesondere kleinere Schnecken molekularbiologisch auf Infektionen zu überprüfen, um ein möglichst genaues Abbild der Prävalenz von Trematodeninfektion in einer Gesamtpopulation von Schnecken zu erhalten.

Es bleibt zu erläutern, weshalb keine deutlicheren Korrelationen zwischen Schalenhöhe und Infektionsrate gefunden wurden. Auf der einen Seite ist bekannt, dass infizierte Schnecken im Durchschnitt eine geringere Lebenserwartung als gesunde Individuen aufweisen (SORENSEN & MINCHELLA, 2001). Dadurch ist es vorstellbar, dass noch vom Vorjahr infizierte Tiere mit einer großen Gehäusehöhe bereits vor dem ersten Sammlungstermin (21.04.2008) verstorben sein könnten. In

dieser Diplomarbeit wurden zudem die höchsten durchschnittlichen Gehäusehöhen der untersuchten *G. truncatula* in den Monaten April und Mai gefunden. Wie bereits erläutert, ist eine größere Anzahl an Neuinfektionen in diesem Zeitraum aufgrund der ungünstigen klimatischen Bedingungen als unwahrscheinlich zu erachten.

4.3. Bedeutung der Faszolidenfunde für Mensch und Tier

In dieser Diplomarbeit konnten sowohl human-, als auch tierpathogene Vertreter der Familie Fasciolidae in *G. truncatula* nachgewiesen werden. Ähnlich der Studie von SATTMANN & HÖRWEG (2006) wurde der für Menschen infektiöse Große Leberegel *F. hepatica* in geringer Prävalenz in *G. truncatula* gefunden. Während menschliche Fasziose in Europa vor allem in Portugal, Frankreich und Spanien ein Gesundheitsproblem darstellt (ESTEBAN et al., 1998 [zit. in MAS-COMA, 2004]), ist die Inzidenz in Österreich mit durchschnittlich 1,1 Fällen/Jahr (1980-2004) (AUER, 2009) als gering zu erachten. Bedingt durch die sehr geringe vorgefundene Prävalenz von *F. hepatica* in *G. truncatula* (SATTMANN & HÖRWEG, 2006) sind menschliche Infektionen mit diesem Parasiten im Untersuchungsgebiet auch weiterhin als Einzelfälle anzusehen. Da menschliche Fasziose zu schwerwiegenden Leberschädigungen führen kann (Koç et al., 2009), sollte der Konsum von ungekochten Wildvegetabilien aus Risikogebieten dennoch mit Bedacht genossen werden. Dies trifft vor allem auf den Verzehr roher Brunnenkresse (*Nasturtium officinale* R. BR.) zu, welche die Hauptinfektionsquelle für Menschen mit *F. hepatica* darstellt (MAS-COMA et al., 1998). Der Große Leberegel ist auch ein wichtiger Parasit von domestizierten Wiederkäuern wie Rindern und Schafen. Massive Infektionen können zu einem plötzlichen Tod der Tiere führen, chronische Erkrankungen gehen meist mit Leistungsminderungen und Produktionsverlusten einher, wodurch beträchtliche ökonomische Verluste entstehen können (TORGERSON & CLAXTON, 1999). In Wildtierpopulationen spielt der Parasit eine eher untergeordnete Rolle (PYBUS, 2001), was auch anhand koprologischer Untersuchungen an Reh- und Rotwild des

Nationalparks Donau-Auen gezeigt wurde (LIESINGER, 2010). Aufgrund der sehr geringen Prävalenz von *F. hepatica* in End- und Zwischenwirten ist eine Bestimmung von Hauptrisikogebieten schwer durchführbar. Hinsichtlich menschlicher Fasziole ist ein Vergleich mit der Befallsrate von Tieren zumal nur bedingt aussagekräftig. Interessanterweise treten hohe Prävalenzen in Mensch und Tier nämlich nicht zwangsläufig im selben Gebiet auf (MAS-COMA, 2004).

Da die nahverwandte Art *F. magna* einen zu *F. hepatica* sehr ähnlichen Lebenszyklus aufweist (PYBUS, 2001), ist allerdings anzunehmen, dass die Risikogebiete dieses Parasiten grundlegend mit jenen von *F. hepatica* überlappen. Die vorgefundene Standortverteilung des Amerikanischen Riesenleberegels zeigte vor allem die einmalig beprobten Standorte Fischamend und Regelsbrunn als Risikogebiete auf. Nach einer GIS-Risikoanalyse von RECKENDORFER & GROISS (2006) stellt Fischamend durch die Verschneidung von vier Risikofaktoren ein Gebiet mit hohem Infektionsrisiko für *F. magna* dar, wogegen für Orth/Donau aufgrund geringerer Wilddichten ein vergleichsweise niedrigeres Infektionsrisiko postuliert wurde. Tatsächlich wurden in einer Untersuchung von SATTMANN & HÖRWEG (2006) an *G. truncatula* aus den Gebieten des Nationalparks Donau-Auen, sowie aus Fischamend, Markthof und Marchegg, ausschließlich im Bereich Fischamend (Fischa N-Ufer) mit *F. hepatica* und *F. magna*-infizierte Schnecken nachgewiesen. Auch die in dieser Diplomarbeit gefundene Gesamtprävalenz von *F. magna* am Standort Fischamend war höher als jene der an den Standorten aus Orth/Donau gefundene, die mit *F. hepatica* infizierte Schnecke wurde hingegen an einem Standort aus Orth/Donau vorgefunden. Ein bemerkenswerter Fund stellt eine *F. magna*-infizierte Schnecke aus Regelsbrunn dar. Da nur vier *G. truncatula* aus diesem Gebiet untersucht wurden, lässt dies eine sehr hohe Prävalenz von *F. magna* in Regelsbrunn vermuten. Die Steigerungsrate der gesamten Zwischenwirtinfektionen von 0,03% (SATTMANN & HÖRWEG, 2006) auf 0,26% innerhalb weniger Jahre ist alarmierend, da *F. magna* gravierende Schäden an heimischen Wildtierbeständen verursachen kann (WINKELMAYER & PROSL, 2001). Zudem können Fasziole-Ausbrüche bei domestizierten Tieren, ähnlich der Fasziole, zu beträchtlichen ökonomischen Verlusten führen (BALBO et al., 1989 [zit. in RAJKOVIĆ-JANJE et al., 2008], PYBUS, 2001). Ein weiterführendes Monitoring dieses Parasiten ist deshalb nicht nur wegen der

möglichen Indikatoreigenschaft bezüglich des, im Untersuchungsgebiet seltener vorkommenden, humanpathogenen großen Leberegels *F. hepatica* als dringend notwendig zu erachten.

4.4. Vergleich der mikroskopischen und molekularbiologischen Methodik

Während mikroskopisch in 2,32% der untersuchten *G. truncatula* Infektionen mit Vertretern der Unterklasse Digenea oder Digenea-ähnlichen nachgewiesen wurden, konnte in den 68 molekularbiologisch untersuchten Stichprobenschnecken ein Trematoden-positiver Anteil von 10,29% festgestellt werden. Eine erhöhte Sensitivität DNA-basierter Methoden in der parasitologischen Diagnostik wurde bereits in früheren Studien festgestellt. So fanden beispielsweise CUCHER et al. (2006) mittels PCR signifikant mehr mit *F. hepatica* infizierte *Lymnaea columella* SAY 1817 und *Lymnaea viatrix* ORBIGNY 1835 im Vergleich zu mikroskopischen Untersuchungen. Auch bei KAPLAN et al. (1997) stellte sich, vor allem während frühen Infektionsstadien, eine DNA-basierte Technik als sensibler heraus, was auf eine Reihe von Gründen zurückzuführen ist. Die Sensitivität mikroskopischer Methoden wird wesentlich von der Lokalisierung und Anzahl der Parasitenstadien innerhalb des Schneckenwirts beeinflusst. Neben Mirazidieninfektionen ist vor allem die mikroskopische Detektion von Sporozysten problematisch, da sich diese, im Fall von beispielsweise *F. hepatica*, vorwiegend im schwer zugänglichen Mantel, einem Tentakel oder der Niere der Schnecke befinden (CARON et al., 2008). Auch sind, besonders bei der Untersuchung einer großen Anzahl von Schnecken mit unbekanntem Infektionsstatus, sehr gründliche Untersuchungen jeder einzelnen Schnecke unverhältnismäßig zeitaufwändig und daher praktisch kaum durchführbar (KAPLAN et al., 1997). Um auf qualitativ hochwertige Ergebnisse zu kommen benötigt es zudem eines erfahrenen Mikroskopisten (CARON et al., 2008).

Während die mikroskopische Detektion von Trematodeninfektionen frühestens acht Tage nach der Exposition zu Mirazidien durchführbar ist (CARON et al., 2008), ist nach KAPLAN et al. (1995) eine Detektionsschwelle von 1 ng Parasiten-DNA

ausreichend, um ein einzelnes Mirazidium vier Stunden p.i. molekularbiologisch zu detektieren. Basierend auf dieser Aussage lassen die Ergebnisse der in dieser Diplomarbeit durchgeführten Primersensitivitätstests darauf schließen, dass, analog zu FASC_f/FASC_r (KAPLAN et al., 1995), auch mit den neu designten Primerpaaren MagnaR/MagnaF und TremF/TremR Trematodeninfektionen in einem frühen Stadium nachgewiesen werden können. Trotz hoher Sensitivität und Spezifität weisen PCR-Methodiken aber auch einige Schwierigkeiten auf, die es zu überwinden gilt. So besteht besonders bei neu entwickelten PCR-Verfahren die Gefahr falsch-negative oder falsch-positive Resultate durch PCR-Inhibitoren, Kontaminationen oder Kreuzreaktionen zu erhalten (CARON et al., 2008). Ein wichtiger Aspekt der deshalb in dieser Diplomarbeit überprüft werden musste, betraf die Robustheit der eingesetzten Primerpaare gegenüber Schnecken-DNA. Dies war insbesondere bei der Stichprobenanalyse von Bedeutung, da hierbei vermutlich viel *G. truncatula*-DNA vermengt mit verhältnismäßig wenig Parasiten-DNA getestet wurde. Die Ergebnisse zeigten auf, dass die Sensitivität der selbstentwickelten Primerpaare auch durch sehr hohe Mengen an *G. truncatula*-DNA nicht verringert wurde. Um etwaige Kontaminanten oder Inhibitoren während der PCR-Reaktion auszuschließen, wurden zudem in jedem Testdurchlauf Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt.

Mögliche Kreuzreaktionen wurden anhand Primeranalysen bioinformatisch, sowie experimentell überprüft. Aus den erhaltenen Daten lies sich schlussfolgern, dass das neuentwickelte Trematodenuniversal-Primerpaar spezifisch für Arten der Klasse Trematoda ist (insbesondere TremF), und Trematoden verschiedener Überfamilien und Ordnungen amplifizieren kann. Da in der zweiten Unterklasse der Trematoda, den Aspidogastrea, kein Generationswechsel stattfindet (LUCIUS & LOOS-FRANK, 2008), konnte zudem anhand der mikroskopischen Vorbestimmung von Larvenstadien bei den isolierten Trematodenstadien eine Verwechslung mit dieser Unterklasse ausgeschlossen werden, zumal unseres Wissens nach Aspidogastrea bisher noch nicht in *G. truncatula* nachgewiesen wurden. In den Überprüfungen des *F. magna*-spezifischen Primerpaars MagnaF/MagnaF wurde dargestellt, dass dieses Primerpaar von den untersuchten Vergleichsarten ausschließlich *F. magna* und *F. hepatica* amplifizieren kann. Da mit diesem Primerpaar *F. magna* nicht artspezifisch

von *F. hepatica* unterschieden werden konnte, wurde zur endgültigen Bestimmung zusätzlich das nach KAPLAN et al. (1995) *F. hepatica*-spezifische Primerpaar FASC_f/FASC_r verwendet.

Dennoch kam es in drei Fällen bei Probenuntersuchungen mit MagnaF/MagnaR zu einer Bildung von Artefakten, welche nicht näher identifiziert werden konnten. Die Reproduzierbarkeit der Artefaktbildungen deutete auf eine unspezifische Primerbindung hin. Nach MÜLHARDT (2009) ist insbesondere bei Verwendung genomischer DNA nahverwandter Spezies die Wahrscheinlichkeit gegeben, unerwünschte Sequenzen durch Mispriming zu amplifizieren. Unspezifische Bindungen können durch eine Erhöhung der Temperatur in der Primer-Hybridisierungsphase verringert werden. Eine Artefaktbildung wurde in dieser Diplomarbeit allerdings auch bei einer Annealing-Temperatur von 56°C beobachtet, was nach MÜLHARDT (2009) bereits eine ausreichend hohe Temperatur für deren Minimierung darstellt. Höhere Annealing-Temperaturen steigern zwar generell die Spezifität, senken aber gleichzeitig die Sensitivität der PCR-Reaktion. Um eine ausreichende Sensitivität zu wahren, wurden die Testungen auf 52°C beibehalten und die Proben mit Artefaktbildungen als *F. magna*-negativ gewertet.

Insgesamt betrachtet entsprach ein Großteil der molekularbiologischen Ergebnisse den mikroskopisch durchgeführten Bestimmungen. Die Redien der am häufigsten gefundenen Familien, Paramphistomidae und Echinostomatidae, verfügen über einige charakteristische morphologische Merkmale (OLSEN, 1974), welche die mikroskopische Unterscheidung erleichterten. Klassifizierungen auf Artniveau wurden mikroskopisch nicht durchgeführt, da beispielsweise Sporozysten und Redien von Vertretern der Überfamilie Echinostomatoidea morphologisch nicht sicher voneinander differenzierbar sind (CUCHER et al., 2006). Zwar konnten mittels FASC_f/FASC_r und MagnaF/MagnaR *F. magna* und *F. hepatica* artspezifisch identifiziert werden, die restlichen Trematodenstadien konnten jedoch anhand Sequenzierung mit dem Trematodenuniversal-Primerpaar nicht eindeutig auf Artniveau zugeordnet werden. Das Hauptaugenmerk dieses Primerpaars lag darauf möglichst alle Trematodenarten zu erfassen. Die hochkonservierte Natur der dafür ausgewählten 18S-DNA-Region (HILLIS & DIXON, 1991) erlaubte bloß eine Zuordnung auf Niveau von Überfamilien/Ordnungen, zumal in der GenBank nicht Sequenzen

aller in Frage kommender Digenea-Arten enthalten waren und die in der Praxis erhaltenen Probensequenzen nicht die gesamte Amplikonlänge umfassten.

Im Vergleich der mikroskopischen und molekularbiologischen Bestimmungen ist noch zu erwähnen, dass vier mikroskopisch als Einzelinfektionen bestimmte Funde molekularbiologisch als Mischinfektionen identifiziert wurden. Dies könnte daran liegen, dass bei Mischinfektionen üblicherweise eine Trematodenart klar dominant gegenüber der anderen ist (AUGOT et al., 1996), und die zahlenmäßig geringer vertretene Art mikroskopisch nicht erfasst wurde.

5. Zusammenfassung

Bestimmung der Prävalenz von *Fascioloides magna* (BASSI 1875) und anderen digenen Trematoden in *Galba truncatula* (O.F. MÜLLER 1774) an drei ausgewählten Standorten im Bereich Orth/Donau (Niederösterreich).

Digene Trematoden sind ubiquitär vorkommende Endoparasiten und umfassen zahlreiche Arten großer human- und veterinärmedizinischer Bedeutung. Die Parasiten verfügen über einen komplizierten Lebenszyklus, der sowohl einen Generations-, als auch einen Wirtswechsel umfasst. In den letzten Jahren breitete sich der eingeschleppte Amerikanische Riesenleberegel *Fascioloides magna* in freilebendem Rot- und Rehwild in den Donau-Auen östlich von Wien aus. Die in Österreich betroffenen Cerviden können durch eine Infektion mit dem Parasiten stark in Mitleidenschaft gezogen werden. Durch wiederholte Triclabendazol-Medikationen wurde zwar eine deutliche Verminderung des Befalls erreicht, eine vollständige Eradikation des Parasiten gelang dadurch jedoch nicht.

Ziel dieser Diplomarbeit war es, die aktuelle Infektionslast der Zwischenwirtschnecke *Galba truncatula* mit *F. magna* und anderen digenen Trematoden im Bereich Orth/Donau (Niederösterreich) zu ermitteln. Dies beinhaltete auch die Erfassung der Standortverteilung infizierter Schnecken und einer möglichen Saisonalität des Befalls, sowie Untersuchungen an populationsdynamischen Aspekten der Zwischenwirtschnecken.

Dazu wurde im Zeitraum April bis Oktober 2008 ein Monitoring von *G. truncatula* an drei ausgewählten Standorten im Bereich Orth/Donau durchgeführt. Bei diesen Standorten handelte es sich um die Standorte Entenhafen (Standort 1), Märchenteich (Standort 2) und Neubruchwiese (Standort 3). Zusätzlich wurde jeweils eine Sammlung in Haslau, Regelsbrunn und Fischamend durchgeführt (=sonstige Standorte).

Es wurden insgesamt 3.871 *G. truncatula* aufgesammelt, vermessen und mikroskopisch auf das Vorhandensein digener Trematoden untersucht. Ungefähr jede zehnte mikroskopisch parasitenfreie Schnecke wurde als Stichprobe entnommen. Insgesamt 68 Stichproben und 30 mikroskopisch detektierte isolierte Trematodenstadien wurden molekularbiologisch mittels PCR und Sequenzierung

untersucht. Zu diesem Zweck wurden zwei Primerpaare entwickelt, welche es ermöglichen sollten, Trematoden allgemein, sowie spezifisch *F. magna* in *G. truncatula* nachzuweisen. Zur Detektion des humanpathogenen Großen Leberegels *Fasciola hepatica* wurde zudem ein *F. hepatica*-spezifisches Primerpaar aus der Literatur entnommen.

Insgesamt 96 Trematodeninfektionen wurden in den 3.871 untersuchten *G. truncatula* detektiert (Prävalenz 2,48%), wobei etwas mehr infizierte Schnecken mit einer Gehäusehöhe von >5 mm (52,1%) gefunden wurden. Vertreter der Überfamilie Paramphistomoidea wurden am häufigsten nachgewiesen (Prävalenz 1,91%), darauf folgten Trematoden der Überfamilie Echinostomatoidea (Prävalenz 0,46%), sowie der Ordnungen Strigeida (Prävalenz 0,10%) und Plagiorchiida (Prävalenz 0,05%). Mit 4,38% (n = 1.347) infizierten Schnecken wurden an Standort 2 die meisten Infektionen nachgewiesen. Darauf folgten die sonstigen Standorte mit 3,04% (n = 427) und Standort 1 mit 1,22% (n = 1.975) infizierten Tieren. Es konnte auch eine Saisonalität des Befalls mit Höhepunkt im Juli (Prävalenz 10,11%, n = 524) festgestellt werden.

Der Amerikanische Riesenleberegel *F. magna* konnte mit einer Gesamtprävalenz von 0,26% (n = 3.871) in den untersuchten Schnecken nachgewiesen werden, wobei die höchste Prävalenz an den einmalig beprobten sonstigen Standorten gefunden wurde (Prävalenz 0,47%, n = 427). Auch an den beiden Hauptstandorten Entenhausen (Prävalenz 0,20%, n = 1.975) und Märchenteich (Prävalenz 0,30%, n = 1.347) konnte der Parasit nachgewiesen werden. Die meisten Infektionen wurden im Juli (Prävalenz 1,15%, n = 524) gefunden. Der Große Leberegel *F. hepatica* konnte einmalig (Prävalenz 0,03%, n = 3.871) in einer im September gesammelten Schnecke von Standort 1 nachgewiesen werden.

Der Vergleich mikroskopischer und molekularbiologischer Methoden bestätigte frühere Studien, in denen DNA-basierte Methoden eine höhere Sensitivität aufwiesen. Zudem konnten morphologisch schwer unterscheidbare Trematodenstadien molekularbiologisch differenziert werden. Anhand der vorgefundenen Schneckendichten und der saisonalen Größenverteilung konnte auf einen 2-gipfligen Reproduktionszyklus von *G. truncatula* geschlossen werden. Darüber hinaus konnte diese Diplomarbeit bestätigen, dass *G. truncatula* in den

Donau-Auen östlich von Wien als Zwischenwirtschnecke für human- und tierpathogene digene Trematoden dienen kann. Im Fall von *F. magna* zeigte ein Vergleich mit einer früheren Studie nach der Triclabendazol-Medikation, dass die Prävalenz des Amerikanischen Riesenleberegels im Verlauf der letzten Jahre stark angestiegen ist. Dies könnte auf eine Erholung der Parasitenpopulation von der Triclabendazol-Behandlung hindeuten, weshalb ein weiterführendes Monitoring dieser Zwischenwirtschnecken empfehlenswert ist.

Determination of the prevalence of *Fascioloides magna* (BASSI 1875) and other digenetic trematodes in *Galba truncatula* (O.F. MÜLLER 1774) at three chosen locations in the area of Orth/Danube (Lower Austria).

Digenetic trematodes are ubiquitous endoparasites and comprise numerous species of great medical and veterinary importance. These parasites have complicated life cycles involving alternation of generations and multiple successive hosts. In the past years, the introduced large American liver fluke *Fascioloides magna* has spread within free-living red deer and roe deer in the wetlands of the Danube, east of Vienna. Austrian cervids can be severely affected by the parasite. Due to repeated triclabendazole medications, the number of infections markedly decreased, however, complete eradication of the parasite has not been achieved.

The aim of this diploma thesis was to determine the current infection rate of *Galba truncatula* with *F. magna* and other digenetic trematodes in the area of Orth/Danube (Lower Austria). This included the evaluation of the distribution of infected snails and a possible seasonality of infections, as well as investigations on aspects of the population dynamics of the intermediate host snails.

For these purposes, a monitoring of *G. truncatula* from three locations, including Entenhafen (location 1), Märchenteich (location 2) and Neubruchwiese (location 3), in the region of Orth/Danube was conducted during April to October 2008. Furthermore, one collection each was performed in Haslau, Regelsbrunn and Fischamend (=other locations).

A total of 3.871 *G. truncatula* were collected, measured and examined under the microscope for the presence of digenetic trematodes. Every tenth microscopically parasite-free snail was chosen as a random sample. Altogether 68 random samples and 30 microscopically detected isolated trematode stages were tested molecular biologically by PCR and sequencing. For this purpose, two primer pairs were developed to enable both the detection of trematodes in general and the specific detection of *F. magna* in *G. truncatula*. In addition, a *Fasciola hepatica*-specific primer pair was chosen from literature for the detection of the human pathogenic common liver fluke *F. hepatica*.

Overall, 96 trematode infections (prevalence 2,48%) were detected in the 3.871 examined *G. truncatula*, whereby slightly more infected snails with a shell height >5 mm (52,1%) were found. The most frequently detected trematodes were members of the superfamily Paramphistomoidea (prevalence 1,91%), followed by trematodes of the superfamily Echinostomatoidea (prevalence 0,46%), as well as the orders Strigeida (prevalence 0,10%) and Plagiorchiida (prevalence 0,05%). With 4,38% (n = 1.347) infected snails, most infections were found at location 2, followed by the other locations with 3,04% (n = 427) and location 1 with 1,22% (n = 1.975) infected animals, respectively. Moreover, a seasonality of infections with a peak in July (prevalence 10,11%, n = 524) was observed.

The large American liver fluke *F. magna* was found with an overall prevalence of 0,26% (n = 3.871) in the examined snails, whereby the highest prevalence was found at the one-time sampled other locations (prevalence 0,47%, n = 427). The parasite was detected at the main locations Entenhausen (0,20%, n = 1.975) and Märchenteich (0,30%, n = 1.347), too. Most infections were found in July (prevalence 1,15%, n = 524). Moreover, the common liver fluke *F. hepatica* was found once (prevalence 0,03%, n = 3.871) in a snail collected in September at location 1.

The comparison of microscopic and molecular biologic methods of investigation confirmed former studies, in which DNA-based methods have shown a higher sensitivity. Furthermore, it was possible to differentiate morphological similar trematode species by molecular biology. The obtained snail densities and seasonal distribution of the shell height indicated a two-annual generation pattern of *G.*

truncatula. Furthermore, this diploma thesis confirmed that *G. truncatula* from the wetlands of the Danube, east of Vienna, can act as intermediate hosts for both human and animal pathogenic digenetic trematodes. In the case of *F. magna*, a comparison with a former study carried out after triclabendazole medication showed, that the prevalence of the large American liver fluke considerably increased over the last few years. This could indicate a recovery of the parasite population from triclabendazole treatment, wherefore further monitoring of intermediate host snails is recommended.

6. Anhang

6.1. Glossar

Art: eine Art umfasst alle Populationen, welche untereinander kreuzbar sind und von anderen Populationen reproduktiv isoliert sind (biologischer Artbegriff).

Abundanz: Häufigkeit, Populationsdichte. Anzahl von Organismen pro Flächen-/Raumeinheit.

adult: erwachsen, geschlechtsreif.

akut: plötzlich auftretend, heftig verlaufend. Gegensatz: chronisch.

Alignment: Anordnung von DNA-Sequenzen zum Nukleotid-Vergleich. Es können mehrere Arten von Alignments unterschieden werden, z.B.:

globales Alignment: paarweises Alignment, in dem alle Basen einer Sequenz berücksichtigt werden.

lokales Alignment: paarweises Alignment, das ein globales Alignment jenes Teilbereichs der Sequenzen darstellt, welcher die bestmögliche Übereinstimmung aufweist.

multiples Alignment: Alignment mehrerer Sequenzen.

Amplifikation: Vervielfältigung von Nukleinsäuren durch PCR.

Amplikon: das durch eine Amplifikation erhaltene Produkt.

anterior: vorne liegend.

apikal: an der Spitze liegend.

Artefakt: unerwünschtes PCR-Produkt. Zu Artefaktbildungen in der PCR kann es kommen, wenn die Primer am falschen Ort hybridisieren.

Aspidogastrea: Unterklasse der Trematoda. Im Gegensatz zu ihrer Schwestergruppe, den Digenea, umfassen die Aspidogastrea relativ wenige Arten und verfügen über keinen Generationswechsel. Die Gruppe parasitiert hauptsächlich in Muscheln und Schnecken.

Basen: Bausteine der Nukleinsäuren. DNA ist aus den Basen Adenin, Guanin (Purine), Cytosin und Thymin (Pyrimidine) zusammengesetzt, RNA enthält anstelle der Base Thymin die Base Uracil (Pyrimidin).

Basenpaar (bp): durch Wasserstoffbrückenbindungen verbundene komplementäre Basen der DNA (A-T, G-C) oder RNA (A-U, G-C). Ein Basenpaar beschreibt die kürzeste mögliche Einheit eines doppelsträngigen DNA-Moleküls.

Biotop: abgegrenzter Lebensraum. Als Biotop bezeichnet man die Gesamtheit an ökologischen Umweltfaktoren einer Lebensgemeinschaft verschiedener Arten (Biozönose) oder einer Art.

Bootstrap: Resampling-Methode in der Statistik. Mittels Bootstrapping kann beispielsweise der Grad an Zuverlässigkeit einer bestimmten Verzweigung in einem phylogenetischen Baum ermittelt werden.

chronisch: langdauernd, schleichend oder wiederkehrend. Gegensatz: akut.

Cluster-Analyse: Methode zur Gruppierung ähnlicher Objekte.

Denaturierung: Aufschmelzen eines DNA-Doppelstranges in Einzelstränge durch chemische oder physikalische (z.B. Wärme) Einwirkung.

Digenea: digene Trematoden, artenreiche Unterklasse der Klasse Trematoda. Der Lebenszyklus digener Trematoden umfasst einen Generationswechsel, in welchem folgende Entwicklungsstadien vorkommen können: Ei, Mirazidium, Sporozyste, Redie, Zerkarie, Metazerkarie, Adulttier. Zudem findet ein obligater Wirtswechsel statt. Häufig kommen im Lebenszyklus dieser Endoparasiten zwei Zwischenwirte vor, wobei der erste Zwischenwirt meist ein Gastropod ist. Adulte Digenea sind oftmals im Verdauungstrakt ihrer Endwirte lokalisiert, können jedoch auch andere Organe befallen.

DNA (deoxyribonucleic acid): Desoxyribonukleinsäure. Die üblicherweise doppelsträngig vorliegende DNA ist aus Nukleotiden zusammengesetzt, welche jeweils aus einem Zucker (Desoxyribose), einem Phosphatrest und einer Base (Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin) bestehen. DNA ist Träger der Erbinformation für alle zellulären Lebensformen und viele Viren.

domestiziert: zum Haustier gezähmt und gezüchtet bzw. zur Kulturpflanze gezüchtet.

dorsal: rückenseitig.

Elution: Heraus- oder Ablösen eines adsorbierten Stoffes aus einer stationären Phase (Adsorbens).

endemisch: in einem bestimmten, begrenzten Gebiet vorkommende Tier-/Pflanzenart oder Krankheit.

Endoparasit: Parasiten, welche im Inneren des Wirtes leben.

enzootisch: in einem bestimmten, begrenzten Gebiet vorkommende Infektionskrankheit bei Tieren.

Enzym: Protein, das chemische Reaktionen in lebenden Organismen katalysiert. Enzyme ermöglichen oder beschleunigen Stoffwechselprozesse ohne dabei selbst verbraucht zu werden.

Enzystierung: Bildung von Zysten. Einkapselung von Zerkarien zu Metazerkarien, ein für den Endwirt infektiöses Ruhe- oder Dauerstadium der Digenea. Der Enzystierungsprozess kann sowohl in der Umwelt, als auch im zweiten Zwischenwirt stattfinden und umfasst die Bildung einer mehrschichtigen Zystenwand, sowie umfassende strukturelle Veränderungen des Parasiten.

Exkretion: Ausscheidung.

Exposition: Aussetzung eines Wirtes gegenüber einem Pathogen.

Exzystierung: Austritt von juvenilen Egel aus den Metazerkarien, häufig im Verdauungstrakt des Wirtes.

Familie: systematische Kategorie, beinhaltet eine oder mehrere ähnliche oder untereinander verwandte Gattungen und steht unterhalb der Kategorie Ordnung.

Fasciola hepatica: Großer Leberegel, Verursacher der Fasziole. Die Übertragung von *Fasciola hepatica* auf den Endwirt findet durch die orale Aufnahme von infektiösen Metazerkarien statt. Es dienen sowohl Menschen, als auch Tiere (üblicherweise Wiederkäuer) als Endwirte, die Hauptzwischenwirtsschnecke in Europa ist *Galba truncatula*.

Fasciolidae: kosmopolitisch vorkommende Familie der Überfamilie Echinostomatoidea (Digenea: Echinostomida). Vertreter der Familie Fasciolidae werden gemeinhin als Leberegel bezeichnet. Ihre Zerkarien enzystieren sich meist an Wasserpflanzen und werden oral vom Endwirt aufgenommen, Adulttiere parasitieren im Gallengangsystem der Leber. Der bekannteste Vertreter der Fasciolidae ist der Große Leberegel *Fasciola hepatica*.

Fascioloides magna: Amerikanischer Riesenleberegel. *Fascioloides magna* ist Verursacher der Fasziole bei Wiederkäuern in Teilen Nordamerikas und Europas. Als Hauptzwischenwirtsschnecke in Europa dient die kleine Sumpfschnecke *Galba truncatula*.

Die Infektion des Endwirtes findet durch die orale Aufnahme von infektiösen Metazerkarien statt.

Faszioloidose: Krankheit, die durch den Befall mit dem Amerikanischen Riesenleberegel *Fascioloides magna* verursacht wird. Als typische Endwirte für *Fascioloides magna* dienen Wiederkäuer wie Wapitis und Karibus, in denen die Infektionen meist subklinisch verlaufen. Es können auch domestizierte Wiederkäuer befallen werden, welche aufgrund schwerer Leberschäden oftmals kümmern und frühzeitig verenden. Infektionen von Menschen wurden bislang nicht beobachtet.

Fasziolose: Krankheit, die durch den Befall mit den Leberegel *Fasciola hepatica* (weltweit) oder *Fasciola gigantica* (tropische Fasziolose, überwiegend in Asien und Afrika) verursacht wird. Menschliche Fasziolose wird oftmals durch den Verzehr roher Brunnenkresse erworben und kann sowohl im akuten, als auch im chronischen Stadium eine Reihe klinischer Symptome, wie beispielsweise eine Vergrößerung der Leber oder Gallengangsentzündungen, hervorrufen. Der Befall domestizierter Wiederkäuer kann zu beträchtlichen produktiven und ökonomischen Verlusten führen.

Fäzes: Kot, Stuhl.

fluoreszieren: durch emittiertes Licht erzeugtes Leuchten nach einer UV-Bestrahlung.

***Galba truncatula*:** Kleine Sumpfschnecke, Leberegelschnecke. *Galba truncatula* ist eine amphibisch lebende Süßwasserschnecke und, unter anderem, europäischer Hauptzwischenwirt für die Leberegel *Fasciola hepatica* und *Fascioloides magna*.

Gattung: systematische Kategorie, die eine oder mehrere ähnliche oder untereinander verwandte Arten beinhaltet. Steht unterhalb der Kategorie Familie.

Gelelektrophorese: Methode zur Trennung von geladenen Biomolekülen (z.B. Nukleinsäuren). Die Moleküle werden durch ein elektrisches Feld nach Größe und elektrischer Ladung in einem Gel (z.B. aus Agarose) aufgetrennt.

Gen: kleinste Funktionseinheit des Genoms, die die genetische Information für ein Genprodukt (Protein, funktionelle RNA) enthält.

Generationswechsel: Entwicklung von Lebewesen über mehrere Generationen, welche sich meist in ihrer Morphologie voneinander unterscheiden. Ein Generationswechsel ist häufig mit einem Wirtswechsel verbunden.

Genetik: Vererbungslehre. Als Genetik bezeichnet man die Wissenschaft von den Strukturen und Prozessen, die die Konstanz und Veränderlichkeit der genetischen Information und ihre Realisierung bewirken. Die Vererbungslehre wurde 1865 durch Mendel begründet.

Genom: gesamte genetische Information eines Organismus.

Geografisches Informationssystem (GIS): computergestützte Analyse verschiedener kartierter Daten, in der Parasitologie beispielsweise Krankheitsprävalenz, Wirtsverteilung und agroökologische Daten.

Gigantismus: Riesenwuchs, beispielsweise bei manchen Schneckenarten als Reaktion auf eine Infektion mit digenen Trematoden.

Habitat: Wohnstätte. Standort, an dem eine Lebensgemeinschaft verschiedener Arten (Biozönose) oder eine Art regelmäßig vorkommt.

Helminthen: Eingeweidewürmer.

Homogenisierung: Herstellung einer gleichartigen, gleichmäßigen (=homogenen) Menge eines Stoffes.

homolog: Merkmale oder Strukturen, die sich aus einer gemeinsamen Urform entwickelt haben. Die Form und Funktion muss dabei nicht übereinstimmen.

Hybridisierung: Anlagerung von Primern an komplementäre, einzelsträngige DNA-Zielsequenzen, wodurch die DNA zwischen dem Primerpaar in der PCR amplifiziert werden kann.

Infektion: Befall eines Wirtes mit einem Fremdorganismus, gekennzeichnet durch das Eindringen und die Vermehrung des Fremdorganismus, sowie einer Abwehrreaktion. Eine Infektion muss nicht zu einer Infektionskrankheit führen.

inkubieren: Lösungen in Reaktionsgefäßen für einen bestimmten Zeitraum auf eine gewünschte Temperatur erwärmen, um beispielsweise eine enzymatische Reaktion zu starten. Dazu kann ein Inkubationsschüttler verwendet werden, bei dem die Lösungen zusätzlich noch mit einer festlegbaren Drehzahl (rpm) ständig durchmischt werden können.

Intern transkribierte Spacer (ITS)-Regionen: nicht-kodierende DNA, welche in Eukaryoten die Gene der 18S-, 5,8S und 28S-rRNA einer Transkriptionseinheit voneinander trennt. Da keine Informationen kodiert werden, ist dieser DNA-Bereich üblicherweise sehr variabel.

Inzidenz: Anzahl der Krankheitsfälle in einem bestimmten Zeitraum.

juvenil: jugendlich, noch nicht geschlechtsreif.

Klade: Monophylum. Gruppe von Arten, die von einer nur ihnen gemeinsamen Stammart abstammen.

Klasse: systematische Kategorie, beinhaltet eine oder mehrere ähnliche oder stammesgeschichtlich verwandte Ordnungen und steht unterhalb der Kategorie Stamm.

Klassifikation: Zusammenfassen von Arten zu Gruppen (höhere Taxa) und ihre hierarchische Anordnung.

kodierende DNA: Anteil der DNA, der die in den Genen enthaltenen Informationen für die Proteinsynthese trägt.

koprologische Untersuchung: Untersuchung von Stuhl/Kot.

Kreuzreaktion: Vervielfältigung unerwünschter DNA-Sequenzen in einer PCR-Reaktion aufgrund unspezifischer Primerbindung (Misspriming).

lateral: seitlich gelegen.

Lebenszyklus: in der Biologie umfasst der Lebenszyklus die Individualentwicklung von der befruchteten Eizelle bis zur adulten Form.

Leberegel: siehe Fasciolidae.

longitudinal: längsgerichtet.

Lymnaeidae: Schlammschnecken, Familie der Lungenschnecken (Pulmonata). Schlammschnecken kommen weltweit vor und leben ausschließlich im Süßwasser.

Majority rule Konsensusbaum: Baum, der die am häufigsten vorkommenden Knoten der zuvor erstellten Bäume eines bestimmten Taxonsets zusammenfassend darstellt.

makroskopisch: mit bloßem Auge sichtbar.

Marker: Gemisch aus DNA-Strängen bekannter Größe, welches zur Bestimmung von Amplikongrößen in Gelelektrophoresen mitanalysiert wird. DNA-Marker in der Gelelektrophorese werden aufgrund ihres Bandenmusters auch als „DNA-Leitern“ bezeichnet.

Maximum-Likelihood: maximale Wahrscheinlichkeit, merkmalsbasierte Methode zur Rekonstruktion phylogenetischer Bäume. Es wird jener Baum ermittelt, der bei den gegebenen Daten unter einem bestimmten Evolutionsmodell am Wahrscheinlichsten ist.

Maximum-Parsimony: maximale Sparsamkeit, merkmalsbasierte Methode zur Rekonstruktion phylogenetischer Bäume. Es wird jener Baum ermittelt, der mit den wenigsten Mutationen erreicht werden kann.

Metazerkarie: für den Endwirt infektiöses Ruhe- oder Dauerstadium der Digenea. Als Metazerkarien bezeichnet man enzystierte Zerkarien. Sie können sich sowohl in der Umwelt (z.B. an Wasserpflanzen wie bei *Fasciola hepatica* oder *Fascioloides magna*), als auch im zweiten Zwischenwirt befinden. Nach oraler Aufnahme durch den Endwirt exzystieren sich aus den Metazerkarien juvenile Egel, welche sich nachfolgend zu Adulttieren entwickeln.

Mimikry: Nachahmung eines anderen Lebewesens zum Selbstschutz und der Täuschung.

Mirazidie: aus dem Ei hervorgehende Wimpernlarve der Digenea. Die Mirazidien mancher Trematodenarten schlüpfen in der Umwelt und suchen als im Wasser freibewegliches Entwicklungsstadium aktiv den ersten Zwischenwirt auf. Es ist auch möglich, dass Mirazidien direkt im Darm des ersten Zwischenwirtes schlüpfen.

Mischinfektion: gleichzeitige Infektion mit mehreren verschiedenen Krankheitserregern.

Misspriming: Hybridisierung eines Primers mit einer DNA-Sequenz, welche nicht der Ziel-DNA entspricht.

Mollusken: Weichtiere (Mollusca). Zu den Mollusken werden unter anderem Schnecken, Muscheln und Tintenfische gezählt.

Monitoring: systematische Überwachung eines bestimmten Zustandes oder Vorganges.

monophyletisch: von einer nur ihnen gemeinsamen Stammart abstammende Gruppe.

Morbidität: Anzahl der Erkrankungen innerhalb einer Population, wird beschrieben durch Morbiditätsziffern, wie z.B. die Prävalenz.

morphologisch: auf das Aussehen, die Form und Struktur von Organismen oder Organen bezogen. Als Morphologie bezeichnet man die Wissenschaft von Gestalten und Formen.

Mortalität: Anzahl der Sterbefälle im Verhältnis zum Durchschnittsbestand einer Population.

Multiplex-PCR: PCR-Methode, in der mehrere verschiedene Primerpaare gleichzeitig eingesetzt werden. Dadurch können unterschiedliche Sequenzen gleichzeitig in einem einzigen Reaktionsschritt amplifiziert werden.

Negativkontrolle: spezieller PCR-Ansatz, in welchem keine DNA zugegeben wird. Die Negativkontrolle sollte in der Gelelektrophorese keine Bande hervorbringen (=negativ bleiben). Damit soll unter anderem sichergestellt werden, dass keine Kontaminationen das Testergebnis verfälschen.

Neighbor-Joining (NJ): Distanzmatrixverfahren zur Rekonstruktion phylogenetischer Bäume. Die Baumberechnung durch NJ basiert auf den Distanzen zwischen den betrachteten Sequenzen.

Neodermis: siehe Tegument.

Nukleinsäuren: kettenförmige, unverzweigte Makromoleküle, in denen Nukleotidbausteine über Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpft sind. Man unterscheidet Desoxyribonukleinsäuren (DNA) und Ribonukleinsäuren (RNA).

Nukleotid: Einzelbaustein der Nukleinsäuren (DNA, RNA). Ein Nukleotid besteht aus einer Base (Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin oder Uracil), welche an ein Zuckermolekül (Ribose oder Desoxyribose) gebunden ist, welches wiederum mit einem Phosphatrest verknüpft ist.

Ordnung: systematische Kategorie, die eine oder mehrere ähnliche oder untereinander verwandte Familien beinhaltet und unterhalb der Kategorie Klasse steht.

Outgroup: Taxon, mit der ein phylogenetischer Baum gewurzelt wird.

paraphyletisch: Taxon, welches nicht alle Nachfahren einer Stammart umfasst.

Parasit: in (Endoparasit) oder an (Ektoparasit) einem Wirt lebender Schmarotzer. Parasiten leben auf Kosten ihres Wirtes, indem sie diesen Energie (meist Nahrung) entziehen. Der Wirt wird zwar durch den Parasiten geschädigt, muss dabei aber nicht zwangsläufig getötet werden.

Parasitose: Erkrankung an einem Parasiten.

patente Infektion: Befall mit Parasiten, bei der die Fortpflanzungsprodukte des Parasiten vom Wirt ausgeschieden werden und somit der Lebenszyklus des Parasiten fortgesetzt werden kann.

Pathogen: Krankheitserreger.

Persistenz: Andauern eines Zustandes über einen längeren Zeitraum.

Phylogenie: Klassifikationsschema, welches die evolutionären Beziehungen von Organismen darstellt.

Phylum: siehe Stamm.

Plathelminthes: Plattwürmer. Plathelminthes verfügen über einen dorsoventral abgeflachten Körper. Zwischen Darm und Körperwand befindet sich Bindegewebe, in welches die Organe eingelagert sind. Zu den Plathelminthes werden sowohl parasitische (z.B. Trematoda), als auch freilebende Formen gezählt.

(DNA-) Polymerase: Enzym, welches zur DNA-Synthese benötigt wird. In der PCR eingesetzte DNA-Polymerasen umfassen beispielsweise:

Taq-Polymerase: hitzestabile DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus*.

Hot-Start Polymerase: die DNA-Polymerase ist beispielsweise an einen Antikörper gebunden und wird erst aktiviert, wenn das Reaktionsgemisch eine bestimmte Temperatur erreicht hat.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR): sensitives Verfahren zur exponentiellen Vervielfältigung von bestimmten DNA-Abschnitten. Im Reaktionsgemisch werden unter anderem eine hitzestabile DNA-Polymerase, ein spezifisches Primerpaar, sowie die zu amplifizierende DNA benötigt. Jede PCR-Reaktion durchläuft mehrere Zyklen von Denaturierung (Schmelzen) der Doppelstrang-DNA, Primerhybridisierung (Anlagerung), sowie Elongation (Verlängerung) des neusynthetisierten Stranges.

Population: Gesamtheit an Individuen in einem bestimmten Gebiet, die sich miteinander fortpflanzen (können).

Positivkontrolle: spezieller PCR-Ansatz, in welchem eine definierte Menge bekannter DNA zugegeben wird, um ein bestimmtes Ergebnis in der Gelelektrophorese zu erzielen. Damit soll unter anderem sichergestellt werden, dass die PCR-Reaktion richtig funktioniert hat.

posterior: hinten liegend.

Präpatenzzeit: Zeitraum von der Infektion bis zur ersten Eiausscheidung. Auf die Präpatenzperiode folgt die Patenzperiode (Zeitdauer der Eiausscheidung).

Prävalenz: Anteil der erkrankten Individuen einer Population zu einem bestimmten Zeitpunkt oder innerhalb eines bestimmten Zeitraumes.

Primer: kurzes Oligonukleotid (17-30 bp Länge), welches mit Einzelstrang-DNA hybridisieren kann. In einer PCR werden üblicherweise zwei Primer (Forward- und Reverse-Primer) eingesetzt, welche den zu amplifizierenden DNA-Bereich flankieren. Die beiden Primer bilden jeweils den Startpunkt für die Strangsynthese.

Proteinase: eiweißspaltendes Enzym.

Protonephridien: einfache, blind geschlossene Ausscheidungsorgane der Plathelminthen und anderen Wirbellosen. Protonephridien bestehen aus einem zur Leibeshöhle blind geschlossenen Röhrensystem, welches mit Terminalzellen im Körperinneren beginnt. In diesen Terminalzellen befinden sich Zilienbündel, durch deren schlagen (auch als „Wimpernflamme“ bezeichnet) Unterdruck erzeugt wird, welcher ein Einströmen von Flüssigkeit in die Röhren bewirkt. Nachdem die Flüssigkeit (ultra-)filtriert wurde und weiteren Modifikationen unterlaufen ist, wird der nun sogenannte „Endharn“ über eine oder mehrere Exkretionsporen in die Umwelt abgegeben.

Purin: Baustein von Nukleinsäuren, der ein stickstoffhaltiges Doppelringsystem enthält. Adenin und Guanin sind Purine der DNA und RNA.

Pyrimidin: Baustein von Nukleinsäuren, der ein stickstoffhaltiges, einfaches Ringsystem enthält. Pyrimidine der DNA sind Cytosin und Thymin, die RNA enthält Uracil statt Thymin.

Redie: Entwicklungsstadium von Digenea, welches sich durch asexuelle Vermehrung aus den Keimballen von Sporozysten oder Mirazidien entwickelt. Redien befinden sich häufig in der Mitteldarmdrüse des ersten Zwischenwirtes und ernähren sich von Wirtsgewebe. Aus den Keimballen der Redien entwickeln sich Zerkarien, welche üblicherweise durch eine Geburtspore entlassen werden.

Remote sensing (RS): Fernerkundung. Als RS bezeichnet man Analysen zur Informationsgewinnung von Objekten, Gebieten oder Vorgängen, zu denen kein direkter Zugang besteht. Die Datenerfassung erfolgt über die Analyse elektromagnetischer Strahlung.

ribosomale DNA (rDNA): Abschnitte der DNA, in denen die Gene für die ribosomale RNA lokalisiert sind.

RNA (ribonucleic acid): Ribonukleinsäure. Einzelsträngige Nukleinsäuren aus ribosehaltigen Nukleotiden mit den Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Uracil, welche die umgeschriebenen genetischen Informationen der DNA enthalten. Es gibt verschiedene Formen von Ribonukleinsäuren, wie die rRNA, die Bestandteil der Ribosomen ist, und die mRNA und tRNA, welche an der Proteinbiosynthese beteiligt sind. Das Genom mancher Viren besteht aus RNA.

Schmelztemperatur (T_m): Als Schmelztemperatur bezeichnet man jene Temperatur, bei der sich die Wasserstoffbrückenbindungen eines doppelsträngigen Nukleinsäuremoleküls lösen und dadurch zwei Einzelstränge entstehen.

Schwestergruppen: Taxa, die einen nur ihnen gemeinsamen Vorfahren besitzen.

Sektion: Zerteilung und mikroskopische Untersuchung der inneren Organe.

Sequenz: Reihenfolge der Basen einer DNA.

Sequenzierchromatogramm: visualisiertes Ergebnis einer DNA-Sequenzierung.

sequenzieren: Ermittlung der Reihenfolge der Basen einer DNA (=Sequenz).

Single Nucleotide Polymorphism (SNP): Einzelnukleotidpolymorphismus. Variation eines einzelnen Basenpaars in einem DNA-Strang.

Spezies: siehe Art.

Sporozyste: Entwicklungsstadium von Digenea, welches sich aus Mirazidien entwickelt. Sporozysten befinden sich im ersten Zwischenwirt und beinhalten ihrerseits Keimballen, welche sich in Tochtersporozysten, Redien oder direkt in Zerkarien differenzieren können. Die darmlosen Sporozysten weisen bereits ein Tegument auf.

Stamm: systematische Kategorie, welche eine oder mehrere ähnliche oder stammesgeschichtlich verwandte Klassen beinhaltet.

Substitution: Austausch von Basen in Nukleinsäuren.

subterminal: nahe dem Ende liegend.

Symptom: Krankheitszeichen.

Synzytium: vielkerniger Zellverband, welcher durch die Verschmelzung von Einzelzellen oder durch Endomitose entsteht.

Systematik: Teilbereich der Biologie zur Erfassung und Darstellung der Vielfaltigkeit von Organismen.

Taxon (Pl. Taxa): beschreibbare natürliche Einheit von Organismen, die von anderen Organismen unterscheidbar ist. Man unterscheidet mehrere taxonomische Rangstufen (Kategorien): Reich (Regum), Abteilung (Divisio bzw. zoolog. Phylum), Klasse (Classis), Ordnung (Ordo), Familie (Familia), Gattung (Genus), Art (Species).

Tegument: sekundäre Körperbedeckung von Saugwürmern, Bandwürmern und Hakensaugwürmern, die zum Schutz und der Nährstoffresorption dient.

Transition: Punktmutation, durch die ein Purin durch ein anderes Purin bzw. ein Pyrimidin durch ein anderes Pyrimidin ersetzt wird.

Transmission: Übertragung, beispielsweise von Krankheitserregern.

Transversion: Punktmutation, durch die ein Purin durch ein Pyrimidin oder umgekehrt ersetzt wird.

Trematoda: Saugwürmer. Vertreter dieser obligat parasitischen Klasse der Plathelminthes verfügen über charakteristische Halteapparate, sowie ein Tegument, und sind meist zwittrig. Die Trematoda umfassen die beiden Schwesterklassen Digenea und Aspidogastrea.

Trematodose: Befall durch Trematoden.

Triclabendazol: Anthelminthikum, welches, wie Albendazol und Mebendazol, zur Gruppe der Benzimidazole gezählt wird. Triclabendazol ist Mittel der Wahl bei Infektionen mit *Fascioloides magna*, *Fasciola hepatica* und *Fasciola gigantica* und wirkt sowohl gegen juvenile, als auch gegen adulte Leberegelstadien. Im Handel ist Triclabendazol unter dem Namen Fasinex® (Novartis) erhältlich und wird oral verabreicht. Chemischer Name: 6-chlor-5-(2,3-dichlorphenoxy)-2-methylthio-benzimidazol.

Vegetation: Gesamtheit an Pflanzen(-gesellschaften), die in einem bestimmten Gebiet wachsen.

ventral: bauchwärts.

ventrolateral: zum Bauch und zur Seite hin gelegen. Setzt sich zusammen aus ventral und lateral.

Vertebrat: Wirbeltier.

veterinärmedizinisch: tiermedizinisch.

vortexen: die gründliche Durchmischung von Lösungen in Reaktionsgefäßen mittels eines Schüttelgeräts (Vortex).

Wirt: Lebewesen, das einen Parasiten mit Nährstoffen versorgt. Ein Wirt kann auch als Schutz, Transportmöglichkeit und Fortpflanzungsstätte dienen. Man unterscheidet mehrere Arten von Wirten, unter anderem:

Endwirt: Wirt, in welchem Parasiten geschlechtsreif werden.

Fehlwirt: Zwischen- oder Endwirt, in dem keine Weiterentwicklung des Parasiten stattfindet.

Hauptwirt: Zwischen- oder Endwirt, welcher von bestimmten Parasitenarten bevorzugt befallen wird und eine für den Zyklus des jeweiligen Parasitenstadiums erhaltende Rolle spielt.

Zwischenwirt: Wirt, in welchem sich Parasiten weiterentwickeln, aber nicht geschlechtsreif werden.

Zerkarie: Schwanzlarve. Entwicklungsstadium von digenen Trematoden, welches sich durch asexuelle Vermehrung aus den Keimballen von Sporozysten, Mirazidien oder Redien entwickelt. Zerkarien verlassen meist aktiv den ersten Zwischenwirt um nachfolgend den nächsten Zwischenwirt oder Endwirt zu penetrieren. Im Fall von beispielsweise *Fasciola hepatica* oder *Fascioloides magna* enzystieren sich die Zerkarien allerdings an Wasserpflanzen zu Metazerkarien, welche oral vom Endwirt aufgenommen werden. Es ist auch möglich, dass die Zerkarien vom ersten Zwischenwirt ausgeschieden und vom zweiten Zwischenwirt oral aufgenommen werden. Zerkarien entwickeln sich üblicherweise in der Umwelt oder im zweiten Zwischenwirt zu Metazerkarien.

Zilien: Wimpern, die beispielsweise als Bewegungsorganellen von Mirazidien dienen.

Zusätzlich verwendete Literatur:

ASPÖCK H. (Hsg.) (2002): Amöben, Zecken, Bandwürmer. Parasiten und parasitäre Erkrankungen des Menschen in Mitteleuropa. Denisia 6, Kat. des OÖ Landesmuseums, 600 pp.

BROWN T. A. (1999): Genomes. BIOS Scientific Pub. Oxford, 472 pp.

PSCHYREMBEL W. (1994): Medizinisches Wörterbuch. Sonderausgabe Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. 257. Auflage, Nikol Verlagsgesellschaft mbH Hamburg, 1722 pp.

6.2. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BMPR2	Knochen-morphogenetischer Proteinrezeptortyp II (bone morphogenetic protein receptor II)
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Chs7	Schlüsselregulator der Chitinsynthase III
COX	Cytochrom-c-Oxidase
COX1	Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit I
Cyt-b	Cytochrom b
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMBOSS	European Molecular Biology Open Software Suite
et al.	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FaNaC	FMRFamide-gated sodium channel
FGF10	Fibroblasten-Wachstumsfaktor 10 (fibroblast growth factor 10)
Fur1	Furin1
g	Gramm
G	Guanin
GIS	geografisches Informationssystem
ITS	Intern transkribierter Spacer
m	Minute
M	Mittelwert
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mm	Millimeter
n	Probenumfang

NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid (=Kochsalz)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
NJ	Neighbor-Joining
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
OTU	operationale taxonomische Einheit (operational taxonomic unit)
OSBP1	Oxysterol-binding protein 1
p.i.	post infectionem
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
Probennr.	Probennummer
rDNA	ribosomale DNA
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	Drehzahl (rounds per minute)
rRNA	ribosomale RNA
RS	Remote sensing
s	Sekunde
S	Svedberg
SCAR	Sequence characterized amplified region
SD	Standardabweichung
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus (Single nucleotide polymorphism)
sp.	species
spp.	mehrere Arten (Plural von sp.)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Azetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
U	Einheit (Unit)
V	Volt
v. Chr.	vor Christus
Vol.	Band (Volume)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)
Wzx	O-Antigen Flippase
zit. in	zitiert in
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

6.3. Literatur

1. ABROUS M, RONDELAUD D, DREYFUSS G. (1996): *Paramphistomum daubneyi* and *Fasciola hepatica*: the effect of dual infection on prevalence and cercarial shedding in preadult *Lymnaea glabra*. J Parasitol. 82:1026-1029.
2. ABROUS M, RONDELAUD D, DREYFUSS G, CABARET J. (1999): Infection of *Lymnaea truncatula* and *Lymnaea glabra* by *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi* in farms in central France. Vet Res. 30:113-118.
3. ADEMA CM, LOKER ES. (1997): Specificity and immunobiology of larval digenean-snail associations. In: FRIED B, GRACZYK TK. (Eds.), Advances in Trematode Biology, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 229-253.
4. AMICI RR. (2001): The history of Italian parasitology. Vet Parasitol. 98:3-30.
5. ANDREWS SJ. (1999): The Life Cycle of *Fasciola hepatica*. In: DALTON JP, Fasciolosis. Wallingford, Oxon, UK: CABI Pub, pp. 411-434.
6. AUER H. (2009): Helminthozoonosen in Mitteleuropa: Epidemiologie - Klinik - Diagnostik - Therapie. Vorlesung, Abt. f. Med. Parasitologie, Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin, Medizinische Universität Wien.
7. AUGOT D, ABROUS M, RONDELAUD D, DREYFUSS G. (1996): *Paramphistomum daubneyi* and *Fasciola hepatica*: The redial burden and cercarial shedding in *Lymnaea truncatula* subjected to successive unimiracidial cross-exposures. Parasitol Res. 82:623-627.
8. BALBO T, ROSSI L, MENEGUZ PG. (1989): Integrated control of *Fascioloides magna* infection in northern Italy. Parassitologia. 31:137-144.
9. BARGUES MD, VIGO M, HORAK P, DVORAK J, PATZNER RA, POINTIER JP, JACKIEWICZ M, MEIER-BROOK C, MAS-COMA S. (2001): European Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences. Infec Gen Evol. 1:85-107.
10. BASSI R. (1875): Sulla cachessia ittero-verminosa, o marciaia dei cervi, causata dal *Distomum magnum*. Medico Veterinario Torino. 4:497-515.
11. BAUDOIN M. (1975): Host castration as a parasitic strategy. Evolution. 29:335-352.
12. BAYNE CJ, LOKER ES. (1987): Survival within the snail host. In: ROLLINSON D, SIMPSON AJG. (Eds.), The Biology of Schistosomes: From Genes to Latrines, San Diego, Academic Press Ltd, pp. 321-346.
13. BENEDEN PJ. VAN (1858): Mémoire sur les vers intestinaux. Mémoire qui a obtenu de l'Institut de France (Académie des Sciences) le Grand prix des Sciences physiques pour l'année 1853. C.R. Seanc. Acad. Sci. 2:1-376.
14. Bidloo GG. (1698): Brief van G. Bidloo aan Antony van Leeuwenhoek; wegens de dieren, welke men zomtyds in de lever der schaapen en andere beestien vind. Delft, 34 pp. (Englischer Abstract in Philosophical Transactions. 22:571-572.)
15. BIGGERI A, CATELAN D, DREASSI E, RINALDI L, MUSELLA V, VENEZIANO V, CRINGOLI G. (2007): Multivariate spatially-structured variability of ovine helminth infections. Geospat Health. 2(1):97-104.

16. BOJANUS LH. (1818): Kurze Nachricht über die Cercarien und ihren Fundort. Isis (Oken). 688-689.
17. BORAY JC. (1964): Studies on the ecology of *Lymnaea tomentosa*, the intermediate host of *Fasciola hepatica*. Australian Journal of Zoology. 12:217-230.
18. BOUVRY M, RAU ME. (1984): *Paramphistomum* spp. in Dairy Cattle in Quebec. Can Vet J. 25:353-356.
19. Braun M. (1889-1892): Vermes. In: H. G. Braun's Klassen und Ordnungen des Tierreichs. Trematoda. Bd. 4. Abt. F. Trematoda, pp. 1-144.
20. BRAY RA. (2008a): Introduction and Key to Superfamilies. In: BRAY RA, GIBSON DI, JONES A. [Eds.], Keys to the Trematoda, Vol. 3, CAB International, Wallingford, pp. 1-5.
21. BRAY RA, GIBSON DI, JONES A. [Eds] (2008b): Keys to the Trematoda. Vol. 3. CAB International, Wallingford. 824 pp.
22. BRIE J DE (1379) : Le bon berger, ou le vray régime et gouvernement des bergers et bergères. (Auszüge publiziert in Bon Berger von P. Lacroix. Isid Liseux, Paris, 1879).
23. BURPO FJ. (2001): A critical review of PCR primer design algorithms and cross-hybridization case study. Biochemistry. 218:1-11.
24. BUZZELL GR. (1983): Composition, secretion, and fate of the glands in the miracidium and sporocyst of *Fasciola hepatica*. Journal of Helminthology. 57:79-84.
25. CALVO-UGARTEBURU C, MCQUAID CD. (1998): Parasitism and invasive species: effects of digenetic trematodes on mussels. Mar Ecol Prog Ser. 169:149-163.
26. CARON Y, RONDELAUD D, LOSSON B. (2008): The detection and quantification of a digenean infection in the snail host with special emphasis on *Fasciola* sp. Parasitol Res. 103 :735-744.
27. CARUS JV. (1863): Vermes. In: PETERS WCH, CARUS JV, GERSTAECKER CEA. (Eds.), Handbuch der Zoologie, Verlag von Wilhelms Engelmann, Leipzig, pp. 422-484.
28. CHAPUIS E, TROUVÉ S, FACON B, DEGEN L, GOUDET J. (2007): High quantitative and no molecular differentiation of a freshwater snail (*Galba truncatula*) between temporary and permanent habitats. Mol Ecol. 16:3484-3496.
29. CHENG TC. (1986): Digenea: The digenetic Trematodes. In: Cheng TC., General Parasitology, 2nd Edition, Academic Press, Inc, pp. 299-377.
30. CHENG TC, SHUSTER CN JR, ANDERSON AH. (1966): A comparative study of the susceptibility and response of eight species of marine pelecypods to the trematode *Himasthla quissetensis*. Trans Am Microsc Soc. 85:284-295.
31. CHIPEV HH. (1993): Decoy effect on host infection by miracidia within snail communities. Parasitology. 106:265-276.
32. CHUNG PR, JUNG Y, PARK YK, HWANG MK. (2001): *Austropeplea ollula* (Pulmonata: Lymnaeidae): A new molluscan intermediate host of a human intestinal fluke, *Echinostoma cinetorchis* (Trematoda: Echinostomatidae) in Korea. The Korean Journal of Parasitology. 39(3):247-253.
33. COUSTAU C, RENAUD F, DELAY B, ROBBINS I, MATHIEU M. (1991): Mechanisms involved in parasitic castration: In vitro effects of the trematode *Proserhynchus squamatus* on the

- gametogenesis and the nutrient storage metabolism of the marine bivalve mollusc *Mytilus edulis*. *Experimental Parasitology*. 73:36–43.
34. CRIBB HT, BRAY RA, OLSON PD, LITTLEWOOD DTJ. (2003): Life cycle Evolution in the Digenea: a New Perspective from Phylogeny. *Advances in parasitology*. 54:197-254.
 35. CRIBB TH. (1988): Life cycle and biology of *Prototransversotrema steeri* Angel, 1969 (Digenea: Transversotrematidae). *Aust J Zool*. 36:111–29.
 36. CRIBB TH, BRAY RA, LITTLEWOOD DTJ, PICHELIN SP, HERNIOU EA. (2001): The Digenea. In: LITTLEWOOD DTJ, BRAY RA. (Eds.), *Interrelationships of the Platyhelminthes*, London, Taylor & Francis, pp. 168-185.
 37. CRINGOLI G, TADDEI R, RINALDI L, VENEZIANO V, MUSELLA V, CASCONI C, SIBILIO G, MALONE JB. (2004): Use of remote sensing and geographical information systems to identify environmental features that influence the distribution of paramphistomosis in sheep from the southern Italian Apennines. *Vet Parasitol*. 122:15-26.
 38. CUCHER MA, CARNEVALE S, PREPELITCHI L, LABBE JH, WISNIVESKY-COLLI C. (2006): PCR diagnosis of *Fasciola hepatica* in field-collected *Lymnaea columella* and *Lymnaea viatrix* snails. *Vet Parasitol*. 137:74-82.
 39. DAR Y, RONDELAUD D, DREYFUSS G. (2003): Cercarial shedding from *Galba truncatula* infected with *Fasciola gigantica* of distinct geographic origins. *Parasitol Res*. 89:185-187.
 40. DE JONG-BRINK M, BERGAMIN-SASSEN M, SOLIS SOTO M. (2001): Multiple strategies of schistosomes to meet their requirements in the intermediate snail host. *Parasitology*. 123:129-141.
 41. DEL CAMPILLO C, VÁZQUEZ R (1999): *Parasitología veterinaria*. McGraw-Hill Interamericana, Madrid. 968 pp.
 42. DIAWARA M, AYADI A, RONDELAUD D. (2003): *Fasciola hepatica*: the development of tissue lesions and their frequencies in naturally-infected *Galba truncatula*. *Parasitol Res*. 90(3):257-60.
 43. DOUMENGE JP, MOTT KE. (1984): Global distribution of schistosomiasis: CEGET/WHO atlas. *World Health Stat Q*. 37:186-99.
 44. DREYFUSS G, VIGNOLES P, RONDELAUD D. (2005): *Fasciola hepatica*: epidemiological surveillance of natural watercress beds in central France. *Parasitol Res*. 95:278-282.
 45. DUNKEL AM, ROGNIE MC, JOHNSON GR. (1996): Distribution of potential intermediate hosts for *Fasciola hepatica* and *Fascioloides magna* in Montana, USA. *Veterinary Parasitology*. 62:63-70.
 46. DUSCHER R, DUSCHER G, HOFER J, TICHY A, PROSL H, JOACHIM A. (2009): *Fasciola hepatica* – Evaluierung von zwei Tankmilch-ELISAs für ein flächendeckendes Screening in Kärnten. Präsentation bei der 43. Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie.
 47. EBERT D, CARIUS HJ, LITTLE T, DECAESTECKER E. (2004): The evolution of virulence when parasites cause host castration and gigantism. *Am Naturalist*. 164(Suppl):19-32.
 48. ECKERT J, FRIEDHOFF KT, ZAHNER H, DEPLAZES P. (2008): *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin*, 2. Auflage. Enke Verlag, Stuttgart. 648 pp.
 49. ERHARDOVÁ B. (1961): *Fascioloides magna* in Europe. *Helminthologia*. 3:91-106.

50. ERHARDOVÁ-KOTRLÁ B. (1968): Parthenogenesis of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) under natural conditions. *Folia Parasitologica*. 15:233–242.
51. ERHARDOVÁ-KOTRLÁ B, KOTRLÝ A. (1968): Einschleppen eines Parasiten der Gattung *Fascioloides* beim Import lebenden Wildes aus anderen Kontinenten. *Zeitschr Jagdwiss*. 14:170-176.
52. ERHARDOVÁ-KOTRLÁ B. (1971): The occurrence of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) in Czechoslovakia. *Academia, Praha*.
53. ESTEBAN JG, BARGUES MD, MAS-COMA S. (1998): Geographical distribution, diagnosis and treatment of human fascioliasis: a review. *Res Rev Parasitol*. 58(1):13-42.
54. ESTEBAN JG, GONZALEZ C, CURTALE F, MUÑOZ-ANTOLI C, VALERO MA, BARGUES MD, EL-SAYED M, EL-WAKEEL AA, ABDEL-WAHAB Y, MONTRESOR A, ENGELS D, SAVIOLI L, MAS-COMA S. (2003): Hyperendemic Fascioliasis associated with Schistosomiasis in villages in the Nile delta of Egypt. *Am J Trop Med Hyg*. 69:429-437.
55. EVANS NA. (1985): The influence of environmental temperature upon transmission of the cercariae of *Echinostoma liei* (Digenea: Echinostomatidae). *Parasitology*. 90:269–275.
56. FALTÝNKOVÁ A, NAŠINCOVÁ V, KABLÁSKOVÁ L. (2007): Larval trematodes (Digenea) of the great pond snail, *Lymnaea stagnalis* (L.), (Gastropoda, Pulmonata) in Central Europe: a survey of species and key to their identification. *Parasite – Journal de la Société Française de Parasitologie*. 14:39–51.
57. FALTÝNKOVÁ A, HORÁČKOVÁ E, HIRTOVÁ L, NOVOBILSKÝ A, MODRÝ D, SCHOLZ T. (2006): Is *Radix peregra* a new intermediate host of *Fascioloides magna* (Trematoda) in Europe? Field and experimental evidence. *Acta Parasitologica*. 51:87–90.
58. FARJALLAH S, SANNA D, AMOR N, BEN MEHEL B, PIRAS C, MERELLA P, CASU M, CURINI-GALLETI M, GARIPPA G. (2009): Genetic characterization of *Fasciola hepatica* from Tunisia and Algeria based on Mitochondrial and Nuclear DNA sequences. *Parasitol Res*. 105:1617-1621.
59. FAUST EC. (1919): The excretory system in Digenea. *Biol Bull*. 36:315-344.
60. FAUST EC. (1929): Human helminthology. A manual for clinicians, sanitarians and medical zoologists. Henry Kimpton, London, 616 pp.
61. FELSENSTEIN J. (1981): Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol*. 17(6):368-76.
62. FELSENSTEIN J. (1993): PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.5c. University of Washington, Seattle, Washington.
63. FITCH WM. (1971): Toward defining the course of evolution: Minimal change for a specific tree topology. *Syst. Zool*. 20:406–416.
64. FOREYT WJ. (1996): Susceptibility of bighorn sheep (*Ovis canadensis*) to experimentally-induced *Fascioloides magna* infections. *J Wildl Dis*. 32:556-559.
65. FOREYT WJ, LEATHERS CW. (1980): Experimental infection of domestic goats with *Fascioloides magna*. *American Journal of Veterinary Research*. 41:883-884.
66. FOREYT WJ, TODD AC. (1976): Development of the large American liver fluke *Fascioloides magna* in white-tailed deer, cattle and sheep. *J Parasitol*. 62:26–32.
67. FREDENSBORG BL, MOURITSEN KN, POULIN R. (2004): Intensity-dependent mortality of *Paracalliope novizealandiae* (Amphipoda: Crustacea) infected by a trematode: experimental

- infections and field observations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 311:253–265.
68. FRETTER V, PEAKE J. (1975): *Pulmonates: Functional Anatomy and Physiology*. Vol. 1. Academic Press Inc., London. 417 pp.
 69. GALAKTIONOV KV, DOBROVOLSKIJ AA, GALAKTIONOV KV. (2003): *The Biology and Evolution of Trematodes: An Essay on the Biology, Morphology, Life Cycles, Transmissions, and Evolution of Digenetic Trematodes*. Kluwer, Boston, MA, 620 pp.
 70. GASCUEL O, STEEL M. (2006): Neighbor-joining revealed. *Mol Biol Evol*. 23(11):1997–2000.
 71. GAST RJ, LEDEE DR, FUERST PA, BYERS TS. (1996): Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: Four nuclear 18 S rDNA Sequence Types. *J Euk Microbiol*. 43(6):498-504.
 72. GIBSON DI. (1996): Trematoda. In: MARGOLIS L, KABATA Z. (Eds.), *Guide to the parasites of fishes of Canada, Part IV, Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences*. No. 124. NRC Press, Ottawa, pp. 1-373.
 73. GIBSON DI, JONES A, BRAY RA. [Eds] (2002): *Keys to the Trematoda*. Vol. 1. CAB International, Wallingford, 521 pp.
 74. GIBSON DI, BRAY RA. (1994): The evolutionary expansion and host-parasite relationships of the Digenea. *International Journal for Parasitology*. 24:1213-1226.
 75. GINETSKINSKAYA TA. (1988): *Trematodes, their life cycles, biology and evolution*. Amerind, New Delhi, 559 pp.
 76. Glöer P. (2002): *Die Süßwassergastropoden Nord- und Mitteleuropas, Bestimmungsschlüssel, Lebensweise, Verbreitung*. Die Tierwelt Deutschlands. ConchBooks. Hackenheim, 327 pp.
 77. GLÖER P., MEIER-BROOK C. (1998): *Süßwassermollusken. Ein Bestimmungsschlüssel für die Bundesrepublik Deutschland*. Deutscher Jugendbund für Naturbeobachtung, Hamburg, 136 pp.
 78. GOLD D. (1980): Growth and survival of the snail *Lymnaea truncatula*: effects of soil type, culture medium and *Fasciola hepatica* infection. *Isr J Zool*. 29:163–170.
 79. GOUMGHAR MD, ABROUS M, FERDONNET D, DREYFUSS G, RONDELAUD D. (2000): Prevalence of *Haplometra cylindracea* infection in three species of *Lymnaea* snails in central France. *Parasitol Res*. 86(4):337-339.
 80. GRACZYK TK, FRIED B. (1999): Development of *Fasciola hepatica* in the Intermediate Host. In: DALTON JP. (Ed.), *Fasciolosis*, Wallingford: CABI Publishing, pp. 465–526.
 81. GRYSEELS B, POLMAN K, CLERINX J, KESTENS L. (2006): Human schistosomiasis. *Lancet*. 368:1106–1118.
 82. GUPTA PD. (1984): Helminthology in India in 18th-19th Centuries with some Remarks on its Recent Progress. *IJHS*. 19(2):109-117.
 83. HAAS W, HABERL M. (1997): Host recognition by trematode miracidia and cercariae. In: FRIED B, GRACZYK TK. (Eds.), *Advances in Trematode Biology*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1-30.
 84. HAN JK, CHOI BI, CHO JM, CHUNG KB, HAN MC, KIM CW. (1993): Radiologic findings of human fascioliasis. *Abdom Imaging*. 18:261–264.

85. HENDERSON AR. (2005): The bootstrap: a technique for data-driven statistics. Using computer intensive analyses to explore experimental data. *Clin Chim Acta*. 359:1-26.
86. HILLIS DM, DIXON MT. (1991): Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q Rev Biol*. 66:411-453.
87. HOPE CAWDERY MJ, GETTINBY G, GRAINGER JNR. (1978): Mathematical models for predicting the prevalence of liver-fluke disease and its control from biological and meteorological data. In: *Weather and Parasitic Animal Disease*, World Meteorological Organisation Technical Note. 159:21-38.
88. HORÁČKOVÁ E, NOVOBILSKÝ A. (2005): Intermediate hosts of the large American liver fluke *Fascioloides magna* in the Czech Republic. *Helminthologia*. 42:182.
89. HORAK IG. (1971): Paramphistomosis in domestic ruminants. In: DAWES B. (Ed.), *Advances in Parasitology*, Academic Press, London, pp. 33-72.
90. HOURDIN P, RONDELAUD D, CABARET J. (1992): Effect of concurrent infection with *Muellerius capillaris* on the development of redial generations of *Fasciola hepatica* in *Lymnaea truncatula*. *J Helminthol*. 66(2):108-17.
91. HUANG AQ. (2000): Clinical analysis of cerebral paragonimiasis. *Chin J Zoonoses*. 16:115–116.
92. IARC (1994a): Infection with liver flukes (*Opisthorchis viverrini*, *Opisthorchis felinus* and *Clonorchis sinensis*). IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 61:121-175.
93. IARC (1994b): Infection with schistosomes (*Schistosoma haematobium*, *S. mansoni* and *S. japonicum*). IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 61:45-119.
94. IBRAHIM MM. (2007): Population dynamics of *Chaetogaster limnaei* (Oligochaeta: Naididae) in the field populations of freshwater snails and its implications as a potential regulator of trematode larvae community. *Parasitol Res*. 101:25–33.
95. JANICKI Z, KONJEVIĆ D, SEVERIN K. (2005): Monitoring and treatment of *Fascioloides magna* in semi-farm red deer husbandry in Croatia. *Vet Res Commun*. 29(2):83–88.
96. JENSEN KT, MOURITSEN KN. (1992): Mass mortality in two common soft-bottom invertebrates, *Hydrobia ulvae* and *Corophium volutator* – the possible role of trematodes. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*. 46:329–339.
97. JEON K, KOH WJ, KIM H, KWON OJ, KIM TS, LEE KS, HAN J. (2005): Clinical features of recently diagnosed pulmonary paragonimiasis in Korea. *Chest*. 128:1423–1430.
98. JOHNSON SC. (1967): Hierarchical Clustering Schemes. *Psychometrika*. 2:241-254.
99. JOKELA J, UOTILA L, TASKINEN J. (1993): Effects of castrating trematode parasite *Rhipidocotyle fennica* on energy allocation of fresh-water clam *Anodonta piscinalis*. *Functional Ecology*. 7:332–338.
100. JONES A. (2005A): Family Fasciolidae RAILLIET, 1895. In: JONES A, BRAY RA, GIBSON DI. (Eds.), *Keys to the Trematoda*. Vol 2. CAB International Press, Cambridge, U.K., pp. 79-86.
101. JONES A. (2005b): Introduction and Key to Superfamilies. In: JONES A, BRAY RA, GIBSON DI. (Eds.), *Keys to the Trematoda*. Vol 2. CAB International Press, Cambridge, U.K., pp. 1-4.
102. JONES A, BRAY RA, GIBSON DI. (Eds.) (2005): *Keys to the Trematoda*. Vol. 2. Wallingford: CAB International. 768 pp.

103. KAMBUROV P, OSI KOVSKI E. (1976): The finding of *Paramphistomum microbothrium* in *Bubalus bubalis* in Bulgaria. Khelmintologiya, Sofia. 2:61-67.
104. KANEV I. (1985): On the morphology, biology, ecology and taxonomy of *Echinostoma revolutum* group (Trematoda: Echinostomatidae: Echinostoma). Diss. Thesis, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia. 467 pp.
105. KANEV I, VASSILEV I, BAYSSADE-DUFOUR C, ALBARET JL, CASSONE J. (1987): Cercarial chaetotaxy of *Echinostoma revolutum* (Froelich, 1802) and *E. echinatum* (Zeder, 1803) (Trematoda, Echinostomatidae). Ann Parasitol Hum Comp. 62(3):222-234.
106. KAPLAN RM, DAME JB, REDDY GR, COURTNEY CH. (1995): A repetitive DNA probe für the sensitive detection of *Fasciola hepatica* infected snails. International Journal for Parasitology. 25:601-610.
107. KAPLAN RM, DAME JB, REDDY GR, COURTNEY CH. (1997): The prevalence of *Fasciola hepatica* in its Snail Intermediate Host Determined by DNA Probe Assay. International Journal for Parasitology. 27(12):1585-1593.
108. KAVETSKA K, RZĄD I, SITKO J. (2008): Taxonomic structure of Digenea in wild ducks (Anatinae) from West Pomerania. Wiad Parazytol. 54(2):131-136.
109. KEISER J, UTZINGER J. (2005): Emerging foodborne trematodosis. Emerg Infect Dis. 11:1507–1514.
110. KEISER J, UTZINGER J. (2007): Food-borne trematodiasis: current chemotherapy and advances with artemisinin and synthetic trioxolanes. Trends Parasitol. 23:555–562.
111. KENDALL SB. (1949): Bionomics of *Limnaea truncatula* and the Parthenitae of *Fasciola hepatica* under Drought Conditions. Journal of Helminthology. 23:57–68.
112. KENDALL SB. (1953): The life story of *Limnaea truncatula* under Laboratory Conditions. Journal of Helminthology. 27:17–28.
113. KENDALL SB, PARFITT JW. (1975): Chemotherapy of infection with *Fasciola hepatica* in cattle. Veterinary Record. 97:9-12.
114. KIMURA M. (1980): A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution. 16:111-120.
115. KIRK RS, LEWIS JW. (1993): The life-cycle and morphology of *Sanguinicola inermis* Plehn, 1905 (Digenea: Sanguinicolidae). Syst Parasitol. 25:125-133.
116. KOÇ Z, ULUSAN Ş, TOKMAK N. (2009): Hepatobiliary fascioliasis: imaging characteristics with a new finding. Diagn Interv Radiol. 15:247–251.
117. KØIE M, CHRISTENSEN NØ, NANSEN P. (1976): Stereoscan studies of eggs, free-swimming and penetrating miracidia and early sporocysts of *Fasciola hepatica*. Zeitschrift für Parasitenkunde. 51:79-90.
118. KOSTADINOVA A, JONES A. (2005): Superfamily Echinostomatoidea LOOSS, 1899. In: JONES A, BRAY RA, GIBSON DI. (Eds.), Keys to the Trematoda. Vol 2. CAB International Press, Cambridge, U.K., pp. 5-8.
119. KOTRLY A, KOTRLÁ B. (1980): Der Einfluss der Lebensbedingungen des Schalenwildes auf das Parasitenvorkommen. Angewandte Parasitologie. 21:70-78.

120. KÜCHENMEISTER GFH. (1852): Über die Umwandlung der Finnen (Cysticerci) in Bandwürmer (Taenien). Vierteljahrsschrift für die praktische Heilkunde. 33:106-158.
121. LA RUE GR. (1957): The classification of digenetic trematoda: a review and a new system. Exp. Parasit. 6:306-349.
122. LA VALETTE ST GEORGE AJH VON (1855): Symbolae ad trematodum evolutionis historiam. Berolini, 38 pp.
123. LEUCKART KGFR. (1881): Zur Entwicklungsgeschichte des Leberegels. Zoologischer Anzeiger. 4:641-646.
124. LEUCKART KGFR. (1882): Zur Entwicklungsgeschichte des Leberegels. Zweite Mittheilung. Zoologischer Anzeiger. 5:524-528.
125. LIESINGER K. (2010): Microscopic and molecular analysis on red deer (*Cervus elaphus*) with particular emphasis on the detection of human pathogenic trematodes (digenean) and the species-specific differentiation from related species. Diplomarbeit (in Arbeit), Universität Wien.
126. LIM JH, KIM SY, PARK CM. (2007): Parasitic diseases of the biliary tract. AJR Am J Roentgenol. 188(6): 1596-603.
127. LITTLEWOOD DTJ, ROHDE K, CLOUGH KA. (1999): The interrelationships of all major groups of Platyhelminthes: phylogenetic evidence from morphology and molecules. Biol J Linn Soc. 66:75-114.
128. LIU Q, WEI F, LIU W, YANG S, ZHANG X. (2008): Paragonimiasis: an important food-borne zoonosis in China. Trends Parasitol. 24(7):318-323.
129. LO C-T, LEE K-M. (1996): Pattern of emergence and the effects of temperature and light on the emergence and survival of heterophyid cercariae (*Centrocestus formosanus* and *Haplorchis pumilio*). Journal of Parasitology. 82:347-350.
130. LOCKE SA, MCLAUGHLIN JD, DAYANANDAN S, MARCOGLIESE DJ. (2010): Diversity and specificity in *Diplostomum* spp. metacercariae in freshwater fishes revealed by cytochrome c oxidase I and internal transcribed spacer sequences. International Journal for Parasitology. 40(3):333-343.
131. LOOS-FRANK B, GOTTSTEIN B. (2006): Helminthen. In: HIEPE T, LUCIUS R, GOTTSTEIN B., *Allgemeine Parasitologie - Mit den Grundzügen der Immunologie, Diagnostik und Bekämpfung*, Parey in Medizinverlage Stuttgart GmbH, pp. 110-140.
132. LUCIUS R, LOOS-FRANK B. (2008): Biologie von Parasiten. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York. 552 pp.
133. LONG EO, DAWID IB (1980): Repeated genes in eukaryotes. Annu Rev Biochem. 49:727-764.
134. MAGE C, BOURGNE H, TOULLIEU JM, RONDELAUD D, DREYFUSS G. (2002): *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: changes in prevalences of natural infections in cattle and in *Lymnaea truncatula* from central France over the past 12 years. Vet Res. 33:439-447.
135. MAJOROS G, SZTOJKOV V. (1994): Appearance of the large American liver fluke *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) (Trematoda Fasciolata) in Hungary. Parasitol Hung. 27:27-38.
136. MANGA-GONZÁLEZ Y, GONZÁLEZ-LANZA C, KANEV I. (1994): *Lymnaea truncatula*, intermediate host of some Plagiorchiidae and Notocotylidae species in León, nw Spain. J Helminthol. 68(2):135-141.

-
137. MARGUSH T, MCMORRIS FR. (1981): Consensus n-Trees. *Bulletin of Mathematical Biology*. 42:239–244.
138. MARINCULIĆ A, DŽAKULA N, JANICKI Z, HARDY Z, LUČINGER S, ŽIVIČNJAK T. (2002): Appearance of American liver fluke (*Fascioloides magna*, Bassi, 1875) in Croatia - a case report. *Vet Arhiv*. 72:319-325.
139. MAS-COMA S, BARGUES MD, ESTEBAN JG (1998): Human fasciolosis. In: DALTON JP (Ed.), *Fasciolosis*, CAB International, Oxon, pp. 411–434.
140. MAS-COMA S. (2004): Human fascioliasis. In: COTRUVO JA, DUFOUR A, REES G, BARTRAM J, CARR R, CLIVER DO, CRAUN GF, FAYER R, GANNON VPJ. (Eds.), *Waterborne Zoonoses: Identification, Causes and Control*, published on behalf of the World Health Organization by IWA Publishing, London, UK, pp. 305-322.
141. MAS-COMA S, BARGUES MD, VALERO MA. (2005): Fascioliasis and other plantborne trematode zoonoses. *Int J Parasitol*. 35:1255–1278.
142. MAS-COMA S, VALERO MA, BARGUES MD. (2009): Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis. *Veterinary Parasitology*. 163:264–280.
143. MCCARTHY AM. (1999): The influence of temperature on the survival and infectivity of the cercariae of *Echinoparyphium recurvatum* (Digenea: Echinostomatidae). *Parasitology*. 118:383-388.
144. McMANUS DP, LOUKAS A. (2008): Current Status of Vaccines for Schistosomiasis. *Clin Microbiol Rev*. 21:225-242.
145. MEHLHORN H, PIEKARSKI G. (2002): *Grundriss der Parasitenkunde*, 6. Aufl., Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg. 167 pp.
146. MEHLIS E. (1831): *Novae observationes de entozois*. Auctore Dr. Fr. Chr. H. Creplin. *Isis* (Oken). 68-99, 166-199.
147. MEKROUD A, BENAKHA A, BENLATRECHE C, RONDELAUD D, DREYFUSS G. (2002): First studies on the habitats of *Galba truncatula* (Mollusca Gastropoda : Lymnaeidae), the snail host of *Fasciola hepatica*, and the dynamics of snail populations in northeastern Algeria. *Rev Med Vet*. 153:181-188.
148. MOREL-VAREILLE R. (1973): Contribution à l'étude du cycle biologique de *Lymnaea truncatula*, Müller dans le Nord-Ouest du Limousin. *Revue Médicale, vétérinaire*. 124:1447–1457.
149. MOURITSEN KN, POULIN R. (2002): Parasitism, community structure and biodiversity in intertidal ecosystems. *Parasitology*. 124:101–117.
150. MÜLHARDT C. (2009): Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). In: MÜLHARDT C., *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*, 6. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, pp. 84-120.
151. MÜLLER OF. (1773): *Vermium terrestrium et fluviatilium, seu animalium infusoriorum, helminthicorum et testaceorum, non marinorum succincta historia*. 1:1-135. *Havniae et Lipsiae*.
152. NICHOLAS KB, NICHOLAS HB JR. (1997): GeneDoc: A Tool for Editing and Annotating Multiple Sequence Alignments. Pittsburgh Supercomputing Center's National Resource for Biomedical Supercomputing. Verfügbar unter: <http://www.nrbsc.org/downloads/> (2. März 2007, Ver. 2.7.000).

153. NIEWIADOMSKA K, LASKOWSKI Z. (2002): Systematic relationships among six species of *Diplostomum* Nordmann, 1832 (Digenea) based on morphological and molecular data. *Acta Parasitol.* 47:20–28.
154. NITZSCH CL. (1807): Seltsame Lebens- und Todesart eines kleinen bisher unbekannten Wasserthierchens. In: Kilian. *Georgia, oder Der Mensch im Leben und im Staate.* 257-262, 281-286.
155. NOLAN MJ, CRIBB TH. (2005): The use and implications of ribosomal DNA sequencing for the discrimination of digenean species. *Advances in Parasitology.* 60:101–163.
156. NORDMAN AV. (1832): *Mikrographische Beiträge zur Naturgeschichte der wirbellosen Thiere.* Vol. 2. Reimer, Berlin. 150 pp.
157. NOVOBILSKÝ A, HORÁČKOVÁ E, HIRTOVÁ L, MODRÝ D, KOUDELA B. (2007): The giant liver fluke *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) in cervids in the Czech Republic and potential of its spreading to Germany. *Parasitol Res.* 100:549-553.
158. OBREBSKI S. (1975): Parasite reproductive strategy and evolution of castration of hosts by parasites. *Science.* 188:1314-1316.
159. ODENING K. (1961): Historische und moderne Gesichtspunkte beim Aufbau eines natürlichen Systems der digenetischen Trematoden. *Biologische Beiträge.* 1:73-90.
160. OLSEN OW. (1974): *Animal parasites: their life cycles and ecology.* Vol. 3. London: Baltinore. 564 pp.
161. OLSON PD, CRIBB TH, TKACH VV, BRAY RA, LITTLEWOOD DT. (2003): Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). *Intern J Parasitol.* 33:733-755.
162. PAGE RDM. (1996): TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences.* 12(4):357-358.
163. PANDA PG. (1985): Outbreak of immature amphistomiasis in cattle in India. *Indian J Vet Sci.* 5:364-375.
164. PARAUD C, GAUDIN C, PORS I, CHARTIER C. (2009): Efficacy of oxyclozanide against the rumen fluke *Calicophoron daubneyi* in experimentally infected goats. *The Veterinary Journal.* 180:265-267.
165. PETERS BG. (1938): Habitats of *L. truncatula* in England and Wales during dry seasons. *Journal of Heminthology.* 16:213–260.
166. PETZOLD F. (1989): Zur Populationsdynamik von *Galba truncatula* (Müll.) und deren Infektion mit *Fasciola hepatica* (L.) in einem endemischen Voralpengebiet der Schweiz. Doktorarbeit, Universität Basel.
167. PFEIFFER H. (1983): *Fascioloides magna*: Erster Fund in Österreich. *Wien Tierärztl Monatsschr.* 70:168-170.
168. PFLEGER V. (1999): *A Field Guide in Colour To Molluscs.* Blitz Editions, Bookmark Ltd. Prague, 216 pp.
169. POULIN R. (1998): *Evolutionary ecology of parasites: From individuals to communities.* Chapman and Hall, London, U.K. 212 pp.
170. POULIN R. (2006): Global warming and temperature-mediated increases in cercarial emergence in trematode parasites. *Parasitology.* 132:143-151.

171. POWLEDGE TM. (2004): The polymerase chain reaction. *Adv Physiol Educ.* 28:44-50.
172. PRASAD PK, TANDON V, BISWAL DK, GOSWAMI L, CHATTERJEE A. (2008): Molecular identification of the Indian liver fluke, *Fasciola* (Trematoda: Fasciolidae) based on the ribosomal internal transcribed spacer regions. *Parasitol Res.* 103(6):1247-1255.
173. PYBUS MJ. (2001): Liver flukes. In: Samuel WM, Pybus MJ, Kocan AA. (Eds.), *Parasitic diseases of wild mammals*, Iowa State Press, Ames, pp. 121–149.
174. RAJSKÝ D, PATUS A, BUKOVJAN K. (1994): The first finding of *Fascioloides magna* BASSI, 1875, in Slovakia. *Slov Vet Čas.* 19:29-30. (in Slovak).
175. RAJKOVIĆ-JANJE R, BOSNIĆ S, RIMAC D, GOJMERAC T. (2008): The prevalence of American liver fluke *Fascioloides magna* (Bassi 1875) in red deer from Croatian hunting grounds. *Eur J Wildl Res.* 54:525-528.
176. RAPSCH C, DAHINDEN T, HEINZMANN D, TORGERSOON PR, BRAUN U, DEPLAZES P, HURNI L, BÄR H, KNUBBEN-SCHWEIZER G. (2008): An interactive map to assess the potential spread of *Limnaea truncatula* and the free-living stages of *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol.* 154:242-249.
177. RECKENDORFER W. (2000): Morphometrie, Hydrologie und Sedimentologie in den Orther Donauauen. Bericht, 20 pp.
178. RECKENDORFER W, GROISS M. (2006): Der Amerikanische Riesenleberegel in den Donau-Auen östlich von Wien. Eine GIS-basierte Risikoanalyse. Bericht, 39 pp.
179. RECKENDORFER W, SCHAEFER K. (2003): Ökologische Grundlagen für das Vorkommen des Amerikanischen Riesenleberegels in den Donau-Auen östlich von Wien Habitatcharakterisierung des Zwischenwirtes (*Galba truncatula*). (nicht publizierte Voruntersuchung).
180. REDI F. (1668): Esperienze intorno alla generazione degli insetti. Per Piero Matini, all'insegna della Stella, Firenze.
181. RIVERA N, IBARRA F, ZEPEDA A, FORTOUL T, HERNANDEZ A, CASTILLO R, CANTO G. (2004): Tegumental surfaces changes in adult *Fasciola hepatica* following treatment in vitro and in vivo with an experimental fasciolicide. *Parasitol Res.* 93:283-286.
182. ROBERTS EW. (1950): 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. *Ann Trop Med Parasitol.* 44:187-206.
183. RODGERS JK, SANDLAND GJ, JOYCE SR, MINCHELLA DJ. (2005): Multi-species interactions among a commensal (*Chaetogaster limnaei limnaei*), a parasite (*Schistosoma mansoni*), and an aquatic snail host (*Biomphalaria glabrata*). *Journal of Parasitology.* 91:709-712.
184. ROHDE K. (2001): The Aspidogastrea: an archaic group of Platyhelminthes. In: LITTLEWOOD DTJ, BRAY RA. (Eds.), *Interrelationships of the Platyhelminthes*, Taylor and Francis, London, pp. 159–167.
185. RONDELAUD D, DREYFUSS G, VIGNOLES P. (2007): Optimization of metacercarial production for three digenean species by the use of Petri dishes for raising lettuce-fed *Galba truncatula*. *Parasitol Res.* 100: 861-865.
186. RONDELAUD D, NOVOBILSKY A, VIGNOLES P, TREUIL P, KOUDELA B, DREYFUSS G. (2006): First studies on the susceptibility of *Omphiscola glabra* (Gastropoda: Lymnaeidae) from central France to *Fascioloides magna*. *Parasitol Res.* 98(4):299-303.

187. RONDELAUD D, VIGNOLES P, ABROUS M, DREYFUSS G. (2001): The definitive and intermediate hosts of *Fasciola hepatica* in the natural watercress beds in central France. *Parasitol Res.* 87(6):475-478.
188. RONDELAUD D, VIGNOLES P, VAREILLE-MOREL C, ABROUS M, MAGE C, MOUZET R, DREYFUSS G. (2004): *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: field observations on the transport and outcome of floating metacercariae in running water. *Journal of Helminthology.* 78:173-177.
189. RUDOLPHI CA. (1808): *Entozoorum sive Vermium Intestinalum Historia naturalis.* Amsterdam. 1:1-527.
190. SAITOU RK, NEI M. (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4:406-425.
191. SALOMON S. (1932): *Fascioloides magna* bei deutschem Rotwild. *Berl Tierärztl Wochenschr.* 48:627-628.
192. SAMNALIEV P, VASSILEV I. (1981): Development of *Paramphistomum microbothrioides* PRICE AND MCINTOSH, 1944 in *Lymnaea (Galba) truncatula*. *Helminthology.* 11:62-69.
193. SAPP KK, LOKER ES. (2000a): A comparative study of mechanisms underlying digenean-snail specificity: in vitro interactions between hemocytes and digenean larvae. *J Parasitol.* 86:1020-1029.
194. SAPP KK, LOKER ES. (2000b): Mechanisms underlying digenean-snail specificity: role of miracidial attachment and host plasma factors. *J Parasitol.* 86:1012-1019.
195. SATTMANN H, HÖRWEIG C. (2006): Untersuchung zur Messung der Befallsrate der Leberegelschnecke *Galba truncatula* mit dem amerikanischen Riesenleberegel *Fascioloides magna* im Nationalpark Donau-Auen. Bericht, 39 pp.
196. SCHABUSS M, RECKENDORFER W. (2006): Einfluß der Gewässervernetzungsmaßnahmen auf die Adult- und Jungfischfauna im Altarmsystem von Orth an der Donau. Wissenschaftliche Reihe Nationalpark Donau-Auen, Heft 13, 26 pp.
197. SCHALLIG HD, SASSEN MJ, HORDIJK PL, DE JONG-BRINK M. (1991): *Trichobilharzia ocellata*: influence of infection on the fecundity of its intermediate snail host *Lymnaea stagnalis* and cercarial induction of the release of schistosomin, a snail neuropeptide antagonizing female gonadotropic hormones. *Parasitology.* 102(1):85-91.
198. SCHÜTT H. (1983): Die Molluskenfauna der Süßwässer im Einzugsgebiet des Orontes unter Berücksichtigung benachbarter Flußsysteme. *Arch Moll.* 113(1/6):17-91, 225-228.
199. SHIM YS, CHO SY, HAN YC. (1991): Pulmonary paragonimiasis: a Korean perspective. *Semin Respir Med.* 12:35-45.
200. SHOSTAK AW, ESCH GW. (1990): Photocycledependent emergence by cercariae of *Halipegus occidualis* from *Helisoma anceps*, with special reference to cercarial emergence patterns as adaptations for transmission. *Journal of Parasitology.* 76:790-795.
201. SILVESTRE A, SAUVÉ C, CABARET J. (2000): Caprine *Paramphistomum daubneyi* (Trematoda) infection in Europe. *Veterinary Record.* 146:674-675.
202. SIMONDS JB. (1880): The rot in sheep: Its nature, cause, treatment, and prevention (Reprinted from the *Journal of the Royal Agricultural Society, London.* 23:64-159). John Murray, London, 1880.

203. SINITSIN DF. (1914): Neue Tatsachen über die Biologie der *Fasciola hepatica* L. Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten 74:280-285.
204. SKOVRONSKII RV. (1985): *Lymnaea truncatula* – first and second intermediate host of *Echinostoma revolutum* and *Hypoderaeum conoideum*. Parazitologiya. 19:323-324.
205. ŚLUSARSKY W. (1955): Studies of the European representatives of *Fasciola magna* (BASSI 1875) Stiles 1894: a new case of the fluke invasion in stag in Poland. Acta Parasitol Pol. 3:1-59. Polnisch.
206. SMITH G. (1981): Copulation and oviposition in *Lymnaea truncatula* (MÜLLER). Research note. Journal of Molluscan Studies. 47:108-111.
207. SORENSEN RE, MINCHELLA DJ. (2001): Snail-trematode life history interactions: Past trends and future directions. Parasitology. 123:3-18.
208. SOULSBY E.J.L. (1965): Textbook of Veterinary Clinical Parasitology. Vol. 1 Helminths. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1120 pp.
209. SPITHILL TW, SMOOKER PM, COPEMAN B. (1999): *Fasciola gigantica*: epidemiology, control, immunology and molecular biology. In: DALTON JP. (Ed.), Fasciolosis, Wallingford: CABI Publishing, 465–526.
210. STORCH V, WELSCH U, WINK M. (2007): Evolutionsbiologie. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 518 pp.
211. SWALES WE. (1935): The life cycle of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875), the large liver fluke of ruminants in Canada with observations on the bionomics of the larval stages and the intermediate hosts, pathology of fascioloidiasis magna, and control measures. Can J Res. 12:177-215.
212. SZMIDT-ADJIDÉA V, ABROUS M, ADJIDÉ CC, DREYFUSS G, LECOMPTE A, CABARET J, RONDELAUD D. (2000): Prevalence of *Paramphistomum daubneyi* infection in cattle in central France Veterinary Parasitology. 87:133-138.
213. TAKEYAMA N, OKUMURA N, SAKAI Y, KAMMA O, SHIMA Y, ENDO K, HAYAKAWA T. (1986): Computed tomography findings of hepatic lesions in human fascioliasis: report of two cases. Am J Gastroenterol. 81:1078-1081.
214. TANDON V, PRASAD PK, CHATTERJEE A, BHUTIA PT. (2007): Surface fine topography and PCR-based determination of metacercaria of *Paragonimus* sp. from edible crabs in Arunachal Pradesh, Northeast India. Parasitol Res. 102:21–28.
215. TAYLOR EL. (1964): Fascioliasis and the Liver Fluke. FAO Agricultural Studies No. 64, Rome. 234 pp.
216. TAYLOR EL. (1937): The revelation of the life-history of the liver fluke as an illustration of the process of scientific discovery. Veterinary Record. 49:53-58.
217. Théron A, Fournier A. (1982): Mise en évidence de structures nerveuses dans le sporocyste-fils du Trématode *Schistosoma mansoni*. C R Acad Sci Paris, Sér III. 294:365-369.
218. THOMAS AP. (1881): Report of experiments on the development of the liver-fluke (*Fasciola hepatica*). Journal of the Royal Agricultural Society of England. 17:1-29.
219. THOMAS AP. (1882): Second report of experiments on the development of the liver-fluke (*Fasciola hepatica*). Journal of the Royal Agricultural Society of England. 18:439-455.

220. THOMAS AP. (1883a): The natural history of the liver-fluke and the prevention of rot. Journal of the Royal Agricultural Society of England. 19:276-305.
221. THOMAS AP. (1883b): The life history of the liver-fluke (*Fasciola hepatica*). Quarterly Journal of Microscopical Science. 23:99-133.
222. THOMPSON JD, GIBSON TJ, PLEWNIAK F, JEANMOUGIN F, HIGGINS DG. (1997): The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research. 25(24):4876-4882.
223. TKACH VV, PAWLOWSKI J, SHARPILO VP. (2000): Molecular and morphological differentiation between species of the *Plagiorchis vespertilionis* group (Digenea, Plagiorchiidae) occurring in European bats, with a re-description of *P. vespertilionis* group (MÜLLER, 1780). Syst Parasitol. 47:9-22.
224. TORGERSON P, CLAXTON J. (1999): Epidemiology and control. In: DALTON JP. (Ed.), Fasciolosis, Wallingford: CABI Publishing, pp. 113–149.
225. TROUVÉ S, DEGEN L, GOUDET J. (2005): Ecological components and evolution of selfing in the freshwater snail *Galba truncatula*. J Evol Biol. 18:358-370.
226. TROUVÉ S, DEGEN L, RENAUD F, GOUDET J. (2003): Evolutionary implications of a high selfing rate in the freshwater snail *Lymnaea truncatula*. Evolution. 57(10):2303-2314.
227. ULLRICH K. (1930): Über das Vorkommen von seltenen oder wenig bekannten Parasiten der Säugetiere und Vögel in Böhmen und Mähren. Prag Arch Tiermed. 10:19-43.
228. UMADEVI K, MADHAVI R. (1997): Effects of light and temperature on the emergence of *Haplorchis pumilio* cercariae from the snail host, *Thiara tuberculata*. Acta Parasitologica. 42:12-16.
229. URSPRUNG J. (2002): Der Amerikanische Riesenleberegel *Fascioloides magna* (Digenea, Trematoda). In: ESSL F, RABITSCH W. (Eds.), Neobiota in Österreich, Umweltbundesamt, Wien, pp. 225-227.
230. URSPRUNG J. (2005): Ergebnisse der Leberuntersuchungen von Rot- und Rehwild aus den Donauauen im Jahre 2004. Präsentation beim 5. Symposium „Erforschung und Bekämpfung des Amerikanischen Riesenleberegels (*Fascioloides magna*)“. Niederösterreichischer Landesjagdverband.
231. URSPRUNG J, JOACHIM A, PROSL H. (2006): Vorkommen und Bekämpfung des Amerikanischen Riesenleberegels, *Fascioloides magna*, in einer Schalenwildpopulation in den Donauauen östlich von Wien. Berl Münch Tierärztl Wochenschr. 119:316-323.
232. VELUSAMY R, SINGH BP, RAINA OK. (2004): Detection of *Fasciola gigantica* infection in snails by polymerase chain reaction. Veterinary Parasitology. 120:85-90.
233. VIGNOLES P, NOVOBILSKÝ A, RONDELAUD D, BELLET V, TREUIL P, KOUDELA B, DREYFUSS G. (2006): Cercarial production of *Fascioloides magna* in the snail *Galba truncatula* (Gastropoda: Lymnaeidae). Parasitol Res. 98:462-467.
234. VIGNOLES P, RONDELAUD D, DREYFUSS G. (2003): A first infection of *Galba truncatula* with *Fasciola hepatica* modifies the prevalence of a subsequent infection and cercarial production in the F1 generation. Parasitol Res. 91:349-352.
235. VILAS R, CRISCIONE CD, BLOUIN MS. (2005): A comparison between mitochondrial DNA and ribosomal internal transcribed regions in prospecting for cryptic species of platyhelminth parasites. Parasitology. 131:839-846.

-
236. VOYTAS, D. (2000): Agarose gel electrophoresis. *Curr Protoc Mol Biol*. 51:2.5A.1-2.5A.9.
237. WAGENER GR. (1857): Beiträge zur Entwicklungs-Geschichte der Eingeweidewürmer. Eine von der Holländischen Societät der Wissenschaften zu Haarlem. 1855. *Natuurkundige verhaudelingen van de Hollandsche maatschappij der wetenschappen te Haarlem* 13. 112 pp.
238. WILKINSON M. (1996): Majority-Rule Reduced Consensus Trees and Their Use in Bootstrapping. *Mol Biol Evol*. 13(3):437-444.
239. WINKELMAYER R, PROSL H. (2001): Riesenleberegel - jetzt auch bei uns? *Weidwerk* 3/2001. 42-44.
240. YAMAGUTI S. (1975): A synoptical review of life histories of digenetic trematodes of vertebrates. Keigaku Publishing Co., Tokyo, Japan.
241. YILDIRIM MZ, GUMUS BA, KEBAPCI U, KOCA SB. (2006): The Basommatophoran Pulmonate Species (Mollusca: Gastropoda) of Turkey. *Turk J Zool*. 30:445-458.
242. YOSHINO TP, VASTA GR. (1996): Parasite-invertebrate host immune interactions. In: COOPER EL. (Ed.), *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, Springer, Berlin, pp. 125-167.
243. ZHADIN VI. (1965): Mollusks of Fresh and Brackish Water of The U.S.S.R. Zoological Institute of The Academy Sciences of The Union of Soviet Socialist Republics. Israel Program for Scientific Translations. 46:1-368. Jerusalem.

6.4. Danksagung

Großer Dank gebührt meinen Betreuern Herrn Dr. Helmut Sattmann, Frau Univ.-Doz. Mag. Dr. Julia Walochnik und Herrn Mag. Christoph Hörweg, die das erfolgreiche Zustandekommen dieser Diplomarbeit ermöglicht und ihren Fortgang stets mit Wohlwollen unterstützt haben. Ich möchte mich besonders für ihre engelsgleiche Geduld und die zahlreichen wertvollen Ratschläge bedanken.

Weiters möchte ich mich bei Frau Univ.-Prof. Dr. Christine Frank bedanken, die sich bereit erklärt hat, die Mentorenschaft für diese Diplomarbeit zu übernehmen.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Kollegin Frau Kerstin Liesinger für die erfolgreiche Zusammenarbeit, besonders aber für die vielen unterhaltsamen Momente während der Sammlungen und der gemeinsamen Laborarbeit.

Weiters möchte ich meiner Kollegin Frau Mag. Verena Pecavar für die technische Einweisung und die sehr freundliche fortlaufende Unterstützung bedanken.

Danken möchte ich auch meinen weiteren KollegInnen Dipl.-Ing. (FH) Florian Astelbauer, Susanne Glöckl, MTA Iveta Häfeli, Dr. Martina Köhler, Markus Kranzler, Jacek Pietrzak, MSc Wilawan Pumidonming, Mag. Ute Scheikl, Michael Syrowatka und Sylvia Tippl, die mich herzlich aufgenommen haben und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ganz besonderer Dank gilt natürlich meiner Familie, die mir dieses Studium ermöglichte und mich durch alle Höhen und Tiefen meiner Studienzeit begleitet hat.

6.5. Curriculum Vitae

ANGABEN ZUR PERSON

Name: Michaela Haider
Geburtsdatum: 14/04/1984
Geburtsort: Linz, Oberösterreich

AUSBILDUNG

Seit 09/2008 Diplomarbeit in Medizinischer Parasitologie
Abteilungen: Medizinische Universität Wien, Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin, Abteilung Molekulare Parasitologie
Naturhistorisches Museum Wien, 3. Zoologische Abteilung
Thema: Bestimmung der Prävalenz von *Fascioloides magna* (BASSI 1875) und anderen digenen Trematoden in *Galba truncatula* (O.F. MÜLLER 1774) an drei ausgewählten Standorten im Bereich Orth/Donau (Niederösterreich).

Seit 10/2003 Studium Biologie, Universität Wien
Studienzweig: Genetik und Mikrobiologie, Schwerpunkt Immunbiologie

1998-2003 Höhere Bundeslehranstalt für Produktmanagement und Präsentation, Linz

TEILNAHME AN TAGUNGEN/FORTBILDUNGSVERANSTALTUNGEN

2010	18/05	„Konsequenzen von Fake Drugs und Medikamenteninteraktionen“*, Fortbildungsveranstaltung, Wien
	20/04	„Impfungen für Hund und Katz“*, Fortbildungsveranstaltung, Wien
	23/02	„Reise und Reisemitbringsel - Schwerpunkt Südamerika“*, Fortbildungsveranstaltung, Wien
2009	12/05	"New emerging diseases - Was kommt aus den Tropen auf uns zu?"*, Fortbildungsveranstaltung, Wien
	21/04	„Wird Urlaub in Österreich immer gefährlicher?"*, Fortbildungsveranstaltung, Wien
	10/03	„Impfungen bei Risikogruppen"*, Fortbildungsveranstaltung, Wien
	27/01	„Parasiten als Reisesouvenirs"*, Fortbildungsveranstaltung, Wien
2008	20-22/11	42. Jahrestagung der ÖGTP*, Innsbruck (Tirol), inklusive Posterpräsentation der aktuellen Studienergebnisse
	13/11	„Wildtiergesundheit, Wildtierkrankheiten, deren Bedeutung und Vermeidung“, Fachtagung, Wien

* Teilnahme und Mitarbeit bei Organisation und Durchführung

WEITERE AKTIVITÄTEN

- 07/2009 Lektorenarbeit für parasitologischen Workshop an der „KinderuniWien“
- Seit 10/2008 Mitarbeit im Sekretariat der Österreichischen Gesellschaft für
Tropenmedizin und Parasitologie
- 07-08/2007 Praktikum am Kompetenzzentrum Molekularbiologie & Genetik
Allgemein öffentliches Krankenhaus der Elisabethinen, Linz

WISSENSCHAFTLICHE AUSZEICHNUNGEN

- 21/11/2008 Erhalt des ÖGTP-Posterpreis 2008
Für die wissenschaftliche Durchführung und die Präsentation der
Arbeit „Bestimmung der Prävalenz digener Trematoden in *Galba
truncatula* an drei ausgewählten Standorten im Bereich Orth/
Donau. Ein Zwischenbericht“ anlässlich der 42. ÖGTP
Jahrestagung in Innsbruck.