

Aus dem Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Untersuchungen zur Kultivierung, genetischen Differenzierung und  
Pathogenese von *Capillaria* spp. beim Huhn**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Katharina Maria Tiersch  
Tierärztin  
aus Berlin

Berlin 2015

Journal-Nr.:3796

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Georg von Samson-Himmelstjerna  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Matthias Gauly  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Hafez Mohamed Hafez

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

*fowls, Capillaria anatis, Aonchotheca caudinflata, Capillaria bursata, Capillaria  
obsignata, embryonic development, establishment, intestines, polymerase  
chain reaction, germany*

Tag der Promotion: 28.07.2015

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen  
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über  
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-662-3

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2015**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder  
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in  
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,  
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch  
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der  
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von  
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written  
authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2015

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

[verlag@menschundbuch.de](mailto:verlag@menschundbuch.de) – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

Für meine Eltern



## **Abkürzungsverzeichnis**

---

ADG	Average daily weight gain
ANOVA	Analysis of variance
bp	Base pairs
BW	Body weight
COI	Untereinheit I der Cytochrom C Oxidase
d.p.i.	Day post infection
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP`s	Desoxynukleosidtriphosphate
EpG	Eggs per gram faeces
FEC	Faecal egg count
H <sub>2</sub> O	Wasser
ITS-1	Internal transcribed spacer 1
NCBI	National Center for Biotechnology Information
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
p.i.	Post infection
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
rDNA	Ribosomale Desoxyribonukleinsäure
SE	Standard error

## Inhaltsverzeichnis

---

TABELLENVERZEICHNIS .....	
ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	
KAPITEL I.....	
1. ALLGEMEINE EINLEITUNG .....	1
1.1 BEDEUTUNG DER PARASITOLEN BEIM GEFLÜGEL IN DEUTSCHLAND .....	1
1.2 CAPILLARIA SPP. DES GEFLÜGELS .....	2
1.3 KULTIVIERUNG VON CAPILLARIA SPP. ....	5
1.4 KÜNSTLICHE INFEKTIONSVERSUCHE MIT CAPILLARIA SPP. ....	7
1.5 DIFFERENZIERUNG VON CAPILLARIA SPP. ....	7
1.6 ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	10
LITERATURVERZEICHNIS.....	12
KAPITEL II .....	21
THE ROLE OF CULTURE MEDIA ON EMBRYONATION AND SUBSEQUENT INFECTIVITY OF CAPILLARIA	
OBSIGNATA EGGS.....	23
ABSTRACT.....	24
2.1. INTRODUCTION .....	25
2.2. MATERIALS AND METHODS .....	27
2.3. RESULTS.....	30
2.4 DISCUSSION .....	37
REFERENCES .....	40
KAPITEL III.....	45
ARTIFICIAL INFECTION OF CHICKENS WITH <i>CAPILLARIA OBSIGNATA</i> EGGS EMBRYONATED IN	
DIFFERENT MEDIA.....	47
ABSTRACT.....	48
3.1 INTRODUCTION .....	49
3.2 MATERIALS AND METHODS .....	50
3.3 RESULTS.....	52
3.4 DISCUSSION .....	59
REFERENCES .....	63

## Inhaltsverzeichnis

KAPITEL IV .....	67
MORPHOLOGISCHE UND GENETISCHE DIFFERENZIERUNG, DER IM LEGEHUHN AM HÄUFIGSTEN VORKOMMENDEN VIER <i>CAPILLARIA</i> -ARTEN .....	69
4.1 EINLEITUNG.....	70
4.2 MATERIAL UND METHODEN.....	73
4.3 ERGEBNIS UND DISKUSSION .....	76
LITERATURÜBERSICHT .....	83
KAPITEL V .....	87
5. ALLGEMEINE DISKUSSION.....	89
5.1 KULTIVIERUNGSVERSUCH MIT <i>C. OBSIGNATA</i> .....	89
5.2 INFEKTIONSVERSUCH MIT <i>C. OBSIGNATA</i> .....	90
5.3 MORPHOLOGISCHE UND GENETISCHE DIFFERENZIERUNG.....	94
6. SCHLUSSFOLGERUNG .....	97
LITERATURVERZEICHNIS.....	98
ZUSAMMENFASSUNG .....	103
SUMMARY.....	105
PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	
DANKSAGUNG	
SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	

## Tabellenverzeichnis

---

### KAPITEL II

<b>Table 1</b>	Culture media used for embryonation of eggs for different nematodes of chicken.	<b>26</b>
<b>Table 2</b>	Embryonation rate, the time required until the first and last embryonation took place within intact female worms and the average proportions of harvested eggs (embryonated, unembryonated and broken-damaged) from female worms kept in different media during incubation and disrupted shortly before counting (Means $\pm$ SE).	<b>33</b>
<b>Table 3</b>	Mean values ( $\pm$ SE) for parasitological parameters and average daily weight gain (ADG) of the chickens infected with 250 infectious <i>C. obsignata</i> eggs incubated in different culture media.	<b>36</b>

### KAPITEL III

<b>Table 4</b>	Faecal egg excretion and female worm fecundity estimates in chickens infected with <i>Capillaria obsignata</i> eggs incubated in different media and given in increasing doses.	<b>54</b>
<b>Table 5</b>	Number and length of <i>Capillaria obsignata</i> in chickens infected with eggs incubated in different media and given in increasing doses.	<b>58</b>

### KAPITEL IV

<b>Tabelle 6</b>	Die vier verschiedenen <i>Capillaria</i> -Spezies mit den drei gefundenen COI- Sequenzen.	<b>77</b>
<b>Tabelle 7</b>	Die drei amplifizierten COI-Gen-Sequenzen der vier verschiedenen <i>Capillaria</i> -Spezies. [ <i>C. obsignata</i> (Sequenz: C.o._1), <i>C. anatis</i> (Sequenz: C.spp._abc_3), <i>C. bursata</i> (Sequenz: C.b._2 und C.spp._abc_3) und <i>C. caudinflata</i> (Sequenz: C.spp._abc_3)] mit 568, 424 bzw. 433 bp.	<b>80</b>



## Abbildungsverzeichnis

---

### KAPITEL I

<b>Abbildung 1</b>	Stammbaum von <i>Capillaria</i> spp. vorkommend in Hühner- vögeln.	<b>2</b>
<b>Abbildung 2</b>	Männliche Bursa (A,C,E,G) und weibliche Vulva (B,D,F,H) von <i>Capillaria obsignata</i> (A,B), <i>C. caudinflata</i> (C,D), <i>C.</i> <i>bursata</i> (E,F) and <i>C. anatis</i> (G,H) im Vergleich (Wakelin, 1965).	<b>9</b>

### KAPITEL II

<b>Figure 3</b>	<i>Capillaria obsignata</i> eggs in different developmental stag- es (a): an un-embryonated egg; (b): a moveable embryo; (c): an infectious larva.	<b>28</b>
<b>Figure 4</b>	Embryonation of the eggs in the first two-thirds of uteri of intact female worms kept in different culture media (means and SE on the error bars).	<b>31</b>
<b>Figure 5</b>	Establishment rates of <i>C. obsignata</i> eggs incubated in different culture media and given to chickens with single dose of 250 eggs/bird (Means and SE on the error bars).	<b>35</b>

### KAPITEL III

<b>Figure 6</b>	Final body weights (on 28 d.p.i.) of birds infected with <i>C.</i> <i>obsignata</i> eggs incubated in different media (Means and SE on the error bars).	<b>52</b>
<b>Figure 7</b>	Establishment rates of <i>C. obsignata</i> in chickens infected with eggs incubated in different culture media (Means and SE on the error bars).	<b>55</b>
<b>Figure 8</b>	Establishment rates of <i>C. obsignata</i> in chickens infected with different infection doses (Means and SE on the error bars).	<b>56</b>

## KAPITEL IV

<b>Abbildung 9</b>	Morphologische Unterschiede zwischen den vier <i>Capillaria</i> -Arten (Fotografiert von Katharina M. Tiersch).	<b>72</b>
<b>Abbildung 10</b>	Die amplifizierte COI-Sequenz von <i>C. obsignata</i> , dargestellt mit den verwendeten Primern.	<b>75</b>

KAPITEL I

## KAPITEL I

---



## 1. Allgemeine Einleitung

---

### 1.1 Bedeutung der Parasitosen beim Geflügel in Deutschland

Nach dem Verbot der konventionellen Käfighaltung bei Legehennen in der Europäischen Union (Anonymous, 1999) sind Endoparasiten wieder zum Thema in der Legehennenhaltung geworden (Permin et al., 1999). *Ascaridia galli*, *Capillaria* spp. und *Heterakis gallinarum* sind hierbei die am weitesten verbreiteten Wurmartarten (Permin und Hansen, 1998; Permin et al., 1999; Ruff, 1999). Permin et al. (1999) fanden in Freilandhaltungssystemen in Dänemark folgende *Capillaria*: *C. obsignata* (53,6 %), *C. anatis* (31,9 %) und *C. caudinflata* (1,5 %). In der Bodenhaltung waren 51,6 % der Legehennen mit *C. obsignata* infiziert. In „Hinterhofsystemen“ fanden sie *C. obsignata* (50,0 %), *C. anatis* (56,3 %) und *C. caudinflata* (6,3 %). Kaufmann et al. (2011a) fanden ebenfalls in der Freilandhaltung und in Bodenhaltungssystemen eine hohe Helminthenprävalenz bei Hühnern vor. Die Autoren zeigen, dass 98 % der Hühner aus Freilandhaltung mit *H. gallinarum* infiziert waren, 88 % mit *A. galli* und 75,3 % mit *Capillaria* spp.

Seit Inkrafttreten der 2001 erlassenen „Verordnung zum Schutz landwirtschaftlicher Nutztiere und anderer zur Erzeugung tierischer Produkte gehaltener Tiere bei ihrer Haltung“ (Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung, 2006) ist ein kontinuierlicher Wandel in der Legehennenhaltung Deutschlands festzustellen: Kamen 2005 noch 73 % der Eierproduktion aus Käfighaltung und nur 14 % aus Bodenhaltung, so stammten 2011 bereits 64,3 % der produzierten Eier aus Bodenhaltung und nur noch 13,9 % aus der konventionellen Käfighaltung. Die Freilandhaltung stieg von 2005 bis 2011 von 12,7 % auf 14,5 %. Die ökologische Erzeugung wurde 2007 erstmals erfasst und stieg bis 2011 auf 7,4 % (DESTATIS, 2012). Durch diese stetige Entwicklung steigt auch die Bedrohung durch parasitäre Erkrankungen in der heutigen Geflügelhaltung. Neben der Beeinträchtigung für das Tier selbst sind Parasiteninfektionen durch indirekte Verluste, die insbesondere durch schlechtere Nährstoffverwertung, Gewichtsverlust, verminderte Zunahme (Ramadan und Znada, 1991) und Behandlungskosten (Gräfner et al., 1985) entstehen, von großer wirtschaftlicher Bedeutung. In der Bodenhaltung haben die Hühner Kontakt zu ihren Fäkalien und können Parasiteneier einfacher aufnehmen. Somit ist das Risiko der Reinfektionen mit Nematodeneiern bei der Bodenhaltung mit oder ohne Auslauf höher (Siegmann, 1993). In der Käfighaltung dagegen haben die Hühner keinen direkten Kontakt zu ihrem Kot, weshalb Infektionen und Reinfektionen vermutlich seltener waren (Keutgen et al., 1999). Vor dem Hintergrund der aktuellen

gesetzgeberischen Entwicklungen in der Geflügelhaltung ist es von besonderem wissenschaftlichen Interesse, im Bereich der genetisch bedingten Parasitenresistenz des Geflügels zu forschen.

## 1.2 *Capillaria* spp. des Geflügels

*Capillaria* gehören zum Stamm der *Nemathelminthes* (Fadenwürmer). Der Unterstamm *Nematoda* (Rundwürmer) umfasst ungefähr 20.000 Arten, die sowohl im Wasser als auch im Boden oder als Parasiten von Pflanzen, Tieren oder Menschen leben (Eckert et al., 2005). Alle Nematoden durchlaufen gewöhnlich vier Larvenstadien bis zum fünften, dem präadulten Stadium, mit dem die Geschlechtsreife erlangt wird. Das Wachstum erfolgt schubweise durch Häutungen der Cuticula. Die meisten Nematoden sind getrenntgeschlechtlich, wobei die weiblichen Nematoden immer größer sind als die männlichen. Die Fruchtbarkeit der Nematoden, insbesondere der parasitischen Arten, ist sehr groß. Die Eier, die aus drei bis vier Schichten aufgebaut sind, sind im Freien sehr widerstandsfähig (Levine, 1936a; Eckert et al., 2005). Bei den parasitären Arten ist häufig die Larve im dritten Stadium (L3) für den Wirt infektiös. Bei den *Adenophorea*, zu denen die *Capillaria* zählen, ist die L1 im Ei infektiös. Die Weiterentwicklung der Larve erfolgt nach Aufnahme im Wirt (Wehr, 1939; Eckert et al., 2005).

Stamm: Nemathelminthes

Unterstamm: Nematoda

Klasse: Adenophorea

Unterklasse: Enoplia

Ordnung: Trichocephalida

Familie: Trichuridae

Gattung: *Capillaria*

Art: *C. obsignata*

*C. anatis*

*C. bursata*

*C. caudinflata*

**Abb. 1** Stammbaum von *Capillaria* spp. (Eckert et al., 2005).

Trotz der Größenunterschiede sind alle Nematoden bis auf die Mundwerkzeuge morphologisch sehr ähnlich aufgebaut. Artsspezifisch sind die jeweiligen Ausprägungen der Vorder- und Hinterenden bzw. der Geschlechtsorgane. Ihr Körper ist von einer Cuticula umschlossen, und die inneren Organe liegen in einer flüssigkeitsgefüllten primären Leibeshöhle (Anderson, 2000). Die Hautmuskulatur ist als Längsschlauch angeordnet und erlaubt eine schlängelnde Bewegung (Eckert et al., 2005).

Es gibt weltweit mehrere Tausend verschiedene *Capillaria*-Arten. Auf jeden spezifischen Wirt haben sich bestimmte Arten spezialisiert. So gibt es fast kein höheres Lebewesen, welches nicht von *Capillaria* parasitiert wird. *Capillaria* gibt es in Fischen, Vögeln, Säugetieren und Menschen. Sie parasitieren in nahezu allen Organen wie beispielsweise in der Luftröhre von Hühnervögeln (*C. annulata*; Eckert et al., 2005), in der Lunge von Hunden und Katzen (*C. aerophila*; Creplin, 1839), in der Leber von Menschen und Katzen (*C. hepatica*; Bancroft, 1893), in der Harnblase von Hunden und Katzen (*C. plica*; Rudolphi, 1819) oder im Darm von Hühnervögeln (*C. obsignata*). In den Organen können die Würmer vor allem bei starkem Befall erhebliche Schäden verursachen. So sind sie beispielsweise im Darm Auslöser für Enteritiden und Abmagerung (Wakelin, 1965), sie können Verursacher einer pathogenen Lebervergrößerung sein (Nabi et al., 2007) oder in der Lunge Wegbereiter für Sekundärinfektionen (Dieffenbacher, 2007).

Die 1 bis 6 cm langen und bis ca. 80 µm breiten Haarwürmer haben sowohl einen direkten als auch einen indirekten Entwicklungszyklus (Eckert et al., 2005). Die Eier, die eine Größe von 50 bis 62 µm haben, gelangen mit dem Kot, Urin oder Sekret in die Außenwelt, wo sie sich dann innerhalb der Eier zur infektiösen L1 entwickeln. Zur Häutung der L1 bis zur L3 kommt es erst nach Wiederaufnahme des infektiösen *Capillaria*-Eies im Darm des Wirtes (Wehr, 1939). Der Kreislauf beginnt erneut.

Die Bekämpfung von *Capillaria* spp. und anderen Nematoden stellt sich bei Legehennen und den heutigen Haltungssystemen als schwierig dar. Zur (mesophylaktische) Therapie für die Legehenne gibt es aktuell drei zugelassene Anthelminthika: Flubendazol und Fenbendazol – ohne Wartezeit auf die Eier – und Piperazin – mit 5 Tagen Wartezeit auf die Eier (Vetidata, 2014). Weitere Bekämpfungsmaßnahmen beinhalten die Kontrolle der Umweltkontamination wie allgemeine Hygiene, das Anlegen von Schutzkleidung vor Betreten des Stalles. Allgemeine Prophylaxe, wie Einstreu trocken halten, Reinigung und Desinfektion nach jedem Nutzungsgang, die bei der Intensivhaltung in Stallungen von großer Bedeutung ist, stellt sich bei der Freilandhaltung als schwierig dar. Potentielle Zwischenwirte der Parasiten lassen sich schwer bekämpfen, zudem lässt sich der Kontakt zu Wildvögeln nicht ver-

hindern. Eine häufige Infektionskontrolle durch Kotuntersuchungen und Sektionen sind induziert (Deplazes et al., 2012).

Als zuverlässiger koproskopischer Nachweis für *Capillaria* gilt das Flotationsverfahren (Eckert et al., 2005), mit dem man zusammen mit einem modifizierten McMaster-Verfahren (MAFF, 1986) die Anzahl der ausgeschiedenen Eier bestimmen kann.

Die in Deutschland beim Nutzgeflügel am häufigsten im Dünndarm vorkommenden *Capillaria*-Arten sind *C. obsignata* (Madsen, 1945), *C. caudinflata* (Molin, 1858), *C. bursata* (Freitas und Almeida, 1934) und *C. anatis* (Schrank, 1790; Travassos, 1915). Unter den vier verschiedenen *Capillaria*-Arten ist *C. obsignata* die häufigste (Friedhoff und Ehlers-Bhodigen, 1965). Ein Grund dafür könnte der direkte Lebenszyklus ohne Zwischenwirt sein. Außerdem sind die Eier sehr widerstandsfähig gegenüber äußeren Umwelteinflüssen. Im feuchten Milieu und bei Temperaturen zwischen -5°C und +35°C können die infektiösen Eier über ein Jahr lang überleben (Levine, 1936a). Die Präpatenz ist mit 19 bis 21 Tagen kurz im Vergleich zu *A. galli* (4–8 Wochen; Rhamadan und Znada, 1991; Idi, 2004) oder *H. gallinarum* (23 Tage; Daş et al., 2011). *C. obsignata* erreicht eine Länge von 7 bis 18 mm und eine Breite von bis zu 80 µm. Die Eier haben eine Größe von 50 bis 62 µm mal 20 bis 27 µm (Graybill, 1924). Nach der sexuellen Fortpflanzung legen die Weibchen unembryonierte Eier. Die *C. obsignata*-Eier gelangen durch den Kot in die äußere Umgebung und entwickeln sich innerhalb des Eis im Zeitraum von 7 bis 21 Tagen zu infektiösen Larven (L1), je nach Temperatur und Luftfeuchtigkeit. Die infektiösen Eier werden vom Wirt aufgenommen und erreichen im Dünndarm innerhalb von 19 Tagen nach vier Häutungen das geschlechtsreife Stadium (Eckert et al., 2005). Die adulten Würmer dringen in die oberflächliche Schleimhaut des Darmes ein und bewirken je nach Befallsdichte unterschiedlich ausgeprägte pathogene Veränderungen. Ein schwacher Befall mit *C. obsignata* verursacht in der Regel geringe Schäden, d.h. lokale Epitheldefekte und entzündliche Infiltrationen. Bei einem stärkeren Befall kann es zu katarrhalischen und hämorrhagischen Entzündungen kommen, die mit Anämie, Resorptionsstörungen, Durchfall, Abnahme der Legeleistung, Kachexie, Abmagerung und Tod einhergehen können (Levine, 1938; Wakelin, 1965). Long und Wakelin (1964) fanden heraus, dass *C. obsignata* die Inzidenz der *A. galli* überschreiten kann. Abgemagerte Legehennen und ein Rückgang der Legeleistung wurden bei *C. obsignata*-Infektionen ebenfalls beschrieben (Long und Wakelin, 1964). *C. caudinflata* leben in Hühnern, Vögeln, Tauben und Fasanen. Für ihre Entwicklung benötigen sie Regenwürmer als Zwischenwirte (Allen und Wehr, 1942). Innerhalb von neun Tagen wird die Larve infektiös. Die Präpatenz beträgt 21 bis 25 Tage (Morehouse, 1944; Wehr und Allen, 1945; Ehlers-Bhodigen,



1961). *C. anatis* parasitiert im Blinddarm von Hühnervögeln (Kaufmann, 1996). Der Lebenszyklus wird als nicht bekannt (Norton und Ruff, 2003) und als direkt (Kaufmann, 1996) beschrieben, sowie unter Verwendung eines Zwischenwirtes (Regenwurm) (Eckert et al., 2005). *C. bursata* findet man in Hühnern, Puten, Gänsen und Fasanen. Diese Art wurde vor allem in Amerika gefunden und selten in Europa (Friedhoff und Ehlers-Bhodigen, 1965); auch sie benötigt einen Zwischenwirt zur Weiterentwicklung. Alle oben genannten *Capillaria* spp. leben in den Schleimhäuten des Dünndarmes oder Blinddarmes und sind Ursache für Abmagerung, Durchfall, hämorrhagische Enteritis und Tod (Nickel, 1953a; Wakelin, 1965). Weitere morphologische Unterschiede zwischen den vier häufigsten *Capillaria*-Spezies beim Huhn sind in Kapitel 1.5 aufgeführt.

### 1.3 Kultivierung von *Capillaria* spp.

Kulturmedien werden schon seit langer Zeit zur Verhinderung von Fäulnis der Nematoden-Eier (Levine, 1936b) und zur Hemmung des Wachstums von Bakterien und Pilzen (Luttermoser, 1937) eingesetzt. Wissenschaftliche Studien haben belegt, dass die Entwicklung der Nematoden-Eier durch Umgebungsbedingungen wie Kulturmedien, Inkubationszeit oder Sauerstoff (Anderson, 2000; Permin et al., 1997a; Dick et al., 1973; Saunders et al., 2000) beeinflusst wird. Es ist nicht bekannt, ob *Capillaria*-Eier mit hohen Embryonierungsraten in einem bestimmten Medium auch eine hohe Infektiosität besitzen. Diverse Medien (0,5 %–2 % Formalin, 0,1 N Schwefelsäure) wurden für die Kultivierung von *A. galli* (Ikeme, 1971; Herd und McNaugh, 1975; Permin et al., 1997a; Permin et al., 1998) und *H. gallinarum* (Sage et al., 2002; Püllen et al., 2008) bereits verwendet. Die Verwendung einer 0,1 % Kaliumdichromatlösung wird ebenfalls zur Embryonierung von *A. galli*-Eiern beschrieben (Bauer, 1999).

Die ersten Kultivierungsversuche von *C. obsignata* wurden von Graybill (1924) publiziert. Der Autor legte gravide *Capillaria*-Weibchen in eine physiologische Kochsalzlösung und ließ die Eier bei Raumtemperatur (22–25 °C) sieben Tage lang embryonieren. In einem weiteren Kultivierungsversuch wurden *C. obsignata*-Eier in zehn Tagen in einer Petrischale mit destilliertem Wasser bei 27 °C vollständig embryoniert und anschließend zur Aufbewahrung bei 4 °C in eine 1 % Formalinlösung überführt (Norton und Joyner, 1965). Berghen (1966) kultivierte *C. obsignata*-Eier in einer gesättigten Natriumchloridlösung für zehn Tage bei 25 °C. In einer Versuchsreihe mit *H. gallinarum*-Eiern brachte die Kultivierung bis zum embryonierten Stadium in vier verschiedenen Medien (0,5 % und 2 % Formalin, 0,1 N Schwefelsäure sowie 0,1 % Kaliumdichromat) unterschiedliche Erfolge (Püllen, 2008). Unklar ist bisher, welche

dieser Lösungen im Vergleich die besten Ergebnisse hinsichtlich der Embryonierung von *C. obsignata*-Eiern liefert.

#### 1.4 Künstliche Infektionsversuche mit *Capillaria* spp.

Künstliche Infektionsversuche mit Nematoden bei Hühnern werden schon lange durchgeführt (Herrick, 1926; Levine, 1938; Sadun, 1948; Lund et al., 1966). Mit den Infektionsversuchen sollen Erkenntnisse darüber gewonnen werden, wie sich der Parasit im Wirt verhält. Dass Resistenzen gegenüber *A. galli* existieren, diese abhängig von der Höhe der Infektionsdosis sind und auch züchterisch genutzt werden können, konnte bereits gezeigt werden (Gauly et al., 2001; Permin und Ranvig, 2001; Schou et al., 2003; Kaufmann et al., 2011b). Infektionsversuche zur Klärung der Bedeutung von Parasitenresistenzen sollen in Zukunft auch mit *C. obsignata* durchgeführt werden können.

Die ersten beschriebenen Infektionsversuche mit *C. columbae* (syn. *C. obsignata*) stammen von Levine (1938). Weitere künstliche Infektionen von Hühnern mit *C. obsignata* folgten von Wehr (1939), Norton und Joyner (1965), Berghen (1966), Kiene et al. (1969) und Enigk et al. (1973). Norton und Joyner (1965) beschrieben eine experimentelle Infektion mit Dosen von 200 bis 100.000 Eiern. Es wurden Etablierungsraten von 87,5 % bei 200 Eiern bis zu 3,1 % bei 100.000 Eiern erzielt. Bei anderen Versuchen kamen die Forscher auf Etablierungsraten von 35,4 % bei einer Infektionsdosis von 500 infektiösen Eiern (Enigk et al., 1973). Berghen (1966) erlangte mit 10.000 infektiösen Eiern eine durchschnittliche Etablierungsrate von 17,2 %. Je kleiner die Infektionsdosis ist, desto höher ist die Etablierungsrate (Sadun, 1948; Dhar und Raina, 1987; Permin et al., 1997b; Gauly et al., 2001).

Paterson und Viney (2002) berichteten, dass sich die Schwere der nematoden-induzierten Krankheit mit der Intensität der Infektion erhöht. Die Entwicklung von Nematoden-Infektionen wird nicht nur durch die Umgebungsbedingungen der infizierten Eier wie Kulturmedien, Temperatur und Inkubationszeit (Dick et al., 1973; Anderson, 2000; Permin et al., 1997a, b) beeinflusst. Sie kann auch durch innere Faktoren wie Wirt-Parasit- und Parasit-Parasit-Interaktionen zu dichteabhängigen Populationsprozessen innerhalb einer Wurmpopulation führen (Anderson und May, 1992; Paterson und Viney, 2002).

#### 1.5 Differenzierung von *Capillaria* spp.

Die vier beim Haushuhn am häufigsten vorkommenden *Capillaria*-Arten wurden ausführlich morphologisch beschrieben (Travassos, 1915; Wehr, 1939; Freitas und Almeida, 1934; Madsen, 1945). *Capillaria*-Arten sind morphologisch anhand ihrer Geschlechtsorgane, und zwar des Uterusausganges bzw. der Spicula, oder ihrer Eier zu

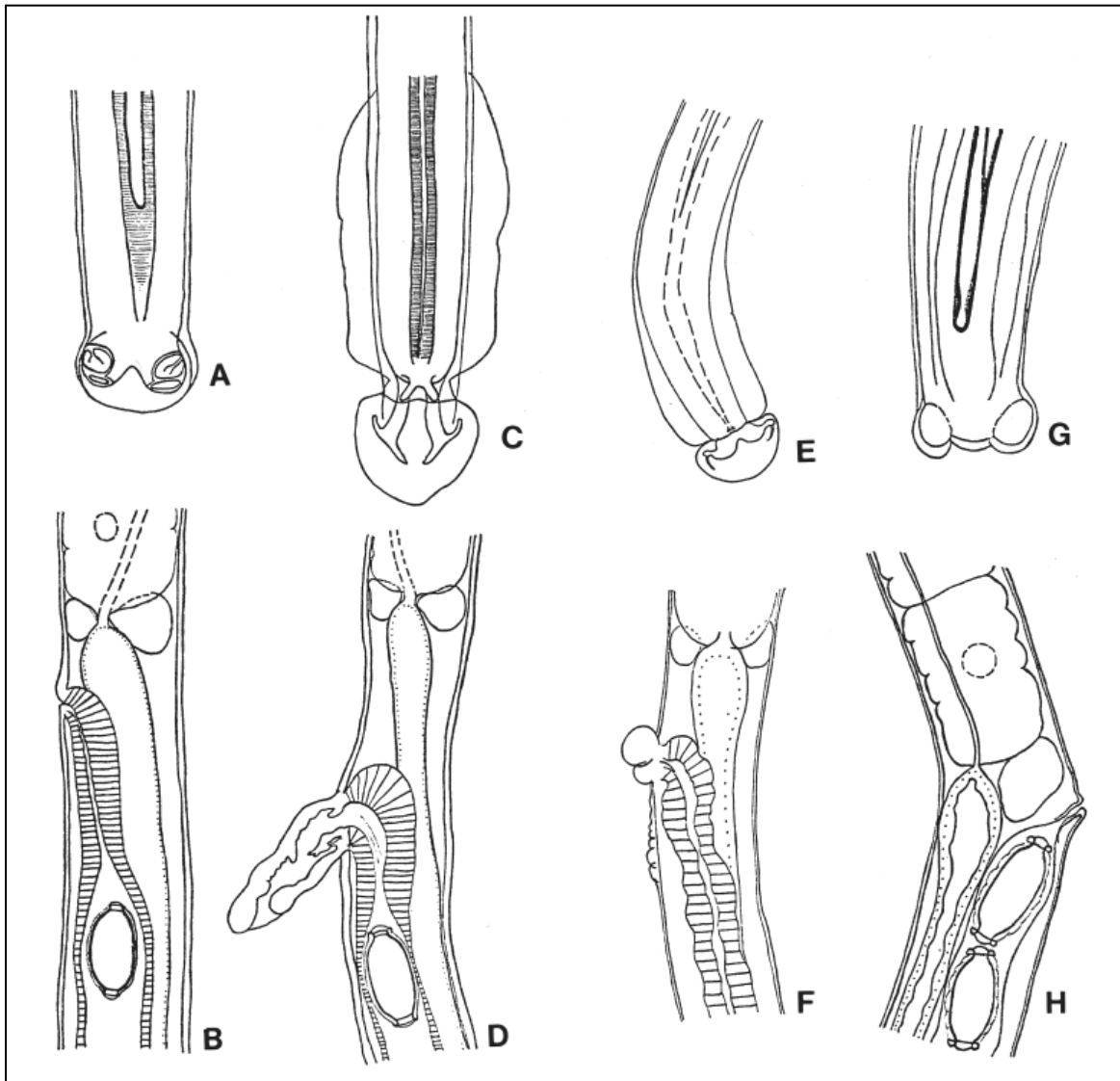
unterscheiden. Die Größe der Würmer lässt nicht auf die Arten schließen, da sich die Länge der Würmer unter Einfluss des Wirtes verändern kann (Madsen, 1951).

Der Uterusausgang der *C. obsignata*-Weibchen wurde in allen früheren Studien von leicht prominent bis zu einer deutlich wulstartigen Erhebung beschrieben (Wehr, 1939; Madsen, 1945; Friedhoff und Ehlers-Bhodigen, 1965). Die *C. obsignata*-Männchen haben eine relativ lange (2,5–2,7 mm), wellige Spiculumscheide und das artspezifische Spiculumende mit zwei hakenähnlichen Bursa-Lappen auf jeder Seite (Madsen, 1945; Wehr, 1939; Friedhoff und Ehlers-Bhodigen, 1965).

*C. caudinflata* wurden erstmalig von Molin 1858 morphologisch beschrieben. Der Uterusausgang der Weibchen hat eine dominante längliche Ausbuchtung, die meist im rechten Winkel vom Wurm absteht (Molin, 1858; Norton und Ruff, 2003; Friedhoff und Ehlers-Bhodigen, 1965). Die *C. caudinflata*-Männchen lassen sich an ihren dominanten Kaudalflügeln erkennen, die in mehrere regelmäßige Abschnitte unterteilt sind (Friedhoff und Ehlers-Bhodigen, 1965). Zudem zeigen sie am Spiculumende zwei hakenähnliche Bursa-Lappen, die dominanter sind als die der *C. obsignata* und die von einer herzförmigen, Bursa-ähnlichen Membran eingefasst sind (Friedhoff und Ehlers-Bhodigen, 1965).

*C. anatis*-Weibchen sind denen der *C. obsignata* morphologisch ähnlich. Der Uterusausgang hat keine besonderen Kennzeichen. Im Gegensatz zu *C. obsignata*-Weibchen findet man keine Erhebung am Ausgang. Die *C. anatis*-Männchen hingegen sind sehr gut von den anderen drei *Capillaria*-Männchen zu unterscheiden. Das Spiculum ist am proximalen und distalen Ende charakteristisch verdickt, und am Spiculumausgang befindet sich eine kurze halbkreisförmige Membran (Friedhoff und Ehlers-Bhodigen, 1965; Norton und Ruff, 2003).

*C. bursata*-Weibchen haben am Uterusausgang mehrere typische hügelige Erhebungen. An der proximalen Seite haben sie meist ein bis zwei dominanter ballonartige Ausbuchtungen und an der distalen Seite mehrere kleine Erhebungen (Freitas und Almeida, 1934; Todd, 1947). *C. bursata*-Männchen sind schwer von *C. caudinflata*-Männchen zu unterscheiden. Die Kaudalflügel an den Spicula des *C. bursata*-Männchens sind nur einmal gelappt und stärker ausgeprägt als die der *C. caudinflata* (Abb. 2).



**Abb. 2:** Männliche Bursa (A,C,E,G) und weibliche Vulva (B,D,F,H) von *Capillaria obsignata* (A,B), *C. caudinflata* (C,D), *C. bursata* (E,F) and *C. anatis* (G,H) im Vergleich (Wakelin, 1965).

Probleme bei der morphologischen Differenzierung der *Capillaria* stellen ihre geringe Größe und die begrenzt zur Verfügung stehenden, charakteristischen morphologischen Merkmale (Zhu et al., 2000) dar. Alternative Ansätze zur morphologischen Identifizierung werden benötigt. Heute ist es möglich, mittels der DNA-Barcoding-Technologie sehr nah verwandte Arten genetisch zu unterscheiden (Tautz et al., 2003; Hebert et al., 2003a; Brede und Steinke, 2006). Als globales System zur Kennzeichnung von Tieren wurde 2003 ein Fragment von etwa 658 bp der ersten Hälfte des mitochondrialen Gens der Untereinheit I der Cytochrom C Oxidase (COI) von Hebert et al. (2003b) vorgeschlagen. Das COI-Gen besitzt den Vorteil, dass Mutationen innerhalb einer Art nur selten auftreten. Mitochondrien werden uniparental vererbt (mütterlicherseits bei Tieren und Menschen, väterlicherseits bei einigen Pflanzen), und die Rekombinationsraten sind sehr niedrig (Giles et al., 1980; Birky, 1995 und 2001; Schwartz und Vissing, 2002 und 2004). Die Gene der Cytochrom C Oxidase-Untereinheiten I und II wurden bereits häufig verwendet, um sich mit phylogenetischen Fragen zu befassen (Simon et al., 1994; Lunt et al., 1996; Salomone et al., 2002; Heethoff, 2004).

Das DNA-Barcoding wird seit Mitte der 1990er-Jahre erfolgreich verwendet und mehrere Arten von Bilateralen, Insekten, Fischen und Vögeln wurden bereits identifiziert (Hebert et al., 2004; Nelson et al., 2007; Ball et al., 2005; Ward et al., 2005; Robba, 2006; Smith et al., 2008; Li et al., 2010; Boehme et al., 2011). Bei *Capillaria* wurden bereits das COI-Gen von *Capillaria sensu lato* und *C. gastrica* aus der Ratte sequenziert (Zhu et al., 2000). Alternativ zur mitochondrialen DNA wird auch die ribosomale DNA als Barcode verwendet (Gasser et al., 1993; Hung et al., 1999, Sim et al., 2010). Die am häufigsten amplifizierten Regionen sind das 18S-rDNA-Gen (Honisch, 2008), das ITS-1-Gen, das 5.8S-rDNA-Gen (Howard et al., 2009; Mullineux und Hausner, 2009) und das ITS-2-Gen (Hoste et al., 1995; Epe et al., 1997).

### **1.6 Zielsetzung der Arbeit**

Im ersten Teil der Arbeit wurde der Einfluss vier verschiedener Kulturmedien auf die Embryonierungsraten von *C. obsignata*-Eiern und deren anschließende Infektiosität bei einer künstlichen Infektion bei jungen Legehennen überprüft (Kapitel II und III).

Anschließend wurde ein weiterer Infektionsversuch mit *C. obsignata* durchgeführt, um eine Aussage über die Auswirkungen der Infektionsdosen auf die Etablierungsraten der getesteten *Capillaria*-Eier treffen zu können. Die Erkenntnisse können genutzt werden, um bei zukünftigen Infektionsversuchen, die der Schätzung genetischer Parameter der Parasitenresistenz dienen, eine maximalen Ausnutzung der

embryonierten *C. obsignata*-Eier zu erzielen (Kapitel III).

Im letzten Teil der Arbeit wurde die Differenzierungsproblematik von *Capillaria* spp. thematisiert und versucht, die Taxonomie der vier im Intestinaltrakt des Huhnes vorkommenden *Capillaria*-Arten über die Fragmente der COI-Sequenzvariationen zu klären (Kapitel IV).

## Literaturverzeichnis

---

- Allen, R. W., Wehr, E. E., 1942. Earthworms as possible intermediate hosts of *Capillaria caudinflata* of the chicken and turkey. Proc. Helminth. Soc. Wash. 9, 72-73.
- Anderson, R. C., 2000. Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development and Transmission. 2. Auflage, CAB International, Wallingford.
- Anderson, R. M., May, R.M., 1992. Infectious diseases of humans: Dynamics and control. Oxford University Press, Oxford.
- Anonymous, 1999. Council Directive 1999/74/EC laying down minimum standards for the protection of laying hens. OJEC, L 203: 53-57.
- Ball, S. L., Hebert, P. D. N., Burian, S. K., Webb J. M., 2005. Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. J. N. Am. Benthol. Soc. 24 (3) 508-524.
- Bauer, R., 1999. Protokoll zur Gewinnung von infektiösen *A.galli*-Eiern. Persönliche Mitteilung, 9.9.1999.
- Berghen, P., 1966. Serum Protein Changes in *Capillaria obsignata* Infections. Exp. Parasitol. 19, 34-41.
- Birky, C. W. Jr., 1995. Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92, 11331-11338.
- Birky, C. W. Jr., 2001. The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms and models. Annu. Rev. Genet. 35, 125-148.
- Boehme, P., Amendt, J., Zehner, R., 2012. The use of COI barcodes for molecular identification of forensically important fly species in Germany. Parasitol. Res. 110(6), 2325-2332. DOI 10.1007/s00436-011-2767-8.
- Brede, N., Steinke, D., 2006. DNA-Barcoding. Taxonomie des 21. Jahrhunderts. Biologie in unserer Zeit. 36 (1), 40-46. DOI: 10.1002/biuz.200410302
- Dänicke, S., Moors, E., Beineke, A., Gauly, M., 2009. Ascaridia galli infection of pullets and intestinal viscosity: consequences for nutrient retention and gut morphology. Br. Poult. Sci. 50(4): 512-520.
- Daş, G., Abel, H. J., Humburg, J., Schwarz, A., Rautenschlein, S., Breves, G., Gauly, M., 2011. Non-starch polysaccharides alter Interaction between *Heterakis gallinarum* and *Histomonas meleagridis*. Vet. Parasitol. 176 (2-3), 208-216.
- Deplazes, P., Eckert, J., v. Samson-Himmelstjerna, G., Zahner, H., 2012. Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. Kap. 20.6.2



- DESTATIS, 2010. Statistisches Bundesamt Deutschland. Pressemitteilung Nr. 069 vom 01.03.2010.
- Dhar, D. N., Raina, O. K., 1987. Establishment of *Ascaridia galli* in betamethasone-treated chickens. *Vet. Parasitol.* , 25 (1), 67-73.
- Dick, J. W., Leland, S. E., Jr., Hansen, M. F., 1973. Hatching and in vitro Cultivation of the nematode *Ascaridia galli* to the third-stage larva. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 92(2), 225-230.
- Dieffenbacher, F., 2007. Untersuchung zur Parasitenfauna von verwilderten Hauskatzen und deren Behandlung mit Selamectin und Praziquantel. *Vet. Med. Diss. FU Berlin.*
- Eckert, J., Friedhoff, K. T., Zahner, H., Deplazes, P., 2005. Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. Kap. 2.3.
- Ehlers- Bhodigen, S., 1961. Der Capillariabefall des Huhnes und seine Behandlung. *Inaug.-Diss. Hannover.*
- Enigk, K., Dey-Hazra, A., Batke, J., 1973 Zur Wirksamkeit von Mebendazol bei Helminthosen von Huhn und Gans. *Avian Pathol.* 2(2), 67-74.
- Epe, C., Samson-Himmelstjerna, v. G., Schnieder, T., 1997. Differences in a ribosomal DNA sequence of liundworm species (Nematoda: Dictyocaulidae) from fallow deer, cattle, sheep and donkeys. *Res. Vet. Sci.* 62, 17-21.
- Freitas, J. F. T., Almeida, L., 1934. Novo nematodeo parasite de Gallus domenicus L., no Brasil: *Capillaria bursata* n. sp. *Recebibo para publicacao*, 18, 273-277.
- Friedhoff, K., Ehlers-Bhodigen, S., 1965. On the diagnosis and epizootiology of *Capillaria* infections in domestic chickens. *Deut. Tierarztl. Woch.* 72(20), 470-478.
- Gasser, R. B., Chilton, N. B., Hoste, H., Beveridge, I., 1993. Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminthes. *Nucleic. Acids. Res.* 21, 2525 2526.
- Gauly, M., Bauer, C., Mertens, C., Erhardt, G., 2001. Effect and repeatability of *Ascaridia galli* egg output in cockerels following a single low dose infection. *Vet. Parasitol.* 96(4), 301-307.
- Gauly, M., Duss, C., Erhardt, G., 2007. Influence of *Ascaridia galli* Infections and anthelmintic treatments on the behavior and social Ranks of laying hens (*Gallus gallus domesticus*). *Vet. Parasitol.* 146, 271-280.
- Gauly, M., Kanan, A., Brandt, H., Weigend, S., Moors, E., Erhardt, G., 2008. Genetic resistance to *Heterakis gallinarum* in two chicken layer lines following a single dose infection. *Vet. Parasitol.* 155 (1-2), 74-79.

- Giles, R. E., Blanc, H., Cann, H. M., Wallace, D. C., 1980. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. PNAS. 77(11), 6715-6719.
- Gräfner, G., Graubmann, H.-D., Schwartz, K., Hiepe, T., Kron, A., 1985. Weitere Untersuchungen zu Vorkommen, Epizootiologie und Bekämpfung der Eimeria-Kokzidiose des Rindes unter den Bedingungen der intensiven Stallhaltung. Monatshefte Veterinärmedizin 40, 41-44.
- Graybill, H. W., 1924. *Capillaria columbae* (Rud.) from the chicken and turkey. J. Parasitol. 10(4), 205-208.
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., de Waard, J. R., 2003a. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. Proc. R. Soc. Lond. B. 270, 96-99.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., 2003b. Biological identifications through DNA barcodes. Proc. R. Soc. Lond. B. 270, 313-321.
- Hebert, P.D.N., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H., Hallwachs, W., 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the Neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101, 14812-14817.
- Heethoff, M., 2004. Genetic diversity and evolutionary age of parthenogenetic oribatid mites (*Acari: Oribatida*). Dissertation, TU Darmstadt.
- Herd, R. P., McNaugh, D. J., 1975. Arrested development and the Histotropic phase of *Ascaridia galli* in the chicken. Int. J. Parasito. 5(4), 401-406.
- Herrick, C. A., 1926. Studies on the resistance of the chicken to the nematode *Ascaridia perspicillum*. Am. J. Epidemiol. 6(1), 153-172.
- Honisch, M., 2008. Phylogenie von Nematoden einheimischer Greifvögel, Inaug-Diss, Berlin.
- Hoste, H., Chilton, N. B., Gasser, R. B., Beveridge, I., 1995. Differences in the Second Internal transcribed Spacer (Ribosomal DNA) between five species of *Trichostrongylus* (Nematoda: Trichostrongylidae). Int. J. Parasitol. 25 (1), 75-80.
- Howard, C., Bremner, P. D., Fowler, M. R., Isodo, B., Scott, N. W., Slater, A., 2009. Molecular Identification of *Hypericum perforatum* by PCR Amplification of the ITS and 5.8S rDNA Region. Planta Med, 75(8), 864-869. DOI: 10.1055/s-0029-1185397.
- Hung, G. C., Gasser, R. B., Beveridge, I., Chilton, N. B., 1999. Species-specific amplification by PCR of ribosomal DNA from some equine strongyles. Parasitol. 119, 69-80.

- Idi, A., Permin, A., Murrell, K. D., 2004. Host age only partially affects resistance to primary and secondary infections with *Ascaridia galli* (Schrank, 1788) in chickens. *Vet. Parasitol.* 122(3), 221-231.
- Ikeme, M. M., 1971. Effects of different levels of nutrition and continuing dosing of poultry with *Ascaridia galli* eggs on the subsequent development of parasite populations. *Parasitol.* 63(2), 233-250.
- Kaufmann, F., Daş, G., Sohnrey, B., Gauly, M., 2011a. Helminth infections in laying hens kept in organic free range systems in Germany. *Livest. Sci.* 141(2-3), 182-187.
- Kaufmann, F., Daş, G., Preisinger, R., Schmutz, M., König, S., Gauly, M., 2011b. Genetic resistance to natural helminth infections in two chicken layer lines. *Vet. Parasitol.* 176(2-3), 250-257.
- Kaufmann, J., 1996. *Parasitic Infections of Domestic Animals: A Diagnostic Manual*, Chapter 1, 360.
- Keutgen, H., Wurm, S., Ueberschär, S., 1999: Pathologisch-anatomische Untersuchungen bei Legehennen aus verschiedenen Haltungssystemen. *Deut. Tierärztl. Woch.* 106, 127-133.
- Kiene, B., Greuel, E., 1969. Effect of various anthelmintics on *Capillaria obsignata* following experimental infection in hens. *Berl. Munch. Tierärztl.* 82(22), 432-436.
- Levine, P. P., 1936a. The effect of various environmental conditions on the viability of the ova of *Capillaria columbae* (Rud.). *J. Parasitol.* 22, 427.
- Levine, P. P., 1936b. A new method for embryonating nematode eggs in fecal discharges. *J. Parasitol.* 22, 291.
- Levine, P. P., 1938. Infection of the chicken with *Capillaria columbae* (Rud.). *J. Parasitol.* 24, 45-52.
- Li, Q. Q., Li, D. Y., Duan, Y. Q., Li, J. M., Liu, X. F., Cao, N., Ye, H., 2010. Application of DNA barcoding in lepidopteran insects. *Chin. Bull. Life Sci.* 22, 307-312.
- Long, P. L., Wakelin, D., 1964. The effects of thiabendazole upon experimental infestations of *Ascaridia galli* and *Capillaria obsignata* in the chicken. *Br. Poult. Sci.* 5(2), 187-192.
- Lund, E. E., Wehr, E. E., Ellis, D. J., 1966. Earthworm Transmission of *Heterakis* and *Histomonas* to Turkeys and Chickens. *J. Parasitol.* 52 (5), 899-902.
- Lunt, D. H., Zhang, D.-X., Szymura, J. M., Hewlitt, O. M., 1996. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Mol. Biol.* 5 (3), 153-165.

- Luttermoser, G. W., 1938. Factors influencing the development and viability of the eggs of *Capillaria hepatica*. Am. J. Epidemiol. 27(2), 275-289.
- Madsen, H., 1945. The species of *Capillaria* parasitic in the digestive tract of Danish gallinaceous and anatine game birds. Danish. Rev. Game Biol. 1, 1-112.
- Madsen, H., 1951. Notes on the species of *Capillaria* Zeder, 1800 known from gallinaceous birds. J. Parasitol. 37(3), 257-265.
- MAFF, 1986. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques. G.D. Reference Book 418.
- Molin, R., 1858. Prospectus helmithum quae in prodromo faunae helmithologicae venetiae continentur. Sitz. Akad. Wiss. Wien. Math. Nat. Cl. 30: 127-158, 33: 302.
- Morehouse, N. F., 1944. Life of *Capillaria caudinflata*, a nematode parasite of the common fowl. Iowa State Coll. J. Sci. 18: 217-253.
- Mullineux, T., Hausner, G., 2009. Evolution of rDNA ITS1 and ITS2 sequences and RNA secondary structures within members of the fungal genera *Grosmannia* and *Leptographium*. Fungal Genet. Biol. 46(11), 855-867.
- Nabi, F., Palaha, H. K., Sekhsaria, D., Chiatale, A., 2007. *Capillaria hepatica* Infestation. In: Indian Pediatrics 44, 781-782.
- Nelson, L. A., Wallmann, J. F., Dowton, M., 2007. Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies. Med. Vet. Entomol. 21, 44-52.
- Norton, C. C., Joyner, L. P., 1965. Experimental chemotherapy of infection with *Capillaria obsignata*. J. Comp. Pathol. 75, 137-145.
- Norton, R. A., Ruff, M. D., 2003. Internal Parasites, Nematodes and Acanthocephalans, in: Barnes, H. J., Glissen, J. R., Fadly, A. M., McDougald, L. R., Swayne, D. E., Saif, Y. M., Diseases of Poultry, 11<sup>th</sup>ed. Iowa State Univ. Press, 931-961.
- Paterson, S., Viney, M.E., 2002. Host immune responses are necessary for density dependence in nematode infections. Parasitol. 125, 283-292.
- Permin, A., Pearman, M., Nansen, P., Bissgaard, M., Frandsen, F., 1997a. An investigation on different media for embryonation of *Ascaridia galli* eggs. Helminth. 34(2), 75-79.
- Permin, A., Bojesen, M., Nansen, P., Bisgaard, M., Frandsen, F., Pearman, M., 1997b. *Ascaridia galli* populations in chickens following single infections with different dose levels. Parasitol. Res. 83(6), 614-617.
- Permin, A., Hansen, J. W., 1998. The Epidemiology, Diagnosis and Control of Poultry Parasites. FAO Handbook. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. The Royal Veterinary and Agriculture University, Copenhagen.

- Permin, A., Nansen, P., Bisgaard, M., Frandsen, F., 1998. *Ascaridia galli* infections in free range layers fed different levels of protein. Br. Poult. Sci. 39, 441-445.
- Permin, A., Bisgaard, M., Frandsen, F., Pearman, M., Kold, J., Nansen, P., 1999. Prevalence of gastrointestinal helminthes in different poultry production systems. Br. Poult. Sci. 40(4), 439-443.
- Permin, A., Ranvig, H., 2001. Genetic resistance to an *Ascaridia galli* infection in chickens. Vet. Parasitol. 102(1-2), 101-111.
- Püllen, U., Cheat, S., Moors, E., Gauly, M., 2008. The role of preparation technique, culture media and incubation time of *Heterakis gallinarum* eggs. Deut. Tierärztl. Woch. 115(1), 30-33.
- Ramadan, H. H., Znada, A. N. Y., 1991. Some pathological and biochemical studies on experimental ascaridiasis in chickens. Nahrung 35 (1), 71-84.
- Robba, L., Russell, S. J., Barker, G. L., Brodie, J., 2006. Assessing the use of the mitochondrial cox1 marker for use in DNA barcoding of red algae (*Rhodophyta*). Am. J. Bot. 93 (8), 1101-1108. doi: 10.3732/ajb.93.8.1101.
- Ruff, M. D., 1999. Important parasites in poultry production systems. Vet. M. Parasitol. 84(3-4), 337-347.
- Sadun, E. H., 1948. Resistance induced in chickens by infections with the nematode *Ascaridia galli*. Am. J. Epidemiol. 47(3), 282-289.
- Sage, R. B., Woodburn, M. I. A., Davis, C., Aebischer, N. J., 2002. The effect of an experimental infection of the nematode *Heterakis gallinarum* on hand-reared grey partridges *Perdix perdix*. Parasitol. 124(5), 529-535.
- Salomone, N., Emerson B. C., Hewitt, G. M., Bernini, F., 2002. Phylogenetic relationships among the Canary Island *Steganacaridae* (Acari, Oribatida) inferred from mitochondrial DNA sequence data. Mol. Ecol. 11(1), 79-89.
- Saunders, L. M., Tompkins, D. M., Hudson, P. J., 2000. The role of oxygen availability in the embryonation of *Heterakis gallinarum* eggs. Int. J. Parasitol. 30(14), 1481-1485.
- Schou, T., Permin, A., Roepstorff, A., Sorensen, P., Kjaer, J., 2003. Comparative genetic resistance to *Ascaridia galli* infections of 4 different commercial layer-lines. Brit. Poult. Sci. 44(2), 182-185.
- Schwartz, M., Vissing, J., 2002. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. In: N. Engl. J. Med. Bd. 347, 576-580.
- Schwartz, M., Vissing, J., 2004. No evidence for paternal inheritance of mtDNA in patients with sporadic mtDNA mutations. In: J. Neurol. Sci. Bd. 218, 99-101.
- Siegmann, O., 1993. Kompendium der Geflügelkrankheiten. Parey Verlag, Berlin.

- Sim, K. A., Hoar, B., Kutz, S. J., Chilton, N. B., 2010. Amplification of the second transcribed spacer ribosomal DNA of individual trichostrongylid nematode larvae by nested polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22, 433-437.
- Simon, C., Frati, F., Becknbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P., 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers, *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87, 651-701.
- Smith, P. J., McVeagh, S. M., Steinke, D., 2008. DNA barcoding for the identification of smoked fish products. *J. Fish Biol.* 72 (2), 464-471. DOI: 10.1111/j.1095-8649.2007.01745.x.
- Sréter, T., Széll, Z., Marucci, G., Pozio, E., Varga, I., 2003. Extraintestinal nematode infections of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Hungary. *Vet. Parasitol.* 115 (4), 329-334. doi:10.1016/S0304-4017(03)00217-6. PMID 12944046.
- Tautz, D., Arctander, P., Minelli, A., Thomas R. H., Vogler, A.P., 2003. A plea for DNA taxonomy. *Trends Ecol. Evol.* 18(2), 70-74.
- Todd, A. C., 1947. On *Capillaria bursata* Teixeira de Freitas and Lins de Almeida, 1934. *J. Tennessee Acad. Sci.* 22, 191-193.
- Verordnung zum Schutz landwirtschaftlicher Nutztiere und anderer zur Erzeugung tierischer Produkte gehaltener Tiere bei ihrer Haltung, (Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung, 22.08.2006, BMELV.
- Vetidata, (Veterinärmedizinischer Informationsdienst für Arzneimittelanwendung, Toxikologie und Arzneimittelrecht), 2014. www.vetidata.de.
- Wakelin, D., 1965. Experimental studies on the biology of *C. obsignata*, Madson, 1945, a nematode parasite of the domestic fowl. *J. Helminth.* 39(4), 399-412.
- Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., Hebert, P. D. N., 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.* 360, 1847-1857.
- Wehr, E. E., 1937. Studies of the development of the Pigeon Capillarid, *Capillaria columbae*. *J. Parasitol.* 23(6), 547-576.
- Wehr, E. E., 1939. Studies on the development of the pigeon Capillarid, *Capillaria Columbae*. *Tech. Bull. U.S. Dep. Agric.* 679, 1-19.
- Wehr, E. E., Allen, R. W., 1945. Additional studies on the life cycle of *C. caudinflata*, a nematode parasite of chickens and turkeys. *Proc. Helminth. Soc. Wash.* 12, 12-14.

Zhu, X., Spratt, D. M., Beveridge, I., Haycock, P., Gasser, R. B., 2000. Mitochondrial DNA polymorphism within and among species of *Capillaria* sensu lato from Australian marsupials and rodents. *Int. J. Parasitol.* 30, 933-938.





## KAPITEL II

---



## **The role of culture media on embryonation and subsequent infectivity of *Capillaria obsignata* eggs**

---

K. M. Tiersch<sup>1\*</sup>, G. Daş<sup>1</sup>, G. v. Samson-Himmelstjerna<sup>2</sup>, M. Gauly<sup>1</sup>

*<sup>1</sup>Department of Animal Sciences, Georg-August-University Göttingen, Albrecht-Thaer-Weg 3, 37075 Göttingen, Germany*

*<sup>2</sup>Institute of Parasitology and Tropical Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Königsweg 67, 14163 Berlin, Germany*

**Published in Parasitology Research (Impact Factor: 2.85) 2013, 112(1), 357-364.  
10/2012; DOI:10.1007/s00436-012-3143-z**

\*Corresponding author

Tel +49 (0)551 395621

Fax +49 (0)551 395587

ktiersc@gwdg.de

**Abstract**

---

This study investigated whether infectivity of *Capillaria obsignata* eggs depends on media culture used for embryonation. Intact female worms were kept in one of following four media: 0.5 % formalin, 2 % formalin, 0.1 % potassium dichromate and 0.1 N sulfuric acid. Embryonation rates of the eggs were quantified either daily in intact females for 16 days, or weekly in disrupted females. Infectivity of the embryonated eggs was tested through an experimental infection of chickens with a single dose of 250 eggs/bird.

The vast majority of the eggs (>82 %) in the first two-third of uteri was able to complete embryonation, irrespective of the culture media used for incubation. However, only 32.6 % of total eggs could be harvested after disruption of the intact females. Embryonation rates of the eggs from disrupted worms were different among four culture media, with 0.1 N sulfuric acid resulting in the highest embryonation rate (44.2 %). All the experimentally infected birds harboured mature worms, with varying establishment rates depending on the culture media ( $P<0.001$ ). Incubation of the eggs in potassium dichromate 0.1 % resulted in a lower ( $P<0.001$ ) establishment rate (10.2 %) when compared with formalin (70.5 % and 47.9 % for concentrations at 0.5 % and 2 %, respectively) or with 0.1 N sulfuric acid (57.5 %).

It can be concluded that most of the eggs in first two-thirds of uteri in the intact females have the potential to complete embryonation without being influenced by the incubation media. However, disruption of the intact females results in lower number of harvestable embryonated eggs, with a considerable variation due to culture media used. With the exception of 0.1 % potassium dichromate, any of the three media, particularly 0.1 N sulfuric acid, can be suggested for embryonation of *C. obsignata* eggs.

Keywords: *Helminthes, Nematode, Eggs, Establishment rate, Poultry*

## 2.1. Introduction

*Ascaridia galli*, *Capillaria* spp. and *Heterakis gallinarum* are the most prevalent helminth species in chicken (Permin and Hansen, 1998; Permin et al., 1999; Ruff, 1999). A recent study (Kaufmann et al., 2011) has shown a high prevalence of helminthes in free-range and deep-litter system hens. Kaufmann et al. (2011) found that 75.3 % of free-range hens were infected with *Capillaria* spp., 88 % with *A. galli* and 98 % with *H. gallinarum*. These results confirm earlier studies showing reemerging helminth infections in the free-range and deep-litter production systems (Permin et al., 1999). Since the prepatent period of *C. obsignata* is shorter (19-22 days; Levine, 1938) than that of *A. galli* (4-8 wk; Idi et al., 2004; Ramadan and Abou Znada, 1991) and *H. gallinarum* (23 days; Daş et al., 2011a) the risk of new and reinfections may be higher in floor husbandry systems where chickens have direct contact to their faeces. Nevertheless, many recent studies focused on exploring factors influencing *A. galli* (Permin et al., 1997a,b; Gaulty et al., 2001; Gaulty et al., 2007; Dänicke et al., 2009; Daş et al., 2012) and *H. gallinarum* infections (Gaulty et al., 2008; Daş et al., 2011b), while less effort has been spent on *Capillaria* infections. This may partly have been due to the lack of knowledge regarding establishment of experimental procedures, i.e. preparation techniques for the infection material and effective infection doses etc., for *Capillaria* infections.

Among four different *Capillaria* species that reside in the intestinal tract of chicken *C. obsignata* is the most common one (Friedhoff et al., 1965). *C. obsignata* live in the mucous membranes of the small intestines and can cause emaciation, diarrhea, hemorrhagic enteritis and could lead to death (Wakelin, 1965). Following sexual reproduction, females lay un-embryonated eggs. The eggs are shed to the external environment through the faeces and undergo development to the infectious larval stage (L1) within 10-21 days, depending on temperature and humidity. The infective eggs may survive over one year depending on the environment (Levine, 1936a). Following ingestion of the embryonated eggs by the host larvae hatch in the small intestine and reach maturity within 19 days (Wehr, 1939).

As embryonation of nematode eggs is affected by several environmental conditions (Dick et al., 1973; Anderson, 1992; Permin et al., 1997a) and shows species specific characteristics, specific requirements must be determined. Two important factors influencing embryonation and the subsequent infectivity of nematode eggs are culture media and duration of incubation. Culture media prevent putrefaction of the *Capillaria* eggs (Levine, 1936b) and inhibit the growth of bacteria and fungi (Luttermoser, 1937, Kopper and Mansfield, 2010). As shown in Table 1 different media for the cultivation of

*C. obsignata* eggs have described in earlier studies (Graybill, 1924; Levine, 1936b; Wehr, 1939; Long and Wakelin, 1964; Norton et al., 1965; Berghen et al., 1966). Similar media were used for the cultivation of *A. galli* eggs (Ikeme, 1971; Herd and McNaugh, 1975; Permin et al., 1997a; Permin et al., 1998) and *H. gallinarum* eggs (Sage et al., 2002; Püllen et al., 2008). Formalin and sulfuric acid are often recommended as suitable culture media for *A. galli* and *H. gallinarum* eggs, whereas they have not been comparably tested for *Capillaria* spp. eggs.

**Table 1** Culture media used for embryonation of eggs for different nematodes of chicken.

Author	Helminths	Media	Temperatur	Time (days)
Graybill (1924)	<i>C. obsignata</i>	Saline solution	22-25°C	7
Levine (1936b)	<i>C. obsignata</i>	2 % K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	np	np
Wehr (1939)	<i>C. obsignata</i>	distilled water	AB	6-8
Norton et al. (1965)	<i>C. obsignata</i>	distilled water	27°C	10
Berghen et al. (1966)	<i>C. obsignata</i>	NaCl	25°C	10
Ikeme et al.(1971)	<i>A. galli</i>	0.1 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25°C	21
Herd and McNaugh (1975)	<i>A. galli</i>	0.5 % Formalin	np	np
Permin et al. (1997a)	<i>A. galli</i>	0.1 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20°C	30
Permin et al.(1998)	<i>A. galli</i>	2 % Formalin	32°C	28
Saunders et al. (2000)	<i>H. gallinarum</i>	0.5 % Formalin	20-25°C	21
Püllen et al. (2008)	<i>H. gallinarum</i>	0.5 % Formalin	AB	2.4.6.8 wk
Püllen et al. (2008)	<i>H. gallinarum</i>	2 % Formalin	AB	2.4.6.8 wk
Püllen et al. (2008)	<i>H. gallinarum</i>	0.1 % K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	AB	2.4.6.8 wk
Püllen et al. (2008)	<i>H. gallinarum</i>	0.1 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	AB	2.4.6.8 wk

AB: ambient temperature (20-22°C), np: not-provided.

For *Capillaria* eggs, it is not clear whether eggs showing higher embryonation rates in a certain medium will also have higher infectivity. Thus any investigation of embryonation of *Capillaria* eggs incubated in different media should ideally be followed by subsequent experimental infection. The aim of this study was to test the impact of various

culture media on embryonation rates of *C. obsignata* eggs and their subsequent infectivity in young layer chickens.

## 2.2. Materials and methods

### 2.2.1 *Capillaria obsignata*

*C. obsignata* females collected from the intestines of naturally infected free-ranging laying hens were used for both the examination of incubation conditions on the embryonation of eggs in different culture media and for further experimental infection of chicken. For the worm harvest, the intestines were opened longitudinally and the contents were washed with tap water through a metal sieve with mesh apertures of 100  $\mu\text{m}$ . The remaining contents including *Capillaria* spp. were transferred into Petri dishes to separate *C. obsignata* females under a stereomicroscope as described by Wakelin (1965). All the female worms were placed in a Petri dish as the main pool.

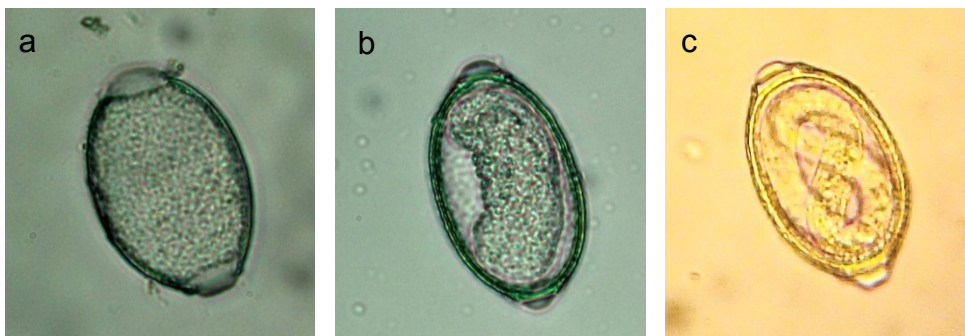
### 2.2.2 Media cultures and quantification of embryonated eggs

Formalin (0.5 % or 2 %), potassium dichromate (0.1 %) and sulfuric acid (0.1 N) were used as the culture media for embryonation of *C. obsignata* eggs. Two parallel procedures were employed to quantify proportions of potentially embryonable and harvestable embryonated eggs, respectively.

In the first approach, development stages of the eggs within uteri of intact worms, kept in one of the media were monitored for 16 days. A group of intact female worms (N=20) were randomly selected from the main pool and the total number of eggs located approximately in the first two-thirds of uterus (proximal to vulva) of each individual was determined. Average length and width of the eggs in the first two-thirds of the uterus were  $52.3 \pm 3.0$  and  $36.4 \pm 9.9$   $\mu\text{m}$ , respectively (n=50 eggs). As the eggs in the last third part of the uterus were small ( $36.4 \pm 9.9$   $\mu\text{m}$  in length and  $17.2 \pm 4.5$   $\mu\text{m}$  in width), they were considered immature and thus incapable of embryonation. The intact females were randomly allocated to one of the four media (n=5 per medium). The arithmetic mean number of eggs within the selected part of uterus was similar ( $P > 0.05$ , one-way-ANOVA) in worms allocated to one of the four media. For each medium, 5 marked Petri dishes, each containing a single female, were used. The Petri dishes were kept at room temperature (20°- 22°C). At daily examinations, the embryonation status of the eggs within the uterus was recorded and the percentage of embryonated eggs determined. Only eggs with an active larva inside were classified as embryonated

(Wehr, 1939). For each female worm, the days in which the first and last embryonation took place were also recorded.

In the second approach, 1000 intact female worms were randomly selected from the main pool and equally allocated to one of the 4 media (n=250 / medium). For each medium 5 Petri dishes, each containing 50 females within 5 ml of culture medium, were used. The Petri dishes were kept at room temperature for 3 weeks (wk) as described above. The amount of culture medium in the Petri dishes was kept constant (5 ml). Embryonation rates of the eggs were determined at the end of second and the third weeks of incubation using 25 randomly selected females from each Petri dish (n=500 per week). Selected females were disrupted by using a Potter S Homogenizer containing 1 ml of water in the cylinder and rotated at 800 rpm for three times each 2 seconds long. Numbers of embryonated and non-embryonated eggs were repeatedly (9 times) determined by counting eggs in subsamples (10  $\mu$ l) of the suspension derived from the homogenizer. A presentation of un-embryonated and embryonated eggs is given in Figure 3.



**Figure 3** *Capillaria obsignata* eggs in different developmental stages (a): an un-embryonated egg; (b): a moveable embryo; (c): an infectious larva.

### 2.2.3 Experimental infection

A total of 20 one-day-old male White Leghorn (Lohmann Selected Leghorns) chicks were reared in a parasite-free environment. The birds received water and a commercial grower diet *ad libitum*. At an age of three wk, the birds were numbered with wing tags, weighed, and allocated to one of four groups based on the culture media used for embryonation of the eggs to be used for the infection. Each group (n=5) was kept in a separated growth unit, and the individual birds were orally infected with a single dose of 250 embryonated eggs of *C. obsignata*, which were cultivated in one of the four corre-



sponding media for 3 wk as described above. The oral infection was performed using a 6 cm long buttoned cannula, which was placed into the crop on day 0, i.e., at an age of 3 wk. The birds were weighed on the infection day and 4 weeks after infection. On days 17, 19, 23 and 28 post infection (p.i.) the birds were placed into single cages for collecting individual faecal samples. Faecal egg counts were performed (FEC) using a modified McMaster technique (MAFF, 1986). The study design did not include an uninfected control group of birds. Post-mortem examinations were performed on day 28 p.i. and the intestines were removed and all *Capillaria* were collected, counted, differentiated for sex and worm length was quantified as described by Wehr (1939).

#### 2.2.4 Statistics

Embryonation rate of the eggs within first two-thirds of uterus was calculated as the proportion of larva containing eggs to the number of eggs counted. Embryonation of the eggs within a female was evaluated in two time periods. The first period was defined as a lag period, the time required until an egg fully developed into a larva (first embryonation). The second period was defined as the time at which the last embryonation took place in a female worm (last embryonation). Differences among media for embryonation rate, for the time required for the first and last embryonations were analyzed with one-way-ANOVA.

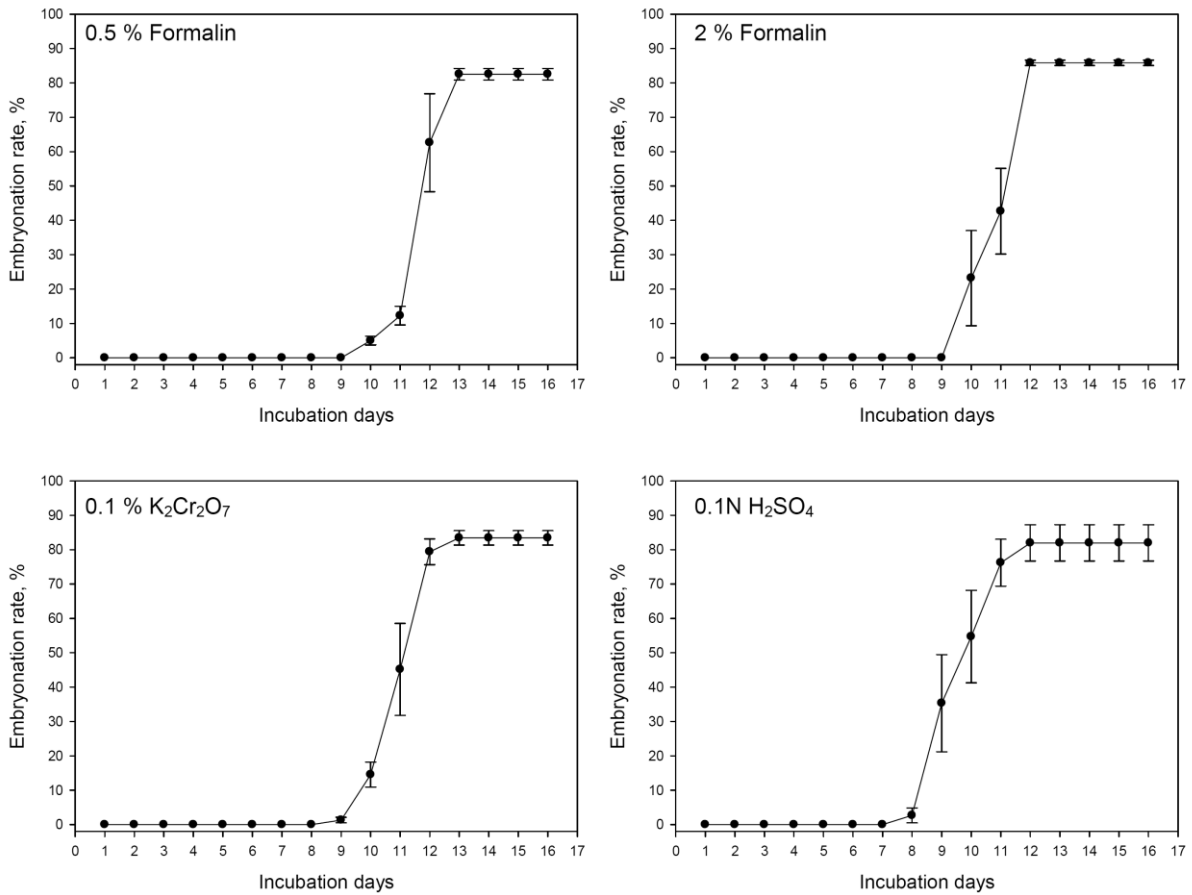
Data regarding proportions of embryonated, un-embryonated and damaged eggs from the worms kept in different media and disrupted shortly before counting were analyzed with a two-way-ANOVA model that included effects of media, incubation weeks and the interaction between these two factors. Worm counts, worm length, body weight on the infection day and average daily weight gain during the infection period (4 wk) were analyzed with one-way-ANOVA, considering the media effect.

Faecal egg counts (eggs per gram faeces, EpG) were log transformed with a function [ $y = \log_{10}(y + 10)$ ] to get approximately normally distributed data. Log transformed EpG data were analyzed with repeated measures ANOVA using proc Mixed of SAS. The model included the fixed effects of media, sampling days (19, 23, 28 d.p.i.) and the interaction effect between media and sampling days. The effect of repeatedly sampled bird (subject) was included in the model as random. As there was no egg (EpG=0) in any of faeces samples on day 17 p.i., data obtained from this day were excluded from the analyses. All post-hoc comparisons were performed with Tukey test with a significance level of  $P < 0.05$ . The statistical analyses were performed with SAS (2010).

## 2.3. Results

### 2.3.1 Embryonation potential of eggs within uteri of intact females

Most of the eggs (>82 %) in the first two-third of the uteri were embryonable (Fig 4), whereas none of the eggs in the last third of the uteri embryonated during the 16 days of observations. In all media, all the embryonable eggs in the first two-thirds of uterus accomplished embryonation fully latest around day 13. As shown in Figure 4, completion of embryonation in all the eggs within uterus took place within 2-3 days after the first egg had fully embryonated. After 16 days of incubation, there was no significant effect of culture media on the embryonation rate of the eggs in the uteri of the intact female worms ( $P=0.807$ ; Table 2). The embryonation rates of the eggs in the first two-thirds of uteri ranged from 82.0 % (SE=0.8) to 85.8 % (SE=5.3) among four different media. The time until first embryonation occurred was significantly ( $P<0.001$ ) shorter for the worms incubated in 0.1 N sulfuric acid when compared to other three media. Similarly, the time required until the last embryonable egg completed embryonation tended ( $P=0.052$ ) to be shorter for worms incubated in 0.1 N sulfuric acid media.



**Figure 4** Embryonation of the eggs in the first two-thirds of uteri of intact female worms kept in different culture media (means and SE on the error bars).

### 2.3.2 Embryonation rates of the eggs harvested from disrupted females

Overall average proportions of embryonated, un-embryonated and damaged eggs harvested from the intact worms that were kept in different media and disrupted shortly before counting, were 32.6 % (SE=1.8), 39.3 % (SE=2.3) and 28.2 % (SE=2.4), respectively. There were no significant ( $P>0.05$ ) interaction effects between media and incubation weeks on the proportions of embryonated, un-embryonated and damaged eggs. Similarly, no significant ( $P>0.05$ ) main effect of incubation weeks was observed on the proportions of embryonated, un-embryonated and damaged eggs. Culture media had significant effects on the proportions of embryonated and un-embryonated eggs from the disrupted worms (Table 2;  $P<0.01$ ). In comparison to formalin (0.5 and 2 %), 0.1 N sulfuric acid increased ( $P<0.05$ ) the proportion of harvested embryonated eggs. Accordingly, the proportion of un-embryonated eggs was higher in the eggs incubated in formalin 0.5 % when compared to sulfuric acid. Proportions of embryonated as well as

un-embryonated eggs incubated in formalin (0.5 % or 2 %) and potassium dichromate did not differ significantly ( $P>0.05$ ).

KAPITEL II / Results

**Table 2** Embryonation rate, the time required until the first and last embryonation took place within intact female worms and the average proportions of harvested eggs (embryonated, un-embryonated and broken-damaged) from female worms kept in different media during incubation and disrupted shortly before counting (Means  $\pm$  SE).

	0.5 % Formalin	2 % Formalin	0.1 % K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	0.1 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	P <sub>≤</sub>
<b>In intact females</b>					
Embryonation rate, %	82.5 $\pm$ 1.69	85.8 $\pm$ 0.79	83.4 $\pm$ 2.1	82.0 $\pm$ 5.30	0.807
First embryonation day	10.2 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	10.2 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	9.6 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	8.6 $\pm$ 0.24 <sup>b</sup>	0.001
Last embryonation day	12.4 $\pm$ 0.24	12.0 $\pm$ 0	12.4 $\pm$ 0.24	11.4 $\pm$ 0.40	0.052
<b>Harvested eggs</b>					
Embryonated, %	24.0 $\pm$ 2.67 <sup>a</sup>	28.9 $\pm$ 3.48 <sup>a</sup>	33.1 $\pm$ 2.48 <sup>ab</sup>	44.2 $\pm$ 3.35 <sup>b</sup>	0.001
Un-embryonated, %	48.4 $\pm$ 4.91 <sup>a</sup>	42.3 $\pm$ 4.56 <sup>ab</sup>	38.9 $\pm$ 3.49 <sup>ab</sup>	27.5 $\pm$ 2.87 <sup>b</sup>	0.008
Broken-damaged, %	27.6 $\pm$ 6.82	28.8 $\pm$ 5.55	28.0 $\pm$ 3.89	28.3 $\pm$ 3.36	0.999

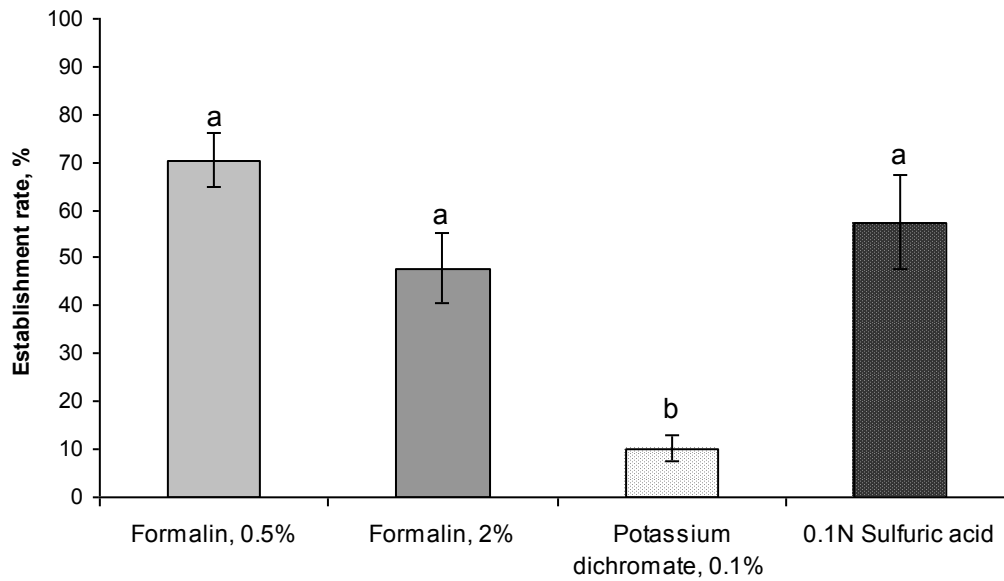
ab: Different letters indicate significant differences between the media (Tukey, P<0.05 after a significant media effect, P<0.01)

### 2.3.3 Experimental infection

None of the birds died, and noticeably no clinical sign of infection was observed during the infection period (4 wk). All the experimentally infected birds harboured mature worms, with varying worm establishment rates depending on the incubation media ( $P < 0.001$ ). As shown in Figure 5 incubation of the eggs in potassium dichromate 0.1 % resulted in a lower (10.2 %) establishment rate when compared with either concentration of formalin (70.5 % and 47.9 % for concentrations of 0.5 % and 2 %, respectively) or with 0.1 N sulfuric acid (57.5 %). There was no significant difference between formalin and sulfuric acid media in their effects on the worm establishment rates ( $P > 0.05$ ). Correspondingly, the mean numbers of female and male worms as well as total worm burdens were not different (Table 3;  $P > 0.05$ ) between formalin (0.5 % and 2 %) and sulfuric acid, whereas incubation of eggs in potassium dichromate significantly lowered worm counts ( $P < 0.001$ ). There was no significant effect of culture media on worm length ( $P > 0.05$ ).

Faecal egg counts of the birds (EpG) were significantly influenced by both culture media (Table 3;  $P = 0.005$ ) and sampling days ( $P < 0.002$ ), whereas there was no significant interaction effect between culture media and sampling days ( $P > 0.05$ ). As indicated in Table 3, overall average EpG was lower ( $P = 0.005$ ) in birds infected with the eggs cultivated in potassium dichromate than in the birds infected with the eggs cultivated either in formalin 0.5 % or in sulfuric acid. Overall average EpG counts in birds infected with the eggs cultivated in formalin 2 % tended ( $P = 0.097$ ) to be higher when compared to the EpG counts of birds infected with the eggs cultivated in potassium dichromate. In all the birds EpG counts gradually increased from day 19 p.i to day 28 p.i. (data not shown).

Body weights of the birds were similar on the infection day ( $P > 0.05$ ). In the end of infection period (day 28 p.i.) there was no significant difference among average daily weight gain (ADG) of the birds infected with eggs cultivated in different media (Table 3;  $P = 0.330$ ).



**Figure 5** Establishment rates of *C. obsignata* eggs incubated in different culture media and given to chickens with a single dose of 250 eggs/bird (Means and SE on the error bars).

ab: different letters indicate significant differences between the media (Tukey,  $P < 0.05$  after a significant media effect,  $P < 0.001$ ).

KAPITEL II / Results

**Table 3** Mean values ( $\pm$ SE) for parasitological parameters and average daily weight gain (ADG) of the chickens infected with 250 infectious *C. obsignata* eggs incubated in different culture media.

	0.5 % Formalin	2 % Formalin	0.1 % K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	0.1 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	P $\leq$
Worm burden, #	176.2 $\pm$ 14.50 <sup>a</sup>	119.8 $\pm$ 18.34 <sup>a</sup>	25.4 $\pm$ 7.10 <sup>b</sup>	143.8 $\pm$ 24.86 <sup>a</sup>	0.001
Females, #	74.2 $\pm$ 6.94 <sup>a</sup>	74.0 $\pm$ 11.85 <sup>a</sup>	11.6 $\pm$ 4.47 <sup>b</sup>	77.2 $\pm$ 9.32 <sup>a</sup>	0.001
Males, #	102 $\pm$ 9.37 <sup>a</sup>	45.8 $\pm$ 8.53 <sup>a</sup>	13.8 $\pm$ 2.70 <sup>b</sup>	66.6 $\pm$ 16.10 <sup>a</sup>	0.001
Larvae, #	1.8 $\pm$ 0.49	1.2 $\pm$ 0.20	0.80 $\pm$ 0.49	3.0 $\pm$ 1.67	0.375
Female length, mm	14.4 $\pm$ 0.82	14.5 $\pm$ 0.34	15.7 $\pm$ 0.68	13.5 $\pm$ 0.17	0.133
Male length, mm	10.3 $\pm$ 0.71	10.6 $\pm$ 0.15	11.5 $\pm$ 0.58	10.35 $\pm$ 0.27	0.308
Average EpG*	161 $\pm$ 37 <sup>a</sup>	126 $\pm$ 46 <sup>ab</sup>	30 $\pm$ 15 <sup>b</sup>	148 $\pm$ 31 <sup>a</sup>	0.005
ADG	14.2 $\pm$ 0.34	14.9 $\pm$ 0.45	16.0 $\pm$ 0.15	12.9 $\pm$ 2.17	0.330

\*: Values represent untransformed data, P-values and multiple comparisons are based on transformed data.

ab: Different letters indicate significant differences between the media (Tukey, P<0.05 after a significant media effect, P<0.001).



## 2.4 Discussion

The vast majority of the eggs (82 %- 86 %) in the first two-thirds of uteri of the intact females were able to embryonate within two weeks, irrespective of the culture media used for incubation. Eggs in this localization of the uterus can be considered as fully developed and capable of embryonation, since their size correspond well to those found in freshly deposited faeces (Graybill, 1924; Wehr, 1939). Accordingly, Norton et al. (1965) reported high embryonation rates (95 %) for *C. obsignata* eggs isolated from faeces and incubated in distilled water. However, the average proportion of harvested embryonated eggs after disruption of the intact females was considerably low (32.6 %), and dependent on the culture media used for incubation. The average proportion of harvested embryonated eggs after disruption of the worms ranged from 24.0 % to 44.2 % with formalin (0.5 %) and 0.1 N sulfuric acid resulting in the lowest and the highest embryonation rates, respectively. The low average proportions of harvested embryonated eggs do not only result from the involvement of immature eggs in the calculations, but also due to the mechanical damage done to the eggs during the disruption of the worms. Although a considerable number of the eggs was damaged (28.2 %) after disruption of intact worms, there was no significant ( $P > 0.05$ ) difference among proportions of the damaged eggs derived from the worms kept in different media. It was not possible to determine the embryonation status of the damaged eggs. Accordingly, similar proportions of the damaged eggs among the four media do not necessarily indicate that disruption of the worms resulted in similar degree of damage to the embryonated eggs of the worms that were kept in different media. In contrast, as the embryonation rates of the eggs in the uteri of intact worms incubated in different media did not differ significantly, it can be inferred that the proportion of embryonated eggs that were damaged during the disruption process was higher for the eggs derived from the worms kept in formalin (0.5 and 2 %) when compared to those kept in sulfuric acid. These results suggest that incubating worms in formalin may have an adverse effect on the integrity of the eggs when compared with sulfuric acid. Effects of formalin and sulfuric acid on embryonation seem to be reproducible for *A. galli* eggs as well. Permin et al. (1997a) isolated *A. galli* eggs from uteri and incubated either in 2 % formalin or in 0.1 N sulfuric acid, which in turn resulted in embryonation rates of 26 % and 41 %, respectively. Since it can not be ensured that a medium favouring embryonation rates will also increase infectivity of the eggs, embryonation rate alone should not be considered as the main criteria for comparing different media. However, it may rather be used as a parameter to assess the efficiency of a medium for the proportion of embryonated eggs at harvest. This is particularly important when the number of available eggs for

embryonation procedures is limited, e.g., in case of rare parasites. However, irrespective of the efficiency of a medium, infection doses are based on the number of infective eggs, and thus infectivity of the eggs should eventually be considered. Infectivity of the eggs, as quantified by the establishment rates, was lowest for the eggs incubated in potassium dichromate, while there was no significant difference among any of the other three media. The impaired ability of the larvae to establish themselves in the intestines might have resulted from toxicity of potassium dichromate solution, which might have induced microscopically non visible effects on the development of larva inside eggs during the incubation period leading to an impairment of the survival of hatched larva. Potassium dichromate is known as a strong algal cell pollutant (Labra et al., 2007) and chromate salts are corrosive and produce cellular damage to tissue (Anonymous, 2010). Burden et al. (1976) showed that *Trichuris suis* eggs, which were embryonated in potassium dichromate, had a lower establishment rate (2 %) when compared to eggs embryonated in a control media (20 %). As suggested by Fairbairn (1960) the low infectivity of embryonated eggs may be explained by chemical changes in the egg shell during the embryonation. Kopper and Mansfield (2010) determined that treatment of *T. muris* eggs with 6.25 % hypochlorite eliminated bacterial and fungal growth on these media, but increased time of exposure to the hypochlorite resulted in increased levels of *T. muris* shell degradation. They suggested that 5- and 10-min exposures of eggs to 6.25 % hypochlorite had limited detrimental effects on the integrity of viable egg shells. The egg wall of nematode eggs consists of the lipid layer, the chitin and the protein cyst (Eckert et al., 2005). In the present study, the aggressive solution might have affected egg shell layers which in turn resulted in an early-hatch and a consequent digestion of larva in the gastrointestinal tract. Although there was no visible change in the morphology of *C. obsignata* eggs incubated in potassium dichromate, size and appearance of the eggs can pronouncedly be influenced under exposure of chemical stressors e.g., benzimidazoles (Dorny et al., 1987).

With the exception of potassium dichromate, establishment rates of the eggs are comparable to the previous studies. Norton (1965), reported 87.5 % and 41.3 % establishment rates for *C. obsignata* eggs inoculated with infection doses of 200 and 1000 eggs/bird, respectively. Despite the significant differences in worm burden of the birds infected with eggs incubated in different media, there were no significant differences for the average daily weight gain (ADG) of the birds. This may partly be explained by the low infection doses. As reported by Norton (1965) the most severe symptoms of *Capillaria* infections are observed in birds infected with high doses of eggs (5000 to 100.000). Since the study design did not include un-infected control birds, lack of dif-

ferences for ADG of the birds does not necessarily indicate that the infection had no effect on host performance; rather it may indicate that the degree of impairment in growth might have been at similar levels, due to relatively low infection dose. To ensure a sufficient level of experimental *Capillaria* infection with adverse effects on host animal performance, further studies including higher infection doses and un-infected controls in their designs are needed.

The results showed that most of the eggs in first two-thirds of uteri in the intact females have the potential for embryonation without being influenced by the incubation media. However, disruption of the intact females results in lower number of harvestable embryonated eggs with a considerable variation due to culture media used. With the exception of 0.1 % potassium dichromate, any of the three media, particularly 0.1 N sulfuric acid, can be suggested for embryonation of *C. obsignata* eggs.

### **Acknowledgements**

Special thanks go to Ms. B. Sohnrey, Mr. E. Toenges and Mr. D. Daniel for their invaluable assistance.

## References

---

- Anderson, R.C., 1992. Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission. CAB Int, Wallingford.
- Anonymous, 1999. Council Directive 1999/74/EC laying down minimum standards for the protection of laying hens. OJEC, L 203: 53-57.
- Anonymous, 2010. Material safety data sheet, Santa Cruz Biotechnology, Inc. [datasheets.scbt.com/sc-203353.pdf](http://datasheets.scbt.com/sc-203353.pdf).
- Berghen, P., 1966. Serum protein changes in *Capillaria obsignata* infections. Exp. Parasitol. 19(1), 34-41.
- Burden, D.J., Hammet, N.C., 1976. A comparison of the infectivity of *Trichuris suis* ova embryonated by four different methods. Vet. Parasitol 2(3), 307-311.
- Dänicke, S., Moors, E., Beineke, A., Gaulty, M., 2009. Ascaridia galli infection of pullets and intestinal viscosity: consequences for nutrient retention and gut morphology. Br. Poult. Sci. 50(4), 512-520.
- Daş, G., Savaş, T., Kaufmann, F., Idris, A., Abel, H., Gaulty, M., 2011a. Precision, repeatability and representative ability of faecal egg counts in *Heterakis gallinarum* infected chickens. Vet Parasitol 183(1-2), 87-94.
- Daş, G., Abel, H. J., Humburg, J., Schwarz, A., Rautenschlein, S., Breves, G., Gaulty, M., 2011b. Non-starch polysaccharides alter interaction between *Heterakis gallinarum* and *Histomonas meleagridis*. Vet. Parasitol. 176 (2-3), 208-216.
- Daş, G., Abel, H., Rautenschlein, S., Humburg, J., Schwarz, A., Breves, G., Gaulty, M., 2012. The effects of dietary non-starch polysaccharides on *Ascaridia galli* infection in grower layers. Parasitol. 139(1), 110-119.
- Dick, J. W., Leland, S.E., Jr. and Hansen, M. F., 1973. Hatching and in vitro cultivation of the nematode *Ascaridia galli* to the third-stage larva. Trans. Am. Microsc. Soc. 92(2), 225-230.
- Dorny, P., Berghen, P., Vercruyssen, J., 1987. Morphological changes in *Capillaria obsignata* (Nematoda: Trichuridae) eggs after treatment with cambendazole. Parasitol. Res. 74, 196-197.
- Eckert, J., Friedhoff, K.T., Zahner, H., Deplazes, P., 2005. Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. Enke Verlag, Kap. 2.3.
- Fairbairn, D., 1960. Physiologic aspects of egg hatching and larval exsheathment in nematodes, in: Stauber LA (Editor), host influence on parasite physiology. Rutgers university press, New Brunswick, NJ, pp. 50-64.

- Friedhoff, K., Ehlers- Bhodigen, S., 1965. On the diagnosis and epizootiology of *Capillaria* infections in domestic chickens. DTW 72 (20), 470-478.
- Gauly, M., Bauer, C., Mertens, C., Erhardt, G., 2001. Effect and repeatability of *Ascaridia galli* egg output in cockerels following a single low dose infection. Vet. Parasitol. 96(4), 301-307.
- Gauly, M., Duss, C., Erhardt, G., 2007. Influence of *Ascaridia galli* infections and anthelmintic treatments on the behavior and social ranks of laying hens (*Gallus gallus domesticus*). Vet. Parasitol. 146(3-4), 271-280.
- Gauly, M., Kanan, A., Brandt, H., Weigend, S., Moors, E., Erhardt, G., 2008. Genetic resistance to *Heterakis gallinarum* in two chicken layer lines following a single dose infection. Vet. Parasitol. 155(1-2), 74-79.
- Graybill, H. W., 1924. *Capillaria columbae* (Rud.) from the chicken and turkey. J. Parasitol. 10(4), 205-207.
- Herd, R. P., McNaught, D.J., 1975. Arrested development and the histotropic phase of *Ascaridia galli* in the chicken. Int. J. Parasitol. 5(4), 401-406.
- Idi, A., Permin, A., Murrell, K.D., 2004. Host age only partially affects resistance to primary and secondary infections with *Ascaridia galli* (Schrank, 1788) in chickens. Vet. Parasitol. 122(3), 221-231.
- Ikeme, M. M., 1971. Effects of different levels of nutrition and continuing dosing of poultry with *Ascaridia galli* eggs on the subsequent development of parasite populations. Parasitol. 63(2), 233-250.
- Kaufmann, F., Daş, G., Sohnrey, B., Gauly, M., 2011. Helminth infections in laying hens kept in organic free range systems in Germany. Livestock Sci. 141(2-3), 182-187.
- Kaufmann, F., Daş, G., Preisinger, R., Schmutz, M., König, S., Gauly, M., 2011. Genetic resistance to natural helminth infections in two chicken layer lines. Vet. Parasitol. 176(2-3), 250-257.
- Kharab, P., Singh, I., 1985. Genotoxic effects of potassium dichromate, sodium arsenite, cobalt chloride and lead nitrate in diploid yeast. Mutat. Res. 155(3), 117-120.
- Kopper, J. J., Mansfield, L. S., 2012. Development of improved methods for delivery of *Trichuris muris* to the laboratory mouse. Parasitol. Res. 107, 1103–1113.
- Labra, M., Bernasconi, M., Grassi, F., De Mattia, F., Sgorbati, S., Airoidi, R., Citterio, S., 2007. Toxic and genotoxic effects of potassium dichromate in *Pseudokirchneriella subcapitata* detected by microscopy and AFLP marker analysis. Aquat. Bot. 86(3), 229-235.

- Levine, P. P., 1936a. The effect of various environmental conditions on the viability of the ova of *Capillaria columbae* (Rud.). J. Parasitol. 22, 427.
- Levine, P. P., 1936b. A new method for embryonating nematode eggs in fecal discharges. J. Parasitol. 22, 291.
- Levine, P. P., 1938. Infection of the chicken with *Capillaria columbae* (Rud.). J. Parasitol. 24(1), 45-52.
- Long, P. L., Wakelin, D., 1964. The effects of thiabendazole upon experimental infestations of *Ascaridia galli* and *Capillaria obsignata* in the chicken. Br. Poult. Sci. 5(2), 187-192.
- Luttermoser, G. W., 1938. Factors influencing the development and viability of the eggs of *Capillaria hepatica*. Am. J. Epidemiol. 27(2), 275-289.
- MAFF, 1986. Ministry of agriculture, fisheries and food. Manual of veterinary parasitological laboratory techniques. G.D. Ref. Book, 418.
- Norton, C. C., Joyner, L. P., 1965. Experimental chemotherapy of infection with *Capillaria obsignata*. J. Comp. Pathol. 75, 137-145.
- Permin, A., Pearman, M., Nansen, P., Bisgaard, M., Frandsen, F., 1997a. An investigation on different media for embryonation of *Ascaridia galli* eggs. Helminthol. 34(2), 75-79.
- Permin, A., Bojesen, M., Nansen, P., Bisgaard, M., Frandsen, F., Pearman, M., 1997b. *Ascaridia galli* populations in chickens following single infections with different dose levels. Parasitol. Res. 83(6), 614-617.
- Permin, A., Hansen, J.W., 1998. The epidemiology, diagnosis and control of poultry parasites. FAO handbook, food and agriculture organization of the United Nations, Rome. Royal Veterinary and Agriculture University, Copenhagen.
- Permin, A., Nansen, P., Bisgaard, M., Frandsen, F., 1998. *Ascaridia galli* infections in free-range layers fed on diets with different protein contents. Br. Poult. Sci. 39(3), 441-445.
- Permin, A., Bisgaard, M., Frandsen, F., Pearman, M., Kold, J., Nansen, P., 1999. Prevalence of gastrointestinal helminths in different poultry production systems. Br. Poult. Sci. 40(4), 439-443.
- Püllen, U., Cheat, S., Moors, E., Gaulty, M., 2008. The role of preparation technique, culture media and incubation time of *Heterakis gallinarum* eggs. DTW 115(1), 30-33.
- Ramadan, H. H., Abou Znada, N. Y., 1991. Some pathological and biochemical studies on experimental ascaridiasis in chickens. Food 35(1), 71-84.
- Ruff, M. D., 1999. Important parasites in poultry production systems. Vet. Parasitol.

84(3-4), 337-347.

- Sage, R. B., Woodburn, M. I. A., Davis, C., Aebischer, N. J., 2002. The effect of an experimental infection of the nematode *Heterakis gallinarum* on hand-reared grey partridges *Perdix perdix*. *Parasitol.* 124(5), 529-535.
- Saunders, L. M., Tompkins, D. M., Hudson, P. J., 2000. The role of oxygen availability in the embryonation of *Heterakis gallinarum* eggs. *Int. J. Parasitol.* 30(14), 1481-1485.
- Wakelin, D., 1965. Experimental studies on the biology of *C. obsignata*, Madson, 1945, a nematode parasite of the domestic fowl. *J. Helminth.* 39(4), 399-412.
- Wehr, E. E., 1939. Studies on the development of the pigeon capillariid, *Capillaria columbae*. *Tech. Bull. U.S. Dep. Agric.* 679, 1-19.





**KAPITEL III**

---



## **Artificial infection of chickens with *Capillaria obsignata* eggs embryonated in different media**

---

K. M. Tiersch<sup>1</sup>, G. Daş<sup>1\*</sup>, G. von Samson-Himmelstjerna<sup>2</sup>, M. Gauly<sup>1</sup>

*<sup>1</sup>Department of Animal Sciences, Livestock Production Systems, Georg-August-University Göttingen, Albrecht-Thaer-Weg 3, 37075 Göttingen, Germany*

*<sup>2</sup>Institute for Parasitology and Tropical Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Königsweg 67, 14163 Berlin, Germany*

**Published in Veterinary Parasitology (Impact Factor: 2.38). 12/2013; 200(1-2):139-146. DOI:10.1016/j.vetpar.2013.11.024**

\*Corresponding author

Tel : +49 551 3922178

Fax : +49 551 395587

E-mail : [gdas@gwdg.de](mailto:gdas@gwdg.de)

**Abstract**

---

The present study investigated whether incubation media have an impact on infectivity of *Capillaria obsignata* eggs in chickens infected with gradually increasing doses. *C. obsignata* eggs collected from female worms were incubated either in formalin (0.5 % or 2 %) or in potassium dichromate 0.1% or in sulfuric acid 0.1 N for three weeks (wk). One-day-old male chicks (N=92) were reared in a parasite-free environment, and infected with 0, 500, 1000 or 2000 eggs at an age of three wk. Post-mortem parasitological examinations were performed on day 28 p.i.

Although all the infected birds harbored adult worms, their growth performance was not affected. Furthermore there was no significant interaction effect between incubation media and infection dose on worm establishment rates ( $P=0.080$ ), while main effects of these two factors were significant ( $P<0.05$ ). The average number of adult worms found in birds infected with the eggs incubated in potassium dichromate were significantly lower ( $P<0.001$ ) than in formalin 0.5 %, formalin 2 % and sulfuric acid 0.1 N. A higher ( $P<0.05$ ) percentage of larvae could establish themselves in the intestines when the birds were infected with 500 eggs (40.5 %) instead of 2000 eggs (26.2 %), indicating density dependent effects.

It is concluded that formalin (particularly 0.5 %), and sulfuric acid can successfully be used as incubation media for *C. obsignata* eggs, whereas potassium dichromate impairs subsequent infectivity of the eggs. Although effects of media on the infectivity of the eggs were confirmed to be fairly repeatable, no harmful effect of infection was quantified on the host animal performance with the infection doses up to 2000 eggs.

*Keywords: Density dependence, poultry, establishment, culture media, nematode*

### 3.1 Introduction

Nowadays the vast majority of laying hens are kept in free range or deep litter systems (DESTATIS, 2010). Over recent years the number of different parasitic infections in chicken increased steadily in the alternative housing systems under different environmental situations (Permin et al., 1999; Thamsborg et al., 1999; Fossum et al., 2009). Problems with nematodes were not prevalent in conventional cages because new- and reinfections were limited (Siegmann, 1993). *Capillaria* spp., as well as *Ascaridia galli* and *Heterakis gallinarum*, are the most common parasites found in laying hens in non-cage housing systems (Permin et al., 1999; Kaufmann et al., 2011). Mönning and Lapage (1956) postulated that probably only *A. galli* and *C. obsignata* are of pathogenic significances and that they have adverse effects on nutrient utilization, growth or behaviour patterns of chicken (Chubb and Wakelin, 1963; Gauly et al., 2007; Daş et al., 2010). *C. obsignata* resides especially in the mucous membranes of the small intestines and causes emaciation, diarrhea, hemorrhagic enteritis and can even lead to death (Wakelin, 1965).

The development of nematode infections is not only affected by environmental conditions the infective eggs are exposed to, such as culture media, temperature and incubation time (Dick et al., 1973; Anderson, 1992; Permin et al., 1997a, b) but also by inner factors like host-parasite and parasite-parasite interactions, which may cause density-dependent effects on worm populations (Anderson and May, 1992; Paterson and Viney, 2002). Paterson and Viney (2002) suggested that immunological memory will induce density-dependent effects on parasite establishment and survival. Intraspecific competition for resources within the host gut has also been hypothesized as a potential cause of density-dependent effects. To understand these contexts and connections in details, it is essential to carry out experimental infections.

For the cultivation of *C. obsignata* eggs different media (Saline solution, 1 % formalin, 2 % potassium dichromate and distilled water) were described in earlier studies (Graybill, 1924; Levine, 1938; Wehr, 1939; Frazier, 1962; Long and Wakelin, 1964; Norton and Joyner, 1965; Berghen, 1966). Other media (0.5 %- 2 % Formalin, 0.1 N sulfuric acid) were used for the cultivation of *A. galli* (Ikeme, 1971; Herd and McNaugh, 1975; Permin et al., 1997a; Permin and Hansen, 1998) and of *H. gallinarum* eggs (Sage et al., 2002; Püllen et al., 2008). Earlier studies have been performed in order to test the infectivity of *C. obsignata* eggs (Levine, 1938; Wehr, 1939; Frazier, 1962; Norton and Joyner, 1965; Enigk et al., 1973). Recently Tiersch et al. (2013) also used four different culture media and tested the infectivity of *C. obsignata* eggs with a low infection dose (250 infectious eggs / bird). Therefore, the aim of this study was to investi-

gate whether incubation media have an impact on infectivity of *C. obsignata* eggs in chicken infected with gradually increasing doses.

### 3.2 Materials and methods

#### 3.2.1 Experimental design and animal material

An experimental design including a two-way factorial (4 x 4) arrangement of treatments, namely incubation media (1-4) and infection doses (0, 500, 1000 or 2000 eggs / bird), was employed. One-day-old male birds (N=92) of Lohmann Selected Leghorn genotype were housed in a parasite-free environment for three wk. At the age of three wk, the birds were weighed, numbered with wing tags and allocated randomly to one of four growth units within the same experimental stable. Each growth unit corresponded to one of four media that were used separately for incubation of *C. obsignata* eggs, i.e. formalin 0.5 %, formalin 2 %, potassium dichromate 0.1 % and sulfuric acid 0.1 N. In each growth unit, the birds were either kept as un-infected (n= 7, 7, 7 and 11) or experimentally infected with 500 or 1000 or 2000 embryonated eggs (n=5 birds / infection dose). The birds received water and a commercial feed *ad libitum* throughout the study. On the infection day (wk 3), there was no significant difference among body weights of the birds allocated to different growth units or infection doses between or within any of growth units (P>0.05).

#### 3.2.2 Infection material, incubation media and experimental infection

*C. obsignata* females collected from the small intestines of naturally infected laying hens were used as the source of infection material as described earlier (Tiersch et al., 2013). Briefly, all worms of *Capillaria* spp. were harvested, and after species differentiation intact females of *C. obsignata* were gathered in a pool. The pooled worms were randomly placed into Petri dishes containing either formalin (0.5 or 2 %), or potassium dichromate 0.1 % or sulfuric acid 0.1 N as culture media for embryonation of the eggs within the uterus of intact females. The incubation took place at room temperature (20–22 °C) for 16 days. After embryonation of the eggs, the intact worms were stored at 4°C for 3 wk until the experimental infection of chickens was performed. On the infection day, the female worms were disrupted using a Potter S homogenizer containing 1 ml of water in the cylinder and centrifuged at 800 rpm for three times each 2 sec long. Average number of embryonated eggs (with an active larva inside) in the suspension was determined microscopically using regular slides and cover slips by counting 9 aliquots of 10 µl at a magnification of 100 times. Thereafter, the individual infection dose was adjusted to an aliquot of 0.2 ml of per bird and given orally using a 6 cm long but-

toned cannula. Un-infected control birds received the same amount of corresponding incubation medium as placebo. All the birds were weighed on the day of infection (day 0) and on day 28 post infection (p.i.). Individual faecal samples were collected on days 19, 23 and 28 p.i. to determine nematode egg intensity in faeces (EPG, eggs per gramme faeces) by using a modified McMaster technique (MAFF, 1986). On day 28 p.i., the birds were euthanized after electrical stunning and the post-mortem parasitological examinations were performed. All *C. obsignata* found in the content of small intestines were collected, counted, differentiated for sex and worm length was measured (Wehr, 1939).

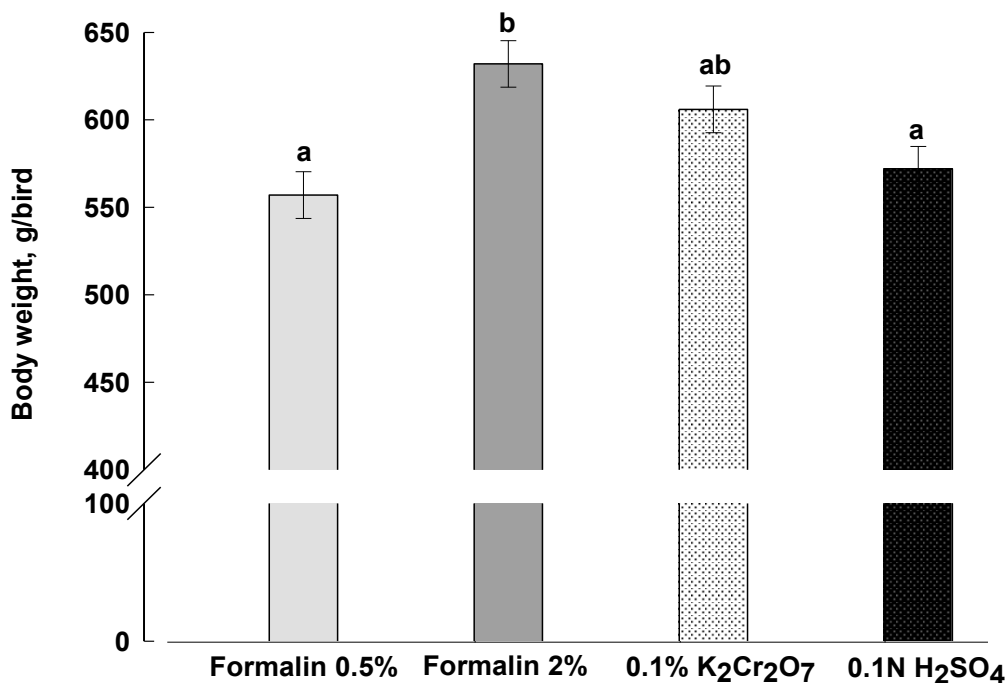
### 3.2.3 Statistics

Data related to final body weight of the birds on day 28 p.i. were analyzed with two-way-ANOVA (4 x 4), including fixed effects of media (1-4) and infection doses (0, 500, 1000, 2000 eggs / bird) as well as the interaction effect between these two factors. Un-infected control birds were excluded from the analyses for the infection parameters (worm- and faecal egg counts). Worm- and faecal egg counts (EpG) were log transformed [ $y = \log_{10}(y + 10)$ ] to produce approximately normally distributed data. Data including the log-transformed worm counts and worm length were analyzed with a reduced two-way-ANOVA (4 x 3), considering fixed effects of media (1-4) and infection doses (500, 1000, 2000 eggs / bird) as well as the interaction effect of these two factors in the model. Log transformed EpG data were analyzed with the repeated measures ANOVA using proc Mixed of SAS. The model included the fixed effects of media (1-4), infection doses (500, 1000, 2000 eggs / bird) and sampling days (19, 23, 28 d.p.i.) and all possible interactions between media, infection doses and the sampling days. The effect of repeatedly sampled bird (subject) was included in the model as random. Fecundity of female worms was defined as the number of eggs in gram of faeces per female worm (EpG / female) on day 28 p.i. Fecundity was also log-transformed and analyzed with the previous model described for the worm count data. All post-hoc comparisons were performed with Tukey test with a significance level of  $P < 0.05$ . The results for the transformed data were back-transformed and represented as the geometric means together with minimum and maximum values of the corresponding raw data. Results obtained for the non-transformed variables are represented as Means  $\pm$  SE. All the statistical analyses were performed with SAS (2010).

### 3.3 Results

#### 3.3.1 Animal performance

During the four weeks of infection period, no birds died and no obvious clinical sign of infection was observed although all the experimentally infected birds harboured mature *C. obsignata*. No significant interaction effect of media and infection dose could be quantified on body weight (BW) of the birds at slaughter ( $P=0.925$ ). Similarly, infection dose did not influence ( $P=0.213$ ) BW. However, as shown in Figure 6, media had a significant effect on BW at slaughter ( $P<0.001$ ). Infections resulting from the eggs incubated in formalin 0.5 % or sulfuric acid 0.1 N impaired BW when compared to the infection with eggs incubated in formalin 2 % (Fig 6;  $P<0.05$ ).



**Figure 6** Final body weights (on 28 d.p.i.) of birds infected with *C. obsignata* eggs incubated in different media (Means and SE on the error bars).

ab: different letters indicate significant differences (Tukey,  $P < 0.05$  after a significant media effect,  $P<0.001$ ).

#### 3.3.2 Faecal egg counts and female worm fecundity

No nematode eggs were found in the faeces of control chickens at any of the sampling days. Independent of infection dose, EPGs of the birds increased significantly ( $P<0.001$ ) from day 19 p.i. to day 23 p.i. ( $P<0.05$ ) and remained constant from this point onward (data not shown;  $P>0.05$ ). However, no interaction effect, either between



media and sampling days or between infection doses and sampling days, was quantified ( $P > 0.05$ ). Similarly, there was no significant interaction effect between medium and infection dose on the faecal egg counts ( $P = 0.693$ ; Table 4). A triple interaction between effects of incubation media, infection doses and sampling days was also absent ( $P = 0.938$ ). Although there was no significant main effect of infection dose on EPG ( $P = 0.158$ ), it was significantly influenced by the incubation media ( $P < 0.001$ ). As shown in Table 1, overall average EPG was lower in the birds infected with the eggs incubated in potassium dichromate than in the birds infected with eggs incubated in any of other three media ( $P < 0.05$ ).

There was no significant interaction effect between medium and infection dose on female worm fecundity (EPG / female). Fecundity of female worms, estimated for day 28 p.i., remained unaffected either by the main effect of infection dose ( $P = 0.531$ ; Table 4) or by the interaction effect between incubation media and infection doses ( $P = 0.791$ ). However, female worms harvested from the birds infected with eggs that had been incubated in potassium dichromate had a higher fecundity ( $P = 0.004$ ) when compared with the worms originating from the eggs incubated in any of three other media (Table 4).

**Table 4** Faecal egg excretion and female worm fecundity estimates in chickens infected with *Capillaria obsignata* eggs incubated in different media and at increasing infection doses.

	<i>Media</i>					<i>Infection doses</i>				<i>Media x Dose</i>
	<b>0.5 % Forma- lin</b>	<b>2 % Forma- lin</b>	<b>0.1 % K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub></b>	<b>0.1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>P, ≤</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>2000</b>	<b>P, ≤</b>	
EPG*†	243 <sup>a</sup> (0-1566)	302 <sup>a</sup> (0-1282)	49 <sup>b</sup> (0-274)	111 <sup>a</sup> (0-588)	0.001	134 (0-728)	172 (0-850)	128 (0-1566)	0.158	0.693
Fecundity*††	1.6 <sup>a</sup> (0-3)	3.7 <sup>ab</sup> (0-15)	5.4 <sup>b</sup> (0-29)	0.8 <sup>a</sup> (0-2)	0.004	3.4 (0-29)	2.7 (0-21)	2.1 (0-15)	0.531	0.791

\*: Back-transformed data: values represent geometric means with minimum and maximum in brackets.

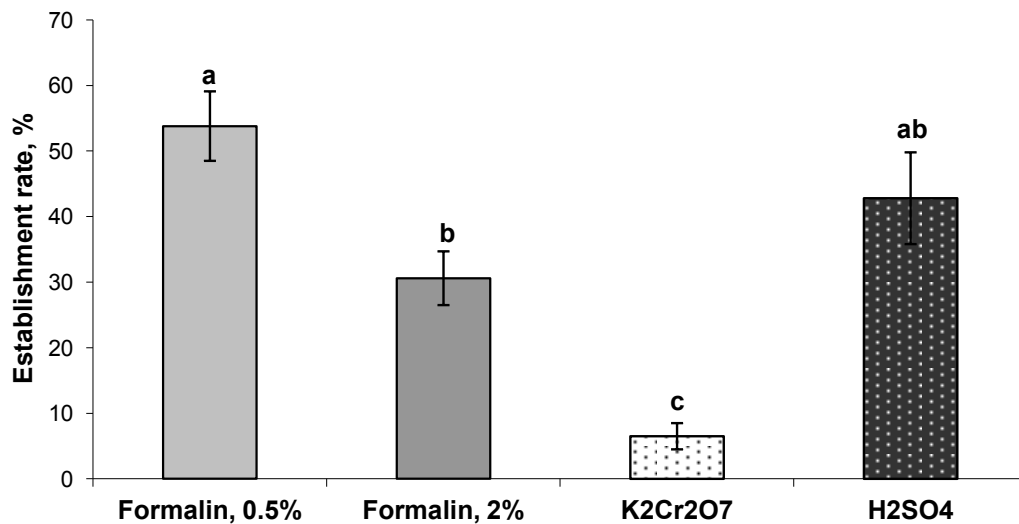
†: EPG on day 28 p.i.

††: Estimated as EPG/female for day 28 p.i.

ab: Values with no common letters on a row within a factor differ (Tukey,  $P < 0.05$  after a significant effect,  $P < 0.01$ ).

### 3.3.3 Establishment rate, worm count and length

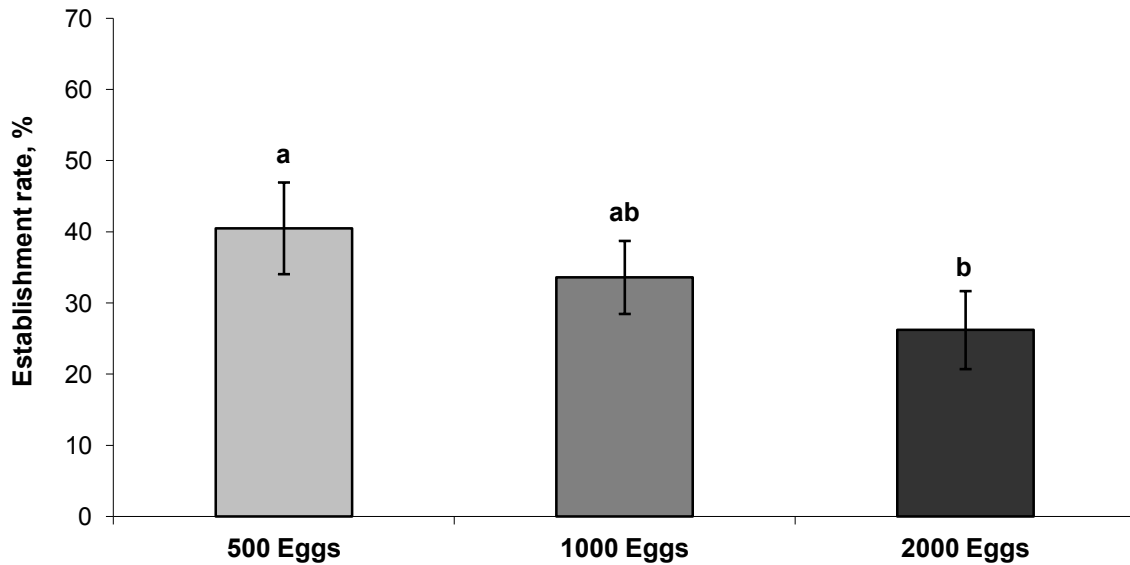
Although there was no significant interaction effect between incubation media and infection doses on worm establishment rates in the infected chickens ( $P=0.080$ ), main effects of these two factors were significant ( $P<0.05$ ). Compared to formalin (0.5 % or 2 %) and sulfuric acid, incubating eggs in potassium dichromate resulted in lower establishment rates ( $P<0.05$ ; Fig 7). Similarly, formalin 2 % impaired establishment rates when compared with formalin 0.5 % ( $P<0.05$ ).



**Figure 7** Establishment rates of *C. obsignata* in chickens infected with eggs incubated in different culture media (Means and SE on the error bars).

abc: different letters indicate significant differences (Tukey,  $P < 0.05$  after a significant media effect,  $P<0.001$ ).

As shown in Figure 8, increasing infection doses resulted in decreasing establishment rates. A higher ( $P<0.05$ ) percentage of larvae could establish themselves in the intestines when the birds were infected with 500 eggs instead of 2000 eggs. There was no significant difference between establishment rates in the birds infected with 1000 eggs when compared to the higher (2000 / bird) or lower (500 / bird) infection doses ( $P>0.05$ ).



**Figure 8** Establishment rates of *C. obsignata* in chickens infected with different infection doses (Means and SE on the error bars).

ab: different letters indicate significant differences (Tukey,  $P < 0.05$  after a significant infection dose effect,  $P=0.045$ ).

The highest worm burden (1794) was found in a bird infected with the eggs incubated in formalin 0.5 % and given as a dose of 2000 infectious eggs. There was no significant interaction effect of the incubation media and the infection doses on the parameters describing worm counts and size ( $P > 0.05$ ; Table 5). Similar to the establishment rates, significant differences were quantified for worm burdens among different media ( $P < 0.05$ ). Average number of worms harvested in birds that were infected with the eggs incubated in potassium dichromate was significantly lower ( $P < 0.05$ ) than those of birds infected with the eggs incubated either in formalin 0.5 % or in formalin 2 % or in sulfuric acid 0.1 N. Total worm burden of the birds infected with the eggs incubated in formalin 0.5 % was also significantly higher ( $P < 0.05$ ) than that of birds infected with the eggs incubated in formalin 2 %. Similar to the total worm burden, female as well as male worm burdens were also smallest in the birds infected with eggs that had been incubated in potassium dichromate, followed by formalin 2 %. The percentage of female worms in the total worm burden ranged from 46.5 % to 52.8 % with formalin 0.5 % and potassium dichromate, respectively.

As shown in Table 5, there was a positive linear relation between the infection dose and the worm burden. Independently from the incubation media, increasing

infection doses gradually resulted in elevated worm burdens ( $P < 0.001$ ). Although, statistically significant ( $P < 0.05$ ) differences were observed between the smallest (500 eggs / bird) and intermediate (1000 eggs / bird) infection doses, there was no significant difference between the intermediate and the highest (2000 eggs / bird) infection doses in their effects on worm counts of the birds ( $p > 0.05$ ). Similar effects were also quantified for the number of female or male worms.

Although the number of established larvae did not significantly differ due to the incubation media ( $P = 0.086$ ), there was a significant difference between larvae counts of the birds infected with varying infection doses ( $P = 0.025$ ). Birds infected with 2000 eggs had higher number of larvae when compared with those of birds infected with 500 eggs (Table 5;  $P < 0.05$ ). Out of 32 uninfected control birds, two were positive for the presence of larvae.

No significant interaction effect between incubation media and infection doses on length of female or male worms was determined (Table 5;  $P > 0.05$ ). However, there were significant differences among four different media for their effects ( $P = 0.015$ ) on female worm length, whereas male worm length remained unaffected ( $P = 0.317$ ). Longer female worms were harvested from the birds that were infected with the eggs incubated in formalin 2 % than in formalin 0.5 % or in sulfuric acid ( $P < 0.05$ ). On average, when taking into account worms from all groups female worms were longer than males. No significant differences in the average length of males or of females were observed among the infection doses ( $P > 0.05$ ; Table 5).

**Table 5** Number and length of *Capillaria obsignata* in chickens infected with eggs incubated in different media and at increasing infection doses.

	<i>Media</i>					<i>Infection doses</i>				<i>Media x Dose</i>
	<b>0.5 % Forma- lin</b>	<b>2 % Forma- lin</b>	<b>0.1 % K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub></b>	<b>0.1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>P, ≤</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>2000</b>	<b>P, ≤</b>	
Worm burden, #*	505 <sup>a</sup> (141-1770)	258 <sup>b</sup> (81-499)	46 <sup>c</sup> (5-609)	400 <sup>ab</sup> (141-1142)	0.001	138 <sup>a</sup> (5-515)	236 <sup>b</sup> (18-859)	356 <sup>b</sup> (21-1770)	0.00 1	0.282
Females, #*	231 <sup>a</sup> (69-558)	130 <sup>a</sup> (41-282)	25 <sup>b</sup> (4-297)	197 <sup>a</sup> (61-753)	0.001	78 <sup>a</sup> (4-2379)	109 <sup>ab</sup> (9-394)	176 <sup>b</sup> (12-753)	0.00 1	0.258
Males, #*	266 <sup>a</sup> (72-1212)	124 <sup>b</sup> (40-251)	23 <sup>c</sup> (1-312)	188 <sup>ab</sup> (46-389)	0.001	63 <sup>a</sup> (1-281)	131 <sup>b</sup> (9-472)	180 <sup>b</sup> (9-1212)	0.00 1	0.509
Larvae, #*	4.14 (0-24)	3.04 (0-8)	1.55 (0-6)	4.82 (0-34)	0.086	1.63 <sup>a</sup> (0-8)	3.74 <sup>ab</sup> (0-11)	4.82 <sup>b</sup> (0-34)	0.02 5	0.131
Female length, mm**	13.0±0.27 <sup>a</sup>	14.5±0.58 <sup>b</sup>	13.6±0.19 <sup>ab</sup>	12.8±0.31 <sup>a</sup>	0.015	13.8±0.30	13.4±0.41	13.3±0.34	0.64 4	0.979
Male length, mm**	10.0±0.21	10.7±0.36	10.4±0.09	10.0±0.12	0.317	10.4±0.18	10.4±0.21	10.1±0.21	0.31 7	0.615

\*: Back-transformed data: values represent geometric means with minimum and maximum in brackets.

\*\* Untransformed data, values represent arithmetic means and standard errors (Means±SE).

abc: Values with no common letters on a row within a factor differ (Tukey, P < 0.05 after a significant effect, P<0.05).

### 3.4 Discussion

Results of this study confirm fully our previous data obtained from an experimental infection with a lower infection dose (Tiersch et al., 2013) that formalin (0.5 and 2 %) and sulfuric acid can successfully be used as incubation media for *C. obsignata* eggs, whereas potassium dichromate impairs infectivity of the eggs. The previous study was performed with a lower infection dose (250 eggs / bird), thus it was unclear whether the four media would have the same effects on infectivity of the eggs in case of higher infection doses. In the present study, an additional emphasis is given to the host animal performance in relation to increasing infection doses.

Although potassium dichromate had no visible effects on embryonation of *C. obsignata* and *T. suis* eggs, adverse effects have been reported on the infectivity of eggs (Burden and Hammet, 1976; Tiersch et al., 2013). In the present study, incubating eggs in potassium dichromate lowered establishment rates, and correspondingly resulted in lower worm burdens in comparison to formalin (0.5 % or 2 %) and sulfuric acid, (Fig 7, Table 5). This is in agreement with data provided by Burden and Hammet (1976), which showed an impaired establishment rate of *T. suis* after embryonating eggs in potassium dichromate 0.2 % instead of using moist vermiculite. Adverse effects of potassium dichromate on the infectivity of the eggs might have resulted from its chemical properties, which can be considered as stressors and cause degeneration of the egg shell during the embryonation (Fairbairn, 1960; Dorny et al., 1987; Kopper and Mansfield, 2010). Harmful effects of potassium dichromate are known for different biological systems. In general, chromate salts are corrosive and cause cellular damage. Potassium dichromate is particularly toxic to aquatic organisms (Anonymous, 2010). For algal cells, it is a strong pollutant (Labra et al., 2007), and can have adverse effects on genetic activity of yeast cells in the growth phase (Galli et al., 1985), thus it is considered as the most potent agent for induction of gene conversion and reverse mutation in yeast cells (Kharab and Singh, 1985).

Compared with *Ascaridia galli*, experimental infections of chickens with *C. obsignata* result in higher (up to 50%) establishment rates (Frazier, 1962; Chubb and Wakelin, 1963). For the experimental purposes, the use of formalin 0.5 % as an incubation medium for different nematode eggs is very common (Sadun, 1948; Herd and McNaugh, 1975; Kemp and Franson, 1975; Saunders et al., 2000; Santos et al., 2001; Andrade and Andrade, 2004; Püllen et al., 2008; Tiersch et al., 2013). At each level of infection dose, eggs incubated in formalin 0.5 % resulted in the highest worm burdens when compared with the eggs incubated in any of other three media (Table 5). Compared to the higher concentration of formalin (2 %), the lower one (0.5 %) was associ-

ated with a higher infectivity of the eggs. This does not necessarily show a higher efficacy of formalin at lower concentrations against growth of undesired microorganisms in the medium [e.g. fungi (Luttermoser, 1938) and bacteria (Kopper and Mansfield, 2010)] it may rather indicate a potentially harmful effect of higher concentration of formalin on the eggs being incubated. Similar to the lower concentration of formalin (0.5 %), sulfuric acid at a relatively low concentration (0.1 N) also provided embryonated eggs that resulted in comparatively high worm counts. These observations may support the hypothesis that the culture media which highly resemble to water, but that still can prevent the eggs from invasion of undesired organisms in the culture, seem to be the most appropriate media in terms of subsequent infectivity of the eggs. Because there was no interaction between incubation media and infection doses on the worm counts of the birds, it can be assumed that the quantified effects of the incubation media are fairly repeatable with higher infection doses, as well.

Establishment rate of certain nematodes decreases as the infection dose increases. This is mainly explained by the competition among larvae establishing themselves in the same predilection site (Ikeme, 1971; Paterson and Viney, 2002) and by the immune interactions between host and parasite (Sadun, 1949). To separate the effects of intraspecific competition for resources from those of the host immune response is essential to understand nematode epidemiology (Paterson and Viney, 2002). Permin et al. (1997b) quantified decreasing establishment rates of 14.2 %, 2.9 % and 0.5 % in chickens infected with the corresponding increasing doses of 100, 500 and 2500 eggs of *A. galli*, respectively. Norton and Joyner (1965) also reported similar results with *C. obsignata* in chickens infected with six different doses ranging increasingly from 200 to 100000. The corresponding establishment rates ranged from 87.5 to 1.1 %. These results are in agreement with those reported in the present study (Fig 8), and repeatedly confirm the density dependent nature of establishment rate in nematodes. The decreased establishment rates, however, do not imply lowered absolute worm burdens after increasing infection doses. Although the intermediate infection dose (1000 eggs) did not differ from the lower (500 eggs) and the higher (2000 eggs) doses in the resulting number of worms, the higher infection dose resulted in higher worm burdens in comparison to the lower dose. These results may indicate limited impact of mechanisms suppressing (density dependence and host immune system) establishment of larvae.

Similar to establishment rate, fecundity of female worms may also show density dependency. As shown with different nematodes, an increase in the number of worms results in a decrease in worm fecundity possibly due to increased competition among



worms (Ikeme, 1971; Kerboeuf and Jolivet, 1984). Although we also observed a numerical decrease (up to -38 %) in female worm fecundity (defined as EPG/female) with the increasing infection doses, these differences were not significantly different from zero ( $P=0.531$ ). However, female worms of the birds infected with the eggs that had been incubated in potassium dichromate had a higher fecundity estimate when compared with those found in birds infected with the eggs that had been incubated in formalin 0.5 % or in sulfuric acid 0.1 N. These latter two incubation media resulted in higher worm burdens than did potassium dichromate. Accordingly, a density dependent effect on female worm fecundity may be the reason for the observed relative higher fecundity. Indeed, such an effect has been reported for the caecal worm, *Heterakis gallinarum*, whose fecundity (as estimated by worm length) is impaired after a threshold of 96 worms (Tompkins and Hudson, 1999). However, we suppose that the observed differences in the fecundity estimates of the worms resulting from different incubation media may not have a biological background, but might have occurred due to a methodological restriction. The employed McMaster egg counting technique had a sensitivity of 50 eggs per gram faeces. Compared to the fecundity of other important poultry nematodes, e.g. *A. galli* (Gauly et al., 2001) or *H. gallinarum* (Tompkins and Hudson, 1999; Daş et al., 2011a), fecundity of *C. obsignata* is expected to be much lower (Tiersch et al., 2013). Faecal egg counts quantified with the McMaster technique have high standard deviations if the samples contain low number of eggs (MAFF, 1986). As the egg density in faeces samples decreases, precision of the faecal egg counts will also decrease (Daş et al., 2011b). In other words, with very low egg counts, probability of imprecise or even of false negative results will increase. As shown in Table 1, fecundity of female worms (EPG per female) originating from the eggs incubated in potassium dichromate ranged from 0 to 29, indicating presence of false negative samples although all the birds of this group harbored at least 4 females. Out of 60 faecal samples there were 8 (false) negative samples, of which 5 were from the birds infected with the eggs incubated in potassium dichromate. Therefore, apparently elevated fecundity of worms in the birds infected with eggs that had been incubated in potassium dichromate does not seem to be originated from the lower worm-worm competition. Thus a more precise fecundity estimate for worm species producing low number of eggs should better be achieved with highly sensitive egg counting techniques, e.g., FLOTAC (Cringoli et al., 2010).

Duration of the experiment (28 d) allowed reinfections of the infected birds and new infections of the uninfected controls being kept in the same housing unit. This was possible because of the short prepatent period (19-22 d; Levine, 1938) and the time

required for embryonation of *C. obsignata* eggs (8 d; Wehr, 1939; Tiersch, 2013), however only at low probabilities. Accordingly only two un-infected birds acquired infection by the natural way (faecal-oral route). As only two controls were infected and the average proportion of larvae to the total worm burden varied between 1-3 % in the infected birds (Table 5), it can be assumed that contribution of new or reinfections to host animal performance was negligible.

As to the effects of the infection on the host animal performance, no direct clinical effect of infection was quantified. Nevertheless, incubation media had a significant effect on body weight (BW) of the birds (Fig 6,  $P < 0.001$ ). However, this result can physiologically not fully be explained. Birds that received eggs incubated in formalin 0.5 % or in sulphuric acid 0.1 N, had higher worm burdens ( $P < 0.001$ ) and lower BW ( $P < 0.001$ ). Although this observation may appear to indicate an adverse effect of infection on the host performance, it is not confirmed by the lack of differences between performance of infected and uninfected control birds. Only severe infections with *C. obsignata* can produce a retardation of growth and stunting in young animals (Wakelin, 1964) and according to Norton and Joyner (1965), this is achieved with extremely large infection doses (5000 to 100000 eggs per bird). Therefore, it can be assumed that infection doses up to 2000 eggs per bird have no pronounced effect on the body weight of the host animal.

It is concluded that formalin (particularly 0.5 %), and sulfuric acid can successfully be used as incubation media for *C. obsignata* eggs, whereas potassium dichromate impairs subsequent infectivity of the eggs. Although effects of media on the infectivity of the eggs were confirmed to be fairly repeatable, no harmful effect of infection was quantified on the host animal performance with the infection doses up to 2000 eggs.

### **Acknowledgements**

Special thanks go to Mrs. B. Sohnrey, Mr. E. Tönges and Mr. D. Daniel for their invaluable assistance.

## References

---

- Anderson, R.C., 1992. Nematode parasites of vertebrates: Their development and transmission. CAB International, Wallingford.
- Anderson, R.M., May, R.M., 1992. Infectious diseases of humans: Dynamics and control. Oxford University Press, Oxford.
- Andrade de, S.B., Andrade, Z.A., 2004. Experimental hepatic fibrosis due to *Capillaria hepatica* infection (differential features presented by rats and mice). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 99 (4).
- Anonymous, 2010. Material Safety Data Sheet, Santa Cruz Biotechnology, Inc. <http://datasheets.scbt.com/sc-203353.pdf>. Accessed 20. August 2013.
- Berghen, P., 1966. Serum protein changes in *Capillaria obsignata* infections. Exp. Parasitol. 19(1), 34-41.
- Burden, D.J., Hammet, N.C., 1976. A comparison of the infectivity of *Trichuris suis* ova embryonated by four different methods. Vet. Parasitol. 2(3), 307-311.
- Chubb, L.G., Wakelin, D., 1963. Nutrition and helminthiasis in chickens. P. Nutr. Soc. 22 (1), 20-25.
- Cringoli, G., Rinaldi, L., Maurelli, M.P., Utzinger, J., 2010. FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. Nat. Protoc. 5, 503–515.
- Daş, G., Kaufmann, F., Abel, H.J., Gaulty, M., 2010. Effect of extra dietary lysine in *Ascaridia galli*-infected grower layers. Vet. Parasitol. 170(3-4), 238–243.
- Daş, G., Abel, H., Rautenschlein, S., Humburg, J., Schwarz, A., Breves, G., Gaulty, M., 2011a. Effects of dietary non-starch polysaccharides on establishment and fecundity of *Heterakis gallinarum* in grower layers. Vet. Parasitol., 178(1-2), 121-128.
- Daş, G., Savaş, T., Kaufmann, F., Idris, A., Abel, H., Gaulty, M., 2011b. Precision, repeatability and representative ability of faecal egg counts in *Heterakis gallinarum* infected chickens. Vet. Parasitol. 183(1-2), 87-94.
- DESTATIS, 2010. Statistisches Bundesamt Deutschland. Pressemitteilung Nr. 069 vom 01.03.2010.
- Dick, J.W., Leland, S.E., Jr., Hansen, M.F., 1973. Hatching and in vitro cultivation of the nematode *Ascaridia galli* to the third-stage larva. Trans. Am. Microsc. Soc. 92(2), 225-230.
- Dorny, P., Berghen, P., Verducruysse, J., 1987. Morphological changes in *Capillaria obsignata* (Nematoda: Trichuridae) eggs after treatment with cambendazole. Parasitol. Res. 74, 196-197.

- Enigk, K., Dey-Hazra, A., Batke, J., 1973. Zur Wirksamkeit von Mebendazol bei Helminthosen von Huhn und Gans. *Avian Pathol.* 2(2), 67-74.
- Fairbairn, D., 1960. Physiologic aspects of egg hatching and larval exsheathment in nematodes, in: Stauber LA (ed), host influence on parasite physiology. Rutgers University Press, New Brunswick, NJ, 50-64.
- Fossum, O., Janson, D.S., Etterlin, P.E., Vågsholm, I., 2009. Causes of mortality in laying hens in different housing systems in 2001 to 2004. *Acta Vet. Scand.* 51, 3–12.
- Frazier, M. N., 1962. Artificial propagation of *Capillaria obsignata* in chickens. *Poult. Sci.* 41(3), 854-856.
- Galli, A., Boccardo, P., Del Carratore, R., Cundari, E., Bronzetti, G., 1985. Conditions that influence the genetic activity of potassium dichromate and chromium chloride in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mut. Res.* 144 (3), 165-169.
- Gauly, M., Bauer, C., Mertens, C., Erhardt, G., 2001. Effect and repeatability of *Ascaridia galli* egg output in cockerels following a single low dose infection. *Vet. Parasitol.* 96(4), 301-307.
- Gauly, M., Duss, C., Erhardt, G., 2007. Influence of *Ascaridia galli* Infections and anthelmintic treatments on the behavior and social Ranks of laying hens (*Gallus gallus domesticus*). *Vet. Parasitol.* 146, 271-280.
- Graybill, H.W., 1924. *Capillaria columbae* (Rud.) from the chicken and turkey. *J. Parasitol.* 10(4), 205-208.
- Herd, R.P., McNaugh, D.J., 1975. Arrested development and the histotropic phase of *Ascaridia galli* in the chicken. *Int. J. Parasitol.* 5(4), 401-406.
- Ikeme, M.M., 1971. Effects of different levels of nutrition and continuing dosing of poultry with *Ascaridia galli* eggs on the subsequent development of parasite populations. *Parasitol.* 63(2), 233-250.
- Kaufmann, F., Daş, G., Sohnrey, B., Gauly, M., 2011. Helminth infections in laying hens kept in organic free range systems in Germany. *Livest. Sci.* 141(2-3), 182-187.
- Kemp, R.L., Franson, J.C., 1975. Transmission of *Histomonas meleagridis* to domestic fowl by means of earthworms recovered from pheasant yard soil. *Avian Dis.* 19(4), 741-744.
- Kerboeuf, D., Jolivet, G., 1984. *Heligmosomoides polygyrus*: Time of anthelmintic treatment and infection parameters in mice exposed to increasing doses of larvae. *Exp. Parasitol.* 57 (3), 307-315.

- Kharab, P., Singh, I., 1985. Genotoxic effects of potassium dichromate, sodium arsenite, cobalt chloride and lead nitrate in diploid yeast. *Mutat. Res.* 155(3), 117-120.
- Kopper, J.J., Mansfield, L.S., 2010. Development of improved methods for delivery of *Trichuris muris* to the laboratory mouse. *Parasitol. Res.* 107, 1103–1113.
- Labra, M., Bernasconi, M., Grassi, F., De Mattia, F., Sgorbati, S., Airoidi, R., Citterio, S., 2007. Toxic and genotoxic effects of potassium dichromate in *Pseudokirchneriella subcapitata* detected by microscopy and AFLP marker analysis. *Aquat. Bot.* 86(3), 229-235.
- Levine, P.P., 1938. Infection of the chicken with *Capillaria columbae* (Rud). *J. Parasitol.* 24, 45-52.
- Long, P.L., Wakelin, D., 1964. The effects of thiabendazole upon experimental infestations of *Ascaridia galli* and *Capillaria obsignata* in the chicken. *Br. Poult. Sci.* 5(2), 187-192.
- Luttermoser, G.W., 1938. Factors influencing the development and viability of the eggs of *Capillaria hepatica*. *Am. J. Epidemiol.* 27(2), 275-289.
- MAFF, 1986. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Manual of veterinary parasitological laboratory techniques. HMSO, London, Reference book 418.
- Mönning, H.O., Lapage, G., 1956. In MÖNNIG'S Veterinary Helminthology and Entomology 4<sup>th</sup> ed. London: Bailliere, Tindall and Cox.
- Norton, C.C., Joyner, L.P., 1965. Experimental chemotherapy of infection with *Capillaria obsignata*. *J. Comp. Pathol.* 75, 137-145.
- Paterson, S., Viney, M.E., 2002. Host immune responses are necessary for density dependence in nematode infections. *Parasitol.* 125(3), 283-292.
- Permin, A., Pearman, M., Nansen, P., Bisgaard, M., Frandsen, F., 1997a. An investigation on different media for embryonation of *Ascaridia galli* eggs. *Helminthol.* 34(2), 75-79.
- Permin, A., Bojesen, M., Nansen, P., Bisgaard, M., Frandsen, F., Pearman, M., 1997b. *Ascaridia galli* populations in chickens following single infections with different dose levels. *Parasitol. Res.* 83(6), 614-617.
- Permin, A., Hansen, J.W., 1998. The epidemiology, diagnosis and control of poultry parasites. Food and agriculture organization of the United Nations, Animal Health Manual No.4, Rome.
- Permin, A., Bisgaard, M., Frandsen, F., Pearman, M., Kold, J., Nansen, P., 1999. Prevalence of gastrointestinal helminths in different poultry production systems. *Br. Poult. Sci.* 40(4), 439-443.

- Püllen, U., Cheat, S., Moors, E., Gauly, M., 2008. The role of preparation technique, culture media and incubation time for embryonation of *Heterakis gallinarum* eggs. DTW, 115(1), 30-33.
- Sadun, E.H., 1948. Resistance induced in chickens by infections with the nematode *Ascaridia galli*. Am. J. Epidemiol. 47(3), 282-289.
- Sadun, E.H., 1949. The antibody basis of immunity in chickens to the nematode, *Ascaridia galli*. Am. J. Epidemiol. 49(1), 101-116.
- Sage, R.B., Woodburn, M.I.A., Davis, C., Aebischer, N.J., 2002. The effect of an experimental infection of the nematode *Heterakis gallinarum* on hand-reared grey partridges *Perdix perdix*. Parasitol. 124(5), 529-535.
- Santos dos, A.B., Tolentino Jr. M., Andrade, Z.A., 2001. Pathogenesis of hepatic septal fibrosis associated with *Capillaria hepatica* infection of rats. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 34(6).
- SAS Institute Inc., 2010. SAS OnlineDoc® Version 9.1.3, Cary, NC, USA
- Saunders, L.M., Tompkins, D.M., Hudson, P.J., 2000. The role of oxygen availability in the embryonation of *Heterakis gallinarum* eggs. Int. J. Parasitol. 30(14), 1481-1485.
- Thamsborg, S.M., Roepstorff, A., Larsen, M., 1999. Integrated and biological control of parasites in organic and conventional production systems. Vet. Parasitol. 84(3-4), 169-186.
- Tiersch, K.M., Daş, G., v. Samson-Himmelstjerna, G., Gauly, M., 2013. The role of culture media on embryonation and subsequent infectivity of *Capillaria obsignata* eggs. Parasitol. Res. 112(1), 357-364.
- Tompkins, D.M., Hudson, P.J., 1999. Regulation of nematode fecundity in the ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus*): not just density dependence. Parasitol. 118(4), 417-423.
- Wakelin, D., 1964. A survey of the intestinal helminths parasitic in British domestic fowl. J Helminth. 38(1-2), 191- 200.
- Wakelin, D., 1965. Experimental studies on the biology of *Capillaria obsignata* Madson, 1945, a nematode parasite of the domestic fowl. J. Helminth. 39(4), 399-412.
- Wehr, E.E., ,1939. Studies on the development of the pigeon capillarid, *Capillaria columbae*. Tech. Bull. U.S. Dep. Agric. 679, 1-19.

## KAPITEL IV

---





**Morphologische und genetische Differenzierung, der im Legehuhn  
am häufigsten vorkommenden vier *Capillaria*-Arten**

---

#### 4.1 Einleitung

Die vier am häufigsten vorkommenden *Capillaria*-Arten bei der Legehennen sind: *Capillaria anatis* (Schrank, 1790), *Capillaria bursata* (Freitas and Almeida, 1934), *Capillaria caudinflata* (Molin, 1858) und *Capillaria obsignata* (Madsen, 1945). In Bodenhaltungssystemen von Legehennen sind *Capillaria* spp. neben *Ascaridia galli* und *Heterakis gallinarum*, die am meisten gefundenen Endoparasiten (Permin et al., 1999; Kaufmann et al., 2011). *Capillaria*-Würmer parasitieren in der Schleimhaut des Dünn- bzw. Blinddarms von domestizierten und wilden Vogelarten. Eine Infektion mit *Capillaria* spp. kann mit Abmagerung, Diarrhoe, blutiger Enteritis und mit dem Tod des befallenen Tieres einhergehen (Levine, 1938; Wakelin, 1964; Norton und Joyner, 1965).

*Capillaria*-Arten lassen sich üblicherweise gut durch ihre Morphologie unterscheiden. In vorangegangenen Arbeiten wurden die morphologischen Unterschiede zwischen den vier o.g. *Capillaria*-Arten sehr genau beschrieben (Abb. 9). Die Vulvaöffnung der Weibchen ist ein bedeutendes Merkmal zur Differenzierung. Die Lokalisation der Vulva befindet sich kurz hinter dem Übergang zwischen Oesophagus und Darm (Norton und Ruff, 2003). Die männlichen Würmer hingegen werden anhand ihrer Spikulumscheide und -länge, sowie ihrer seitlichen, caudalen Flügel unterschieden.

*C. bursata*-Individuen sind die längsten der vier Arten. Weibliche *C. bursata* können eine Länge von 28-35 mm erreichen, männliche sind 15-18 mm lang (Friedhoff und Ehlers-Bhodigen, 1965). *C. bursata*-Weibchen weisen um die Vulvaöffnung mehrere kleine, rundliche Hügel auf. Die *C. bursata*-Männchen tragen eine 1.75 mm lange Spikulumscheide mit einem verdickten proximalen Ende und auffällige, ungelappte seitliche Membranflügel (Abb.9).

Da sich *C. bursata*- und *C. caudinflata*-Männchen sehr ähnlich sind, ist es schwierig die beiden Arten zuverlässig voneinander zu unterscheiden. Es gibt Autoren, die darüber diskutierten, es handle sich um eine Art (Madsen, 1951). Friedhoff und Ehlers-Bhodigen (1965) vertraten die Meinung, dass die umstrittenen, schwer zuzuordnenden Arten, unreife Formen von *C. caudinflata* sein sollen. *C. caudinflata* weisen genau wie *C. bursata* dominante seitliche Kaudalflügel auf, welche sich aber in mehrere regelmäßig geformte Abschnitte unterteilen. Zudem weisen sie im Gegensatz zu *C. bursata* eine behornte Spikulumscheide auf, sowie eine herzförmige, bursaähnliche Membran (Friedhoff und Ehlers-Bhodigen, 1965). Im Gegensatz dazu lassen sich die *C. caudinflata*-Weibchen sehr spezifisch durch ihre ausgeprägten, bis zu 95 mm lan-








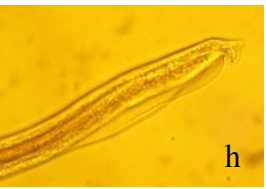
gen Anhängsel unterscheiden (Abb.9). Die Länge der *C. caudinflata*-Weibchen ist 12 bis 25 mm und die der Männchen 9 bis 18 mm (Kaufmann, 1996).

*C. obsignata*-Individuen sind die kürzesten, mit 11 bis 18 mm bei den Weibchen und 8-13 mm bei den Männchen (Tiersch et al., 2013). Das morphologische Hauptmerkmal der *C. obsignata*-Weibchen ist ein kleiner Wulsthügel vor der Vulvaöffnung. *C. obsignata*-Männchen haben eine sehr lange Spicula und keine seitlichen Schwanzflügel (Abb. 9).

Die *C. anatis*-Weibchen haben eine Länge von 11 bis 28 mm und die Männchen von 8-15 mm (Kaufmann, 1996). *C. anatis* unterscheiden sich morphologisch von anderen durch die Spicula der Männchen, die charakteristisch ein verdicktes proximales und distales Ende aufweist. Außerdem haben sie keine deutlichen Membranflügel (Friedhoff und Ehlers-Bhodigen, 1965). Die Weibchen von *C. anatis* haben eine kleine, unscheinbare Vulvaöffnung, die sehr ähnlich derjenigen der *C. obsignata* ist (Wakelin, 1965). Jedoch ist der Scheideneingang deutlich kürzer, so dass die Eier im Vergleich zu *C. obsignata* direkt am Ausgang liegen (Abb.9).

Dennoch stellt sich die morphologische Differenzierung der *Capillaria* aufgrund ihrer geringen Größe und der begrenzt zur Verfügung stehenden, charakteristischen morphologischen Merkmale als problematisch dar (Zhu et al., 2000). Zusätzliche Methoden zur Speziesdifferenzierung sind daher interessant und notwendig. Eine Möglichkeit zur Unterscheidung stellt die genetische Differenzierung mit sogenannten Biomarkern dar. Hebert et al. (2003) benannte ein Fragment von etwa 648 bp, einen Teil des 1545 bp langen mitochondrialen Cytochrom C Oxidase Untereinheit I-Gens (COI) als globales Identifizierungssystem, das DNA-Barcoding. Eine große Auswahl von Bilateralen, vor allem Insekten, Fischen und Vögeln konnten bisher erfolgreich mit diesem DNA-Barcode identifiziert werden (Hebert et al., 2004; Nelson et al., 2007; Boehme et al., 2011). Diese Technik hat sich weiterhin als besonders nützlich bei Untersuchungen erwiesen, bei denen sich die morphologische Identifikation aufgrund der phänotypischen Plastizität (Derry et al., 2003; Adamowicz et al., 2004) oder kryptischen Diversität (Smith et al., 2006; Quicke et al., 2006; Yassin et al., 2008) als schwierig darstellte. Einen Teil des COI-Gens von *Capillaria sensu lato* (AJ288169.1) und *C. gastrica* (AJ288161.1) aus Ratten wurde bereits erfolgreich sequenziert (Zhu et al., 2000).

Das Ziel dieser Studie war es, die intraspezifische und interspezifische Sequenzvariationen des COI-Gens der vier *Capillaria* spp. zu analysieren, um alternativ für die morphologische Differenzierung einen möglichen Biomarker zu finden.

Geschlecht	<i>C. obsignata</i>	<i>C. anatis</i>	<i>C. bursata</i>	<i>C. caudinflata</i>
Weibchen				
Männchen				

**Abb. 9** Morphologische Unterschiede zwischen den vier *Capillaria*-Arten (Fotografiert von Katharina M. Tiersch)

**Weibchen**

- a) *C. obsignata*, Vulvausgang mit einem kleinen Hügel \*
- b) *C. anatis*, Vulvausgang ohne besondere charakteristische Merkmale, kürzer als bei *C. obsignata* \*
- c) *C. bursata*, Vulvausgang mit mehreren, halbrunden Kutikularhügeln\*
- d) *C. caudinflata*, Vulvausgang mit charakteristischer Erhebung, bis zu 95 µm lang\*

**Männchen**

- e) *C. obsignata*, ohne seitliche Kaudalflügel und mit einer sehr langen Spikulumscheide (2.5-2.7 mm)\* (1.1-1.5 mm)\*\*\*
- f) *C. anati*, ohne seitliche Kaudalflügel, verdicktes proximales und distales Ende, proximale Dornen \*\*; lange Spicula (0.7-1.9 mm)\*\*\*
- g) *C. bursata*, mit großen, ungelappten Kaudalflügeln und ein verdicktes proximales Ende, Spicula ca. 1,75 mm lang \*
- h) *C. caudinflata*, mit großen Kaudalflügeln aus gelappten Abschnitten, unverdicktes proximales Ende und herzförmiger Membran\*

\*(Friedhoff und Ehlers-Bhodigen, 1965), \*\*(Permin und Hansen, 1998), \*\*\*(Kaufmann, 1996)

## 4.2 Material und Methoden

### 4.2.1 Parasitenmaterial

Die verwendeten *Capillaria* spp. wurden bei Routineuntersuchungen vom Darm 20 natürlich infizierter Legehennen von verschiedenen Ställen 100 km rund um Göttingen gesammelt. Um die Würmer zu gewinnen, wurde der Darm der Hennen längs aufgeschnitten und der Darminhalt mit der abgeschabten Schleimhaut über einem 100 µm Metallsieb ausgewaschen. Das gesiebte Material inklusive der *Capillaria* spp. wurde in Petrischalen geschüttet. Anschließend wurde jeder *Capillaria* spp. auf ein Objektträger gelegt und bei 400-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop nach den Beschreibungen von Friedhoff und Ehlers-Bhodigen (1965), Wakelin (1965) und Tiersch et al. (2013a, b) differenziert. Direkt im Anschluss wurden die Würmer fotografiert (Abb. 9), nummeriert (*C. obsignata* = Co1-Co71; *C. anatis* = Ca1- Ca14; *C. bursata* = Cb1-Cb30; *C. caudinflata* = Cc1-Cc23) und einzeln in einem mit 1.5 ml destillierten Wasser gefüllten Eppendorf Reaktionsgefäß aufbewahrt. Bis zur DNA-Isolation wurden die Würmer bei -20°C gefroren gelagert. *C. obsignata* wurden häufig zusammen mit anderen Nematoden, wie *A. galli* oder *H. gallinarum* gefunden, während *C. anatis*, *C. bursata* und *C. caudinflata* nur in Mischinfektionen untereinander bzw. mit *C. obsignata* auftraten.

### 4.2.2 DNA Isolation und Amplifikation

Die DNA eines jeden Wurms wurde erfolgreich mit Hilfe der Standard-Phenol-Chloroform-Methode nach Sambrook und Russell (2001) isoliert. Die DNA-Aufreinigung mit dem EZNA® Insect DNA Kit ergab keine ausreichend hohen DNA-Konzentrationen und wurde daher nicht verwendet. Die DNA-Konzentrationen wurden spektrometrisch bestimmt (Nanodrop T1000, Peqlab, Deutschland).

Die Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) (25 µl) wurde in 2,5 µl von 10x-Puffer + MgCl<sub>2</sub> (Roche; 15 mM), 2,5 µl MgCl<sub>2</sub> (Roche; 25 mM), 1,5 µl dNTP's (Roche; 10 mM), 0,5 µl von jedem Primer (100 pmol / µl) und 0,5 µl Taq-Polymerase (Roche, 5 U / µl) mit 3 µl DNA (20 ng / µl) und 14 µl H<sub>2</sub>O unter den folgenden Bedingungen in einem Biometra T-Gradient Thermocycler (Biometra, Deutschland) durchgeführt: eine anfängliche Denaturierung bei 94 °C für 5 min, dann 34 Zyklen von 94 °C für 30 s (Denaturierung); 55 °C für 30 s (Primerhybridisierung); 72 °C für 30 s (Amplifikation), gefolgt von einer letzten Amplifikation von 5 Minuten bei 72 °C. Um eine Kontamination der Ansätze auszuschließen, wurde in jedem PCR-Lauf eine Negativprobe (Ansatz ohne DNA) mitgeführt. Zur Verifizierung des Ergebnisses des Reinigungsvorganges wurde jedes PCR-Produkt mit 6 µl 1x Loading Dye (LD) vermischt, auf ein – mit 0,1 %igen

Ethidiumbromid versetztes – 2 %iges Agarosegel gegeben und mittels Elektrophorese bei 120 Volt 30 min. laufen gelassen. Die gereinigten PCR-Produkte wurden direkt unter Verwendung des BigDyeR Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit ® (Applied Biosystems, Deutschland) auf einem automatisierten DNA-Sequencer (Applied Biosystems, Deutschland ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer) sequenziert. Die hieraus gewonnenen Daten wurden analysiert und mit Hilfe der Software-Suite Lasergene™ 6 ® Sequence Analysis Software SeqMan II (DNASTAR, Inc., Deutschland) kombiniert und manuell ausgewertet.

Im ersten Schritt konnte ein Teil des COI-Gens (~ 430 bp) aus sieben *C. obsignata*-Weibchen und -Männchen amplifiziert werden. Zuerst wurden die beschriebenen Primer JB3 (5`-3` TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT- vorwärts) und JB4.5 (5`-3` TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG- rückwärts) von Zhu et al. (2000) genutzt.

Aus uns unbekanntem Gründen funktionierten die oben erwähnten Primer (JB3F und JB4.5R) kein zweites Mal. Deshalb wurde basierend auf der bereits amplifizierten Sequenz von *C. obsignata* (Abb. 10) zwei neue Primer (CO1.2F und CO1.3R) entwickelt. Mit den neuen Primern CO1.2F (5`-3` TGGGCATCCTGAGGTTTATATTTAGT- vorwärts) und CO1.3R (5`-3` ACATAATGAAAATGACCTACTACATAATA- rückwärts) konnte der gleiche Teil des COI-Gens (~ 430 bp) von weiteren 34 *C. obsignata* amplifiziert werden. Die PCR mit den neuen Primern wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, mit Ausnahme der Annealing-Temperatur von 50,1 °C statt 55 °C und 40 anstelle von 34 Zyklen.

Aufgrund der Übereinstimmung von 79% mit dem *Trichuris suis* COI-Gen (NCBI: HQ204209), wurde zur Sequenzierung eines zusätzlichen ca. 150 bp überlappenden Fragments des COI-Gens zwei neue Primer Co1.1F (5`-3` ATTATTTACAATCGGAGGGTTAAC- vorwärts) und TS2R (5`-3` AGTTAAGTTTGCTCCTGCAAATATTA- rückwärts) mit der bereits amplifizierten *C. obsignata*- und der bekannten *Trichuris suis*-COI-Sequenz (NCBI: HQ204209) entwickelt (Abb. 10). Die gereinigten PCR-Produkte wurden unter den gleichen Bedingungen sequenziert wie beschrieben mit einer modifizierten Annealingtemperatur von 55,7 °C.

1	TTTTTTT  <b>TGG</b>	<b>GCATCCTGAG</b>	<b>GTTTATATTT</b>	<b>TAGT</b>  ACTACC	AGCCTTTGGT
51	GTAATTCAG	AAGCATTAAT	ATTTATTTCA	GGTAAATTCA	AAGTATTTGG
101	TCCATTAGGA	ATAATTTATG	CAATAATAAG	AATTGGAATT	TTAGGATGTT
151	TTGTGTGAGG	GCATCATATA	TATACTGTAG	GAATAGACAT	TGATACTCGA
201	GCATACTTTA	CAGCTGCTAC	AATAATTATT	GGTGTACCAA	CCGGTGTTAA
251	AATTTTTAGA	TGATTAGCTA	CTTTATATGG	TTCTGCTGTT	AAAATAACTC
301	CACTATTTAT	ATGGGTTATA	GGCTTTCTTA	AG  <u>ATTATTTA</u>	CAATCGGAGG
351	<u>GTTAAC</u>  TGGA	ATTTCCCTAT	CTAATGCTTC	ATTAGACTTA	TTATTACATG
401	ATACA  <b>TATTA</b>	<b>TGTAGTAGGT</b>	<b>CATCTTCATT</b>	<b>TTGT</b>  TTTAAG	AATAGGCGTT
451	GTGTTTGCTA	TTATAGTGGC	AATCACCTTA	TGATTACCTT	GAATATTAGG
501	TATTTCACTT	AATACTATAT	TACAAAAAAA	CTCAATTCCT	TT  <u>TAATATTT</u>
551	<u>GCAGGAGCAA</u>	<u>ACTTAACT</u>  AT			

**Abb. 10** Die amplifizierte COI-Sequenz von *C. obsignata*, dargestellt mit den verwendeten Primern

- Primer Co1.2F (fett) und Primer Co1.3R (fett und kursiv) wurden für die Sequenzierung von DNA aller *Capillaria* spp. verwendet.
- Mit den Primern Co1.1F (unterstrichen) und TS2R (unterstrichen und kursiv) konnten bei Verwendung von *C. obsignata* DNA ein weiterer Teil des COI-Gens sequenziert werden.

### 4.3 Ergebnis und Diskussion

Das Ziel der Arbeit war es, die spezifisch morphologischen Unterschiede der vier *Capillaria*-Arten in Legehennen darzustellen und zu beweisen, dass diese auch genetisch unterschieden werden können.

Das Ergebnis der Sequenzierung von 138 Würmern der vier verschiedenen Arten war ein 422-568 bp langes Teilstück des COI-Gens (Tabelle 7). Drei individuelle Sequenzen namens Co\_1, Cb\_2 und C.spp\_abc\_3 sind identifiziert worden. Bei 58 der 138 PCR-Produkte war es möglich, Sequenzdaten mit Vorwärts- und Rückwärts-Primer zu erhalten. Alle anderen sequenzierten *Capillaria* spp. (Männchen wie Weibchen) zeigten entweder nur eine Vorwärts- oder eine Rückwärts-Sequenz und wurden daher nicht mit in die Ergebnisse einbezogen.

Zhu et al. (2000) gelang es ein ca. 420 bp langes Teilstück des COI-Gens von *Capillaria* sensu lato zu amplifizieren und nicht wie von Herbert (2003) beschrieben ein Fragment von über 600 bp. Uns war es möglich mit den neu entworfenen Primern (Co1.1F und TS2R) weitere ca. 150 bp von 21 *C. obsignata*-Individuen zu sequenzieren und somit insgesamt 568 bp des COI-Gens von *C. obsignata*. Zwei Proben (Co1 und Co16) wiesen einen Einzelnukleotidpolymorphismus (engl. single nucleotide polymorphism, SNP) am Basenpaar 155 (G-> A) bzw. 173 (T-> C) auf (Tabelle 6). Es wurden keine weiteren intraspezifischen Sequenzvariationen für die *C. obsignata*-COI-Sequenz gefunden.

Die anschließenden Sequenzierungen der drei anderen *Capillaria*-Spezies (*C. anatis*, *C. bursata* und *C. caudinflata*) ergaben nur zwei unterschiedliche Sequenzen (Tabelle 6). Die Amplifizierung von drei *C. bursata*-Weibchen ergab die Sequenz C.b.\_2 mit 425 bp. Eine intraspezifische Variation zeigte die Sequenzierung sieben weiterer *C. bursata*-Weibchen, die alle die Sequenz C.spp\_abc\_3 aufwiesen. Ein SNP wurde im *C. bursata*-Wurm Cbx3 am Basenpaar 264 (C->T) gefunden. Alle morphologischen Parameter entsprachen den in Tabelle 9 beschriebenen und alle Weibchen wiesen den gleichen Uterusausgang auf. Die Sequenzierung des COI-Gens von zwei *C. caudinflata*-Männchen und fünf *C. anatis*-Weibchen ergab ebenso die schon bekannte Sequenz C.spp\_abc\_3.

Die Übereinstimmung der drei Sequenzen lag im Bereich von 81.4 bis 84.5 %. Die Sequenzen C.o.\_1 und C. spp\_abc\_3 zeigten die höchste Übereinstimmung mit 84.5 %. Die Übereinstimmung der C.o.\_1- und der C.b.\_2-Sequenz betrug 83 % und zwischen der C.b.\_2- und der C.spp\_abc\_3-Sequenz 81.4 % (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).



**Tabelle 6** Die vier verschiedenen *Capillaria*-Spezies mit den drei gefundenen COI-Sequenzen

Sequenz	<i>C. obsignata</i>	<i>C. anatis</i>	<i>C. bursata</i>	<i>C. caudinflata</i>
<b>C.o._1</b> (568 bp)	Co1- Co41			
<b>C.b._2</b> (424 bp)			Cb3 Cb4 Cb6	
<b>C.spp_abc_3</b> (433 bp)		Ca4 Ca11 Ca15 Ca17 Ca20	Cb3x Cb5x Cb6x Cb8x Cb9x Cb11x Cb19x	Cc15 Cc16

Bei den oben genannten Ergebnissen stellt sich die Frage nach deren Aussagekraft. Alle *Capillaria* spp. wurden einzeln morphologisch nach den Beschreibungen verschiedener Autoren (Freitas und Almeida, 1934; Madsen, 1945; Wakelin, 1965; Norton und Ruff, 2003) differenziert und anschließend fotografiert. Bezüglich der Unterscheidung von *C. bursata*- und *C. caudinflata*-Männchen traten Schwierigkeiten bei der exakten morphologischen Differenzierung auf. Dies wurde schon von Madsen (1951) sowie Friedhoff und Ehlers-Bhodigen (1965) diskutiert. Madsen (1951) vermutete, dass *C. bursata* und *C. caudinflata* tatsächlich zu einer Art gehören. Die Flügel der männlichen Spicula der beiden Arten können kaum unterschieden werden. Auch die Eier sind in beiden Spezies gleich beschrieben. Madsen (1951) beschrieb des Weiteren, dass die Weibchen von *C. caudinflata* mit ihren typischen Vulva-Anhängseln identisch mit *C. bursata*-Weibchen seien, die von Todd (1947) dargestellt worden sind, nachdem diese Anhängsel mechanisch entfernt wurden.

Trotz der zu bestätigenden und in der Literatur bereits beschriebenen Probleme bei der Differenzierung der Männchen, ist davon auszugehen, dass die morphologische Unterscheidung zwischen den weiblichen Tieren fehlerfrei geglückt ist, da sich diese gut unterscheiden lassen (Abb. 9). Da sieben weibliche *C. bursata* und fünf weibliche *C. anatis* die gemeinsame Sequenz C.spp\_abc\_3 aufwiesen, obwohl diese sehr gut morphologisch zu unterscheiden sind, muss in Betracht gezogen werden, dass entweder die Spezies nicht valide sind oder aber die PCRs mit DNA kontaminiert wa-

ren und deshalb bei allen drei Spezies dieselbe Sequenz gefunden wurde (Tabelle 6). Diese Annahme erscheint wahrscheinlicher als die, dass die beiden Spezies nicht valide sind. Denn zum einen gibt es morphologisch zuverlässige Größenunterschiede in ihrer Länge und zum anderen ist *C. anatis* im Blinddarm zu finden, während *C. bursata* im Dünndarm vorkommt. Gerade bei der Sequenz C.spp.\_abc\_3 ist eine Kontamination als Grund für die identisch gefundenen Sequenzen bei drei *Capillaria*-Arten anzunehmen (Tabelle 6). Die Sequenz C.b.\_2 hingegen spricht für eine eigene Sequenz von *C. bursata*, kann jedoch aufgrund der geringen Anzahl von Tieren nur als Mutmaßung angesehen werden. Inwieweit eine Wirt-Parasit-Interaktion durch die in den Hühnerdärmen ausschließlich gefundenen Mischinfektionen von *C. anatis*, *C. bursata* und *C. caudinflata* einen Einfluss auf die Ergebnisse hat, konnte nicht weiter eruiert werden.

Eine mögliche DNA-Kontamination sollte mittels der Sequenzierung weiterer Gene, z.B. dem ITS-2- Gen bewiesen bzw. ausgeschlossen werden. Trotz mehrfachen Versuchen gelang es nicht, mit denen für Nematoden bereits verwendeten Primern und Biometraprogrammen (Epe et al., 1997) ein PCR-Produkt mit den vier *Capillaria*-Arten herzustellen. Letztlich mußten diese Bemühungen aus zeitlichen Gründen ohne Erfolg abgebrochen werden.

Die Erwartung, dass alle vier verschiedenen *Capillaria*-Arten spezifische Unterschiede hinsichtlich der COI-Sequenz aufweisen, ließ sich in unserer Arbeit nicht bestätigen. Bei der Art *C. obsignata* ist davon auszugehen, dass es eindeutig eine eigene COI-Gen-Sequenz gibt. Dies konnte bei den anderen drei Arten nicht nachgewiesen werden. Trotz der kritischen Frage nach einer möglichen DNA-Kontamination innerhalb der Proben der drei *Capillaria*-Arten kann dennoch die weiterführende Frage nach der Nützlichkeit des COI-Gens zur taxonomischen Unterscheidung eng verwandter *Capillaria*-Arten untereinander gestellt werden. Vorausgegangene Studien empfehlen das COI-Gen, um verschiedene Insektenarten (Ward et al., 2005; Nelson et al., 2007) oder Wurmartarten wie Trematoden (Pauly et al., 2003), Cestoden (Bowles und McManus, 1994) oder Nematoden (Blouin et al., 1998), genetisch zu unterscheiden. Ebenso wurde das COI-Gen von *Capillaria* spp. bereits erfolgreich sequenziert: Zhu et al. (2000) sequenzierten verschiedene *Capillaria*-Arten aus unterschiedlichen Wirten und Geweben. Allerdings differenzierten sie morphologisch nur *C. gastrica*; die anderen Arten wurden als *Capillaria* sensu lato zusammengefasst. Einige Autoren berichteten, dass das COI-Gen allein nicht geeignet sei, um z. B. Schwämme (Erpenbeck et al., 2006) oder andere *Capillaria*-Arten (Honisch, 2008) zuverlässig zu identifizieren. Erpenbeck et al. (2006) empfahlen die Einbeziehung der I3-M11-Partition für den er-

folgreichen Einsatz von COI-Partitionen. Andere Autoren schlugen die Verwendung des ITS1- oder ITS2-Gens für einen rDNA-Barcode-Scan bei Helminthen vor (Gasser et al., 1993 und 1994; Epe et al., 1997; Sim et al., 2010) oder rieten zum 18S-rRNA-Gen für Nematoden (Bhadury et al., 2006; Honisch, 2008). Auch Will und Rubinoff (2004) stellten das von Hebert et al. (2003) ernannte COI-System zur Identifizierung von Tieren infrage. Avise (2000) hebt hervor, dass die Definition einer „Spezies“ eine schwierige Debatte sei, die nicht zufriedenstellend mit einem Teil eines einzelnen Gens gelöst werden könne. Dies gelte vor allem für nah verwandte Arten.

Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass sich die morphologische Differenzierung dieser sehr kleinen Nematoden weiterhin als schwierig darstellt und ungeachtet unserer fragwürdigen Ergebnisse hinsichtlich der genetischen Differenzierung die Frage nach der Eignung des COI-Gens zur Identifizierung eng verwandter Arten erneut aufwirft.

Dennoch konnten bei der genetischen Differenzierung auch neue Erkenntnisse gewonnen werden. Die Isolierung der *Capillaria*-DNA funktionierte zuverlässig mittels der Phenol-Chloroform-Methode und nicht mit dem oft verwendeten E.Z.N.A® Insect DNA Kit. Die beschriebenen Primer zur Sequenzierung des COI-Gens für *Capillaria* spp. (Zhu et al., 2000) konnten keine wiederholbaren und zufriedenstellende Ergebnisse bringen und wurden durch neu entwickelte Primer ersetzt. Zudem konnte bei *C. obsignata* mit weiteren, neu entwickelten Primern zusätzliche 150 bp des COI-Gens sequenziert und somit erstmalig bei *Capillaria* spp. über 560 bp des COI-Gens identifiziert werden.

In weiterführenden Untersuchungen sollten sowohl erneut das COI-Gen als auch weitere Gene der vier *Capillaria*-Arten identifiziert und verglichen werden, um die Frage der Zugehörigkeit endgültig zu klären.

KAPITEL IV / Ergebnis und Diskussion

**Tabelle 7** Die drei amplifizierten COI-Gen-Sequenzen der vier verschiedenen *Capillaria*-Spezies. [*C. obsignata* (Sequenz: C.o.\_1), *C. anatis* (Sequenz: C.spp.\_abc\_3), *C. bursata* (Sequenz: C.b.\_2 and C.spp.\_abc\_3) und *C. caudinflata* (Sequenz: C.spp.\_abc\_3)] mit 568, 424 bzw. 433 bp. Grün markiert: SNP's am Basenpaar 155 (Co1 -> A), 173 (Co16 -> C) und 264 (Cb3 -> T). Gelb markiert: Die Nukleotide unterscheiden sich in allen drei Sequenzen.

Sequenz	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45			
C.o._1	T	T	T	T	T	T	T	T	G	G	G	C	A	T	C	C	T	G	A	G	G	T	T	T	A	T	A	T	T	T	T	A	G	T	A	C	T	A	C	C	A	G	C	C	T			
C.b._2									G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T	.	A	.	.	.	.	C	C	.
C.spp_abc_3					T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	C	.	C	.	.	.	.	G	A	.	

Sequenz	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
C.o._1	T	T	G	G	T	G	T	A	A	T	T	T	C	A	G	A	A	G	C	A	T	T	A	A	T	A	T	T	T	A	T	T	C	A	G	G	T	A	A	A	T	T	C	A	
C.b._2	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	T	C	.	A	.	.	.	A	A	.	.	T	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.	.	C	.	
C.spp_abc_3	.	.	.	.	A	.	.	C	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	A	C	.	G	.	.	.	C	A	.	.	C	.	.	C	.	.	C	.	.	A	.	.	.	.	T	.

Sequenz	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135			
C.o._1	A	A	G	T	A	T	T	T	G	G	T	C	C	A	T	T	A	G	G	A	A	T	A	A	T	T	T	T	A	T	G	C	A	A	T	A	A	T	A	A	G	A	A	T	T	G		
C.b._2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C.spp_abc_3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	T	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Sequenz	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	
C.o._1	G	A	A	T	T	T	T	A	G	G	A	T	G	T	T	T	T	G	T	G	T	G	A	G	G	G	C	A	T	C	A	T	A	T	A	T	A	T	A	C	T	G	T	A	G	
C.b._2	.	T	T	.	A	C	.	.	.	A	.	.	C	.	.	C	.	.	T	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	T	.	G	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	T	.
C.spp_abc_3	.	A	A	.	T	C	.	.	.	C	.	.	T	.	.	T	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	C	.	.	G	.	.	T	.	.	.	.	.	.	A	.

Sequenz	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225		
C.o._1	G	A	A	T	A	G	A	C	A	T	T	G	A	T	A	C	T	C	G	A	G	C	A	T	A	C	T	T	T	A	C	A	G	C	T	G	C	T	A	C	A	A	T	A	A		
C.b._2	.	.	.	.	G	.	T	A	.	T	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	A	.	.	C	.	.	T	.	.	
C.spp_abc_3	.	.	.	.	A	.	.	T	G	.	G	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Sequenz	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270		
C.o._1	T	T	A	T	T	G	G	T	G	T	A	C	C	A	A	C	C	G	G	T	G	T	T	A	A	A	A	T	T	T	T	T	A	G	A	T	G	A	T	T	A	G	C	T	A		
C.b._2	.	.	.	.	T	.	.	A	.	A	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	A	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.	A	.
C.spp_abc_3	.	.	.	.	C	.	.	T	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	A	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	T	.

Sequenz	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315		
C.o._1	C	T	T	T	A	T	A	T	G	G	T	T	C	T	G	C	T	G	T	T	A	A	A	A	T	A	A	C	T	C	C	A	C	T	A	T	T	T	A	T	/	A	T	G	G		
C.b._2	.	.	C	.	.	.	.	C	.	.	C	.	.	A	T	A	.	A	.	C	.	C	.	A	.	A	T	.	T	T	.	.	C	.	A	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A

## KAPITEL IV / Ergebnis und Diskussion

C. spp abc 3 . . . T . . . T . . . **A** . . . T T A . G . T . A . C . T A . A C . . . / . . T **G** . . . . T . . . . G

Sequenz	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	
C.o_1	G	T	T	A	T	A	G	G	T	T	T	C	T	T	A	A	G	A	T	T	<b>A</b>	T	/	T	T	/	A	C	A	A	T	C	G	G	A	G	G	<b>G</b>	T	T	A	A	C	T	G	
C.b_2	.	.	A	A	.	C	.	.	A	.	.	/	.	T	T	/	G	C	.	T	<b>C</b>	.	A	.	.	T	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	<b>A</b>	.	.	.	.	.	.	.	.
C. spp abc 3	.	.	T	G	.	C	.	.	A	.	.	/	.	C	T	A	/	A	.	A	<b>T</b>	.	A	.	.	T	.	.	T	.	.	C	.	.	G	.	.	<b>T</b>	.	.	.	.	.	.	.	.

Sequenz	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	
C.o_1	G	A	A	T	T	T	C	C	C	T	A	T	C	T	A	A	T	G	C	T	T	<b>A</b>	T	T	A	G	A	C	T	T	A	T	T	A	T	T	A	C	A	T	G	A	T	A		
C.b_2	.	A	.	.	.	.	T	T	.	.	.	.	A	.	C	.	T	.	.	.	.	<b>C</b>	.	.	.	.	.	T	.	G	C	.	.	C	.	T	.	.	.	.	.	.	.	C	.	
C. spp abc 3	.	T	.	.	.	.	C	T	.	.	.	.	T	.	.	T	.	.	A	.	.	<b>T</b>	.	.	.	.	.	T	.	.	A	T	.	.	C	.	A	.	.	.	.	.	.	.	T	.

Sequenz	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450		
C.o_1	C	<b>A</b>	T	A	T	T	A	T	G	T	A	G	T	A	G	G	T	C	A	T	C	T	T	C	A	T	T	T	T	G	T	T	T	T	A	A	G	A	A	T	A	G	G	C	G		
C.b_2	.	<b>C</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C. spp abc 3	.	<b>T</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	A	.	.	.	A	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	

Sequenz	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495			
C.o_1	T	T	G	T	G	T	T	T	G	C	T	A	T	T	A	T	A	G	T	G	G	C	A	A	T	C	A	C	C	T	T	A	T	G	A	T	T	A	C	C	T	T	G	A	A			
C.b_2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C. spp abc 3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Sequenz	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540				
C.o_1	T	A	T	T	A	G	G	T	A	T	T	T	C	A	C	T	T	A	A	T	A	C	T	A	T	A	T	T	A	C	A	A	A	A	A	A	A	C	T	C	A	A	T	T	C	C			
C.b_2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C. spp abc 3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Sequenz	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	
C.o_1	T	T	T	T	A	A	T	A	T	T	T	G	C	A	G	G	A	G	C	A	A	A	C	T	T	A	A	C	T	A	T	
C.b_2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C. spp abc 3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

**Danksagung**

Diese Arbeit entstand in Zusammenarbeit und mit freundlicher Unterstützung des Departments für Nutztierwissenschaften, Abteilung Biotechnologie und Reproduktion landwirtschaftlicher Nutztiere, Prof. Dr. Christoph Knorr, Burckhardtweg 2, 37077 Göttingen, Deutschland.

## Literaturübersicht

---

- Adamowicz, S.J., Hebert, P.D.N., Marinone, M.C., 2004. Species diversity and endemism in the Daphnia of Argentina. *Zool. J. Linn. Soc. Lond.* 140, 171–204.
- Bhadury, P., Austen, M. C., Bilton, D.T., Lamshead, P. John D., Rogers, A.D., Smerdon, G.R., 2006. Development and evaluation of a DNA-barcoding approach for the rapid identification of nematodes. *Marine Ecology Progress Series*, 320. 1-9.
- Blouin, M.S., Yowell, C.A., Courtney, C.H., Dame, J.B., 1998. Substitution Bias, Rapid Saturation, and the Use of mtDNA for Nematode Systematics. *Mol. Biol. Evol.* 15(12), 1719–1727.
- Boehme, P., Amendt, J., Zehner, R., 2011. The use of COI barcodes for molecular identification of forensically important fly species in Germany. *Parasitol Res* (DOI 10.1007/s00436-011-2767-8).
- Bowles, J., McManus, D.P., 1994. Genetic characterization of the Asian Taenia, a newly described taeniid cestode of humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50(1), 33-44.
- Derry, A.M., Hebert, P.D.N., Prepas, E.E., 2003. Evolution of rotifers in saline and sub-saline lakes: a molecular phylogenetics approach. *Limnol. Oceanogr.* 48, 675–685.
- Epe, C., Samson- Himmelstjerna, v. G., Schnieder, T., 1997. Differences in a ribosomal DNA sequence of lungworm species (*Nematoda: Dictyocaulidae*) from fallow deer, cattle, sheep and donkeys. *Res. Vet. Sci.* 62, 17-21.
- Erpenbeck, D., Hooper, J.N.A., Wörheide, G., 2006. COI phylogenies in diploblasts and `Barcoding of Life`- are we sequencing a suboptimal partition? *Mol. Ecol. Notes* 6, 550- 553.
- Freitas, J.F.T., Almeida, L., 1934. Novo nematodeo parasite de Gallus domenicus L., no Brasil: *Capillaria bursata* n. Sp. *Recebibo para publicacao*, 18, 273- 277.
- Friedhoff, K., Ehlers- Bhodigen, S., 1965. On the diagnosis and epizootiology of *Capillaria* infections in domestic chickens. *DTW.* 72(20), 470-478.
- Gasser, R.B., Chilton, N.B., Hoste, H., Beveridge, I., 1993. Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminthes. *Nucleic. Acids. Res.* 21, 2525- 2526.
- Gasser, R.B., Chilton, N.B., Hoste, H., Stevenson, L.A., 1994. Species identification of trichostrongyle nematodes by PCR- linked RFLP. *Int. J. Parasitol.* 24(2), 291-293.

- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 270, 313-21.
- Hebert, P.D.N., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H., Hallwachs, W., 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the Neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 14812-14817.
- Honisch, M., 2008. Phylogenie von Nematoden einheimischer Greifvögel Inaug-Diss, Berlin.
- Kaufmann, F., Daş, G., Sohnrey, B., Gauly, M., 2011. Helminth infections in laying hens kept in organic free range systems in Germany. *Liv. Sci.* 141(2-3), 182-187.
- Kaufmann, J., 1996. Parasitic Infections of Domestic Animals: A Diagnostic Manual, Chapter 1, 360.
- Levine, P.P., 1938. Infection of the chicken with *Capillaria columbae* (Rud). *J. Parasitol.* 24, 45-52.
- Madsen, H., 1945. The species of *Capillaria* parasitic in the digestive tract of Danish gallinaceous and anatine game birds. *Danish Rev. Game Biology* 1, 1-112.
- Madsen, H., 1951. Notes on the species of *Capillaria* Zeder, 1800 known from gallinaceous birds. *J. Parasitol.* 37(3), 257-265.
- Molin, R., 1858. Prospectus helmithum quae in prodromo faunae helmithologicae venetiae continentur. *Sitz. Akad. Wiss. Wien. Math. Nat. Cl.* 30, 127-158.
- Nelson, L.A., Wallmann, J.F., Dowton, M., 2007. Using COI barcodes to identify 84orensicallly and medically important blowflies. *Med. Vet. Entomol.* 21, 44-52.
- Norton, C.C., Joyner, L.P., 1965. Experimental chemotherapy of infection with *Capillaria obsignata*. *J. Comp. Pathol.* 75, 137-145.
- Pauly, A., Schuster, R., Steuber, S., 2003. Molecular characterization and differentiation of opisthorchiid trematodes of the species *Opisthorchis felineus* (Rivolta, 1884) and *Metorchis bilis* (Braun, 1790) using polymerase chain reaction. *Parasitol. Res.* 90(5), 409-414.
- Permin, A., Hansen, J.W., 1998. The epidemiology, diagnosis and control of poultry parasites. Food and agriculture organization of the United Nations, animal health manual No.4, Rome.
- Quicke, D.L.J., Mori, M., Zaldivar-Riveron, A., Laurene, N.M., Shaw, M.R., 2006. Suspended mummies in *Aleiodes* species (Hymenoptera: Braconidae: Rogadinae) with descriptions of six new species from western Uganda based largely on DNA sequence data. *J. Nat. His.* 40, 2663–2680.



- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sim, K.A., Hoar, B., Kutz, S.J., Chilton, N.B., 2010. Amplification of the second transcribed spacer ribosomal DNA of individual trichostrongylid nematode larvae by nested polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22, 433-437.
- Smith, M.A., Woodley, N.E., Janzen, D.H., Hallwachs, W., Hebert, P.D.N., 2006. DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *P. Nat. Acad. Sci. USA.* 103, 3657–3662.
- Tiersch, K.M., Daş, G., v. Samson-Himmelstjerna, G., Gaulty, M., 2013a. The role of culture media on embryonation and subsequent infectivity of *Capillaria obsignata* eggs. *Parasitol. Res.* 112(1), 357-364.
- Tiersch, K.M., Daş, G., v. Samson-Himmelstjerna, G., Gaulty, M., 2013b. Artificial infection of chickens with *Capillaria obsignata* eggs embryonated in different media. *Vet. Parasitol.* 200(1-2), 139-146.
- Todd, A.C., 1947. On *Capillaria bursata* Teixeira de Freitas and Lins de Almeida, 1934. *J. Tennessee Acad. Sci.* 22, 191-193.
- Wakelin, D., 1964. A survey of the intestinal helminth parasites in British domestic fowl. *J. Helminth.* 38, 19-200.
- Wakelin, D., 1965. Experimental studies on the biology of *C. obsignata*, Madson, 1945, a nematode parasite of the domestic fowl. *J. Helminth.* 39(4), 399-412.
- Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R., Hebert, P.D.N., 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.* 360, 1847-1857.
- Wehr, E.E., 1939. Studies on the development of the pigeon Capillarid, *Capillaria Columbae*. *Tech. Bull. U.S. Dep. Agric.* 679, 1-19.
- Will, K.W., Rubinoff, D., 2004. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. *Cladistics* 20, 47-55.
- Yassin, A., Capy, P., Madi-Ravazzi, L., Ogereau, D., David, J.R., 2008. DNA barcode discovers two cryptic species and two geographical radiations in the invasive drosophilid *Zaprionus indianus*. *Mol. Ecol. Res.* 8, 491–501.
- Zhu, X., Spratt, D.M., Beveridge, I., Haycock, P., Gasser, R.B., 2000. Mitochondrial DNA polymorphism within and among species of *Capillaria* sensu lato from Australian marsupials and rodents. *Int. J. Parasitol.* 30, 933-938.



**KAPITEL V**

---



## 5. Allgemeine Diskussion

---

### 5.1 Kultivierungsversuch mit *C. obsignata*

Der Kultivierungsversuch mit *C. obsignata* erbrachte das Ergebnis, dass die *C. obsignata*-Eier in allen vier Medien prinzipiell das gleiche Embryonierungspotenzial mit sich bringen. Nach 16 Tagen waren über 80 % der ausgezählten Eier in jedem Medium vollständig embryoniert. Dies würde bedeuten, dass die einzelnen Medien keinen Einfluss auf die Entwicklung der Embryos genommen hätten. Dies widerspricht jedoch Erkenntnissen, nach denen die Entwicklung der Nematoden-Eier durch Umgebungsbedingungen, wie Kulturmedien, Inkubationszeit oder Sauerstoff, beeinflusst wird (Anderson, 1992; Permin et al., 1997a; Dick et al., 1973; Saunders et al., 2000). Betrachtet man hingegen die Schnelligkeit der Entwicklung, so embryonierten die *Capillaria*-Eier in 0,1 N Schwefelsäure innerhalb von 8,6 Tagen signifikant schneller als in den anderen drei o.g. Medien.

Im zweiten Teil des Kultivierungsversuches blieben die Eier während der Entwicklung in den Uteri der *C. obsignata*-Weibchen, und die Embryonierungsraten wurden erst nach Zerkleinerung der Uteri verglichen. Der durchschnittliche Anteil der embryonierten Eier nach der Zerstörung der intakten Weibchen war deutlich niedriger (32,6 %), abhängig vom Kulturmedium, das für die Inkubation verwendet wurde. Die Embryonierungsraten (%) von 0,5 % Formalin ( $24.0 \pm 2.67$ ) und 2 % Formalin ( $28.9 \pm 3.48$ ) unterschieden sich signifikant ( $P \leq 0.001$ ) von der Embryonierungsrate von 0,1 N Schwefelsäure ( $44.2 \pm 3.35$ ).

Dies würde bedeuten, dass das Formalin, verglichen mit der Schwefelsäure, einen nachteiligen Einfluss auf die Unversehrtheit der Eier in den inkubierten Weibchen hätte. Die niedrigen durchschnittlichen Embryonierungsraten der gewonnenen, embryonierten Eier resultierten allerdings nicht nur aus der Einbeziehung der unreifen Eier in die Berechnungen, sondern auch aus der mechanischen Schädigung der Eier, die durch Zerstörung der Würmer eintritt. Die durchschnittliche Rate der Eier, die bei der Zerkleinerung der Uteri zerstört wurden, betrug bei allen vier Medien  $29,26 \% \pm 1,36$ . Dies zeigt, dass die angewandte Zerkleinerungsmethode mit dem Potter-S-Homogenisator zwar eine relativ hohe Verlustrate mit sich bringt, aber zu standardisierten Ergebnissen führt. Die niedrigen Embryonierungsraten, die sich beim Auszählen der Eier ergaben, sind ggf. weiterhin damit zu erklären, dass bei der Zerstörung des

Weibchens alle im Uterus vorhandenen Eier frei werden und daher in die Auszählung mit einfließen. Dies führt zu einer erheblichen Verschiebung der Werte, da mehr nicht embryonierte Eier gezählt werden als im ersten Teil des Versuches. Beim Auszählen der Eier im Uterus der Weibchen wurden nur solche Eier beobachtet und gezählt, die in einer Reihe und nicht überlappend im Uterus angeordnet waren und eine Größe von ca. 52 µm bis 36 µm aufwiesen; insofern also ausschließlich Eier, welche von der Größe und dem Aussehen her auch natürlich mit dem Kot der Hühner ausgeschieden werden würden (Graybill, 1924; Wehr, 1939). Alle anderen nicht embryonierten Eier, die sich überlappend im hinteren Teil des Uterus befanden und nicht eindeutig zählbar waren, flossen nicht in die Auswertung mit ein. Dadurch lassen sich die beiden Ergebnisse nicht unmittelbar miteinander vergleichen. Zu den Ergebnissen der ersten Studie passt ein Versuch von Norton und Joyner (1965), in dem von Embryonierungsraten über 95 % berichtet wurde, nachdem die *C. obsignata*-Eier aus dem Kot der Hühner isoliert wurden und sich diese in destilliertem Wasser embryonieren ließen. Auch hierbei wurden nur Eier verwendet, die anscheinend befruchtet waren und vom *Capillaria*-Weibchen ausgeschieden worden waren.

Dennoch sollte die Gewinnungsmethode der *Capillaria*-Eier aus den Weibchen weiter verbessert werden, um zu erreichen, dass höhere Anteile embryonierter Eier entstehen. Die im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen gemachte Beobachtung, dass 0.1 N Schwefelsäure für die Embryonierung von *C. obsignata*-Eiern am effektivsten ist, deckt sich mit den Empfehlungen von Permin et al. (1997a), 0.1 N Schwefelsäure für die Entwicklung von *A. galli*-Eiern zu verwenden.

## 5.2 Infektionsversuch mit *C. obsignata*

Im zweiten Versuch, dem Infektionsversuch, wurden die vollständig embryonierten Eier aus den vier verschiedenen Medien auf ihre Infektiosität getestet. Dazu wurden die Hühner in vier Gruppen eingeteilt. Jede Gruppe wurde mit Eiern, welche in jeweils einem der vier Medien inkubiert wurden, infiziert. Innerhalb einer Gruppe wurden die Hühner mit vier verschiedenen Infektionsdosen infiziert. Die eingesetzten Dosen waren 250, 500, 1000 und 2000 infektiöse *C. obsignata*-Eier. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Infektion mit *Capillaria*-Eiern, die in 0,5 % Formalin kultiviert wurden, zu den höchsten Wurmbürden führten. In dieser Gruppe lagen die Etablierungsraten der verschiedenen Dosen alle bei über 50 %. Dies stimmt mit einer Bemerkung von Chubb und Wakelin (1963) überein. Sie beschrieben, dass es möglich ist, große Etablierungs-

raten von etwa 50 % mit *C. obsignata* zu erhalten. Ebenso stützen diese Etablierungsraten eine Studie von Norton und Joyner (1965). Sie beschrieben Etablierungsraten zwischen 87,5 % und 31,1 % bei einer Infektionsdosis von 200 bzw. 2000 *C. obsignata*-Eiern, die in destilliertem Wasser kultiviert wurden. Die hier erreichten, höheren Etablierungsraten der Eier bei 0,5 % Formalin als bei 2 % Formalin lassen nicht darauf schließen, dass es durch niedrigere Konzentrationen zu einem höheren Wachstum von unerwünschten Mikroorganismen, z. B. Pilze (Luttermoser, 1938) und Bakterien (Kopper und Mansfield, 2010), kommt und somit zu einer erhöhten potentiellen Schädigung der Eier. Vielmehr ist bei diesem Ergebnis davon auszugehen, dass höhere Konzentrationen der Inkubationsmedien die Eier vermehrt negativ beeinflussen. Die Verwendung von 0,5 % Formalin für die Embryonierung von Nematoden-Eiern zur künstlichen Infektion wurde häufig beschrieben (Sadun, 1948; Herd und McNaugh, 1975; Kemp und Franson, 1975; Saunders et al., 2000; Santos et al., 2001; Andrade und Andrade, 2004; Püllen et al., 2008) und unterstützt diesbezüglich unsere Ergebnisse. Zwischen Formalin (0,5 % und 2 %) und 0,1 N Schwefelsäure gab es jedoch keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Etablierungsraten der verschiedenen Infektionsdosen. Ähnlich wie bei der niedrigeren Konzentration von Formalin (0,5 %) hat die Infektion mit in relativ niedrig konzentrierter Schwefelsäure (0,1 N) inkubierten Eiern ebenfalls zu vergleichsweise hohen Wurmzahlen geführt. Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass die Kulturmedien, die in ihrer Zusammensetzung Wasser sehr ähneln, aber dennoch die inkubierten Eier vor der Invasion von unerwünschten Organismen schützen, die am besten geeigneten Medien im Hinblick auf die spätere Infektiosität der Eier sind.

Da es keinen Interaktionseffekt zwischen Inkubationsmedium und Infektionsdosis in Bezug auf die Wurmzahlen der Hühner gab, kann davon ausgegangen werden, dass die quantifizierten Auswirkungen der Inkubationsmedien auch mit höheren Infektionsdosen wiederholbar sind. Trotzdem sollten die Embryonierungsraten nicht allein als die wichtigsten Kriterien für den Vergleich verschiedener Medien betrachtet werden, da nicht sichergestellt werden kann, dass bei einem Medium mit hohen Embryonierungsraten auch die Infektiosität der Eier erhöht ist. Ebenso wenig können die Etablierungsraten als Parameter für die Effizienz eines Mediums verwendet werden. Wichtig werden diese Aspekte, wenn die Anzahl der verfügbaren Eier beim Embryonierungsverfahren begrenzt ist, z. B. bei seltenen Parasiten.

Die Infektion mit den in 0,1 % Kaliumdichromat inkubierten Eiern zeigte bei allen getesteten Infektionsdosen signifikant niedrigere Etablierungsraten als die Infektion mit den drei weiteren, sich untereinander nicht signifikant unterscheidenden Medien Formalin (0,5 % und 2 %) und 0,1 N Schwefelsäure. Kaliumdichromat ist dafür bekannt, dass es in der Lage ist, durch die intakte Haut aufgenommen zu werden und Zellgewebe zu schädigen (Anonymous, 2010). Außerdem ist Kaliumdichromat ein starker Algenzell-Schadstoff (Labra et al., 2007), führt zu einer genetischen Veränderung in der Wachstumsphase von Hefezellen (Galli et al., 1985) und ist das stärkste Mittel zur Induktion von Gen-Konversion und Reverse-Mutation in Hefezellen (Kharab und Singh, 1985). Die Wand eines Nematoden-Eis besteht aus mindestens drei Schichten: der Lipidschicht, dem Chitin und der Proteinhülle (Eckert et al., 2005). Es ist anzunehmen, dass Kaliumdichromat die Fähigkeit besitzt, die Proteinhülle des *C.-obsignata*-Eis zu beeinflussen und es somit angreifbar für die Magensäure im Wirt zu machen. Die infektiöse Larve würde verdaut werden und nicht in den Darm des Wirtes gelangen. Auch Fairbairn (1960) spekulierte, dass eine geringe Infektiosität durch eine chemische Veränderung der Ei-schale während der Embryonierung erklärt werden müsse. Bei einer Arbeit mit *T. suis*-Eiern zeigte sich ebenfalls, dass die künstliche Infektion mit in Kaliumdichromat embryonierten Eiern zu geringeren Etablierungsraten (2 %) führte als die Infektion durch in Kontrollmedium inkubierte Eier (20 %) (Burden und Hammet, 1976). Zwar gab es keine sichtbaren Veränderungen in der Morphologie der in Kaliumdichromat inkubierten *C. obsignata*-Eier; es können aber Größe und Aussehen der Eier, die chemischen Stressoren wie z.B. Benzimidazole (Dorny et al., 1987) ausgesetzt sind, beeinflusst werden. Auch Kopper und Mansfield (2010) haben festgestellt, dass die Behandlung von *T. muris*-Eiern mit 6,25 % Hypochlorit das Bakterien- und Pilzwachstum auf diesen zwar hemmt; gleichzeitig erhöht aber die Zeit der Exposition den Abbau der *T.-muris*-Eischale. Sie schlugen deshalb vor, die Exposition der Eier mit 6,25 % Hypochlorit auf 5 und 10 Minuten zu begrenzen, um die nachteilige Auswirkung auf die intakten Eierschalen zu vermindern.

Bei künstlichen Infektionen mit *A. galli* wurde festgestellt, dass die Etablierungsrate desto höher ist, je kleiner die Infektionsdosis ist (Sadun, 1949; Dhar und Raina, 1987; Permin et al., 1997b; Gaulty et al., 2001). Norton und Joyner (1965) zeigten ebenfalls bei *C. obsignata* fallende Etablierungsraten (87,5 % und 41,3 %) bei steigenden Infektionsdosen (200 bis 1000 Eier pro Tier). Auch unsere Ergebnisse zeigten die Tendenz, dass die Etablierungsraten von 46,5 % (250 infektiöse Eier) auf 26,2 % (2000



infektiöse Eier) sanken. Erklärt werden kann dies durch das Immunsystem und die Wechselwirkungen zwischen Wirt und Parasit (Sadun, 1949). Ebenso wird vermutet, dass die Konkurrenz unter den Larven an der gleichen Prädilektionsstelle eine Ursache dafür sein könnte (Ikeme, 1971; Paterson und Viney, 2002).

Norton und Joyner (1965) empfehlen eine Dosis von 2000 infektiösen Eiern für eine experimentelle Infektion. Diese empfohlene Infektionsdosis kann nicht durch unsere Ergebnisse bestätigt werden. Für eine künstliche Infektion mit *C. obsignata* erwies sich eine Infektionsdosis von 500 Eiern als ausreichend, da die Größe der Wurmbürden und die Eiausscheidungsrate zu signifikanten Interpretationsergebnissen führten. Um jedoch einen direkten Effekt auf die Tiere zu erhalten, werden von unserer Seite höhere Infektionsdosen als 2000 infektiöse Eier pro Huhn empfohlen. Keiner der Junghähne in der vorliegenden Studie zeigte klinische Symptome oder pathologische Zustände. Ebenso wenig gab es trotz der erheblichen Unterschiede in der Wurmbelastung der infizierten Vögel keine signifikanten Unterschiede für die durchschnittliche tägliche Gewichtszunahme (ADG) der Vögel. Dies erklärt sich teilweise aus den niedrigen Infektionsdosen. Nur bei schweren Infektionen mit *C. obsignata* kann eine Verlangsamung des Wachstums sowie Wachstumsstörungen bei Jungtieren beobachtet werden (Wakelin, 1965). Dies wird nach Norton und Joyner (1965) erst mit extrem großen Infektionsdosen (5000 bis 100.000 Eier pro Vogel) erreicht. Daher kann davon ausgegangen werden, dass Infektionsdosen bis zu 2000 Eier pro Tier keine ausgeprägte Wirkung auf das Körpergewicht des Wirtstieres haben. Die mangelnden Unterschiede der ADG lassen nicht zwangsweise darauf schließen, dass Infektionen mit *Capillaria*-Eiern keinen Einfluss auf die Leistungsfähigkeit der infizierten Tiere haben. Es könnte ebenso darauf hindeuten, dass das Wachstum der Hühner aufgrund der eingesetzten, relativ niedrigen Infektionsdosen ähnlich gering beeinträchtigt wurde.

Ähnlich wie bei den Etablierungsraten kann die Fruchtbarkeit der weiblichen Würmer ebenfalls dichteabhängige Regulationsprozesse zeigen. Die Anzahl der weiblichen Würmer und die Anzahl der ausgeschiedenen Eier aus den Hühnern, die mit den in Kaliumdichromat inkubierten Eiern infiziert wurden, führten zu einer höheren Fruchtbarkeitsschätzung im Vergleich zu den weiblichen Würmern und ausgeschiedenen Eiern aus Hühnern, welche mit Eiern aus Formalin oder 0,1 N Schwefelsäure infiziert worden waren. Obwohl auch wir eine numerische Abnahme (bis zu -38 %) in der weiblichen Fruchtbarkeit (definiert als EPG / weibliche Würmer) mit den ansteigenden Infektionsdosen beobachten konnten, waren diese Unterschiede nicht signifikant groß

( $P = 0,531$ ). Auch Ikeme (1971) sowie Kerboeuf und Jolivet (1984) berichteten, dass sich die Fruchtbarkeit der Weibchen mit zunehmenden Infektionsdosen verringert. Mögliche Gründe dafür sind Umgebungsbedingungen, weniger Wettbewerb und Wurm-zu-Wurm-Interaktionen (Ikeme, 1971). Angenommen, die beobachteten Unterschiede in der Fruchtbarkeitsschätzung der Würmer wären nicht aufgrund eines biologischen Hintergrundes zu beobachten, sondern würden aufgrund einer methodischen Einschränkung auftreten, so ließe sich dies nur durch das angewandte Verfahren erklären: Die verwendete McMaster-Technik hat eine Sensitivität von 50 Eiern pro Gramm Kot. Im Vergleich zur Eiausscheidungsintensität von anderen wichtigen Geflügel-Nematoden, z.B. *A. galli* (Gauly et al., 2001.) oder *H. gallinarum* (Tompkins und Hudson, 1999; Daş et al., 2011), ist die Fruchtbarkeit von *C. obsignata* vermutlich niedriger (Tiersch et al., 2013; KAPITEL II). Die mit der McMaster-Technik quantifizierten Eierzahlen weisen hohe Standardabweichungen auf, wenn die Proben eine geringe Anzahl von Eiern (MAFF, 1986) enthalten. Dies würde bedeuten, wenn nur eine sehr geringe Anzahl von Eiern gezählt würde, erhöhte sich die Wahrscheinlichkeit von ungenauen oder sogar falsch negativen Ergebnissen. Deshalb sollten zur genaueren Schätzung der Fruchtbarkeit bei geringer Anzahl ausgeschiedener Eier besser hochempfindliche Ei-Zähltechniken eingesetzt werden, z. B. FLOTAC (Cringoli et al., 2010).

### 5.3 Morphologische und genetische Differenzierung

Im dritten Versuchsteil sollten die artspezifischen Unterschiede morphologischer und genetischer Art der vier beim Geflügel am häufigsten vorkommenden *Capillaria*-Arten (*C. obsignata*, *C. anatis*, *C. bursata* und *C. caudinflata*) genauer bestimmt werden. Die *Capillaria* spp. wurden einzeln morphologisch nach den Beschreibungen verschiedener Autoren (Freitas und Almeida, 1934; Madsen, 1945; Wakelin, 1965; Norton und Ruff, 2003) differenziert und anschließend fotografiert. Bezüglich der Unterscheidung von *C. bursata*- und *C. caudinflata*-Männchen traten Schwierigkeiten bei der exakten morphologischen Differenzierung auf. Dies wurde schon von Madsen (1951) sowie Friedhoff und Ehlers-Bhodigen (1965) diskutiert. Die Flügel der Spicula der beiden Arten können kaum unterschieden werden. Auch die Eier sind in beiden Spezies gleich beschrieben. Madsen (1951) erwähnte auch, dass die Weibchen von *C. caudinflata* mit ihren typischen Vulva-Anhängseln identisch mit *C. bursata*-Weibchen seien, die von Todd (1947) dargestellt worden sind, nachdem diese Anhängsel mechanisch entfernt wurden. Somit ging Madsen davon aus, dass es sich bei *C. bursata* und *C. caudinflata* um

eine Art handle. Gemäß der Theorie von Friedhoff und Ehlers-Bhodigen (1965) wurde angenommen, dass die umstrittenen Arten von Männchen unreife Männchen von *C. caudinflata* seien.

Entgegen der Erwartung ließ sich in unserer Arbeit nicht bestätigen, dass alle vier verschiedenen *Capillaria*-Arten spezifische Unterschiede hinsichtlich der COI-Sequenz aufweisen. Bei der genetischen Differenzierung von 41 *C. obsignata* ergab sich eine insgesamt 568 bp lange COI-Sequenz (C.o.\_1). Intraspezifische Unterschiede zeigten sich bei zwei *C. obsignata*: Co1 hatte an Basenpaar 155 (G->A) und Co16 an Basenpaar 173 (T->C) jeweils einen SNP. Eine weitere COI-Sequenz C.spp\_abc\_3 mit 433 bp konnte bei fünf *C. anatis*, sieben *C. bursata* und zwei *C. caudinflata* nachgewiesen werden. Hierbei wurde bei einem *C. bursata* Cbx3 ein SNP am Basenpaar 264 (C->T) gefunden. Eine weitere Sequenz C.b.\_2 mit 424 bp zeigten drei andere Exemplare von *C. bursata*. Die Übereinstimmung der drei Sequenzen lag im Bereich von 81.4 bis 84.5 %. Die Sequenzen C.o.\_1 und C.spp\_abc\_3 zeigten die höchste Übereinstimmung mit 84.5 %. Die Übereinstimmung der C.o.\_1- und der C.b.\_2-Sequenz betrug 83 % und zwischen der C.b.\_2- und der C.spp\_abc\_3-Sequenz 81.4 %.

Es muss in Betracht gezogen werden, dass entweder die Spezies nicht valide sind oder die PCRs mit DNA kontaminiert waren und deshalb bei allen drei Spezies dieselbe Sequenz C.spp\_abc\_3 gefunden wurde. Da sich die weiblichen Tiere einer Art morphologisch gut unterscheiden lassen, es zuverlässige Größenunterschiede in ihrer Länge gibt und grundsätzlich *C. anatis* im Blinddarm vorkommt, während *C. bursata* im Dünndarm zu finden ist, erscheint die Annahme einer Kontamination am wahrscheinlichsten. Die Sequenz C.b.\_2 könnte hingegen für eine eigene Sequenz von *C. bursata* sprechen, dies kann jedoch aufgrund der geringen Anzahl von Tieren nur gemutmaßt werden.

Dennoch sollte, trotz Annahme einer Kontamination, auch die Frage nach der Nützlichkeit des COI-Gens zur taxonomischen Unterscheidung eng verwandter *Capillaria*-Arten untereinander gestellt werden. In der Literatur gibt es Hinweise, dass sich das von Hebert et al. (2003) ernannte COI-System nicht als alleiniges DNA-Barcoding eignet (Will und Rubinoff, 2004). Avise (2000) vertritt die Meinung, dass die Definition einer Spezies gerade bei eng verwandter Arten nicht alleine mit einem Teil eines einzelnen Gens geklärt werden kann. Auch Erpenbeck et al. (2006) empfehlen die Einbeziehung der I3-M11-Partition für den erfolgreichen Einsatz von COI-Partitionen. Andere Autoren schlugen die Verwendung des ITS1- oder ITS2-Gens für

einen rDNA-Barcode-Scan bei Helminthen vor (Gasser et al., 1993 und 1994; Epe et al., 1997; Sim et al., 2010) oder rieten zum 18S-rRNA-Gen für Nematoden (Bhadury et al., 2006; Honisch, 2008).

Andere Studien hingegen empfehlen das COI-Gen, um verschiedene Insektenarten (Ward et al., 2005; Nelson et al., 2007) oder Wurmartarten, wie Trematoden (Pauly et al., 2003), Cestoden (Bowles und McManus, 1994) oder Nematoden (Blouin et al., 1998), genetisch zu unterscheiden. Ebenso wurde das COI-Gen von *Capillaria* spp. bereits erfolgreich von Zhu et al. (2000) sequenziert.

Um die Frage der Zugehörigkeit der vier *Capillaria*-Arten beim Huhn endgültig zu klären, sind weitere Untersuchungen genetischer als auch morphologischer Art unerlässlich.

## **6. Schlussfolgerung**

---

Bei zukünftigen Infektionsversuchen mit *C. obsignata*, z. B. im Rahmen der Resistenzforschung, kann man die Verwendung der Medien mit 0,5 % Formalin oder mit 0,1 N Schwefelsäure zur Embryonierung der Eier empfehlen. Eine Dosis von 500 infektiösen Eiern pro Tier ist unter Tierschutzaspekten sicherlich zu vertreten. Um einen Effekt der *Capillaria* am Wirt ausmachen zu können, müsste die Dosis jedoch erhöht werden (> 2000 Eier).

Die weiterhin schwierige morphologische Differenzierung der männlichen *C. bursata* und *C. caudinflata* stellt insofern in der Praxis bzw. bei zukünftigen Infektionsversuchen kein Problem dar, als dass *C. obsignata* zum einen morphologisch gut von den anderen drei Arten zu unterscheiden ist und zum anderen eine eigene COI-Sequenz gefunden wurde, mit der die Art eindeutig differenziert werden kann. Da *C. obsignata* von allen *Capillaria* spp. in der Geflügelhaltung die größte Rolle spielt (Permin et al., 1999) und als einzige Art zuverlässig einen direkten Entwicklungszyklus aufweist (Eckert et al., 2005), wird man auch weiterhin hauptsächlich mit *C. obsignata* zu Forschungszwecken arbeiten. Die künstliche Infektion, wie sie mit *C. obsignata* durchgeführt wurde, würde sich bei den anderen Arten aufgrund des Zwischenwirtes als schwieriger darstellen. Um eine adäquate Aussage über die genetischen Unterschiede treffen zu können, sind diesbezüglich weitere Untersuchungen unerlässlich.

## Literaturverzeichnis

---

- Anderson, R.C., 1992. Nematode parasites of vertebrates: Their development and transmission. CAB International, Wallingford.
- Andrade de, S.B., Andrade, Z.A., 2004. Experimental hepatic fibrosis due to *Capillaria hepatica* infection (differential features presented by rats and mice). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 99 (4).
- Anonymous, 2010. Material Safety Data Sheet, Santa Cruz Biotechnology, Inc. <http://datasheets.scbt.com/sc-203353.pdf>. Accessed 20. February 2013.
- Avise, J.C., 2000. Phylogeography: the History and Formation of Species. Harvard University press, Cambridge, MA.
- Bhadury, P., Austen, M. C., Bilton, D.T., Lamshead, P., John, D., Rogers, A.D., Smerdon, G.R., 2006. Development and evaluation of a DNA-barcoding approach for the rapid identification of nematodes. Marine Ecol. Prog. Ser. 320, 1-9.
- Blouin, M.S., Yowell, C.A., Courtney, C.H., Dame, J.B., 1998. Substitution Bias, Rapid Saturation, and the Use of mtDNA for Nematode Systematics. Mol. Biol. Evol. 15(12), 1719–1727.
- Bowles, J., McManus, D.P., 1994. Genetic characterization of the Asian Taenia, a newly described taeniid cestode of humans. Am. J. Trop. Med. Hyg. 50(1), 33-44.
- Burden, D.J., Hammet, N.C., 1976. A comparison of the infectivity of *Trichuris suis* ova embryonated by four different methods. Vet. Parasitol. 2(3), 307-311.
- Chubb, L.G., Wakelin, D., 1963. Nutrition and helminthiasis in chickens. PNS. 22 (1), 20-25.
- Cringoli, G., Rinaldi, L., Maurelli, M.P., Utzinger, J., 2010. FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. Nat. Protoc. 5, 503–515.
- Daş, G., Abel, H., Rautenschlein, S., Humburg, J., Schwarz, A., Breves, G., Gauly, M., 2011. Effects of dietary non-starch polysaccharides on establishment and fecundity of *Heterakis gallinarum* in grower layers. Vet. Parasitol., 178, 121-128.
- Dhar, D.N., Raina, O.K., (1987) Establishment of *Ascaridia galli* in betamethasone-treated chickens. Veterinary Parasitology, 25 (1), 67-73.
- Dick, J.W., Leland, S.E., Jr., Hansen, M.F., 1973. Hatching and in vitro cultivation of the nematode *Ascaridia galli* to the third-stage larva. Trans. Am. Microsc. Soc. 92(2), 225-230.

- Dorny, P., Berghen, P., Vercruyssen, J., 1987. Morphological changes in *Capillaria obsignata* (Nematoda: Trichuridae) eggs after treatment with cambendazole. *Parasitol. Res.* 74, 196-197.
- Eckert, J., Friedhoff, K.T., Zahner, H., Deplazes, P., 2005. Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. Enke Verlag, Kap. 2.3.
- Epe, C., Samson- Himmelstjerna, v. G., Schnieder, T., 1997. Differences in a ribosomal DNA sequence of lungworm species (*Nematoda: Dictyocaulidae*) from fallow deer, cattle, sheep and donkeys. *Res. Vet. Sci.* 62, 17-21.
- Erpenbeck, D., Hooper, J.N.A., Wörheide, G., 2006. COI phylogenies in diploblasts and 'Barcoding of Life' - are we sequencing a suboptimal partition? *Mol. Ecol. Notes* 6, 550-553.
- Fairbairn, D., 1960. Physiologic aspects of egg hatching and larval exsheathment in nematodes, in: Stauber LA (ed), host influence on parasite physiology. Rutgers University Press, New Brunswick, NJ, 50-64.
- Freitas, J.F.T., Almeida, L., 1934. Novo nematodeo parasite de Gallus domenicus L., no Brasil: *Capillaria bursata* n. sp. *Recebido para publicacao*, 18, 273- 277.
- Friedhoff, K., Ehlers- Bhodigen, S., 1965. On the diagnosis and epizootiology of *Capillaria* infections in domestic chickens. *DTW.* 72(20), 470-478.
- Galli, A., Boccardo, P., Del Carratore, R., Cundari, E., Bronzetti, G., 1985. Conditions that influence the genetic activity of potassium dichromate and chromium chloride in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mut. Res.* 144, 165-169.
- Gasser, R.B., Chilton, N.B., Hoste, H., Beveridge, I., 1993. Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminthes. *Nucleic. Acids. Res.* 21, 2525- 2526.
- Gasser, R.B., Chilton, N.B., Hoste, H., Stevenson, L.A., 1994. Species identification of trichostrongyle nematodes by PCR- linked RFLP. *Int. J. Parasitol.* 24(2), 291-293.
- Gauly, M., Bauer, C., Mertens, C., Erhardt, G., 2001. Effect and repeatability of *Ascaridia galli* egg output in cockerels following a single low dose infection. *Vet. Parasitol.* 96(4), 301-307.
- Graybill, H.W., 1924. *Capillaria columbae* (Rud.) from the chicken and turkey. *J. Parasitol.* 10(4), 205-208.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 270, 313-21.
- Herd, R.P., McNaugh, D.J., 1975. Arrested development and the histotropic phase of *Ascaridia galli* in the chicken. *Int. J. Parasitol.* 5(4), 401-406.

- Honisch, M., 2008. Phylogenie von Nematoden einheimischer Greifvögel Inaug-Diss, Berlin.
- Ikeme, M.M., 1971. Effects of different levels of nutrition and continuing dosing of poultry with *Ascaridia galli* eggs on the subsequent development of parasite populations. Parasitol. 63(2), 233-250.
- Kemp, R.L., Franson, J.C., 1975. Transmission of *Histomonas meleagridis* to domestic fowl by means of earthworms recovered from pheasant yard soil. Avian Dis. 19(4), 741-744.
- Kerboeuf, D., Jolivet, G., 1984. *Heligmosomoides polygyrus*: Time of anthelmintic treatment and infection parameters in mice exposed to increasing doses of larvae. Exp. Parasitol. 57, 307-315.
- Kharab, P., Singh, I., 1985. Genotoxic effects of potassium dichromate, sodium arsenite, cobalt chloride and lead nitrate in diploid yeast. Mutat. Res. 155(3), 117-120.
- Kopper, J.J., Mansfield, L.S., 2010. Development of improved methods for delivery of *Trichuris muris* to the laboratory mouse. Parasitol. Res. 107, 1103–1113.
- Labra, M., Bernasconi, M., Grassi, F., De Mattia, F., Sgorbati, S., Airoidi, R., Citterio, S., 2007. Toxic and genotoxic effects of potassium dichromate in *Pseudokirchneriella subcapitata* detected by microscopy and AFLP marker analysis. Aquat. Bot. 86, 229-235.
- Luttermoser, G.W., 1938. Factors influencing the development and viability of the eggs of *Capillaria hepatica*. Am. J. Epidemiol. 27(2), 275-289.
- Madsen, H., 1945. The species of *Capillaria* parasitic in the digestive tract of Danish gallinaceous and anatine game birds. Danish Rev. Game Biology 1, 1-112.
- Madsen, H., 1951. Notes on the species of *Capillaria* Zeder, 1800 known from gallinaceous birds. J. Parasitol. 37(3), 257-265.
- MAFF, 1986. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Manual of veterinary parasitological laboratory techniques. HMSO, London, Reference book 418.
- Nelson, L.A., Wallmann, J.F., Downton, M., 2007. Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies. Med. Vet. Entomol. 21, 44-52.
- Norton, C.C., Joyner, L.P., 1965. Experimental chemotherapy of infection with *Capillaria obsignata*. J. Comp. Pathol. 75, 137-145.
- Norton, R.A., Ruff, M.D., 2003. Internal Parasites, Nematodes and Acanthocephalans. In Barnes, H.J., Glissen, J.R., Fadly, A.M., McDougald, L.R., Swayne, D.E., Saif, Y.M., Dis. Poult. Iowa State Univ. Press, 931-961.



- Paterson, S., Viney, M.E., 2002. Host immune responses are necessary for density dependence in nematode infections. *Parasitol.* 125, 283-292.
- Pauly, A., Schuster, R., Steuber, S., 2003. Molecular characterization and differentiation of opisthorchiid trematodes of the species *Opisthorchis felineus* (Rivolta, 1884) and *Metorchis bilis* (Braun, 1790) using polymerase chain reaction. *Parasitol. Res.* 90(5), 409-414.
- Permin, A., Pearman, M., Nansen, P., Bisgaard, M., Frandsen, F., 1997a. An investigation on different media for embryonation of *Ascaridia galli* eggs. *Helminthol.* 34(2), 75-79.
- Permin, A., Bojesen, M., Nansen, P., Bisgaard, M., Frandsen, F., Pearman, M., 1997b. *Ascaridia galli* populations in chickens following single infections with different dose levels. *Parasitol. Res.* 83(6), 614-617.
- Permin, A., Bisgaard, M., Frandsen, F., Pearman, M., Kold, J., Nansen, P., 1999. Prevalence of gastrointestinal helminths in different poultry production systems. *Br. Poult. Sci.* 40(4), 439-443.
- Püllen, U., Cheat, S., Moors, E., Gaulty, M., 2008. The role of preparation technique, culture media and incubation time of *Heterakis gallinarum* eggs. *DTW*, 115(1), 30-33.
- Sadun, E.H., 1948. Resistance induced in chickens by infections with the nematode *Ascaridia galli*. *Am. J. Epidemiol.* 47(3), 282-289.
- Sadun, E.H., 1949. The antibody basis of immunity in chickens to the nematode, *Ascaridia galli*. *Am. J. Epidemiol.* 49(1), 101-116.
- Santos dos, A.B., Tolentino, M., Andrade, Z.A., 2001. Pathogenesis of hepatic septal fibrosis associated with *Capillaria hepatica* infection of rats. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 34(6).
- Saunders, L.M., Tompkins, D.M., Hudson, P.J., 2000. The role of oxygen availability in the embryonation of *Heterakis gallinarum* eggs. *Int. J. Parasitol.* 30(14), 1481-1485.
- Sim, K.A., Hoar, B., Kutz, S.J., Chilton, N.B., 2010. Amplification of the second transcribed spacer ribosomal DNA of individual trichostrongylid nematode larvae by nested polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22, 433-437.
- Tiersch, K.M., Daş, G., v. Samson-Himmelstjerna, G., Gaulty, M., 2013. The role of culture media on embryonation and subsequent infectivity of *Capillaria obsignata* eggs. *Parasitol. Res.* 112(1), 357-364.
- Todd, A.C., 1947. On *Capillaria bursata* Teixeira de Freitas and Lins de Almeida, 1934. *J. Tennessee Acad. Sci.* 22, 191-193.

- Tompkins, D.M., Hudson, P.J., 1999. Regulation of nematode fecundity in the ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus*): not just density dependence. *Parasitol.* 118(4), 417-423.
- Wakelin, D., 1965. Experimental studies on the biology of *C. obsignata*, Madson, 1945, a nematode parasite of the domestic fowl. *J. Helminth.* 39(4), 399-412.
- Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R., Hebert, P.D.N., 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.* 360, 1847-1857.
- Wehr, E.E., 1939. Studies on the development of the pigeon Capillarid, *Capillaria Columbae*. *Tech. Bull. U.S. Dep. Agric.* 679, 1-19.
- Will, K.W., Rubinoff, D., 2004. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. *Cladistics* 20, 47-55.
- Zhu, X., Spratt, D.M., Beveridge, I., Haycock, P., Gasser, R.B., 2000. Mitochondrial DNA polymorphism within and among species of *Capillaria* sensu lato from Australian marsupials and rodents. *Int. J. Parasitol.* 30, 933-938.

## **Zusammenfassung**

---

*Capillaria obsignata* gehört mit *Ascaridia galli* und *Heterakis gallinarum* zu den häufigsten Nematodenarten des Haushuhns. Am Department für Nutztierwissenschaften der Georg-August-Universität Göttingen wurden bereits Forschungsarbeiten zur genetisch bedingten Parasitenresistenz insbesondere gegenüber den Spezies *A. galli* und *H. gallinarum* durchgeführt. Um weitere Forschungsprojekte auch bei der Gattung *Capillaria* etablieren zu können, sollten die Handhabung und das Verhalten von *C. obsignata*-Eiern hinsichtlich der Embryonierung nach Inkubation in verschiedenen Medien sowie die anschließende künstliche Infektion untersucht werden.

Im ersten Versuch wurde die Entwicklungsphase der nicht embryonierten *C. obsignata*-Eier in vier Kulturmedien (0,5 % und 2 % Formalin, 0,1 % Kaliumdichromat und 0,1 N Schwefelsäure) in uteri miteinander verglichen. Die Ergebnisse zeigen, dass die meisten Eier (> 82 %) in den ersten zwei Dritteln des Uterus in intakten Weibchen das Potenzial zur Embryonierung haben, ohne dass dabei ein Einfluss des Inkubationsmediums zu beobachten war. Die anschließende Zerstörung der Weibchen mittels Potters Homogenisator zur Gewinnung einer Suspension führte jedoch zu einer signifikanten Reduktion embryonierter Eier (< 33 %).

Die nachfolgende Verwendung im Rahmen einer experimentellen Infektion wurde mit vier verschiedenen Infektionsdosen (250, 500, 1000, 2000 Eier) und den, sich im Uterus der Weibchen befindlichen und jeweils in den o.g. vier Medien inkubierten, vollständig embryonierten Eiern durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass 0,5-prozentiges Formalin und Schwefelsäure mit Etablierungsraten, der nach Inkubation in diesen Medien gewonnenen Eier von 54 % respektive 43 % erfolgreich als Inkubationsmedien für *C. obsignata*-Eier verwendet werden können. Die Inkubation in Kaliumdichromat hingegen scheint die Infektiosität der Eier negativ zu beeinflussen und ging mit einer Etablierungsrate von lediglich 6,5 % einher ( $P < 0,001$ ). Eine Leistungsdepression des Wirtstieres bei Infektionsdosen von 250 bis 2000 Eiern wurde nicht beobachtet.

Im Verlauf weiterer Untersuchungen sollten die vier häufigsten *Capillaria*-Arten des Geflügels (*C. obsignata*, *C. bursata*, *C. caudinflata* und *C. anatis*) zuerst morphologisch unterschieden werden. Anschließend erfolgte eine genetische Differenzierung basierend auf der Sequenzierung des Gens der ersten Untereinheit der Cytochrom C Oxidase (COI) der mitochondrialen DNA. Bei 41 *C. obsignata*-Individuen konnte ein COI-Fragment von 568 bp (*C.o.\_1*) erfolgreich sequenziert werden. Eine weitere Se-

quenz mit 433 bp wurde in sieben *C. bursata*, fünf *C. anatis* und zwei *C. caudinflata* gefunden (C. spp. \_abc\_3). Außerdem zeigten drei weitere *C. bursata*-Individuen eine eigene Sequenz mit 424 bp (C.b.\_2). Die Übereinstimmung der drei Sequenzen lag im Bereich von 81.4 bis 84.5 %. Das Ergebnis der Sequenz C. spp. \_abc\_3 ist als fraglich zu betrachten, da sich die drei Arten morphologisch generell zuverlässig von-einander unterscheiden lassen. Es muß in Betracht gezogen werden, dass die erhaltenen Sequenzdaten auf Amplifikation von bereits zuvor vervielfältigter DNA, d.h. in Folge von DNA-Kontamination, zurückzuführen sind. Weitere Untersuchungen, z.B. durch Sequenzierung weiterer Gene, sind erforderlich um dieser Frage nachzugehen.

## Summary

---

### Studies on the cultivation, genetic differentiation and pathogenesis of *Capillaria* spp. in chicken

*Capillaria obsignata* is, together with *Ascaridia galli* and *Heterakis gallinarum*, one of the most common nematode species in chicken. The Department of Animal Sciences, Georg-August-University Göttingen, researches on the genetic resistance against parasites in chicken. Especially studies concerning resistance in chicken against the species *A. galli* and *H. gallinarum* have been published before. In order to establish further research projects on *Capillaria*, the handling and behavior of *C. obsignata* during incubation and embryonation and the subsequent artificial infection has to be investigated.

In the first experiment the in uteri development of non-embryonated *C. obsignata* eggs in four different incubation media (0.5 % and 2 % formalin, 0.1 % potassium and 0.1 N sulfuric acid) were compared. The results showed that most of the eggs (> 82 %) in the first two-thirds of uteri in the intact females have the potential for embryonation without being influenced by the incubation media. However, the subsequent disruption of the females by Potters homogenizer to obtain a suspension of the eggs, led to a significant loss of embryonated eggs (< 33 %).

For the second experiment an infection of chickens with four different infection dosages (250, 500, 1000 and 2000 eggs) was performed. Prior to use for experimental infection the eggs were incubated in the uteri of the female worms to complete embryonation in the four different media. It emerged that 0.5 % formalin and sulfuric acid which produce eggs with establishment rates of 54 % and 43 %, respectively, can be successfully used as incubation media for *C. obsignata* eggs, whereas potassium dichromate which produces eggs resulting in an establishment rate of 6.5 %, impairs subsequent infectivity of the eggs ( $P < 0.001$ ). The effects of media on the infectivity of the eggs were confirmed to be fairly repeatable. Noteworthy, no harmful effect of infection was encountered concerning the host animal performance with the infection doses from 250 up to 2000 eggs.

In the third experiment the four most prevalent *Capillaria* species in poultry (*Capillaria obsignata*, *Capillaria bursata*, *Capillaria caudinflata* and *Capillaria anatis*) were distinguished morphologically. This was followed by a genetic differentiation with the sequencing of the cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene of the mitochondrial DNA. A COI fragment of 568 bp (C.o.\_1) was successfully sequenced for 41 *C. obsignata* individuals. Another sequence with 433 bp was found in seven *C. bursata*,

five *C. anatis*, and two *C. caudinflata* (C.spp.\_abc\_3). Furthermore three *C. bursata* showed a distinct sequence with 424 bp (C.b.\_2). Identities among the three different sequences ranged from 81.4 to 84.5 %. The results of the sequence C.spp.\_abc\_3 are to be regarded as questionable, since the species can in general be reliably distinguished morphologically. It thus has to be considered, that the obtained sequences stems from the amplification of pre-amplified DNA i.e. as a consequence of contamination. Further investigations e.g. by sequencing additional genes are needed to clarify this issue.

**Publikationsverzeichnis**

---

Poster session: *The role of culture media on infectivity of Capillaria obsignata eggs*; Tiersch, K.M., Das, G., Von Samson-Himmelstjerna, G. and Gauly, M., EAAP, Session 39. Management and health business meeting and free communications, 29. August 2012.

Published: *Artificial infection of chickens with Capillaria obsignata eggs embryonated in different media* (Tiersch, K.M., Daş, G., v. Samson-Himmelstjerna, G., Gauly, M.) 12/2013; Veterinary Parasitology (Impact Factor: 2.38) 200(1-2):139-146. DOI:10.1016/j.vetpar.2013.11.024.

Published: *The role of culture media on embryonation and subsequent infectivity of Capillaria obsignata eggs*. (Tiersch, K.M., Daş, G., v. Samson-Himmelstjerna, G., Gauly, M.) 2013; Parasitology Research (Impact Factor: 2.85) 2013, 112(1), 357-364. 10/2012; DOI:10.1007/s00436-012-3143-z.

## **Danksagung**

---

Eine Doktorarbeit ist im Nachhinein doch etwas aufwendiger, als ich mir das zu Beginn vor 5 Jahren vorgestellt habe. Definitiv weiß ich nach dieser langen Zeit, dass eine Doktorarbeit immer eine Gemeinschaftsarbeit ist und dass man es nur in einem tollen Team, mit guter Betreuung und mit wahren Freunden schafft, so ein Werk durchzuziehen und zum Abschluss zu bringen! Ich habe wunderbare Menschen kennenlernen dürfen, die mich über diese Jahre unterstützt haben. Ihnen gelten deshalb meine größte Anerkennung und mein größter Dank! Ich bedanke mich aufrichtig bei:

**Prof. Dr. Georg v. Samson-Himmelstjerna**, für die Betreuung meiner Doktorarbeit, Ihre Geduld und Ihre schnellen Korrekturen!

**Prof. Dr. Dr. Matthias Gauly**, für Ihre zuverlässige Art, immer erreichbar zu sein und Ihre noch schnelleren Korrekturen! ☺ Es hat mir sehr viel Spaß gemacht, bei Ihnen zu promovieren!

**Prof. Dr. Christoph Knorr**, für die Ermöglichung und Deine freundliche Unterstützung beim genetischen Teil meiner Arbeit!

**Birgit Sohnrey**, für die schönen Stunden im Labor und Deine unermüdliche Mithilfe, die ca. 50.000 *Capillaria*-Würmchen zu zählen!

**Erwin Tönges**, für Deine Hilfe bei den Hühnerversuchen, für Dein immer offenes Ohr und Deine Freundschaft!

**Dr. Gürbüz Daş**, für Deine Hilfe im Labor und für Deine perfektionistische Art meine Statistik und meine Paper so zu korrigieren, dass sie direkt angenommen wurden! Ohne Dich hätte ich das nicht geschafft!

**Sabrina Pach**, für Deine geduldige Unterstützung und die Beantwortung meiner 10.000 Fragen und für Deine Freundschaft!

**Dr. Claudia Floren**, für Deine Hilfe, Erklärungen und Dein Können ☺

**Dr. Falko Kaufmann**, für Deine tägliche, sehr unterhaltsame Art im Labor, Deine Tipps und Deine Mithilfe!

**Dr. Eva Moors**, für Deine Betreuung meiner Arbeit in der ersten Zeit!

**Burchhard Möllers**, für Deine jederzeit einschreitende Hilfe bei jeglichen Computerproblemen, inklusive stark „vervirter“ Laptops!

**Dr. Christian Lambertz**, für Deine Hilfe im Labor und die lustige Zeit als Bürogenosse.

**Dr. Christine Friedrich**, für die vielen lustigen Kaffeepausen!

**Stefanie Ammer**, für Deine Freundschaft ☺



## Danksagung

Meinem Mann, für Deine Unterstützung und die tollen Jahre, die wir gemeinsam mit den Doktorarbeiten hatten!

Meiner Mutter, für die unzähligen Stunden Babysitten, damit ich endlich fertig werde!

Meinem Vater, für den größten Motivationsschub dieser Arbeit. Traditionen muss man fortführen!

Meinem Bruder, für das unzählige Korrekturlesen.

Meiner Schwiegermutter, für die Unterstützung jeglicher Art.

Des Weiteren bedanke ich mich noch bei allen nicht genannten Mitarbeitern aller drei Institute, die sich meiner Arbeit angenommen und die mich alle unterstützt und freundlich aufgenommen haben!

Vielen Dank!

**Selbständigkeitserklärung**

---

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 20. Juni 2015

Katharina Maria Tiersch