

Aus dem Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in
der Veterinärmedizin der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Universitätsklinik für Geflügel und Fische
(Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Michael Hess)

**Nachweis und Quantifizierung von *Histomonas meleagridis* in
Kotproben von unterschiedlichen Hühnergenotypen nach
experimenteller Infektion mit *Heterakis gallinarum* und *Ascaridia
galli***

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Lukas Wachter

Wien, im Juni 2020

Betreuer und Begutachter:

Betreuer: Ass.-Prof. Dr. med. vet. Dieter Liebhart, Dipl. ECPVS

Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der
Veterinärmedizin

Universitätsklinik für Geflügel und Fische

Veterinärmedizinische Universität Wien

Begutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Herbert Weissenböck, Dipl. ECPHM

Department für Pathobiologie

Institut für Pathologie und gerichtliche Veterinärmedizin

Veterinärmedizinische Universität Wien

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	6
2.	LITERATURÜBERSICHT	8
2.1.	NEMATODEN DES GEFLÜGELS	8
2.1.1.	<i>Ascaridia galli</i>	8
2.1.1.1.	Morphologie	9
2.1.1.2.	Pathogenität und Klinik	9
2.1.2.	<i>Heterakis gallinarum</i>	9
2.1.2.1.	Taxonomische Einordnung	10
2.1.2.2.	Morphologie	10
2.1.2.3.	Entwicklung und Epidemiologie	10
2.1.2.4.	Pathogenese und Pathologie	11
2.1.3.	<i>Ascaridia galli</i> und <i>Heterakis gallinarum</i>	11
2.1.3.1.	Diagnose	11
2.1.3.2.	Therapie bei Nematodenbefall	11
2.2.	PROTOZOEN	12
2.2.1.	<i>Histomonas meleagridis</i>	13
2.2.1.1.	Taxonomische Einordnung	13
2.2.1.2.	Morphologie	13
2.2.1.3.	Infektion und Vorkommen im Wirt	14
2.2.1.4.	Epidemiologie	14
2.2.1.5.	Pathogenese und Pathologie, Klinik	14
2.2.1.6.	Diagnose, Therapie und Bekämpfung	15
2.3.	<i>H. MELEAGRIDIS</i> IM ZUSAMMENSPIEL MIT <i>H. GALLINARUM</i> BEI HÜHNERN	16
3.	MATERIAL UND METHODEN	17
3.1.	PROBENUMFANG	17
3.2.	HERSTELLEN DER VERDÜNNUNGSREIHE	18
3.3.	VORBEREITEN DER KOTPROBEN	18

3.4.	DNA-EXTRAKTION	18
3.4.1.	Standardreihe	18
3.4.2.	Kot.....	19
3.5.	QUANTIFIZIERUNG VON HISTOMONADEN IM KOT MITTELS qPCR	20
3.6.	STATISTISCHE METHODEN	21
4.	ERGEBNISSE.....	22
4.1.	ERMITTLUNG DER STANDARDKURVE	22
4.2.	QUANTIFIZIERUNG VON <i>H. MELEAGRIDIS</i> IN KOTPROBEN	24
4.2.1.	Lohmann Brown Plus (LB)	24
4.2.2.	Lohmann Dual (Dual)	25
4.2.3.	Ross 308 (Ross).....	26
4.2.4.	Ausscheidung von <i>H. meleagridis</i> zwischen Genotypen im Vergleich	27
4.2.5.	Statistische Auswertung.....	28
5.	DISKUSSION	29
5.1.	CONCLUSIO	32
6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	33
7.	SUMMARY	34
8.	LITERATURVERZEICHNIS	35
9.	TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS	40
10.	ANHANG: DATENSÄTZE DER STUDIE	41
10.1.	LOHMANN BROWN PLUS.....	41
10.2.	LOHMANN DUAL.....	43
10.3.	ROSS 308.....	45

Danksagung

Als Erstes möchte ich mich bei Herrn Ass. Prof. Dr. med. vet. Dieter Liebhart bedanken. Er war jederzeit für mich erreichbar und hat mich in allen Belangen unterstützt.

Herrn Dr. Gürbüz Daş danke ich für das zur Verfügung stellen der Proben, welche diese Forschungsarbeit erst ermöglicht haben.

Weiterer Dank gilt Frau Mag.^a rer.nat. Barbara Jaskulska, welche mich bei meinen Tätigkeiten im Labor tatkräftig unterstützt hat.

Für die Hilfestellung bei der digitalen Auswertung der Ergebnisse danke ich Frau Dr.rer.nat. Ivana Bilic.

Auch allen anderen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Geflügelklinik, welche mir in irgendeiner Form behilflich waren, möchte ich auf diesem Weg meinen Dank aussprechen.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern, meiner Schwester und meiner Freundin danken, welche mich bei all meinen Entscheidungen immer unterstützt haben. Dafür werde ich ewig dankbar sein.

1. Einleitung und Fragestellung

Histomonas meleagridis ist ein Flagellat aus der Familie *Dientamoebidae* und dem Reich *Protozoa* (NCBI:txid135588). Infektionen von Geflügel mit dem Erreger wurden bereits auf allen Kontinenten nachgewiesen (McDougald 2005). Die von *H. meleagridis* ausgelöste Krankheit ist unter verschiedenen Synonymen wie Histomonose, Schwarzkopfkrankheit oder Typhlohepatitis bekannt. Erwähnt wurde die Krankheit erstmals im Jahr 1895 bei Puten (Smith 1895). Später konnte auch die Infektion von Hühnern gezeigt werden (Chester und Robin 1900).

Die weltweite Verbreitung von *H. meleagridis* wird dadurch begünstigt, dass der Parasit den Nematoden *Heterakis gallinarum* als Vektor benützt (McDougald 2005).

H. meleagridis gewinnt in der heutigen Zeit immer mehr an Bedeutung. Grund hierfür ist die Tatsache, dass sämtliche Therapeutika und Prophylaktika per Gesetz verboten wurden, da eine bedenkenlose Verwendung dieser Medikamente und Futtermittelzusätze nicht gewährleistet werden kann. In der Europäischen Union ist die Vorschrift zur Verwendung von Präparaten wie Nitroimidazolen und Nifursol in den Verordnungen EWG/1798/1995, EWG/2205/2001 sowie EWG/1756/2002 geregelt. Folglich besteht ein Therapienotstand, der ein Problem für den Tierschutz darstellt und auch massive wirtschaftliche Ausfälle mit sich bringen kann. Ein Fokus der Bekämpfung von Histomonose bei Puten liegt aktuell auf der Vermeidung der Infektion mit dem Zwischenwirt *H. gallinarum*. Bei Hühnern ist Histomonose in den meisten Fällen mild verlaufend, pathologische Veränderungen im Blinddarm, in der Leber sowie Legeleistungsdepression sind jedoch bekannt (Liebhart *et al.* 2017).

Vor einigen Jahren wurde eine Studie zur Seroprävalenz von Grafl *et al.* (2011) durchgeführt. In diesem Projekt wurden sowohl Legehennen als auch Masthühner einbezogen und das Ergebnis zeigte einen signifikanten Unterschied der beiden Gruppen. So waren im Vergleich deutlich weniger Masthühner serologisch positiv als Legehühner. Von 1120 Serumproben aus 56 verschiedenen Legehennen-Herden wurden 418 (37,3%) positiv auf Antikörper gegen *H. meleagridis* getestet. Bei den Masthühnern wurden 400 Serumproben aus 20 verschiedenen Herden betrachtet, bei denen 33 (8,3%) positiv waren. Diese Unterschiede können einerseits dem unterschiedlichen Genom der Hühner und andererseits der unterschiedlichen Haltung beziehungsweise Haltungsdauer geschuldet sein. Während es sich jedoch bei der Untersuchung von Grafl *et al.* (2011) um eine Feldstudie handelt, beschäftigt sich die

vorliegende Diplomarbeit mit Proben von Hühnern unterschiedlichen Genotyps, die unter experimentellen Bedingungen mittels eines identischen Haltungssystems generiert wurden.

Bis dato gibt es keine Studien zu Ausscheidungsraten mit Erregerquantifizierung bei Hühnern beziehungsweise unterschiedlichen Hühnertypen, und somit auch keine Daten über Variationen der Ausscheidungszahl von Histomonaden nach der Infektion.

Ziel dieser Arbeit war es daher, DNA von *H. meleagridis* im Kot von Hühnern unterschiedlicher Hühnertypen beziehungsweise Nutzungsarten, die mit Eiern von mit Histomonaden kontaminierten *H. gallinarum* experimentell infiziert wurden, nachzuweisen. In diesem Versuchsdesign wurden die Hühner darüber hinaus auch mit *Ascaridia galli* infiziert, um Fragestellungen zur Co-Infektion beider Nematoden zu beantworten. Da es sich hierbei jedoch um ein anderes Thema handelt, wird auf diese Fragestellung in der Diplomarbeit nicht eingegangen. Vielmehr geht es in dieser Arbeit um die Menge der ausgeschiedenen Histomonaden-DNA, damit Rückschlüsse auf die Zahl der im Kot befindlichen Protozoen und Unterschiede in der Erregerausscheidung zwischen den Hühnertypen gezogen werden können. Weiters sollen die Ergebnisse einen Überblick über den Infektionsstatus der Hühner über mehrere Wochen nach der Infektion geben und erstmals die Ausscheidungsdynamik in Zahlen nach einer Infektion über den Zwischenwirt dargestellt werden.

2. Literaturübersicht

Die Infektion mit dem Nematoden *H. gallinarum* kann sowohl direkt als auch indirekt erfolgen. Als Zwischenwirt für die indirekte Übertragung ist dabei vor allem der Nematode *H. gallinarum* zu nennen. Es konnte gezeigt werden, dass bereits die Wurmeier des Nematoden mit *H. meleagridis* infiziert sind (Lee 1969, 1971). Auch Regenwürmer können als Stapelwirte für *H. gallinarum* fungieren (Lund und Chute 1973). Somit besteht für kontaminierte Ausläufe eine jahrelange Infektionsgefahr (Schnieder 2006). In den folgenden Unterkapiteln werden wichtige Studien und für die Diplomarbeit relevante Literatur zu beiden Parasiten zusammengefasst. Aufgrund der Co-Infektion mit *A. galli* wird in dem folgenden Literaturüberblick auch auf diesen Nematoden eingegangen, obgleich er kein Überträger von *H. meleagridis* ist (Eckert *et al.* 2008).

2.1. Nematoden des Geflügels

Nematoden oder Rundwürmer sind sehr verbreitete und wichtige Parasiten beim Geflügel. Über 50 geflügelrelevante Spezies wurden beschrieben (Belete *et al.* 2016). Generell sind Nematoden lange spindelartige Würmer. Ihre Farbe variiert von gebrochenem weiß bis zu cremigen gelb (Leeson und Summer 2009). Generell sind bei diesen Würmern die Geschlechter getrennt und ihr Vorkommen kann sich über den gesamten Intestinaltrakt der Wirtstiere, vom Kropf bis zur Kloake, erstrecken (Belete *et al.* 2016). Die folgenden Unterkapitel sollen im Speziellen Informationen zu *A. galli* und *H. gallinarum* geben und die jeweiligen morphologischen und pathologische Unterschiede aufzeigen.

2.1.1. *Ascaridia galli*

A. galli ist der häufigste Vertreter der Nematoden, welche in Hühnern vorkommen. Er ist im Dünndarm angesiedelt und parasitiert in Hühnern, Puten, Tauben, Gänsen sowie Enten (McDougald *et al.* 2013).

2.1.1.1. Morphologie

Der Körper des Wurms ist zylindrisch, cremeweiß sowie halbtransparent. Das Vorderende ist gekennzeichnet durch eine prominente Mundöffnung, welche von drei großen Lippen umrandet wird. Zusätzlich sind auf den Lippen zahnähnliche Dentikel ausgebildet (Ashour *et al.* 1994). Weiters wird beschrieben, dass eine quer gestreifte Kutikula über die gesamte Länge des Körpers verläuft. Der Geschlechtsdimorphismus ist deutlich ausgeprägt. So können weibliche Würmer eine Länge bis 11,5 Zentimeter erreichen (McDougald *et al.* 2013). Ebenso charakteristisch ist das stumpfe und gerade Ende des Körpers. Die Vulvaöffnung befindet sich im mittlern Bereich. Männliche Askariden sind deutlich kürzer (5 bis 7,6 Zentimeter) und haben ein spitzeres und gebogeneres caudales Ende (Ramadan und Znada 1992). Darüber hinaus werden zehn Paare von Papillen beschrieben, die sich linear am Schwanz befinden. Auf die Unterscheidung von *A. galli* und *H. gallinarum* wird im Punkt 2.2.5. eingegangen.

2.1.1.2. Pathogenität und Klinik

Eine Infektion mit *A. galli* kann jede Altersklasse von Geflügel betreffen. Ein schwerer Befall führt zu Gewichtsabnahme und verringerter Eiproduktion, sowie fallweise zu Obstipation. Die Würmer können bei einem massiven Befall weiblicher Wirtstiere bis zu deren Eileitern aufsteigen und können dann in Hühnereiern zu finden sein (Jacobs *et al.* 2003).

2.1.2. *Heterakis gallinarum*

H. gallinarum ist ein kleiner weißer Rundwurm, der im Zäkum von Geflügel zu finden ist. Neben Hühnern zählen auch Puten, Enten, Gänse, Auerhühner, Rebhühner, Fasane und Wachteln zu seinen Wirten (McDougald *et al.* 2013). Auf die weiteren morphologischen Unterschiede zu anderen Nematoden, insbesondere zu *A. galli*, wird in den folgenden Kapiteln gesondert eingegangen.

2.1.2.1. Taxonomische Einordnung

Die aktuelle taxonomische Einordnung wurde über die Plattform von National Center for Biotechnology Information recherchiert und in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Taxonomische Einordnung von *H. gallinarum* (NCBI:txid65465)

Stamm	<i>Nematoda</i>
Klasse	<i>Secernentea</i>
Ordnung	<i>Ascaridida</i>
Überfamilie	<i>Heterakoidea</i>
Familie	<i>Heterakidae</i>
Gattung	<i>Heterakis</i>
Art	<i>Heterakis gallinarum</i>

2.1.2.2. Morphologie

In der Gattung *Heterakis* gibt es einige wichtige morphologische Merkmale: So haben sie drei Lippen um die Mundöffnung, kutikuläre Verbreiterungen am Vorderende, einen Ösophagus mit birnenförmigem Endbulbus und Klappenapparat, als auch deutliche Besonderheiten am Hinterende von männlichen und weiblichen Würmern (Schnieder 2006). Die Größe liegt beim männlichen *H. gallinarum* bei 4 bis 13 Millimeter und bei weiblichen bei 8 bis 15 Millimeter (Cupo und Beckstead 2019). Die Dimension der Eier wird mit 63-79x41-48µm angegeben (Permin und Hansen 1998). Die Eier mit einer dunklen Zygote sind dickschalig und die Eioberfläche ist glatt.

2.1.2.3. Entwicklung und Epidemiologie

Die adulten Stadien leben in den Zäka, seltener im hinteren Dünndarm sowie im Dickdarm. Ein weiblicher Wurm legt pro Tag etwa 900 Eier, welche ungefurcht mit dem Kot ausgeschieden werden. Die weitere Entwicklung der Eier erfolgt in der Umwelt. Dort entwickelt

sich im Ei eine infektiöse Larve. Der Vorgang vom ungefurchten Ei bis zur infektiösen Larve ist dabei temperaturabhängig (Schnieder 2006).

Die larvenhaltigen Eier können in der Umwelt mehrere Monate und auch kalte Perioden überdauern. Wenn die Eier von paratenischen Wirten wie Regenwürmern aufgenommen werden, verlängert sich die Zeit der Überlebensdauer der infektiösen Larven deutlich (Cupo und Beckstead 2019).

Nach oraler Aufnahme von Wirtstieren schlüpfen die Larven im Dünndarm aus den Eiern und wandern innerhalb von 2 Tagen in die Zäka (Schnieder 2006).

2.1.2.4. Pathogenese und Pathologie

Ein schwacher Befall, zum Beispiel bei Erstinfektion, verursacht meist unbedeutende Schäden (Schnieder 2006). So beschreibt das Lehrbuch des letztgenannten Autors, dass geringgradige Hämorrhagien, Desquamationen der Epithelzellen und eine geringgradige Verdickung der Mukosa histologisch festgestellt werden können. Bei schwerem Befall kann es bei Hühnern zu Typhlitis, Inappetenz und Diarrhö kommen (Riddell und Gajadhar 1988).

2.1.3. *Ascaridia galli* und *Heterakis gallinarum*

2.1.3.1. Diagnose

Der Nachweis erfolgt mittels Flotationsverfahren, um die Eier im Kot zu belegen, oder bei der Sektion, um die Nematoden direkt im Darm festzustellen. Eine Differenzierung von *Heterakis*-Eiern und *Ascaridia*-Eiern ist schwierig, da sie Ähnlichkeit aufweisen (Reid *et al.* 1973). Die Unterscheidung der adulten Stadien ist verhältnismäßig einfach, da die männlichen *A. galli* bis zu 7,5 Zentimeter und die weiblichen bis zu 12 Zentimeter lang sind (Eckert *et al.* 2008). Auch die bei einer Sektion erhobene Lokalisation der adulten Würmer gibt Aufschluss über deren Gattung, da *H. gallinarum* in den Zäka parasitiert, wohingegen *A. galli* im Dünndarm zu finden ist. Die Eier haben eine Größe von 73-92x45-57 µm (Urquart *et al.* 1996).

2.1.3.2. Therapie bei Nematodenbefall

Zur Therapie beim Geflügel werden Anthelmintika eingesetzt, die oral über Futter oder Wasser verabreicht werden (Eckert *et al.* 2008). Für Geflügel sind in Österreich die Wirkstoffe

Flubendazol und Fenbendazol zugelassen (Österreichisches Arzneimittelspezialitätenregister, 2020). Beide gehören in die chemische Gruppe der Benzimidazole. Diese Wirkstoffgruppe greift in die Glukoseaufnahme sowie in den intrazellulären Glukosetransport der Würmer ein, damit diese absterben (Löscher *et al.* 2002). Im Detail beruht die Wirkung auf der Hemmung des Aufbaus der Microtubuli in den Darmzellen, wodurch die Absorption von Glukose gestört wird und der Parasit nicht überleben kann.

2.2. Protozoen

Die Gruppe der Darmprotozoen stellen weiter Geflügelparasiten dar, von denen relevante Vertreter in Tabelle 2 aufgelistet sind.

Tabelle 2: Wichtigen Protozoen bei Hühnern und deren Lokalisation im Wirtstier

Parasiten	Lokalisation im Wirtsorganismus	Spezies	Referenzen
Kokzidien	Dünndarm	<i>Eimeria acervulina</i>	Tyzzler 1929
	Unterer Dünndarm bis Kloake	<i>Eimeria brunetti</i>	Levine 1942
	Oberer Dünndarm	<i>Eimeria hagani</i>	Levine 1938
	Mittlerer Dünndarm	<i>Eimeria maxima</i>	Tyzzler 1929
	Unterer Dünndarm	<i>Eimeria mitis</i>	Tyzzler 1929
	Zwölffingerdarm bis Kloake	<i>Eimeria mivati</i>	Edgar und Siebold 1964
	Dünndarm	<i>Eimeria necatrix</i>	Johnson 1930
	Zwölffingerdarm	<i>Eimeria praecox</i>	Johnson 1930
	Zäka	<i>Eimeria tenella</i>	Railliet und Lucet 1891
Cryptosporidien	Epithel des Respirations- und Gastrointestinaltrakt	<i>C. baileyi</i> , <i>C. meleagridis</i>	O'Donoghue 1995
Histomonaden	Zäkum Leber und andere innere Organe	<i>H. meleagridis</i>	McDougald 2005
Trichomonaden	Schnabelhöhle, Ösophagus, Kropf	<i>Trichomonas gallinae</i>	Levine 1973
	Unterer Verdauungstrakt	<i>Tetratrichomonas gallinarum</i>	Amin <i>et al.</i> 2012
Hexamiten	Oberer Gastrointestinaltrakt	<i>Spironucleus meleagridis</i>	McNeil <i>et al.</i> 1941

2.2.1. *Histomonas meleagridis*

H. meleagridis ist ein Flagellat der im Blinddarm von Geflügel parasitiert und auch in inneren Organen wie der Leber zu Nekrosen und Entzündungen führen kann. Details über diesen Protozoen sind in den folgenden Unterkapiteln dargestellt.

2.2.1.1. Taxonomische Einordnung

Die aktuelle taxonomische Einordnung basiert auf Ergebnissen der Plattform National Center for Biotechnology Information und wird in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Taxonomische Einordnung von *H. meleagridis* (NCBI:txid135588)

Reich	<i>Protozoa</i>
Stamm	<i>Parabasala</i>
Ordnung	<i>Trichomonadida</i>
Familie	<i>Dientamoebidae</i>
Gattung	<i>Histomonas</i>
Art	<i>Histomonas meleagridis</i>

2.2.1.2. Morphologie

H. meleagridis tritt in zwei Formen auf: eine begeißelte und eine unbegeißelte Erscheinungsform. Sie sind beide rundlich und zwischen 8 und 17 µm groß. Die sich im Darmlumen oder in Kulturen befindlichen Stadien sind begeißelt (Abbildung 1), während die Histomonaden im Gewebe unbegeißelt sind (Hess und McDougald 2013).

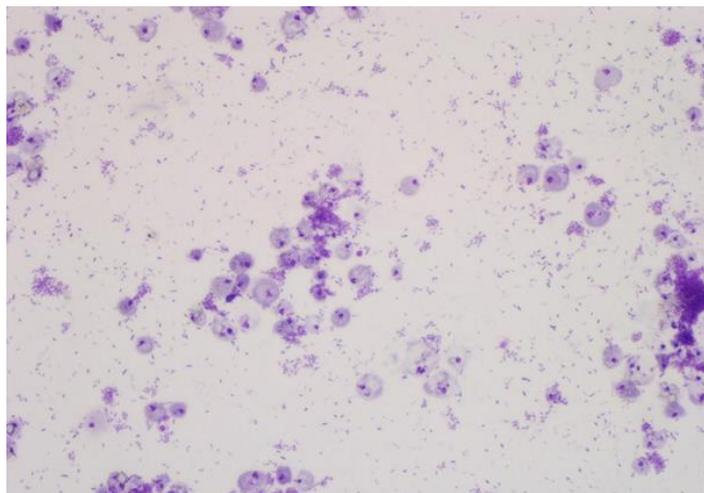


Abbildung 1: Histomonaden aus einer Kultur im Ausstrich (Giemsafärbung, Balken = 50 µm)

2.2.1.3. Infektion und Vorkommen im Wirt

Nach der direkten Infektion oder der Aufnahme via dem Zwischenwirt *H. gallinarum* besiedeln Histomonaden vor allem den Blinddarm des Wirtstieres. Von dort aus können sie in die inneren Organe vordringen (Schnieder 2006). Die direkte Infektion kann oral als auch kloakal erfolgen. Es wird vermutet, dass die kloakale Infektion durch die reverse Peristaltik des Enddarms geschieht, wenn der Wirt über die Kloake mit kontaminiertem Kot in Kontakt kommt (McDougald 2005).

2.2.1.4. Epidemiologie

Der Erreger existiert weltweit. Neben Hühnervögeln wie Puten, Haushuhn, Pfau, Perlhuhn, Fasan, Wachtel, Birkhuhn sind auch andere Vögel wie Strauß, Nandu, Trappe, Marabu empfänglich (Eckert *et al.* 2008). Latent infizierte Hühner sowie von der Krankheit genesene Puten sind als Erregerreservoir von Bedeutung. Auch verseuchte Ausläufe, die noch jahrelang ansteckungsfähig bleiben, spielen eine große Rolle (Schnieder 2006).

2.2.1.5. Pathogenese und Pathologie, Klinik

Vom Darmlumen aus dringen die Histomonaden in die Darmwand ein, wo sie sich extrazellulär vermehren und Ulcera in der Schleimhaut verursachen. Durch hämatogene Streuung dringt der Erreger von der Darmwand in die Leber vor, wo er multiple Läsionen verursachen kann. Läsionen in der Leber sind rundlich mit einem Durchmesser von 3 bis 10 Millimeter und oftmals im Gewebe eingezogen. Die weiß-gelblichen Nekrosenherde mit rötlichem Rand können tief in das Lebergewebe reichen und konfluieren. Konsekutiv können Erreger auch in Nieren, Lunge, Milz, Gehirn und andere Organe gelangen (Grabensteiner und Hess 2006). Begünstigt wird der Befall auch durch eine im Zäkum vorherrschende geeignete Bakterienflora (Eckert *et al.* 2008). Auch eine differenzierte Anfälligkeit der Zielspezies wird von den letztgenannten Autoren zusammengefasst. So sind Puten sehr empfänglich für die Erkrankung an Histomonose. Ebenso sind die klinischen Symptome deutlicher und äußern sich in Apathie, allgemeiner Schwäche und schwefelgelben Kot. Hühner hingegen sind geringer betroffen und der Befall kann auf die Zäka beschränkt bleiben (Curtice 1907).

2.2.1.6. Diagnose, Therapie und Bekämpfung

Zum Nachweis von *H. meleagridis* kann ein Schleimhautgeschabsel aus dem Zäkum von frisch getöteten Tieren für die Diagnose herangezogen werden. Auch ein Kulturversuch in Nährmedium ist möglich. Mittels histopathologischer Untersuchung können betroffene Organe untersucht werden, um den Erreger nachzuweisen. Histomonaden können mit Hämatoxylin und Eosin, Grocott oder PAS-Färbung in Organproben von infizierten Tieren unspezifisch gefärbt werden (Eckert *et al.* 2008). Zu den spezifischen histologischen Nachweisen zählen die *in situ* Hybridisierung sowie die Immunhistochemie (Liebhart *et al.* 2013).

Die Methodik der PCR wurde in den vergangenen Jahren verwendet, um zum Beispiel die Möglichkeit einer Identifizierung und Differenzierung von *H. meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* und *Blastocystis spp* zu untersuchen (Grabensteiner und Hess 2006). Im Review von Hess *et al.* (2015) sind weitere PCR Anwendungen in Bezug auf *H. meleagridis* dargestellt. Im Hinblick auf die Verwendung von Fäkalproben wurde die Methodik der PCR unter anderem von Huber *et al.* (2005), Hussain *et al.* (2015) sowie Landman *et al.* (2015) beschrieben.

In Bezug auf die Bekämpfung der Krankheit besteht im Moment ein Therapienotstand, da kein Präparat für die Behandlung oder Chemoprophylaxe zugelassen ist (Eckert *et al.* 2008). Seit dem Jahr 2003 gibt es von der Europäischen Union keine weitere Zulassung von Nifursol als Futterzusatzstoff für Geflügel. Diese sind in den Verordnungen EWG/1798/1995, EWG/2205/2001 sowie EWG/1756/2002 geregelt. Es besteht derzeit nur die Möglichkeit, Paromomycin, ein für Schweine zugelassenes Antibiotikum, für Geflügel umzuwidmen. Dieses darf aber nicht prophylaktisch eingesetzt werden.

Einen Überblick über die Entwicklung der Therapiemöglichkeiten aus der Vergangenheit bis zur Gegenwart gibt die Publikation von Liebhart *et al.* (2017). In diesem wissenschaftlichen Bericht wird auf jegliche Wirkstoffe, die bisher untersucht wurden und auch auf Möglichkeiten, wie gegen Histomonaden in Zukunft vorgegangen werden kann, Bezug genommen.

Zur Bekämpfung stehen aktuell nur Hygienemaßnahmen wie zum Beispiel richtiges Reinigen und Desinfizieren, bauliche Maßnahmen wie die Verwendung von gut reinigbaren Materialien bei Fußböden und dergleichen, und das getrennte Aufstallen von Hühnern und Puten zur Verfügung (Eckert *et al.* 2008).

2.3. *H. meleagridis* im Zusammenspiel mit *H. gallinarum* bei Hühnern

Schon im Jahr 1920 zeigten Graybill und Smith (1920) in ihrer Studie, dass eine Infektion mit *H. meleagridis* durch die Eier von *H. gallinarum* erfolgen kann. Eine weitere Studie bestätigte diese Ergebnisse (Tyzzer 1934).

Bei einer Co-Infektion der beiden Parasiten in den Zäka können *H. gallinarum* Histomonaden inkorporieren. *H. meleagridis* vermehrt sich dann vorerst im Darm der Nematoden. Danach werden die Histomonaden mit den Eiern von *H. gallinarum* ausgeschieden. Sobald die Larve des Wurms im empfänglichen Wirt schlüpft, werden auch Histomonaden freigesetzt (Eckert *et al.* 2008).

In einer früheren Studie untersuchte Lund (1967), wie sich die Infektion mit *H. meleagridis* und *H. gallinarum* bei vier unterschiedlichen Hühnerrassen sowie einer Putenspezies verhält. Es wurde ermittelt, wie viele adulten Würmer ausgeschieden wurden und, ob auch Histomonaden ausgeschieden wurden. Die Hühnerrassen waren White Leghorn, New Hampshire, Rhode Island Red sowie eine Kreuzung aus New Hampshire und Barred Plymouth Rock. Bei den Puten handelte es sich um Beltsville Small Whites. Das Ergebnis zeigte, dass die Rasse Rhode Island Reds die meisten Nematoden ausgeschieden hat, aber prozentual die wenigsten Tiere dieser Rasse Histomonaden ausgeschieden haben. Im Mittelfeld waren die Kreuzungshühner gefolgt von White Leghorn sowie New Hampshire. Bei diesen drei Gruppen nahmen die adulten Nematoden sukzessive ab und der Anteil an Histomonaden ausscheidenden Tieren nahm zu. An der Spitze der Ausscheider lagen die untersuchten Puten. Eine Quantifizierung von Histomonaden wurde jedoch in dieser Studie nicht durchgeführt.

3. Material und Methoden

3.1. Probenumfang

Die Kotproben, welche für diese Studie verwendet werden, stammen aus einem Infektionsversuch, durchgeführt im Leibnitz Institut für Nutztierbiologie (Dummersdorf, Deutschland). Im Zuge dieses Versuches wurden Hühner mit embryonierten Eiern von *H. gallinarum* und *A. galli* co-infiziert. Der Tierversuch wurde unter Einhaltung der geltenden Tierschutzgesetze durchgeführt und vom zuständigen Ethikkommittee für Tierexperimente genehmigt (Mecklenburg-Western Pomerania State Office for Agriculture, Food Safety and Fishery, Germany; permission no: AZ: 7221.3-1-066/15).

In der vorliegenden Studie wurden Kotproben von drei unterschiedlichen Hühnergenotypen gesammelt. Bei diesen Genotypen handelt es sich um ein Legehybrid (Lohmann Brown Plus), ein Masthybrid (Ross 308) sowie Zweinutzungshühner (Lohmann Dual). Insgesamt wurden 232 Einzelkotproben untersucht. Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich dabei von der zweiten bis zur neunten Woche nach der Infektion, wobei wöchentlich Proben genommen wurden. Infiziert wurden die Tiere am 7. Lebenstag mit 250 embryonierten Eiern von *H. gallinarum* und derselben Zahl von *A. galli*-Eiern. Die Proben umfassten sowohl infizierte Tiere als auch nicht infizierter Tiere, welche als Kontrolltiere dienten. Eine detaillierte Auflistung der gesamten Proben ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Anzahl der gesammelten Einzeltierkotproben pro Genotyp sowie Sammelzeitpunkt

	Woche nach der Infektion															
	2		3		4		5		6		7		8		9	
Genotyp	I ¹	K ²	I	K	I	K	I	K	I	K	I	K	I	K	I	K
LB	8	4	4	4	4	4	9	4	4	4	4	4	4	4	8	4
Dual	8	4	4	4	4	4	10	4	4	4	4	4	4	4	9	4
Ross 308	8	4	4	4	4	4	9	4	4	4	4	4	4	4	8	3
Gesamt	24	12	12	12	12	12	28	12	12	12	12	12	12	12	25	11

¹ Kotprobe eines infizierten Tieres

² Kotprobe eines nicht infizierten Kontrolltieres

3.2. Herstellen der Verdünnungsreihe

Um eine quantitative Auswertung über die Ausscheidung von Histomonaden im Kot mittels qPCR treffen zu können, wurde aus einer klonalen Kultur von *H. meleagridis* eine Verdünnungsreihe hergestellt.

Dabei wurden Histomonaden der Kultur *H. meleagridis*/Turkey/Austria/2922-C6 mittels eines Neubauer Hämocytometers (Sigma-Aldrich, Vienna Austria) im Mikroskop (200x Vergrößerung) (Nikon, Japan) gezählt und die Protozoenzahl auf eine Konzentration von 1×10^6 Histomonaden / 1 ml Kulturmedium verdünnt.

Für die Verdünnungsreihe wurden dann weitere Zellkonzentrationen mit 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10^1 und 10^0 Histomonaden / ml Kulturmedium in 2ml Eppendorf-Röhrchen hergestellt. Die Zellsuspensionen wurden anschließend für die DNA-Extraktion verwendet (siehe Kapitel 3.4.).

3.3. Vorbereiten der Kotproben

Die Proben aus dem beschriebenen Tierversuch wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gefroren gelagert. Von jeder Einzelkotprobe wurden 200 mg in 2 ml Röhrchen eingewogen. Dabei wurden für jede Probe separate sterile Einwegpinzetten und Einweghandschuhe verwendet, um Kontaminationen zu vermeiden.

3.4. DNA-Extraktion

3.4.1. Standardreihe

In vitro kultivierte Histomonaden mit definierter Zellzahl wurden mittels DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Niederlande) nach dem Herstellerprotokoll bearbeitet. Zu diesem Zweck wurden die Proben bei 13000 RPM (Revolutions Per Minute) für eine Minute zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Danach wurden 200 µl ATL Puffer (DNeasy® Blood & Tissue Kit) hinzugefügt und die Suspension mittels Vortexmischer gemischt. Nach der Beimengung von 20 µl Proteinase K (DNeasy® Blood & Tissue Kit) wurden die Proben für zwei Stunden bei 56 °C in einen Thermomixer inkubiert. ATL Puffer und Proteinase K (DNeasy® Blood & Tissue Kit) waren dabei für die Zelllyse notwendig, um die DNA zu freisetzen. Nach der Inkubation wurden 200 µl AL Puffer (DNeasy® Blood & Tissue Kit) beigefügt und gut durchgemischt. Nach dem Hinzufügen von 200 µl Ethanol wurde nochmals gemischt. Im Anschluss wurde der Inhalt

in die DNeasy® Mini Röhrchen (Qiagen) überbracht und bei 8000 RPM für eine Minute zentrifugiert. Nach dem Waschen der Proben mit den Buffern AW1 und AW2 (DNeasy® Blood & Tissue Kit), um nicht benötigte Proteine und Salze auszuwaschen, wurde mit 200 µl Buffer AE (DNeasy® Blood & Tissue Kit) die DNA eluiert. Die DNA wurde dann bis zur Verwendung für die qPCR bei -20 °C eingefroren.

3.4.2. Kot

Um DNA aus dem Kot der Tiere zu extrahieren, wurde der QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen) verwendet. Mit geringen Modifikationen wurde dabei das Standardprotokoll des Herstellers eingehalten. Unter Luftabzug, um Kontaminationen zu vermeiden, wurden jeweils 200 mg Kot in den 2 ml Röhrchen, eine im Durchmesser 4 Millimeter große Stahlkugel und ein 500 µl InhibitEX Puffer (QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit) beigegeben. Dieser Puffer wurde benötigt, um auch DNA in Eiern von *H. gallinarum* zugänglich zu machen. Das Aufbrechen der Eier wurde dazu noch mit Hilfe des QIAGEN TissueLyser mechanisch unterstützt, bei einer Frequenz von 30 Schwingungen / s für zwei Minuten. Dabei wurden die Proben aufgrund der Stahlkugel homogenisiert und die Eier mechanisch aufgebrochen. Nach dem ersten Durchgang wurden die Proben gewendet und nochmals für zwei Minuten bei einer Frequenz von 30 Schwingungen / s geschüttelt. Danach wurden die Proben bei 13500 RPM für weniger als eine Minute zentrifugiert, um einer Verschmutzung beim Beimengen von weiteren 500 µl InhibitEX Puffer vorzubeugen. Nachdem nun weitere 500 µl InhibitEX Puffer dazugegeben wurden und nun einer Gesamtmenge von 1000 µl InhibitEX Puffer entsprach, wurden die Proben noch einmal homogenisiert. Anschließend kamen sie für fünf Minuten bei einer Temperatur von 95°C und 450 RPM in den Thermomixer comfort (Eppendorf, Deutschland). Nach Ablauf der Zeit wurden die Proben bei 13200 RPM für eine Minute zentrifugiert, sodass der Kot am Grund des Röhrchens pelletiert war und der Überstand abgenommen werden konnte. Der Überstand (600 µl) wurde nun in neue 2ml Röhrchen verbracht, die schon 25 µl Proteinase K (QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit) enthalten haben. Dann wurden 600 µl AL Puffer (QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit) beigemischt. Anschließend erfolgte eine Homogenisierung der Proben und eine Inkubierung für zehn Minuten bei 70°C und 450 RPM im Thermomixer comfort (Eppendorf). Der nächste Schritt war, den Proben jeweils 600 µl Ethanol hinzugefügen und diese gut zu schütteln. Nun wurden 2 ml QIAamp Zentrifugations-Röhrchen vorbereiten und jeweils 600 µl der Proben in die Filterröhrchen pipettiert. Danach wurden die Proben eine Minute bei 13200 RPM zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde

das Filtrat mit den Sammelröhrchen verworfen und der Filtereinsatz in ein neues Sammelröhrchen gesteckt. In den nächsten Schritten wurde das restliche Probenmaterial in der gleichen Weise behandelt (jeweils max. 600 µl) bis die gesamte Probe filtriert war. Die letzten Schritte dieser DNA-Extraktion wurden konform der Beschreibung für die DNA-Extraktion von Histomonaden aus Kultur (siehe oben) durchgeführt. Die DNA wurde dann bis zur Verwendung für die qPCR bei -20 °C eingefroren.

3.5. Quantifizierung von Histomonaden im Kot mittels qPCR

Zur Quantifizierung von Histomonaden wurde eine qPCR angewendet, die kürzlich zum spezifischen Nachweis des Erregers etabliert wurde (Sulejmanovic *et al.* 2019). Verwendet wurde dazu das AriaMx Real-time PCR System von Agilent Technologies (Kalifornien, USA). Dieses System basiert auf dem 18S rRNA Gen, um *H. meleagridis* nachzuweisen. Dazu wurden 20 µl Reaktionsgemisch mit dem Agilent Mx3000P (Agilent Technologies) unter Verwendung des Brilliant III UltraFast QPCR Master Mix (Agilent Technologies) mit 30 nM ROX als Referenzfarbstoff, 0,2 µM Primer und 0,3 µM TaqMan-Sonde. Der thermische Ablauf der Zyklen war 15 Minuten bei 95 °C, gefolgt von 40 Zyklen von 15 Sekunden bei 95 °C und von 30 Sekunden bei 60 °C. Während des 60 °C Zyklus wurde die Fluoreszenz nachgewiesen und aufgezeichnet. Die Untersuchungen sämtlicher Kotproben wurde im Duplikat durchgeführt (qPCR1 und qPCR2).

Tabelle 5: Sequenzen der Primer und der Sonde, welche in der qPCR verwendet wurden (Sulejmanovic *et al.* 2019)

Name	Sequenz 5'-3'
Hm-18S-rtF	ATCAAGGGCGAGAGTAGGAG
Hm-18S-rtR	CCCAGAGCCCATGAACTATTG
Hm-18S-rtP	FAM-CCTACCTTAAACTATGCCGACRAGGGCTTATTTTTT-BHQ1

3.6. Statistische Methoden

Die Analyse und statistische Auswertung der Daten erfolgte anhand des Programms SPSS. Zur Überprüfung der Forschungsfragen wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung (ANOVA) durchgeführt. Diese hat überprüft, ob die Populationsmittelwerte der jeweiligen Stichprobe gleich waren und demnach die Nullhypothese, dass es keinen Unterschied bzw. keinen Zusammenhang zwischen den geprüften Daten gegeben hat. Bei einem signifikanten Ergebnis wurde die Nullhypothese verworfen und stattdessen die Alternativhypothese gewählt. Die Alternativhypothese ist generell aber nicht in der Lage, Aussagen darüber zu machen, welche Gruppen sich voneinander unterscheiden. Aus diesem Grund wurden Post hoc-Analysen durchgeführt, die Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen identifizieren sollten. Die Voraussetzung für die Durchführung einer einfaktoriellen Varianzanalyse ist Varianzhomogenität (Homoskedastizität). Sie ist gegeben, wenn die Varianz in allen Gruppen gleich ist und wird in SPSS mit dem Levene-Test überprüft. Ein signifikanter Levene-Test ($p < 0,05$) verletzt die Varianzhomogenität. In diesem Fall konnte der Welch-Test interpretiert werden, der als robustes Verfahren gegenüber Varianzheterogenität gilt. Nimmt er einen p-Wert von unter 0,05 an, kann von signifikanten Mittelwertsunterschieden in den geprüften Daten ausgegangen werden (Rasch et al. 2014).

Die in der vorliegenden Untersuchung durchgeführte ANOVA (Analysis of variance) sollte überprüfen, ob sich die Mittelwerte der einzelnen Durchgänge in den drei Gruppen über die Zeit signifikant unterscheiden. Als Irrtumswahrscheinlichkeit wurde ein Wert von $p < 0,05$ festgelegt.

Um die Validität der Ergebnisse zu erhöhen, wurde jede Kotprobe als Duplikat ausgewertet (qPCR1 und qPCR2).

Als Innersubjektvariable fungierten bei der einfaktoriellen Varianzanalyse die Ct-Werte zum ersten und zweiten Messzeitpunkt. Als Zwischensubjektfaktoren dienten die drei Gruppen LB, Dual und Ross 308.

4. Ergebnisse

4.1. Ermittlung der Standardkurve

Um beim Standard einen Mittelwert für die spätere Quantifizierung berechnen zu können, wurden sieben identische qPCRs durchgeführt. Dadurch sollte eine möglichst hohe Präzision des Standards gewährleistet sein. Weiters wurde bei der Analyse der Proben auch der Standard aller qPCRs analysiert. In Tabelle 5 ist zu sehen, dass bei einer Konzentration von einer Zelle des Protozoen *H. meleagridis* ein positives Ergebnis um den 40. Zyklus der qPCR auftritt und bei einer höheren Anzahl von Histomonaden weniger Zyklen nötig sind.

Tabelle 6: Werte der einzelnen Konzentrationen des Standards

PCR Replikat								
	1	2	3	4	5	6	7	
Standard Anzahl der Histomonaden	Cq (ΔR) ¹	Cq (ΔR)	Mittelwert					
10 ⁰	40.46	41.16	41.35	39.28	39.9	40.58	40.27	40.4285714
10 ¹	36.28	37.32	37.6	38.9	37.05	38.22	38	37.6242857
10 ²	32.03	33.98	34.28	35.42	33.36	34.22	34.25	33.9342857
10 ³	30	30.76	30.36	31.22	31.05	29.75	31.02	30.5942857
10 ⁴	25.8	27.12	25.79	26.12	25.6	25.4	25.84	25.9528571
10 ⁵	21.64	21.74	21.47	23.14	21.05	20.9	22.71	21.8071429
10 ⁶	17.67	18.22	18.08	19.56	18.12	17.44	18.26	18.1928571

¹ Cq (ΔR): Anzahl von Zyklen bis zur positiven Detektion

Mit diesen Daten kann, basierend auf der Standardkurve, die in Abbildung 2 dargestellt ist, die Exkretion von *H. meleagridis* der einzelnen Kotproben quantitativ errechnet werden. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass die Anzahl der Zyklen, welche bis zum Nachweis von Histomonaden erforderlich ist, negativ mit der Anzahl der Parasitenzellen korreliert. Für die Bearbeitung der Daten aus der qPCR wurde die Software Agilent AriaMx Version 1.7 (Agilent Technologies Kalifornien, USA) verwendet.

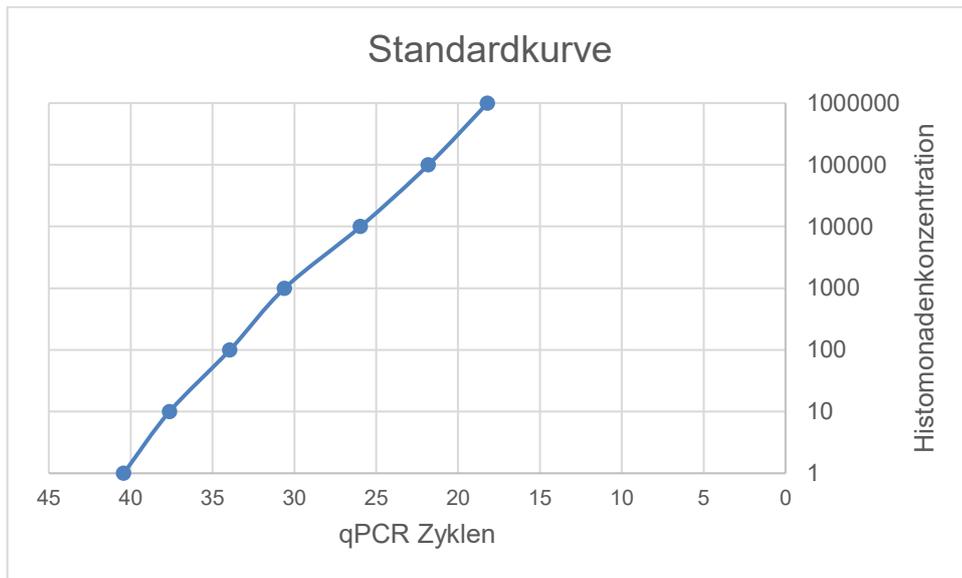


Abbildung 2: Standardkurve der qPCR bei bekannter Histomonadenkonzentration

4.2. Quantifizierung von *H. meleagridis* in Kotproben

In den folgenden Kapiteln werden die einzelnen Hühnergenotypen erst gesondert für sich bewertet und im Anschluss ein Gesamtüberblick der Ergebnisse dargestellt. Die Rohdaten zu den Ergebnissen befinden sich im Anhang (Kapitel 10).

4.2.1. Lohmann Brown Plus (LB)

Beim Legehybrid Lohmann Brown Plus konnte, wie in Abbildung 3 ersichtlich, in der zweiten Woche nach der Infektion, nur bei 13% der Tiere eine Ausscheidung von Histomonaden festgestellt werden. In den darauffolgenden Wochen hat hingegen ein hoher Anteil (zwischen 75 und 100%) der Tiere Histomonaden ausgeschieden. Die Zahl der durchschnittlich ausgeschiedenen Histomonaden im Kot pro Huhn in Woche 2 und 3 nach der Infektion war gering (maximal 32 Histomonaden pro Gramm Kot), zwischen Woche 4 und Woche 8 mehr als verdoppelt (70 bis 152 Histomonaden) und erreichte den höchsten Wert (233 Histomonaden) in der neunten Woche, am Ende der Studie. Generell kann festgehalten werden, dass bei LB-Hühnern ab der dritten Woche nach der Infektion eine hohe Rate (75%) an ausscheidenden Hühnern bestanden hat. Die Kontrollproben des nicht infizierten Genotyps waren über die gesamte Studienzeit negativ (Daten nicht abgebildet).

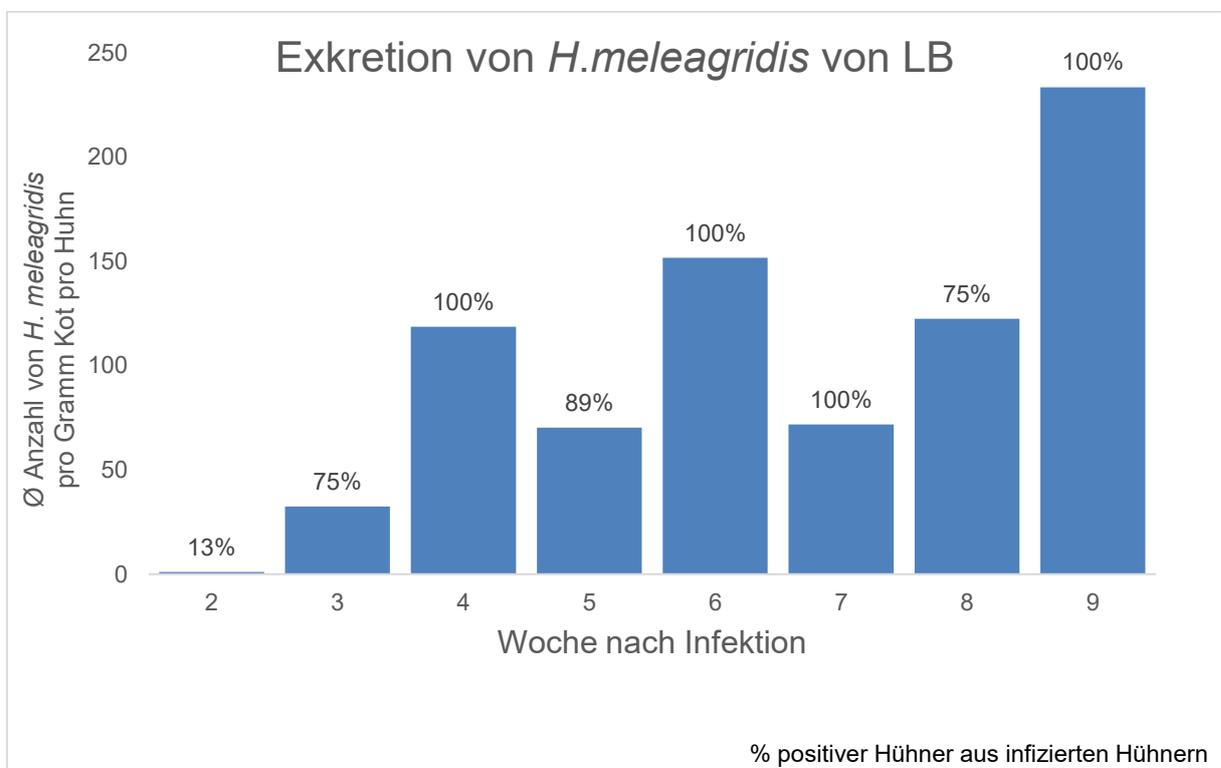


Abbildung 3: Exkretion von *H. meleagridis* bei Lohmann Brown Plus-Hühnern

4.2.2. Lohmann Dual (Dual)

Bei den Zweinutzungshühnern Lohmann Dual konnte in der zweiten und dritten Woche nach der Infektion bei 50% der Hühner eine Ausscheidung von Histomonaden festgestellt werden (Abbildung 4). In der vierten Woche waren bereits alle Hühner positiv, wohingegen in der fünften Woche wiederum nur mehr 60% der Hühner Histomonaden ausschieden. Bis auf Woche 7 (75%) waren danach wieder sämtliche Dual-Hühner als Ausscheider zu identifizieren. Der höchste Wert an ausgeschiedenen Histomonaden (143 Histomonaden pro Gramm Kot) wurde am Ende der Studie, in der neunten Woche, erreicht. Zusätzlich fällt auf, dass wie schon beim Genotypen Lohmann Brown Plus, ein Anstieg der durchschnittlich ausgeschiedenen Histomonaden pro Tier bis zur vierten Woche nach der Infektion sichtbar war (20-108 Histomonaden). In weiterer Folge kam es dann zu einer geringeren Ausscheidung (24 Histomonaden in Woche 5 nach der Infektion), welche sich kontinuierlich bis zur neunten Woche nach der Infektion steigerte. Sämtliche Kotproben von nicht infizierten Lohmann Dual-Hühnern waren negativ (Daten nicht abgebildet).

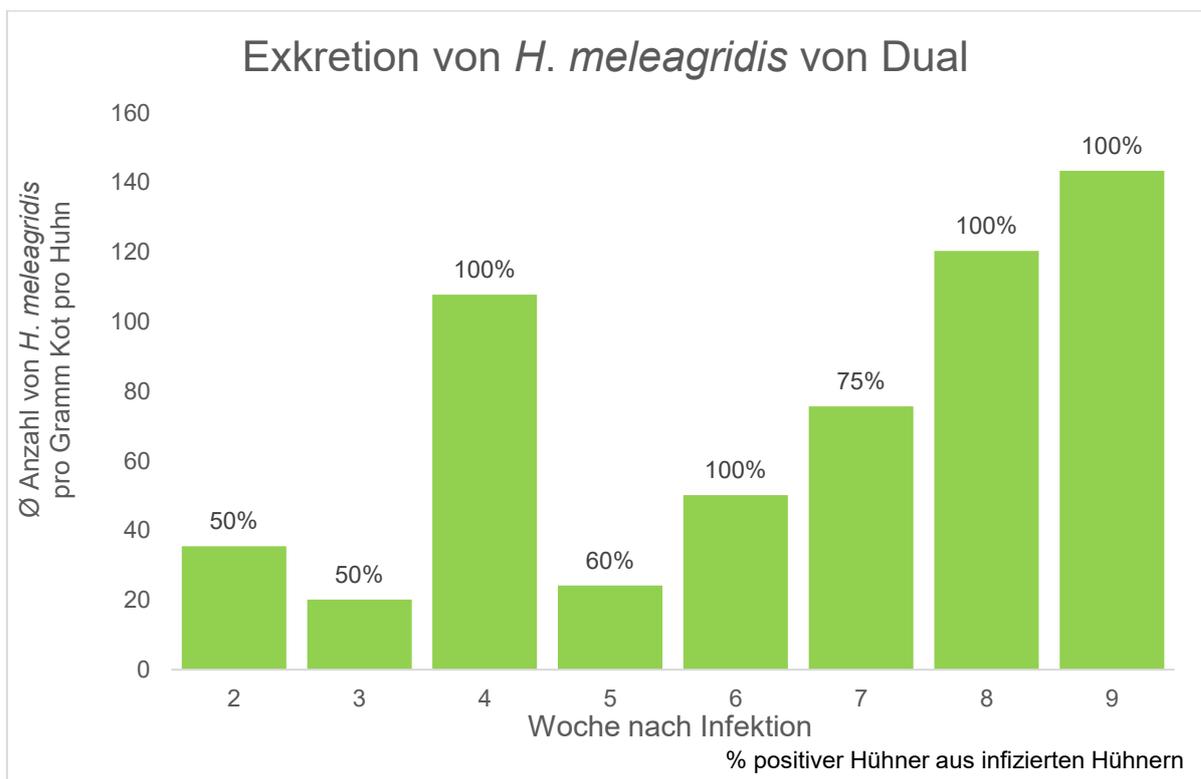


Abbildung 4: Exkretion von *H. meleagridis* bei Lohmann Dual-Hühnern

4.2.3. Ross 308 (Ross)

Bei den Masthybriden Ross 308 war die Ausscheidungsrate zwischen 0% (dritte Woche nach der Infektion) und 100% (vierte, siebte und neunte Woche) variabel (Abbildung 5). In der zweiten, vierten, fünften und achten Woche variierten die Ausscheider zwischen 25% und 63%. Im Gegensatz zu den beiden anderen in dieser Studie untersuchten Genotypen, ergab sich der Maximalwert an ausgeschiedenen Histomonaden in der vierten Woche nach der Infektion (177 Histomonaden pro Gramm Kot). Nach der vierten Woche blieb die mittlere Zahl der ausgeschiedenen Histomonaden in einem Bereich unter 55 Parasiten. Kotproben von nicht infizierten Kontrolltieren des Genotyps Ross 308 sind mittels qPCR als negativ ausgewertet worden (Daten nicht abgebildet).

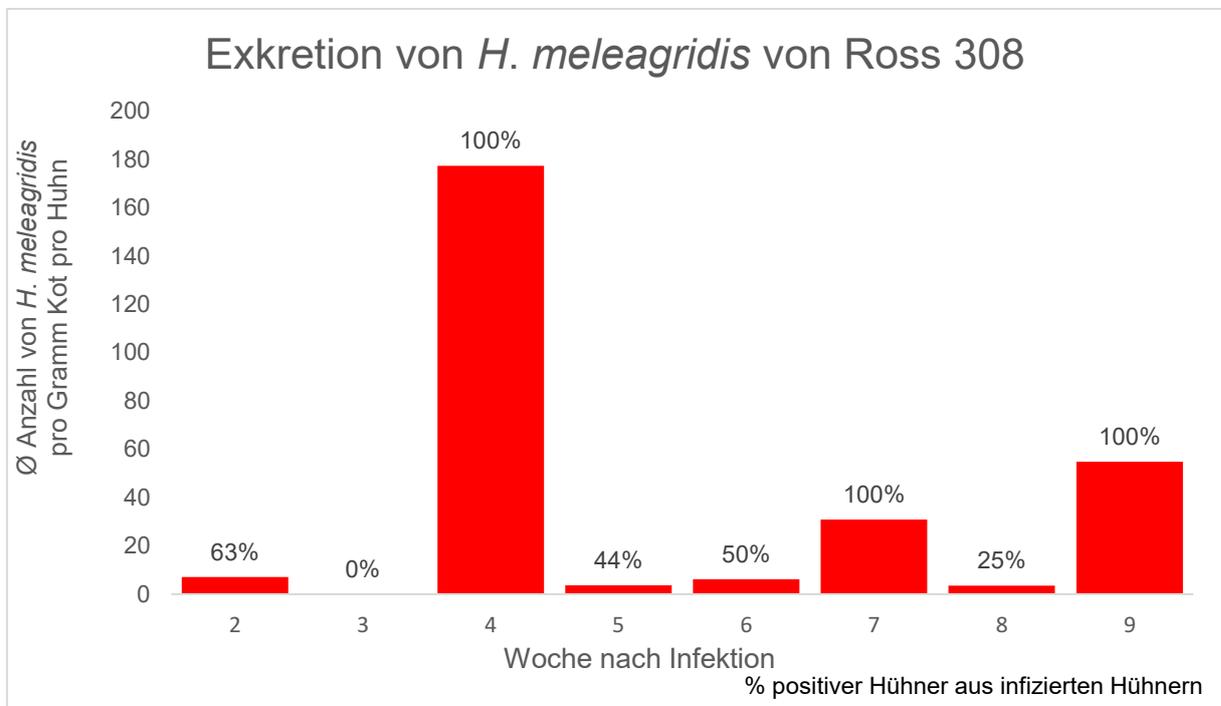


Abbildung 5: Exkretion von *H. meleagridis* bei Ross 308-Hühnern

4.2.4. Ausscheidung von *H. meleagridis* zwischen Genotypen im Vergleich

Im Überblick zeigen die Ergebnisse, dass bei allen in der Studie untersuchten Genotypen ein Nachweis von Histomonaden im Kot ab der zweiten Woche nach der Infektion erfolgte, und nur bei einer Probennahme sämtlicher Hühner negativ war (Ross 308) (Abbildung 6). Bei allen drei Genotypen wird ein Einbruch der Ausscheidung nach der vierten Woche der Infektion und ein Wiederanstieg bis zur neunten Woche (sowohl Ausscheidungsrate als auch die Zahl der ausgeschiedenen Histomonaden) ersichtlich. Bei nicht infizierten Hühnern aller Genotypen wurde keine DNA von *H. meleagridis* im Kot der Tiere detektiert (Daten nicht abgebildet).

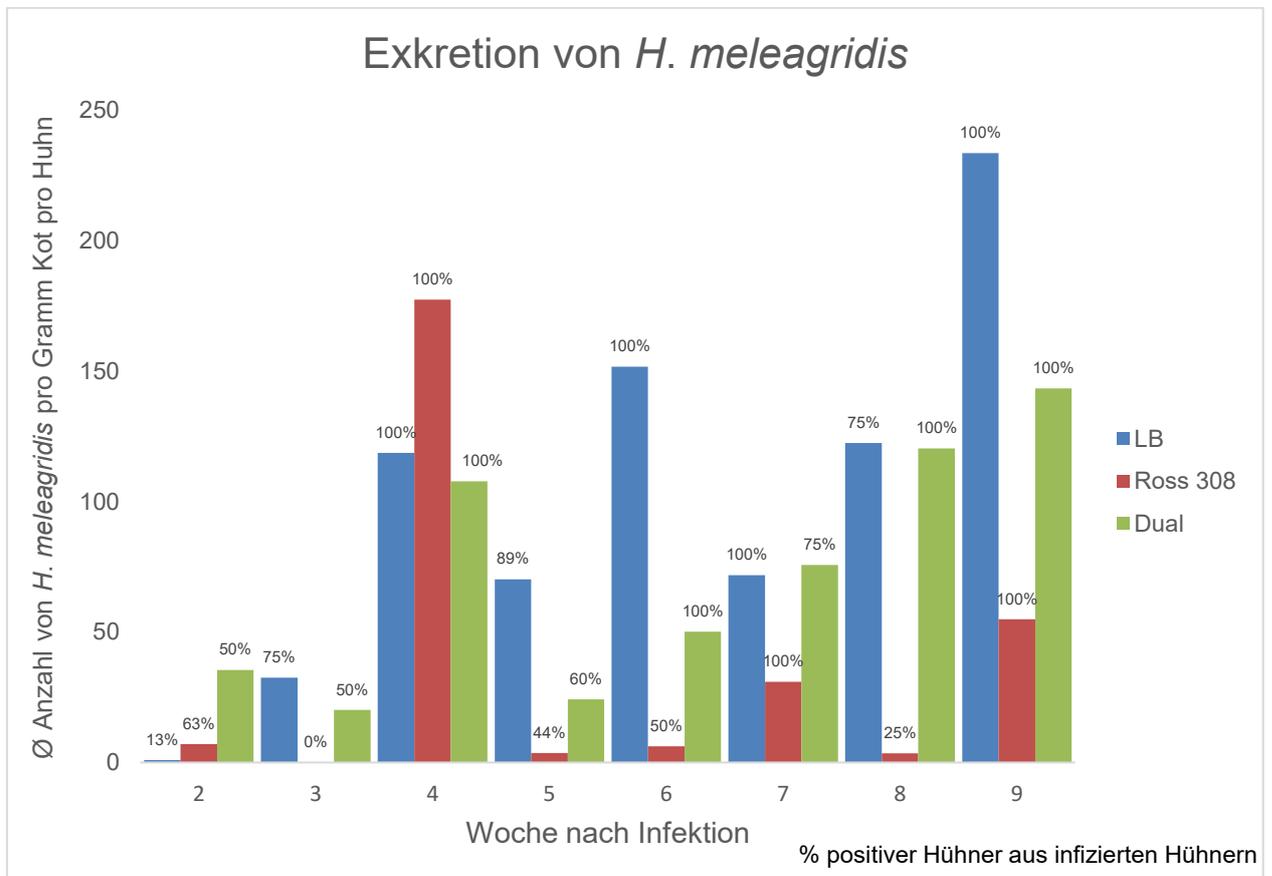


Abbildung 6: Exkretion von *H. meleagridis* (Genotypen vergleichend)

4.2.5. Statistische Auswertung

Im Überblick sind die Mittelwerte der Cq(ΔR) der qPCR Ergebnisse der unterschiedlichen Gruppen in Tabelle 7 dargestellt. Eine einfaktorielle ANOVA mit Messwiederholung konnte aufgrund von Inhomogenität der Fehlervarianzen gemäß Levene-Test ($p < 0,05$) nicht interpretiert werden. Post hoc-Tests konnten dennoch analysiert werden und zeigen, dass sich die Gruppen über die Zeit hinweg (LB vs. Ross 308: $p = 0,311$; LB vs. DB: $p = 1,0$; Ross vs. DB: $p = 0,217$) nicht signifikant voneinander unterscheiden (Konfidenzintervalle: LB vs. Ross 308: Mittelwert (MW); 5,95; 95%-CI; -2,80, 14,49; LB vs. DB: MW; -0,544; 95%-CI; -9,10, 8,01; Ross 308 vs. DB: MW; -6,39; 95%-CI; -14,94, 2,17). Dieses Ergebnis konnte auch durch das Heranziehen des Welch-Tests bekräftigt werden ($p = 0,193$), der zur weiteren Prüfung der Mittelwertsunterschiede herangezogen wurde.

Tabelle 7: Statistische Daten

Genotyp	Anzahl (N)	Mittelwert (Standardabweichung)	
		qPCR1-Cq (ΔR)	qPCR2-Cq (ΔR)
LB	45	29.06 (15.82)	28.95 (15.75)
Ross 308	45	23.23 (19.24)	23.08 (19.11)
DB	47	29.83 (15.77)	29.26 (15.48)

5. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit lag auf dem Nachweis von Histomonaden in Kot von Hühnern nach einer Infektion mit *H. gallinarum*, unter Verwendung eines etablierten DNA-Extraktionsverfahrens und einer darauffolgenden qPCR. Es sollte dabei die Ausscheidungsrate von drei unterschiedlichen Hühnergenotypen dargestellt werden, um damit auf die Prävalenz verschiedener kommerzieller Genotypen schließen zu können.

Bei Puten wurde die Schwarzkopfkrankheit bereits vor über 100 Jahren von Cushman (1893) beschrieben. Kurze Zeit später haben Chester und Robin (1900) berichtet, dass Hühner ebenso betroffen sein können. Auch wenn Morbidität und Mortalität bei Hühnern nicht so hoch sind wie bei Puten, ist die Histomonose eine verlustreiche Krankheit bei Mast und Legehybriden (McDougald 2005). Die Problematik der Histomonose ergibt sich aktuell daraus, dass es seit 2003 eine Limitierung der Chemotherapeutika seitens der europäischen Gesetzgebung gibt welche in den Verordnungen EWG/1798/1995, EWG/2205/2001 sowie EWG/1756/2002 geregelt sind. Zusätzlich wurde gezeigt, dass sich der Erreger *H. meleagridis* in alternativen Haltungssystemen verbreiten kann (Hafez *et al.* 2001). Die Relevanz von Biosicherheit in Geflügelbetrieben bei Ausbrüchen von Histomonose wurden in verschiedenen Studien dargestellt (Ganapathy *et al.* 2000, Cortes *et al.* 2004, Popp *et al.* 2011). Eine kürzlich durchgeführte Untersuchung aus Vietnam zeigte, dass die Prävalenz bei Junghennen und Legehühnern dort deutlich geringer war als in Europa (Nguyen *et al.* 2015).

Im frühen zwanzigsten Jahrhundert wurde bereits erkannt, dass der Nematode *H. gallinarum* eine wesentliche Rolle bei der Verbreitung von *H. meleagridis* spielt (Graybill und Smith 1920, Tyzzer 1934). Untersuchungen verdeutlichten, dass Hühner aufgrund ihrer geringeren Anfälligkeit für Histomonose seltener klinisch erkranken als Puten, aber dennoch ein Infektionsreservoir darstellen können (Lund und Chute 1970, 1973). Basierend auf diesen Ergebnissen wird empfohlen, Puten und Hühner nicht in direkter Umgebung zu halten (McDougald 2005).

Heute rückt diese Problematik wieder mehr in den Vordergrund, da die konventionelle Käfighaltung in Europa verboten wurde und alternative Haltungssysteme verwendet werden. Aus diesem Grund können häufigere Infektionen mit Parasiten in Geflügelbetrieben auftreten. Darüber hinaus stellen kontaminierte Ausläufe ein hohes Risiko für eine Infektion sowie einer Reinfektion mit *H. gallinarum* beziehungsweise *H. meleagridis* dar (Esquenet *et al.* 2003,

Hafez *et al.* 2001). Auch die Tatsache, dass Regenwürmer als Stapelwirt für *H. gallinarum* fungieren, verstärkt die Möglichkeit einer parasitären Infektion (Lund *et al.* 1966).

Über die Jahre erschienen zahlreiche Publikationen über *H. meleagridis*, dessen Verbreitung und Übertragungswege. Einen umfangreichen Überblick gibt die Arbeit von Hauck und Hafez (2012). Die Autoren fassen darin experimentelle Infektionen von Geflügel mit *H. meleagridis* mit oder ohne Vektor zusammen. Fest steht, dass die Rolle von *H. gallinarum* für die Infektion von Geflügel relevant ist, ebenso wie eine direkte Infektion von Tier zu Tier. Die Ausscheidung mit Quantifizierung von Histomonaden nach einer Infektion von Hühnern mit *H. gallinarum* wurde bis dato nicht untersucht.

In der vorliegenden Studie war eine real-time quantitative PCR die Technik der Wahl, um Zellzahlen von Histomonaden im Kot bestimmen zu können. Andere Methoden, welche für den Nachweis von Histomonaden zur Verfügung stehen wie zum Beispiel die Isolierung von Histomonaden mittels Kloakentupfer (Hess *et al.* 2006), waren im gegebenen Fall nicht durchführbar, da es sich bei dem verwendeten Probenmaterial um tiefgefrorene Einzelkotproben handelte. Aktuell beschränkt sich die Verwendung einer qPCR zum quantitativen Nachweis von *H. meleagridis* auf Kot von direkt infizierten Puten (Landman *et al.* 2015) oder auf Kot vermengt mit kultivierten Histomonaden (Hussain *et al.* 2015). In der vorliegenden Arbeit kam die bereits etablierte real-time PCR von Sulejmanovic *et al.* (2019) zum Einsatz. Für die Quantifizierung in der vorliegenden Arbeit wurden Standardwerte bestimmt, welche aus einer definierten Verdünnungsreihe aus klonalen Histomonaden hergestellt wurde. Das Prinzip, dass die Menge an Amplifikat direkt mit der Menge an Proben-DNA korreliert, ergibt einen exakten Rückschluss auf die Anfangskonzentration der Probe. Eine Unterscheidung zwischen bei der Ausscheidung lebenden bzw. infektiösen oder toten Histomonaden konnte mittels der qPCR nicht gemacht werden. Daher können die Ergebnisse nicht auf die Infektionsfähigkeit der Kotproben schließen lassen und es müssten für diese Fragestellung Infektionsexperimente durchgeführt werden.

Entsprechend dem Lebenszyklus von *H. gallinarum* wurden Kotproben im aktuellen Versuch erst ab der zweiten Woche nach Infektion gesammelt, da der Nematode diese Zeitperiode braucht, um sich im Wirt zu vermehren (Eckert *et al.* 2008). Proben von früheren Zeitpunkten waren nicht verfügbar, es ist jedoch anzunehmen, dass Histomonaden nach einer Infektion via *H. gallinarum* auch früher ausgeschieden werden können, da sich nach einer direkten Infektion der Erreger schon zwei Tage nach der Infektion mittels Re-Isolierung aus Kloakentupfern nachweisen lässt (Hess *et al.* 2006). Die Co-Infektion von *A. galli* wurde in dieser Studie

vernachlässigt, da der Spulwurm weder als Vektor für *H. meleagridis* fungiert noch im gleichen Darmabschnitt wie *H. gallinarum* parasitiert (McDougald 2013, Hess und McDougald 2013).

Insgesamt wurden in dieser Studie 137 Kotproben von infizierten Tieren analysiert. Von dieser Probenanzahl waren mittels qPCR 99 Proben positiv. Die Analyse der Proben ergab, dass sich die Ausscheidungsrate der drei Gruppen bis zur vierten Woche nach der Infektion steigerte und in der fünften Woche nach der Infektion zurückging. Darauf folgte wiederum ein Anstieg bis zur neunten Woche nach der Infektion. Aus diesem Verlauf kann geschlossen werden, dass eine geringere Ausscheidung vor der vierten Woche nach der Infektion möglicherweise auf die akute Entzündung im Blinddarm zurückgeht. Der Verlauf der Entzündung im Zäkum ist zehn Tage der Infektion am deutlichsten ausgeprägt und auch noch nach drei Wochen als pathologische Läsion erkennbar (Liebhart *et al.* 2011). Die lokale Immunreaktion gegen *H. meleagridis* (Liebhart *et al.* 2018) könnte somit eine verminderte Ausscheidung des Erregers mit sich bringen. Danach nimmt in der aktuellen Studie der Befall an ausgeschiedenen Parasiten ab der fünften Woche nach der Infektion wieder zu. Dies wäre damit zu erklären, dass die Typhlitis zurückgegangen ist und der Erreger sich nun im Darmlumen etablieren kann. Basierend auf diesen Ergebnissen kann angenommen werden, dass sich Histomonaden über die gesamte Versuchsdauer von neun Wochen im Darm vermehrt und/oder sich die Hühner auch immer wieder selbst mit Histomonaden re-infizieren. Generell ist beschrieben, dass die Ausscheidung von Histomonaden bei infizierten Hühnern intermittierend erfolgt (Hess *et al.* 2006).

Aufgrund der Ausscheidung von Histomonaden und der damit durchgeführten statistischen Auswertung der Proben zeigte sich, dass es keine Unterschiede zwischen den Hühnergenotypen gibt. Auch der Verlauf der Ausscheidung stellte sich bei allen drei Genotypen sehr ähnlich dar. Somit kann angenommen werden, dass der Hühnergenotyp keinen Einfluss auf die Ausscheidung und somit Verbreitung von Histomonaden in einem Hühnerbetrieb einnimmt. Jedenfalls verdeutlichen die Ergebnisse der aktuellen Studie die Tatsache, dass Hühner eine wichtige Rolle als Ausscheider und Erregerreservoir von Histomonaden spielen können.

Eine frühere Studie zur Seroprävalenz von *H. meleagridis* zeigte, dass das Haltungssystem einen Einfluss auf das Vorkommen des Erregers hat (Grafl *et al.* 2011). Ein genetischer Einfluss von Hühnern wurde in der letztgenannten Arbeit nicht untersucht, die aktuellen Ergebnisse lassen keinen Hinweis darauf zu. Dennoch ist zu beachten, dass ein indirekter serologischer Nachweis im Blut von Wirtstieren mit dem direkten Nachweis im Kot nicht

unmittelbar vergleichbar ist. Beide Untersuchungsmethoden könnten sich jedoch in einer umfassenden Studie von Hühnern in unterschiedlichen Haltungsformen und Genotypen ergänzen und so neue Erkenntnisse zur Prävalenz von Histomonose in Hühnerbetrieben ergeben.

5.1. Conclusio

Die Auswertung der Ergebnisse ergibt, dass eine Infektion mit *H. meleagridis* über die Eier von *H. gallinarum* sehr effektiv ist, auch wenn in dieser Studie eine mögliche direkte Übertragung des Flagellaten innerhalb der einzelnen Gruppen von Genotypen nicht untersucht wurde. Letztlich konnte gezeigt werden, dass alle Hühner, gleich welchen Genotyps, spätestens bis zum Ende des Versuches Histomonaden ausgeschieden haben.

Die Anwendung der qPCR zur Detektion von Histomonaden im Kot kann wertvolle Informationen zum Infektionsstatus infizierter Hühner geben. Die Quantifizierung des Erregers in Kotproben hat gezeigt, dass die Erregerzahl variiert, was im akuten Krankheitsstadium mit einer Reduktion von ausgeschiedenen Histomonaden einhergeht.

6. Zusammenfassung

Histomonose, ausgelöst durch den Erreger *Histomonas meleagridis*, ist beim Geflügel von aktueller Relevanz, da bisher verwendeten Prophylaktika sowie Therapeutika verboten wurden. Der daraus resultierende Therapienotstand führt dazu, dass sich zunehmend Geflügel mit dem Parasiten infiziert und es keine effektive Möglichkeit zur Bekämpfung der Krankheit gibt.

Eine wichtige Bedeutung kommt dem Zwischenwirt *H. gallinarum* zu. So sind die Eier des Nematoden *H. gallinarum* ein Reservoir für Histomonaden. Der Nematode kann sich in Regenwürmern anreichern, welche sich in den Ausläufen der Geflügelherden befinden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Ausscheidungsrate von *H. meleagridis* bei drei verschiedenen Hühnergenotypen nach einer Infektion mit *H. gallinarum* mittels einer qPCR untersucht. Dazu wurden 232 Einzelkotproben aus kontrolliert infizierten Tieren verwendet, wobei sich unter diesen Proben auch Kot von nicht infizierten Tieren, welche als Kontrollgruppe dienten, befanden. Um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten, wurden drei verschiedene Geflügelgenotypen (Ross 308, Lohmann Brown Plus und Lohmann Dual) in die Studie aufgenommen.

Beim Genotyp Ross 308 war der Kot von 60% der Tiere positiv, bei Lohmann Brown Plus 77% und bei Lohmann Dual 78%. Die durchschnittliche Ausscheidung variierte von 35 Histomonaden bei Ross 308 über 72 Histomonaden bei Lohmann Dual bis zu 100 Histomonaden bei Lohmann Brown Plus. Auch wenn bei den Masthybriden der Prozentsatz an nachgewiesenen Histomonaden geringfügig unter den beiden anderen Genotypen liegt, konnte basierend auf statistischen Berechnungen keine genotypspezifische Prädisposition festgestellt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Ausscheidung von Histomonaden im Kot von Hühnern nach einer Infektion mit *H. gallinarum* Eiern mittels qPCR nachgewiesen und quantifiziert. Dabei ist hervorzuheben, dass sämtliche Hühnergenotypen über den gesamten Zeitraum der Studie den Flagellaten ausgeschieden haben und daher potenzielle Überträger waren.

7. Summary

Histomonosis, caused by the pathogen *Histomonas meleagridis*, is becoming increasingly important in poultry. Previously used prophylactic and therapeutic agents have now been banned because safety of consumers cannot be guaranteed. The resulting emergency in therapy led to cases of histomonosis without options for treatment.

The intermediate host *H. gallinarum* plays an important role. Eggs of the nematode *H. gallinarum* are a reservoir for the histomonads. This nematode in turn can accumulate in earthworms, which can be present in free-range areas of poultry flocks.

In the present work, the excretion rate of *H. meleagridis* in three different chicken genotypes after infection with *H. gallinarum* was investigated using a qPCR.

For this purpose, 232 single faecal samples from controlled infected animals were used, including faeces from non-infected animals which served as a control group. Three different poultry genotypes were included in the study (Ross 308, Lohmann Brown Plus and Lohmann Dual) to investigate differences in the shedding of *H. meleagridis* due the host genetic.

In the Ross 308 genotype, faeces were positive in 60% of the animals, 77% in Lohmann Brown Plus and 78% in Lohmann Dual. The average excretion varied from 35 histomonads for Ross 308 to 72 histomonads for Lohmann Dual to 100 histomonads for Lohmann Brown Plus. Even if the percentage of detected histomonads in the fattening hybrids is slightly below the other two genotypes, no genotype-specific predisposition could be determined based on statistical analyses.

In the present work, the excretion of histomonads in feces of chickens after infection with *H. gallinarum* eggs was detected and quantified by qPCR. It should be emphasized that all genotypes of chickens have excreted the flagellate over the entire period of the study and can therefore act as potential carriers.

8. Literaturverzeichnis

- AMIN, A., BILIC, I., BERGER, E., HESS, M. (2012): *Trichomonas gallinae* in comparison to *Tetratrichomonas gallinarum* induces distinctive cytopathogenic effects in tissue cultures, *Veterinary Parasitology*, 186(3-4), 196-206.
- ASHOUR, A. A. (1994): Scanning electron microscopy of *Ascaridia galli* (Schrank, 1788), *Freeborn*, 1923 and *A. columbae* (Linstow, 1903). *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 24(2), 349-355.
- BELETE, A., ADDIS, M., AYELE, M., (2016): Review on major gastrointestinal parasites that affect chickens, *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare* Vol. 6, No. 11, 11-21.
- CHESTER, F. D., and ROBIN, M. D., (1900): Entero-hepatitis or blackhead of fowls, 12th Annual Report of the Delaware Agricultural Experiment Station, June 30.
- CORTES, P.L., CHIN, R.P., BLAND, M.C., CRESPO, R. & SHIVAPRASAD, H.L. (2004): Histomoniasis in the bursa of fabricius of chickens. *Avian Diseases*, 48(3), 711-715.
- CUPO, K. L., and BECKSTEAD, R. B. (2019): *Heterakis gallinarum*, the cecal nematode of gallinaceous birds: a critical review, *Avian Diseases*, 63(3), 381-388.
- CURTICE, C. (1907): Notes on experiments with blackhead of turkeys. U.S.D.A. Circ. 119
- CUSHMAN, S. (1893): The production of turkeys. Rhode Island Agricultural Experiment Station Bulletin, 25
- ECKERT, J. (2008): Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. 2., vollst. überarb. Aufl., Enke, Stuttgart. Kapitel 2, 37-41.; Kapitel 3, 325-330.
- EDGAR, S. A., and SIEBOLD, C. T., (1964): A new coccidium of chickens, *Eimeria mivati* sp.n. (Protozoa: *Eimeriidae*) with details of its life history. *The Journal of Parasitology*, 50, 193-204.
- ESQUENET, C., P., DE HERDT, H., DE BOSSCHERE, S., RONSMANS, R., DUCATELLE, and J. VAN, (2003): An outbreak of histomoniasis in free-range layer hens. *Avian Pathology: journal of the W.V.P.A*, 32(3), 305-308.
- GANAPATHY, K., SALAMAT, M.H., LEE, C.C. & JOHARA, M.Y. (2000): Concurrent occurrence of salmonellosis, colibacillosis and histomoniasis in a broiler flock fed with antibiotic-free commercial feed. *Avian Pathology: journal of the W.V.P.A*, 29(6), 639-642.

- GRABENSTEINER, E. and HESS, M. (2006): PCR for the identification and differentiation of *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* and *Blastocystis spp*, *Veterinary Parasitology*, 142(3-4), 223-230.
- GRAFL, B., LIEBHART, D., WINDISCH, M., IBESICH C., HESS, M., (2011): Seroprevalence of *Histomonas meleagridis* in pullets and laying hens determined by ELISA, *The Veterinary Record*, 168(6), 160.
- GRAYBILL, H. W. & SMITH, T. (1920): Production of fatal blackhead in turkeys by feeding embryonated eggs of *Heterkis papillosa*. *The Journal of Experimental Medicine*, 31(5), 647-655.
- HAFEZ, H. M., MAZAHERI, A., PRUSAS, C., BOHLAND K., POPPEL M., and SCHULZ D., (2001): Actual infectious diseases in layer flocks kept in alternative rearing systems. *Tierärztliche Praxis* 29, 168-174.
- HAUCK, R., HAFEZ, M., (2012): Experimental infections with the protozoan parasite *Histomonas meleagridis*: a review, *Parasitology Research*, 112(1), 19-34.
- HESS M., GRABENSTEINER E. & LIEBHART D. (2006): Rapid transmission of the protozoan parasite *Histomonas meleagridis* in turkeys and specific pathogen free chickens following cloacal infection with a mono-eukaryotic culture, *Avian Pathology : journal of the W.V.P.A.*, 35(4), 280-285.
- HESS, M., LIEBHART, D., BILIC, I., GANAS, P. (2015): *Histomonas meleagridis* – New insights into an old pathogen, *Veterinary Parasitology*, 208(1-2), 67-76.
- HESS, M. & MCDUGALD, L.R. (2013) Diseases of poultry: Histomoniasis (blackhead) and other protozoan diseases of the intestinal tract. In D. E. Swayne, J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, D. L. Suarez, & V. Nair (Eds.), 13th edn (pp.1172-1182). Wiley-Blackwell: Ames, IA.
- HUBER, K., CHAUVE, C., & ZENNER, L. (2005). Detection of *Histomonas meleagridis* in turkeys cecal droppings by PCR amplification of the small subunit ribosomal DNA sequence. *Veterinary Parasitology*, 131(3-4), 311–316.
- HUSSAIN, I., JASKULSKA, B., HESS, M., & BILIC, I. (2015). Detection and quantification of *Histomonas meleagridis* by real-time PCR targeting single copy genes. *Veterinary Parasitology*, 212(3-4), 382–388.

- JACOBS, R.D., HOGSETTE, J.A., BUTCHER, J.D. (2003): Nematode parasites of poultry (and where to find them). The Institute of Food and Agricultural Sciences (IFAS) series PS18, University of Florida, USA, 1-3.
- JOHNSON, W. T. (1930): Coccidiosis of the chicken with special reference to species. Station Bulletin Oregon Agriculture Experiment Station 358
- LANDMAN, W. J. M., TER VEEN, C., VAN DER HEIDJEN H. M. J. F., KLINKENBERG, D. (2015): Quantification of parasite shedding and horizontal transmission parameters in *Histomonas meleagridis*-infected turkeys determined by real-time quantitative PCR, Avian Pathology: journal of the W.V.P.A, 44(5), 358-365.
- LEE, D.L. (1969): The structure and development of *Histomonas meleagridis* (*Masticamoebidae*: Protozoa) in the female reproductive tract of its host, *Heterakis gallinae* (Nematoda). Parasitology, 59(3), 877-884.
- LEE, D.L. (1971): The structure and development of the protozoon *Histomonas meleagridis* in the male reproductive tract of its intermediate host, *Heterakis gallinarum* (Nematoda). Parasitology, 63(3), 439-445.
- LEESON, S., und SUMMER J.D. (2009): Internal parasites: broiler breeder production; 1st edition by Nottingham University Press in 2000, University Books, Guelph, Ontario, Canada
- LEVINE, P. P. (1938): *Eimeria hagani* n. sp. (Protozoa: *Eimeriidae*) a new coccidium of the chicken. Cornell Veterinarian, 28, 263-266.
- LEVINE, P. P. (1942): A new coccidium pathogenic for chickens, *Eimeria brunetti* n. sp. (Protozoa: *Eimeriidae*). Cornell Veterinarian, 32, 430-439.
- LEVINE, N.D. (1973): Protozoan parasites of domestic animals and of man, 2nd ed. Burgess, Minneapolis.
- LIEBHART, D. ZAHOR, M., A., PROKOFIEVA, I., HESS, M., (2011): Safety of avirulent histomonads to be used as a vaccine determined in turkeys and chickens, Poultry Science, 90(5), 996-1003.
- LIEBHART, D., GANAS, P., SULEJMANOVIC, T., HESS, M., (2017): Histomonosis in poultry: previous and current strategies for prevention and therapy, Avian Pathology: journal of the W.V.P.A, 46(1), 1–18.

LÖSCHER, W. (Hrsg) (2002): Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin, Kapitel 16, 418-420.

LUND, E. E., WEHR, E. E., ELLI, D., J., (1966): Earthworm transmission of heterakis and histomonas to turkeys and chickens. The Journal of Parasitology, 52(5), 899-902.

LUND, E. E. (1967): Response of four breeds of chickens and one breed of turkey to experimental Heterakis and Histomonas Infektions. Avian Diseases, 11(3), 491-502.

LUND, E. E., and CHUTE A. M., (1970): Relative importance of young and mature turkeys and chickens in contaminating soil with histomonas-bearing Heterakis eggs. Avian Diseases, 14(2), 342-348.

LUND, E.E., A.M. CHUTE (1973): Two consecutive transfers of *Heterakis gallinarum*: Effects on caecal worms and on histomonads. Journal of Helminthology, 47(2), 141-153.

MCDUGALD LR. (2005): Blackhead disease (histomoniasis) in poultry: a critical review. Avian Diseases, 49(4), 462-476.

MCDUGALD, L.R. (2013) Diseases of poultry: Internal parasites. In D. E. Swayne, J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, D. L. Suarez, & V. Nair (Eds.), 13th edn (pp.1172-1182). Wiley-Blackwell: Ames, IA.

MCNEIL, E., HINSHAW W.R., and KOFOID C.A. (1941): *Hexamita meleagridis* sp. nov. from the turkey. American Journal of Hygiene, 34, 71-82.

NCBI Taxonomy Browser (Zugriff 18.03.2020):

NCBI:txid135588, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=135588>

NCBI:txid65465, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=65465>

NGUYEN, D.T., BILIC, I., JASKULSKA, B., HESS, M., LE, D.Q., LE HUA, L.N., HUYNH, V.V., NGUYEN, S.T. & VU-KHAC, H. (2015): Prevalence and genetic characterization of *Histomonas meleagridis* in chickens in Vietnam. Avian Diseases, 59(2), 309-314.

O'DONOGHUE, P.J. (1995): *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. International Journal for Parasitology, 25(2), 139-195.

ÖSTERREICHISCHES ARZNEIMITTELSPEZIALITÄTENREGISTER (Zugriff 20.05.2020):

https://aspreregister.basg.gv.at/aspreregister/faces/aspreregister.jspx?_afLoop=1524992153056991&_afWindowMode=0&_adf.ctrl-state=qccu2u0tv_4

- PERMIN, A., and HANSEN, J.W. (1998): Diagnostic methods: epidemiology, diagnosis and control of poultry parasites. FAO animal health manual, No 4. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy
- POPP, C., HAUCK, R., BALCZULAT, S. & HAFEZ, H.M. (2011): Recurring histomonosis on an organic farm. *Avian Diseases*, 55(2), 328-330.
- RAILLIET, A. and LUCET, A. (1891): Note sur quelques especes de coccidies encore peu etudiees. *Bulletin de la Société zoologique de France*, 16, 246-250.
- RAMADAN, H.H., Znada, N.Y.A. (1992): Morphology and life history of *Ascaridia galli* in the domestic fowl that are raised in Jeddah. *Journal of King Saud University – Science*, 4, 87-99.
- RASCH, B., FRIESE, M., HOFMANN, W. & NAUMANN, E. (2014): *Quantitative Methoden 2: Einführung in die Statistik für Psychologen und Sozialwissenschaftler*. (4. Auflage), Berlin, Springer Verlag.
- REID, W.M., J.L. MABON, and W.C. HARSHBURGER. (1973): Detection of worm parasites in chicken eggs by candling. *Poultry Science*, 52(6), 2316–2324.
- RIDDELL, C., and A. GAJADHAR. (1988): Cecal and hepatic granulomas in chickens associated with *Heterakis gallinarum* infection. *Avian Diseases*, 32(4), 836-838.
- SCHNIEDER, T. (Hrsg) (2006): *Veterinärmedizinische Parasitologie*. 6., vollst. überarb. u. erw. Aufl., Parey, Stuttgart. Kapitel 7, 576-630.
- SMITH, T. (1895): An infectious disease among turkeys caused by Protozoa (infectious enterohepatitis). US Department. Agriculture. Bureau. Animal. Industry. Bulletin, No. 8, 7.
- SULEJMANOVIC, T., TURBLIN, V. BILIC, I., JASKULSKA, B., HESS, M., (2019): Detection of *Histomonas meleagridis* DNA in dust samples obtained from apparently healthy meat turkey flocks without effect on performance, *Avian Pathology: journal of the W.V.P.A*, 48(4), 329-333.
- TYZZER, E. E. (1929): Coccidiosis in gallinaceous birds, *American Journal of Epidemiology*, Volume 10, Issue 2.
- TYZZER, E. E. (1934): Studies on histomoniasis, or „blackhead“ infektion, in the chicken and the turkey. *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences*, 69, 189-264.
- URQUART, G.M., ARMOUR J., DUNCAN J.L., DUNN A.M., and JENNINGS F.W. (1996): *Veterinary Parasitology*; 2nd Edition, Blackwell Science.

9. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: Taxonomische Einordnung von <i>H. gallinarum</i> (NCBI:txid65465)	10
Tabelle 2: Wichtigen Protozoen bei Hühnern und deren Lokalisation im Wirtstier	12
Tabelle 3: Taxonomische Einordnung von <i>H. meleagridis</i> (NCBI:txid135588)	13
Tabelle 4: Anzahl der gesammelten Einzeltierkotproben pro Genotyp sowie Sammelzeitpunkt	17
Tabelle 5: Sequenzen der Primer und der Sonde, welche in der qPCR verwendet wurden (Sulejmanovic et al. 2019).....	20
Tabelle 6: Werte der einzelnen Konzentrationen des Standards	22
Tabelle 7: Statistische Daten.....	28
Abbildung 1: Histomonaden aus einer Kultur im Ausstrich (Giemsafärbung, Balken = 50 µm)	13
Abbildung 2: Standardkurve der qPCR bei bekannter Histomonadenkonzentration	23
Abbildung 3: Exkretion von <i>H. meleagridis</i> bei Lohmann Brown Plus-Hühnern	24
Abbildung 4: Exkretion von <i>H. meleagridis</i> bei Lohmann Dual-Hühnern	25
Abbildung 5: Exkretion von <i>H. meleagridis</i> bei Ross 308-Hühnern.....	26
Abbildung 6: Exkretion von <i>H. meleagridis</i> (Genotypen vergleichend)	27

10. Anhang: Datensätze der Studie

10.1. Lohmann Brown Plus

Tabelle 8: Daten der qPCR gesamt von Lohmann Brown Plus

Proben Nr.	Woche post infektionem	qPCR1 - Cq (ΔR)	qPCR2 - Cq (ΔR)	
7	2	0	0	Kontrolltier
8	2	0	0	infiziert
9	2	0	0	infiziert
16	2	0	0	Kontrolltier
17	2	40.23	39.93	infiziert
18	2	0	0	infiziert
25	2	0	0	Kontrolltier
26	2	0	0	infiziert
27	2	0	0	infiziert
34	2	0	0	Kontrolltier
35	2	0	0	infiziert
36	2	0	0	infiziert
53	3	0	0	Kontrolltier
54	3	0	0	Kontrolltier
55	3	0	0	Kontrolltier
56	3	0	0	Kontrolltier
57	3	0	0	infiziert
58	3	39.29	38.3	infiziert
59	3	39.65	40	infiziert
60	3	36.63	36.24	infiziert
77	4	0	0	Kontrolltier
78	4	0	0	Kontrolltier
79	4	0	0	Kontrolltier
80	4	0	0	Kontrolltier
81	4	36.9	37.02	infiziert
82	4	35.23	35.78	infiziert
83	4	36.21	36.71	infiziert
84	4	36.41	35.52	infiziert
91	5	0	0	Kontrolltier
92	5	37.78	37.75	infiziert
93	5	39.92	39.4	infiziert
100	5	0	0	Kontrolltier
101	5	40.25	39.29	infiziert
102	5	37.4	38.28	infiziert
109	5	0	0	Kontrolltier

110	5	39.48	39.35	infiziert
111	5	0	0	infiziert
118	5	0	0	Kontrolltier
119	5	38.11	37.55	infiziert
120	5	42.15	39.65	infiziert
126	5	35.02	33.8	infiziert
143	6	0	0	Kontrolltier
144	6	0	0	Kontrolltier
145	6	0	0	Kontrolltier
146	6	0	0	Kontrolltier
147	6	40.26	39.99	infiziert
148	6	35.63	36.6	infiziert
149	6	35.64	35.08	infiziert
150	6	35.73	36.36	infiziert
167	7	0	0	Kontrolltier
168	7	0	0	Kontrolltier
169	7	0	0	Kontrolltier
170	7	0	0	Kontrolltier
171	7	38.28	38.13	infiziert
172	7	36.81	38.39	infiziert
173	7	35.91	36.14	infiziert
174	7	39.45	39.32	infiziert
191	8	0	0	Kontrolltier
192	8	0	0	Kontrolltier
193	8	0	0	Kontrolltier
194	8	0	0	Kontrolltier
195	8	34.73	35.19	infiziert
196	8	0	0	infiziert
197	8	35.09	34.5	infiziert
198	8	40.69	39.8	infiziert
205	9	0	0	Kontrolltier
206	9	33.36	32.77	infiziert
207	9	36.14	35.72	infiziert
214	9	0	0	Kontrolltier
215	9	34.68	35.13	infiziert
216	9	38.7	36.71	infiziert
223	9	0	0	Kontrolltier
224	9	35.55	35.58	infiziert
225	9	34.72	35.18	infiziert
232	9	0	0	Kontrolltier
233	9	37.44	36.59	infiziert
234	9	38.37	39.93	infiziert

10.2. Lohmann Dual

Tabelle 9: Daten der qPCR gesamt von Lohmann Dual

Proben Nr.	Woche post infektionem	qPCR1 - Cq (ΔR)	qPCR2 - Cq (ΔR)	
4	2	0	0	Kontrolltier
5	2	35.99	38.18	infiziert
6	2	0	0	infiziert
13	2	0	0	Kontrolltier
14	2	0	0	infiziert
15	2	40.58	35.43	infiziert
22	2	0	0	Kontrolltier
23	2	36.83	38.24	infiziert
24	2	0	0	infiziert
31	2	0	0	Kontrolltier
32	2	0	0	infiziert
33	2	41.95	40.12	infiziert
45	3	0	0	Kontrolltier
46	3	0	0	Kontrolltier
47	3	0	0	Kontrolltier
48	3	0	0	Kontrolltier
49	3	0	0	infiziert
50	3	37.52	37.79	infiziert
51	3	0	0	infiziert
52	3	37.85	38.54	infiziert
69	4	0	0	Kontrolltier
70	4	0	0	Kontrolltier
71	4	0	0	Kontrolltier
72	4	0	0	Kontrolltier
73	4	36.21	36.6	infiziert
74	4	36.1	35.82	infiziert
75	4	37.58	36.3	infiziert
76	4	36.03	36.05	infiziert
88	5	0	0	Kontrolltier
89	5	0	0	infiziert
90	5	38.57	39.68	infiziert
97	5	0	0	Kontrolltier
98	5	40.29	39.49	infiziert
99	5	0	0	infiziert
106	5	0	0	Kontrolltier
107	5	0	0	infiziert

108	5	37.92	40.34	infiziert
115	5	0	0	Kontrolltier
116	5	38.47	37.92	infiziert
117	5	36.63	36.33	infiziert
122	5	0	0	infiziert
125	5	36.1	35.55	infiziert
135	6	0	0	Kontrolltier
136	6	0	0	Kontrolltier
137	6	0	0	Kontrolltier
138	6	0	0	Kontrolltier
139	6	39.88	38.76	infiziert
140	6	40.16	36.8	infiziert
141	6	37.48	37.8	infiziert
142	6	40.34	38.12	infiziert
159	7	0	0	Kontrolltier
160	7	0	0	Kontrolltier
161	7	0	0	Kontrolltier
162	7	0	0	Kontrolltier
163	7	0	0	infiziert
164	7	39.79	40.09	infiziert
165	7	37.57	39.01	infiziert
166	7	35.48	35.41	infiziert
183	8	0	0	Kontrolltier
184	8	0	0	Kontrolltier
185	8	0	0	Kontrolltier
186	8	0	0	Kontrolltier
187	8	35.98	34.7	infiziert
188	8	39.35	37.04	infiziert
189	8	39.04	37.89	infiziert
190	8	34.88	34.63	infiziert
202	9	0	0	Kontrolltier
203	9	37.57	35.81	infiziert
204	9	36.88	36.66	infiziert
211	9	0	0	Kontrolltier
212	9	36.17	35.39	infiziert
213	9	38.36	38.25	infiziert
220	9	0	0	Kontrolltier
221	9	40.16	38.62	infiziert
222	9	35.58	35.28	infiziert
226	9	39.35	40.31	infiziert
229	9	0	0	Kontrolltier
230	9	39.96	36.84	infiziert

231	9	33.93	33.02	infiziert
-----	---	-------	-------	-----------

10.3. Ross 308

Tabelle 10: Daten der qPCR gesamt von Ross 308

Proben Nr.	Woche post infektionem	qPCR1 - Cq (ΔR)	qPCR2 - Cq (ΔR)	
1	2	0	0	Kontrolltier
2	2	39.67	39.08	infiziert
3	2	39.16	39.73	infiziert
10	2	0	0	Kontrolltier
11	2	0	0	infiziert
12	2	42.38	39.12	infiziert
19	2	0	0	Kontrolltier
20	2	41.39	39.76	infiziert
21	2	0	0	infiziert
28	2	0	0	Kontrolltier
29	2	0	0	infiziert
30	2	39.32	40.12	infiziert
37	3	0	0	Kontrolltier
38	3	0	0	Kontrolltier
39	3	0	0	Kontrolltier
40	3	0	0	Kontrolltier
41	3	0	0	infiziert
42	3	0	0	infiziert
43	3	0	0	infiziert
44	3	0	0	infiziert
61	4	0	0	Kontrolltier
62	4	0	0	Kontrolltier
63	4	0	0	Kontrolltier
64	4	0	0	Kontrolltier
65	4	35.71	35.93	infiziert
66	4	35.08	35.25	infiziert
67	4	36.61	36.64	infiziert
68	4	35.55	34.57	infiziert
85	5	0	0	Kontrolltier
86	5	0	0	infiziert
87	5	39.21	40.56	infiziert
94	5	0	0	Kontrolltier
95	5	41.56	40.75	infiziert

103	5	0	0	Kontrolltier
104	5	0	0	infiziert
105	5	0	0	infiziert
112	5	0	0	Kontrolltier
113	5	39.25	40.31	infiziert
114	5	39.89	40.42	infiziert
121	5	0	0	infiziert
124	5	0	0	infiziert
127	6	0	0	Kontrolltier
128	6	0	0	Kontrolltier
129	6	0	0	Kontrolltier
130	6	0	0	Kontrolltier
131	6	0	0	infiziert
132	6	38.74	40.4	infiziert
133	6	0	0	infiziert
134	6	40.03	40.04	infiziert
151	7	0	0	Kontrolltier
152	7	0	0	Kontrolltier
153	7	0	0	Kontrolltier
154	7	0	0	Kontrolltier
155	7	38.1	39.1	infiziert
156	7	40.39	39.92	infiziert
157	7	38.64	36.89	infiziert
158	7	39.03	0	infiziert
175	8	0	0	Kontrolltier
176	8	0	0	Kontrolltier
177	8	0	0	Kontrolltier
178	8	0	0	Kontrolltier
179	8	0	0	infiziert
180	8	0	0	infiziert
181	8	39.32	38.87	infiziert
182	8	0	0	infiziert
199	9	0	0	Kontrolltier
200	9	39.22	38.45	infiziert
201	9	38.94	37.47	infiziert
208	9	0	0	Kontrolltier
209	9	35.51	35.54	infiziert
210	9	39.09	40.17	infiziert
217	9	0	0	Kontrolltier
218	9	39.32	38.57	infiziert
219	9	36.96	35.72	infiziert
227	9	37.33	36.09	infiziert

228	9	39.37	39.48	infiziert
-----	---	-------	-------	-----------