

Aus dem Institut für Tierpathologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Erster Nachweis von *Sarcocystis calchasi*
bei Habichten (*Accipiter gentilis*) und
Sperbern (*Accipiter nisus*) in Norddeutschland
und Beschreibung zweier neuer, nah verwandter
Sarcocystis-Arten**

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

vorgelegt von
Lena Olias
Tierärztin aus Itzehoe

Berlin 2018
Journal-Nr.: 4062

Aus dem Institut für Tierpathologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Erster Nachweis von *Sarcocystis calchasi* bei Habichten (*Accipiter gentilis*) und
Sperbern (*Accipiter nisus*) in Norddeutschland und Beschreibung zweier neuer,
nah verwandter *Sarcocystis*-Arten**

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

vorgelegt von
Lena Olias
Tierärztin aus Itzehoe

Berlin 2018

Journal-Nr.: 4062

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Achim D. Gruber, PhD
Zweiter Gutachter: PD Dr. med. vet. Jürgen Krücken
Dritter Gutachter: PD Dr. med. vet. Kerstin Müller

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

hawks, sarcocystis calchasi, epidemiology, histopathology, electron microscopy,
polymerase chain reaction, germany

Tag der Promotion: 26.09.2018

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86387-936-5

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2018

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

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 2018 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	IV
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT	3
2.1 Parasiten der Apicomplexa.....	3
2.2 Aviäre Sarkosporidien.....	6
2.3 Lebenszyklus der Sarkosporidien.....	11
2.4 Lebenszyklus von <i>S. calchasi</i>	14
2.5 Pathophysiologie der Sarkosporidiose	17
2.6 Differentialdiagnosen zur zerebralen Sarkosporidiose der Taube.....	18
2.7 Wirtsspezifität aviärer Sarkosporidien	21
2.8 Speziesidentifikation der Sarkosporidien	22
2.9 Zugrundeliegende Hypothese dieser Arbeit	25
3. MATERIAL UND METHODEN	27
3.1 Material.....	27
3.1.1 Herkunft von Habicht, Ringeltauben und Sperbern	27
3.1.2 Chemikalien und Reagenzien	28
3.1.3 Angesetzte Puffer	29
3.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	29
3.1.5 Geräte	29
3.1.6 Software.....	30
3.2. Methoden.....	31
3.2.1 Histopathologische Untersuchung.....	31
3.2.2 Elektronenmikroskopische Untersuchung.....	31
3.2.3 DNA-Extraktion aus Gewebe und Parasiten	32
3.2.4 Universelle Primer für PCR-Reaktionen	33
3.2.5 Herstellung von PCR-Reaktionsgemisch	35
3.2.6 PCR-Protokoll	36
3.2.7 Analyse der PCR-Produkte.....	36
3.2.8 Phylogenetische Analyse der sequenzierten PCR-Produkte	37
3.2.9 Entwicklung einer speziesspezifischen <i>semi-nested</i> PCR.....	38
3.2.10 Durchführung der speziesspezifischen <i>semi-nested</i> PCR.....	40

3.2.11	Analyse der <i>semi-nested</i> PCR-Produkte.....	40
4.	ERGEBNISSE	41
4.1	Histopathologische und elektronenmikroskopische Analyse einer neuen <i>Sarcocystis</i> spp. aus der Muskulatur von Ringeltauben	41
4.2	Morphologie von Sarkosporidienstadien im Darm von Sperbern	47
4.3	Sequenzanalyse von Sarkosporidien aus Ringeltauben und Sperbern identifiziert zwei neue Spezies	48
4.4	Zusammenfassung der Taxonomie der hier beschriebenen Spezies aus Ringeltauben und Sperbern	55
4.5	Histologisch zeigen Habichte und Sperber eine hohe Befallsrate mit Sarkosporidien	56
4.6	Neu entwickeltes nested-PCR Verfahren identifiziert <i>S. calchasi</i> und unterscheidet nächst verwandte Sarkosporidien	57
4.7	Hohe Befallsrate von Habichten und Sperbern mit drei verschiedenen Sarkosporidienarten	59
4.8	<i>Sarcocystis</i> sp. ex <i>A. nisus</i> kommt in verschiedenen Sequenzvarianten vor.....	64
5.	DISKUSSION	65
5.1	Erkenntnisse aus der phylogenetischen Analyse aviärer Sarkosporidien	65
5.2	Speziesspezifische <i>semi-nested</i> PCR als Grundlage für retrospektive, epidemiologische und diagnostische Untersuchungen.....	68
5.3	Analyse der Wirtsspezifität als Schlüssel zum Verständnis der hohen Virulenz von <i>S. calchasi</i>	69
5.4	Prävalenz von <i>S. calchasi</i> im Endwirt	72
5.5	Ausblick	77
6.	ZUSAMMENFASSUNG	81
7.	SUMMARY	83
8.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	85
9.	TABELLENVERZEICHNIS	86
10.	LITERATUR	87
11.	PUBLIKATIONEN AUS DIESER ARBEIT IN FACHZEITSCHRIFTEN MIT PEER REVIEW-SYSTEM	103

12.	DANKSAGUNG	104
13.	SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	105

I VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

Abb.	<u>A</u> bbildung
APMV-1	<u>A</u> viäres <u>P</u> aramyxovirus 1
BLAST	engl. <u>B</u> asic <u>L</u> ocal <u>A</u> lignment <u>S</u> earch <u>T</u> ool
bp	<u>B</u> asenpaare
C	Konoid (engl. <u>c</u> onoid)
EM	<u>E</u> lektronen <u>m</u> ikroskop
EPM	engl. <u>E</u> quine <u>P</u> rotozoal <u>M</u> yceloencephalitis
engl.	<u>E</u> nglisch/ aus dem Englischen
FFPE	<u>F</u> ormalin- <u>f</u> ixiert und <u>P</u> araffin- <u>e</u> ingebettet
gDNA	genomische DNA
GS	engl. <u>g</u> round <u>s</u> ubstance
H5N1	<u>H</u> ämagglutinin <u>5</u> , <u>N</u> euraminidase <u>1</u>
HC	Wirtszelle (engl. <u>h</u> ost <u>c</u> ell)
HE	<u>H</u> aematoxylin und <u>E</u> osin
HPAIV	<u>H</u> ochpathogenes <u>a</u> viäres <u>I</u> nfluenza <u>v</u> irus
ITS1	Spacer-DNA-Sequenz (engl. <u>I</u> nternal <u>t</u> ranscribed <u>s</u> pacer 1)
MCL	engl. <u>M</u> aximum <u>C</u> omposite <u>L</u> ikelihood
MEGA4	engl. <u>M</u> olecular <u>E</u> volutionary <u>G</u> enetics <u>A</u> nalysis
ML	engl. <u>M</u> aximum <u>L</u> ikelihood
MN	engl. <u>m</u> icronemes
MP	engl. <u>M</u> aximum <u>P</u> arsimony
MTOC	engl. <u>M</u> icro <u>t</u> ube- <u>o</u> rganizing <u>c</u> enter
N	<u>N</u> ukleus
NDV	<u>N</u> ewcastle <u>D</u> isease <u>V</u> irus

pAPMV-1	Tauben-Paramyxovirus 1 (engl. <i>Pigeon</i> APMV-1)
PC	Zystenwand (engl. <i>Primary cyst wall</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PE	engl. <i>pellicle</i>
PMV	<u>Paramyxovirus</u>
Publ.	<u>Publikation</u>
p.i.	post <u>infectionem</u>
RH	Rhoptrien (engl. <i>rhoptries</i>)
rRNA	<u>ribosomale</u> RNA
RT-PCR	<u>Reverse</u> <u>Transkription</u> -Polymerase Kettenreaktion
S.	<u>Sarcocystis</u>
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
SSU	engl. <i>small subunit</i>
Syn	<u>Synonym</u>
ZNS	<u>Zentrales</u> <u>Nervensystem</u>

1. EINLEITUNG

Sarkosporidien (Stamm: Apicomplexa, Familie: Sarcocystidae) gehören zu den weltweit am weitesten verbreiteten protozoären Parasiten der Wirbeltiere (Dubey, 2015). Das Wirtsspektrum der über 200 bislang beschriebenen Spezies erstreckt sich über Säugetiere, Vögel, Reptilien und Fische (Odening, 1998). Die wirtschaftliche und epidemiologische Bedeutung ist groß, da einige Spezies bedeutsame Pathogene in der Nutztier-, Pferde- oder Vogelhaltung darstellen und zum Teil auch zoonotischen Charakter haben (Dubey, 2015).

Sarkosporidien wurden zum ersten Mal 1843 von Miescher erwähnt, der die von ihm in der Skelettmuskulatur der Hausmaus gefundenen Zysten als Mieschersche Schläuche bezeichnete (Miescher, 1843). Lange Zeit war unklar, ob es sich bei Sarkosporidien um Protozoen oder Pilze handelt (Fayer, 2004), bis 1967 mittels Elektronenmikroskopie Bradyzoiten in den Zysten entdeckt wurden, so dass eine Zuordnung zum Stamm der Apicomplexa erfolgte (Senaud, 1967). Erst Anfang der 1970er Jahre wurde dann der zweiwirtige parasitäre Zyklus mit sämtlichen Entwicklungsstadien aufgeklärt (Mehlhorn and Heydorn, 1978). Über aviäre *Sarcocystis* (*S.*)-Arten ist bisher nur wenig bekannt. Während die bisherigen Studien lediglich die Prävalenz bei verschiedenen Vogelspezies sowie die lichtmikroskopisch erkennbare Morphologie der Zysten beschreiben, wurden die Lebenszyklen und die Ultrastruktur kaum erforscht und molekularbiologische Untersuchungen erst in jüngster Vergangenheit durchgeführt. Unter den aviären *Sarcocystis*-Arten finden sich für den Zwischenwirt hochvirulente Spezies, die zu fatalen Krankheitsausbrüchen führen können. So ist beispielsweise *S. falcatula* für größere Verluste unter in den USA gehaltenen Altweltpapageien bekannt (Clubb and Frenkel, 1992). *S. neurona* befällt neben Vögeln auch Pferde und führt bei diesen zu schwerwiegenden, zum Teil tödlich verlaufenden zentralnervösen Erkrankungen (Dubey et al., 2001a; Mansfield et al., 2008). Bei einer Seroprävalenz von 45 - 60 % in den USA ist eine Infektion mit diesem Parasit bei Pferden häufig (Bentz et al.,

1997; Rossano et al., 2001; Saville et al., 1997). Kürzlich wurde mit *Sarcocystis calchasi* eine weitere hochvirulente Art entdeckt und deren Lebenszyklus aufgeklärt (Olias et al., 2010b). Ähnlich wie *S. neurona* bei Pferden löst *S. calchasi* eine zentralnervöse Erkrankung unter Haustauben aus und hat in den vergangenen Jahren zu größeren Verlusten in deutschen Brieftaubenzuchten geführt. Bisher waren für *S. calchasi* nur die Haustaube (*Columba livia* f. *domestica*) als Zwischenwirt und der Habicht (*Accipiter g. gentilis*) als Endwirt bekannt (Olias et al., 2010b). Unklar war, ob der Parasit auch andere Wirte infiziert, wie hoch seine Prävalenz im Endwirt ist und wie groß sein Verbreitungsgebiet ist. Ziel des vorliegenden Dissertationsprojektes war es daher, eine geeignete labortechnische Methode zu entwickeln, die es erlaubt, diesen Fragen nachgehen zu können und darüber hinaus Antworten auf die Frage zu finden, inwieweit die hohe Virulenz von *S. calchasi* mit einer niedrigen Wirtsspezifität korreliert.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Parasiten der Apicomplexa

Sarkosporidien sind unter Wirbeltieren weit verbreitete einzellige Parasiten (Dubey, 2015). Sarkosporidien gehören zum Stamm der Apicomplexa (Abbildung 1), welche eine Gruppe sehr diverser Organismen von vermutlich über 5000 Arten darstellen (Levine, 1988). Kürzlich durchgeführte genetische Untersuchungen gehen jedoch von einer weit größeren Diversität von über 1 Million Arten aus (Pawlowski et al., 2012).

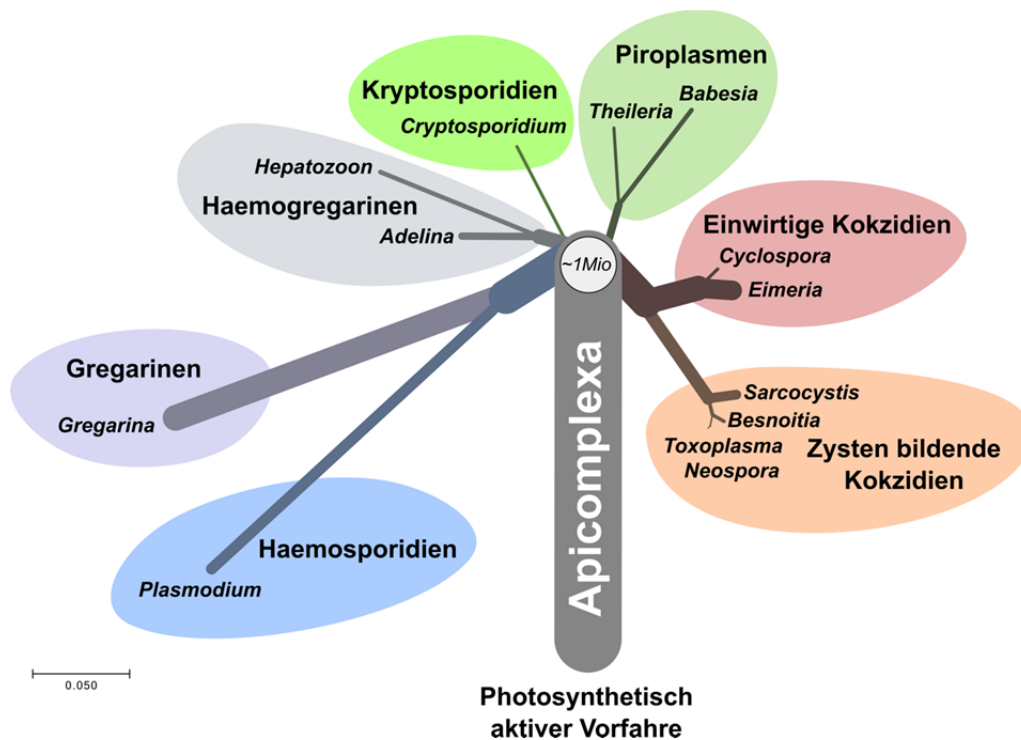


Abbildung 1. Phylogenetischer Stammbaum der Apicomplexa

Das Genus *Sarcocystis* zeigt sich am nächsten verwandt mit anderen Zysten bildenden Parasiten wie *Toxoplasma gondii*. Schematische Darstellung basierend auf *unrooted neighborhood joining tree* partieller 18S rRNA Sequenzen generiert mit MEGA4.

Abbildung: L. Olias

Die meisten Parasiten der Apicomplexa infizieren eine große Bandbreite von Wirtstieren. Sowohl Wirbellose (unter anderem Insekten und Würmer) als auch kaltblütige und warmblütige Wirbeltiere werden befallen (Bartošová-Sojková et al., 2015). Bei den Wirbellosen überwiegen allerdings die Gregarinen, welche keine Wirbeltiere befallen (<http://tolweb.org/Gregarina/124806>). Es wird heute davon ausgegangen, dass der intrazelluläre beziehungsweise epizelluläre Lebensstil der Parasiten einige Male im Laufe der Evolution unabhängig voneinander entstanden ist (Bartošová-Sojková et al., 2015).

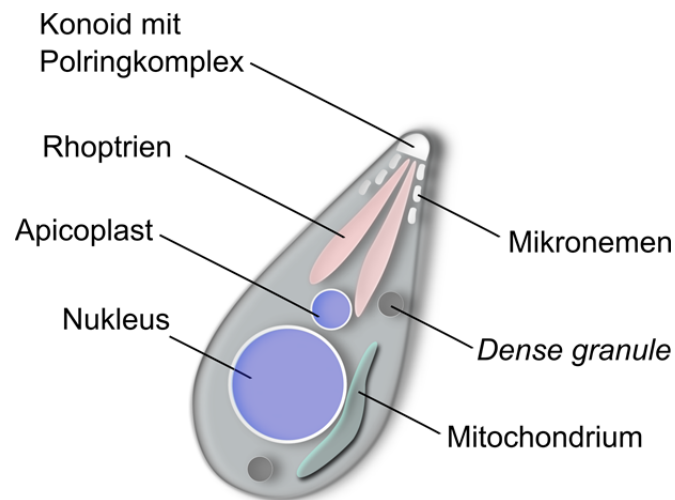


Abbildung 2. Ultrastrukturelle Charakteristika der Apicomplexa am Beispiel eines Tachyzoiten von *Toxoplasma gondii*

Abbildung: L. Olias

Ein Vergleich der Apicomplexa mit ihrem nächst verwandten Taxon, den freilebenden und Photosynthese betreibenden Chromerida sowie den Colpodellida, lässt viele gemeinsame evolutionäre Anpassungsmerkmale erkennen (Janouškovec et al., 2015). Alle Apicomplexa verfügen über bestimmte Ultrastrukturmerkmale, die sich am apikalen Pol der Parasiten befinden (Abbildung 2) und sowohl sekretorische Organellen wie Rhoptrien und Mikronemen als auch ein *microtubule-organizing center* (MTOC; Konoid) umfassen (Morrisette and Sibley, 2002).

Die am umfassendsten untersuchten Parasiten der Apicomplexa sind verständlicherweise jene, welche Erkrankungen beim Menschen auslösen. Die größte Bedeutung spielen hier *Plasmodium* spp., welche Malaria auslösen (Miller et al., 2013), *Toxoplasma gondii* (Weiss und Dubey, 2009), die Ursache der Toxoplasmose, und *Cryptosporidium* spp. als Auslöser einer schwerwiegenden Durchfallerkrankung (Checkley et al., 2015). Bei Nutztieren haben insbesondere *Eimeria* spp., *Theileria* spp. sowie *Cryptosporidium* spp. eine große wirtschaftliche Bedeutung (Fayer und Xiao, 2007; Gardner et al., 2005; Sharman et al., 2010). In der Wirtsanpassung gibt es unter den Apicomplexa große Unterschiede. Beispielsweise kann *T. gondii* nahezu jedes warmblütige Wirbeltier infizieren und scheint auch keine Wirtszellpräferenz aufzuweisen (Kim und Weiss, 2013). Ganz im Gegensatz dazu sind die vielfältigen *Eimeria* spp. und *Sarcocystis* spp. sehr stark wirtsadaptiert und infizieren pro Parasitenart ein sehr kleines Wirtsspektrum, welches aus einer oder sehr wenigen nah verwandten Wirtsspezies besteht. In einigen Fällen kann es jedoch zur Infektion eines ausgedehnteren Wirtsspektrums kommen (Beispiel *Sarcocystis neurona*, siehe unten), was dann in der Regel mit einer erhöhten Virulenz des Parasiten für das Wirtstier einhergeht (Dubey, 2015; Dubey et al., 2001a). Die Zahl der vorkommenden *Eimeria* und *Sarcocystis* spp. kann derzeit mit mehreren Hundert angegeben werden, dürfte jedoch ein Vielfaches über den bereits beschriebenen Spezies liegen (Odening, 1998; Pawlowski et al., 2012).

2.2 Aviäre Sarkosporidien

Sarcocystis-Arten, die Vögel infizieren, sind häufig und kommen weltweit vor. Dennoch wurden bisher nur wenige von ihnen klassifiziert und es wurde erst von weniger als 10 Arten der zweiwirtige (heteroxene) Lebenszyklus mit End- und Zwischenwirt aufgeklärt (Odening, 1998). Abgesehen von zahlreichen Fallberichten ist bisher kaum etwas über die Prävalenz und Pathophysiologie aviärer Sarkosporidien bekannt (Butkauskas et al., 2007; Dubey, 2015; Mansfield et al., 2008). Während der Parasit in seinem Lebenszyklus den Endwirt kaum belastet oder gar schädigt, besitzen einige aviäre *Sarcocystis*-Arten ein hochvirulentes Potential für ihre Zwischenwirte. Neben *S. calchasi* sollen im Folgenden daher insbesondere unter diesem Gesichtspunkt die wichtigsten aviären *Sarcocystis*-Arten näher betrachtet werden.

Sarcocystis calchasi wurde erstmals 2006 in einem Brieftaubenbestand in Berlin nachgewiesen. Der Parasit wird vom Habicht (*Accipiter g. gentilis*; Endwirt) auf die Haustaube (*Columba livia f. domestica*; Zwischenwirt) übertragen (Abbildung 1; Olias et al., 2009; Olias et al., 2010b). In der Haustaube verursacht *S. calchasi* eine massive, häufig letal verlaufende zentralnervöse Erkrankung (Olias et al., 2010a). Die zentralnervöse Symptomatik der Taube lässt sich dabei klinisch nicht von der Salmonellose, der Paramyxovirose oder der hochpathogenen aviären Influenza (HPAI) unterscheiden (Olias et al., 2009; Olias et al., 2010b). Seit 2006 wurden weitere Ausbrüche in deutschen Brieftaubenhaltungen dokumentiert und 2011 wurde *S. calchasi* erstmals bei einer Brieftaube mit zentralnervöser Symptomatik in den USA diagnostiziert (Wünschmann et al., 2011). Mittlerweile wurde *S. calchasi* in weiteren Tauben in den USA und in Japan nachgewiesen (Hodo et al., 2016; Trupkiewicz et al., 2016; Ushio et al., 2015). Bislang waren das Wirtsspektrum und die Prävalenz des Parasiten unklar. Da aviäre *Sarcocystis*-Arten, wie im Folgenden an einigen

Beispielen näher erläutert, in der Regel eine geringere Wirtsspezifität aufweisen und häufig auch Fehlwirte erkranken, lag die Vermutung nahe, dass auch *S. calchasi* andere Vogelarten infizieren könnte (Olias et al., 2010b).

Sarcocystis rileyi kommt vor allem in Nordamerika vor, wurde jedoch kürzlich erstmals auch in Europa beschrieben (Kutkienė et al., 2011). Die Löffelente (*Anas clypeata*) und die Stockente (*Anas platyrhynchos*) dienen als Zwischenwirt und das Stinktier (*Mephitis mephitis*) als Endwirt (Dubey et al., 2003b; Dubey et al., 2010; Kutkienė et al., 2011). In Europa ist der Endwirt dagegen noch unbekannt. In verschiedenen Studien wurde bei adulten Stockenten eine je nach Untersuchungsgebiet in den USA stark variierende Prävalenz zwischen 3 % und 27,2 % dokumentiert (Chabareck, 1973; Drouin und Mahrt, 1979; Fedynich und Pence, 1992). Bedeutung erlangt der Parasit insbesondere dadurch, dass das Muskelfleisch von Wildenten durch den Befall ungenießbar wird.

Sarcocystis falcatula war in der Vergangenheit für fatale Sarkosporidiose-Ausbrüche in amerikanischen Papageienhaltungen verantwortlich. (Box et al., 1984). So verendeten im Zoo von San Diego 37 Altwelt-Papageien über einen Zeitraum von etwa einem Jahr perakut (Hillyer et al., 1991). Zu vergleichbaren Ausbrüchen kam es in zwei Papageienhaltungen in Florida. Hier waren über die aus Ozeanien stammenden Papageien hinaus auch 1 - 2 % südamerikanische Papageiennestlinge betroffen (Clubb und Frenkel, 1992). Auch aus einem brasilianischen Vogelpark wurde von einem fatal verlaufenden Ausbruch berichtet, der hauptsächlich Altwelt-Papageien betraf (Godoy et al., 2009). *S. falcatula* wird durch Sporozysten aus den Fäzes des Virginia-Opossums (*Didelphis virginiana*) übertragen, welches somit den Endwirt darstellt. Natürliche Zwischenwirte des Parasiten sind Kuhstärklinge (*Moluthrus* spp.), Dohlegrackeln (*Cassidix mexicanus*) und Purpurgrackeln (*Quiscalus quiscula*), die keine klinische Symptomatik zeigen (Box und Duszynski, 1978; Box et al.,

1984; Clubb und Frenkel, 1992; Duszynski und Box, 1978). In experimentellen Studien wurde außer für Papageien (Psittaciformes) auch eine hohe Virulenz für Vögel der Ordnungen Passeriformes und Columbiformes nachgewiesen. Hühner (*Gallus gallus* dom.) hingegen erkrankten nicht (Box und Smith, 1982; Smith et al., 1990; Suedmeyer et al., 2001). *S. falcatula* verzeichnet damit eine auffallend niedrige Spezifität auf Seiten der Zwischenwirte. Diese niedrige Wirtsspezifität und hohe Virulenz sowie die lange Schizogoniedauer von bis zu fünf Monaten im Endwirt lassen *S. falcatula* als eines der potentesten Pathogene unter den bisher bekannten *Sarcocystis*-Arten erscheinen.

Eine sehr nahe verwandte Spezies, *Sarcocystis neurona*, verursacht dagegen außer bei Vögeln auch bei zahlreichen Säugetieren (unter anderem Pferd, Hund, Katze, Waschbär, Stinktier, Nerz und Rhesusaffe) eine neurologische Erkrankung, die sehr schwerwiegend bis letal verlaufen kann (Cheadle et al., 2001; Dubey et al., 2003a; Dubey et al., 2001a; Dubey et al., 2006; Klumpp et al., 1994; Mansfield et al., 2008; Smith et al., 1990). *S. neurona* zeichnet sich damit ebenfalls durch eine niedrige Wirtsspezifität aus, die über die von *S. falcatula* noch hinaus geht. Endwirt stellt neben dem Weißohr-Opussum (*Didelphis albiventris*) auch das Virginia-Opossum dar (Dubey et al., 2001a; Fenger et al., 1997). Interessanterweise konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass sowohl *S. falcatula* als auch *S. neurona* gleichzeitig den Braunkopf-Kuhstärbling (*Moluthrus ater*) als Zwischenwirt nutzen, ohne bei diesem Vogel jedoch schwerwiegende pathologische Veränderungen zu induzieren (Mansfield et al., 2008).

Bei Tieren mit durch *S. neurona* ausgelöster zentralnervöser Symptomatik vermehren sich die Parasiten in den Neuronen des ZNS und verursachen dadurch Zellschäden und Entzündungsreaktionen (Dubey, 2001). Die dadurch hervorgerufene *Equine Protozoal Myeloencephalitis* (EPM) ist einer der am häufigsten diagnostizierten neurologischen Erkrankungen bei Pferden in den USA (MacKay, 1997). Zahlreiche Studien ergaben eine

Seroprävalenz von *S. neurona* bei Pferden in den USA von 45 - 60 % (Bentz et al., 1997; Rossano et al., 2001; Saville et al., 1997). Klinische Anzeichen der EPM sind eine verschlechterte Koordination, Verlust der Propriozeption, Muskelschwund, Schwäche und in schweren Fällen Niederlegen und Tod (MacKay, 1997). Das Pferd wurde lange Zeit als Fehlwirt betrachtet. In neueren Studien wurden allerdings Zysten in Zungen- und der Skelettmuskulatur nachgewiesen, die das Pferd als Zwischenwirt möglich erscheinen lassen (Mansfield et al., 2008).

In der Literatur finden sich neben Studien zu *S. neurona* zahlreiche Einzelfallbeschreibungen von Sarkosporidiosefällen mit zentralnervöser Symptomatik (Aguilar et al., 1991; Dubey et al., 1998; Dubey and Speer, 1991; Dubey et al., 2001b; Hillyer et al., 1991; Jacobson et al., 1984; Mutalib et al., 1995; Olson et al., 2007; Spalding et al., 2002; Teglas et al., 1998; Villar et al., 2008). Eine genetische Charakterisierung der verantwortlichen *Sarcocystis*-Art erfolgte jedoch in der Regel nicht. Über Fälle von Haustauben oder anderen Taubenarten mit infektionsbedingter, zentralnervöser Symptomatik war vor den Ausbrüchen in den Berliner Brieftaubenbeständen nichts bekannt (Olias et al., 2010a; Olias et al., 2010b). Haustauben waren lediglich experimentell empfänglich für *S. falcatula*, jedoch ohne zentralnervöse klinische Befunde oder zerebrale Läsionen zu zeigen (Box and Smith, 1982). Dagegen wurde in der Vergangenheit von einigen perakuten Todesfällen bei in Gefangenschaft gehaltenen Wildtauben in Amerika berichtet, die auf *Sarcocystis*-Stadien bisher nicht identifizierter Arten in der Lunge zurückzuführen waren (Ecco et al., 2008; Suedmeyer et al., 2001; Villar et al., 2008). Intramuskuläre Zystenstadien bei Tauben fanden ebenfalls nur in wenigen epidemiologischen Studien ohne weitere Angaben zur Morphologie, Klinik oder Pathologie Erwähnung. Bei einer Untersuchung von 255 Carolinatauben (*Zenaida macroura*) in den USA wurden 1977 in 12,5 % der Tauben Zysten in der quergestreiften Muskulatur und in 2,3 % der Tauben Zysten im Myokard gefunden (Barrows and Hayes, 1977). In einer weiteren

Studie wurden Zysten in der Brustmuskulatur von Carolinatauben (Prävalenz 8,9 %) und Weissflügeltauben (*Zenaida asiatica*; Prävalenz 10,4 %) in Florida beschrieben (Conti and Forrester, 1981). In Südafrika wurden bei drei von 70 Palmtauben (*Streptopelia senegalensis*) Zysten in der Muskulatur gefunden (Kaiser, 1983).

Auch Greifvögel wurden bereits als Zwischenwirte beschrieben, hauptsächlich dienen sie jedoch zahlreichen *Sarcocystis*-Arten als Endwirt (Lindsay and Blagburn, 1999; Salt, 1958; Svobodová et al., 2004; Yabsley et al., 2009). So wurde der Habicht inzwischen als Endwirt von mindestens fünf morphologisch unterscheidbaren *Sarcocystis*-Arten erwähnt (Cerna und Kvasnovska, 1986; Gottschalk, 1972; Holling und Fowle, 1955; Kolarova, 1986; Olias, 2010a).

2.3 Lebenszyklus der Sarkosporidien

Sarkosporidien sind intrazelluläre, obligat zweiwirtige (heteroxene) Parasiten der Apicomplexa. Sie gehören zur Untergruppe Coccidia (Mehlhorn and Heydorn, 1978). End- und Zwischenwirt stehen in der Regel in einem Räuber-Beute-Verhältnis zueinander (Fayer, 2004). Im Falle von *S. calchasi* ist beispielsweise der Habicht Endwirt und die Haustaube Zwischenwirt (Olias et al., 2010b). Kokzidien weisen generell einen dreiphasigen Generationswechsel auf. Im Zwischenwirt, dem Beutetier (meist Herbi- oder Omnivor), findet die ungeschlechtliche Vermehrung (Schizogonie) statt. Darauf folgen Gamogonie und Sporogonie im Endwirt, dem Raubtier (Fleischfresser; Dubey, 2015; Mehlhorn und Heydorn, 1978). Im Folgenden sollen die einzelnen Phasen des Zyklus im Detail erläutert werden.

Schizogonie im Zwischenwirt

Nach der oralen Aufnahme von Sporozysten, die vom Endwirt mit den Fäzes ausgeschieden werden, erfolgt die extraintestinale Schizogonie im Zwischenwirt (Mehlhorn und Heydorn, 1978). Zunächst werden im oberen Verdauungstrakt Sporozoiten aus den Sporozysten freigesetzt. Die Sporozoiten durchdringen die Dünndarmwand und siedeln sich dann in den Endothelzellen von Blutgefäßen und in deren näherer Umgebung an. Oftmals ist die Leber das am stärksten befallene Organ (Fayer, 2004; Mehlhorn und Heydorn, 1978). Auch das Großhirn ist ein bei Schafen, Schweinen und Kälbern häufig befallenes Organ (Fayer and Johnson, 1973; Heydorn, 1977; Munday et al., 1975). Sowohl die Lokalisation als auch die Anzahl der stattfindenden Schizogonien variieren je nach *Sarcocystis*-Spezies. In allen großen Haustierarten (Schaf, Ziege, Rind, Schwein, Pferd) wurden im Gefäßendothel Schizonten erster und zweiter Generation identifiziert, während bei kleinen Säugern wie etwa der Maus nur eine Schizontengeneration vorgefunden wurde, die sich in der Regel in Hepatozyten befand (Dubey et al. 1989). Etwa einen Monat *post infectionem* (p.i.) verlassen die aus den

Schizonten hervorgegangenen Merozoiten das Gefäßendothel und dringen in Muskelfasern ein. Schizonten und Merozoiten zahlreicher *Sarcocystis*-Arten stellen dabei ein hochvirulentes Entwicklungsstadium dar, welches zu einer schweren Erkrankung oder auch zum Tod des Zwischenwirtes führen kann (Dubey, 2015).

Bildung von Gewebezysten im Zwischenwirt

Etwa 25-30 Tage p.i. setzt die Bildung von Gewebezysten ein. Diese werden vor allem in der quergestreiften Muskulatur gebildet, bei *S. ovicanis*, *S. suicanis* und *Frenkelia* spp. finden sich diese auch im Gehirn (Mehlhorn und Heydorn, 1978). Darüber hinaus wurden Zysten auch in den Purkinjefasern des Herzens, im Myokard, im Rückenmark und selten auch in glatter Muskulatur nachgewiesen (Fayer, 2004). Nach circa 40 Tagen p.i. sind keine Schizonten oder freien Merozoiten mehr nachweisbar. Nachdem die Merozoiten in die Muskelfasern eingedrungen sind, werden sie in eine parasitophore Vakuole eingeschlossen. Die Membran dieser Vakuolen wird auf der Innenseite durch ein osmiophiles Material zu einer 20-100 nm dicken Primärhülle verstärkt (Mehlhorn und Heydorn, 1978). Charakteristische, je nach *Sarcocystis*-Spezies variierende Invaginationen und Vorstülpungen kennzeichnen diese Primärhüllen, die zur Speziesbestimmung herangezogen werden können (Dubey, 2015). Jedoch bilden viele Arten auch morphologisch identische Primärhüllen aus, so dass eine Artbestimmung anhand dieser in vielen Fällen nicht definitiv möglich ist. Innerhalb der Vakuole beginnt nun der aus dem Merozoiten entstandene Metrozyt mit der Endodyogenie, so dass sich die Zysten innerhalb etwa eines Monats mit zahlreichen Metrozyten füllen. Die aus den Endodyogenien entstehenden Tochterzellen nehmen zunehmend die Gestalt von Zystenmerozoiten (syn. für Zystozoit) an. Nach circa 75 Tagen p.i., bei einigen aviären Arten auch früher (Olias et al., 2010b), sind die Zysten dann vorwiegend mit Zystozoit gefüllt und infektiös (Dubey, 2015). Die Persistenz der Zysten im Zwischenwirt kann lebenslänglich anhalten, allerdings beginnt der Abbau oftmals schon wenige Monate nach der

Infektion. Die Infektiösität der Zysten kann auch über ein Jahr lang erhalten bleiben, ohne dass der Zwischenwirt geschädigt wird (Dubey, 2015).

Gamogonie und Sporogonie im Endwirt

Im Endwirt findet die geschlechtliche Entwicklungsphase (Gamogonie) statt. Der Endwirt infiziert sich, indem er Gewebe des Zwischenwirts mit reifen Zysten verzehrt (Dubey, 2015). In Magen und Darm werden die Zystozoen frei. Diese penetrieren die Mukosa des Dünndarms und entwickeln sich je nach Spezies innerhalb von Stunden bis Tagen weiter zu einkernigen Mikro- und ein- bis mehrkernigen Makrogamonten, wobei zu 95 % weibliche Makrogamonten entstehen. Die männlichen und weiblichen Gamonten verschmelzen. Die dabei entstehende Zygote wird von einer Wand umgeben, anschließend entwickelt sich die Oozyste (Fayer, 2004). Die Gamogonie ist innerhalb von 24 Stunden abgeschlossen. Sie findet je nach *Sarcocystis*-Art und je nach Gamogoniestadium in unterschiedlichen Zellen statt. So beginnt beispielsweise die Entwicklung der Gamonten von *S. muris*, *S. hirsuta* (syn. *S. bovifelis*) und *S. cruzi* (syn. *S. bovicanis*) in den Becherzellen des Dünndarms, wohingegen die Entwicklung der Gamonten von *S. idahoensis* in den Enterozyten der Basalmembran beginnt. Die Sporulation der Oozysten findet in der Lamina propria statt. Zum Teil wurden auch in den Mesenteriallymphknoten Oozysten gefunden. Es entstehen zwei Sporoblasten mit jeweils zwei Kernen. Diese Sporoblasten werden von einer eosinophilen Wand umgeben und werden damit zu Sporozysten. Jede Sporozyste enthält vier Sporozoiten (Dubey, 2015). Die Oozysten gelangen zurück ins Darmlumen. Die sehr dünne Oozystenwand reißt sehr leicht, so dass neben den wenigen intakten Oozysten vor allem freie Sporozysten ausgeschieden werden (Fayer, 2004). Die Exkretion der Oozysten und Sporozysten während der oftmals viele Monate betragenden Patenzzeit erfolgt nicht dauerhaft und nicht in konstanter Menge (Porter et al., 2001; Ruiz and Frenkel, 1976). Während der ersten Tage p.i. werden nur wenige Dauerstadien im Kot der Endwirte gefunden. Darauf folgt für kurze Zeit ein

Ausscheidungsmaximum und schließlich die Exkretion einer gleichbleibend geringen Anzahl von Oozysten und Sporozysten (Mehlhorn und Heydorn, 1978). Durch die orale Aufnahme von mit diesen Dauerstadien kontaminiertem Wasser oder Futter infizieren sich wiederum die Zwischenwirte und der Lebenszyklus des Parasiten schließt sich (Dubey, 2015).

2.4 Lebenszyklus von *S. calchasi*

Der Lebenszyklus von *S. calchasi* folgt den oben aufgeführten allgemeinen Entwicklungsstadien. Inzwischen konnten jedoch einige Details des Zyklus genauer aufgeklärt werden (Abbildung 3). So werden nach der oralen Aufnahme von durch den Habicht ausgeschiedenen Oozysten und Sporozysten im Verdauungstrakt der Haustaube die Sporozoiten aus den Sporozysten freigesetzt. Nachdem diese die Darmwand durchdrungen haben, siedeln sie sich vor allem in der Leber und in der Milz an, aber auch in und neben Endothelzellen zahlreicher anderer Organe (Niere, Lunge, Knochenmark, gefäßnahes Bindegewebe; Olias et al., 2010a). Schizonten und Merozoiten stellen das für die Taube hochpathogene Entwicklungsstadium in der ersten Phase des Krankheitsverlaufs dar, welche mit Apathie, Polyurie, Diarrhoe und einer hohen Letalität einhergeht. Die aus den Schizonten hervorgegangenen Merozoiten dringen anschließend in die quergestreifte Skelett- und Herzmuskulatur der Haustaube ein. Dort setzt dann die Bildung von Zysten ein. Innerhalb der Zysten setzt eine Vervielfachung der Zystenmerozoiten durch Endodyogenie ein. Knapp zwei Monate p.i. setzen bei der Taube dann unvermittelt schwere zentralnervöse Symptome wie Zittern, Torticollis, Opisthotonus und Paralyse ein, die die zweite Phase des Krankheitsverlaufs darstellen (Olias et al., 2010a). Die reifen Zysten des Parasiten stellen dann das infektiöse Stadium für den Endwirt, den Habicht, dar. Nachdem ein Habicht zystenhaltiges Muskelfleisch aufgenommen hat, werden im Magen-Darmtrakt die Zystenmerozoiten frei und penetrieren die Mukosa der Darmwand. Hier findet die Differenzierung zu Mikro- und Makrogamonten statt. Diese verschmelzen und

die entstandene Zygote entwickelt sich weiter zu einer Oozyste, in der die Sporulation stattfindet. Die Oozysten gelangen zurück ins Darmlumen und werden dann vom Habicht ab dem 6. Tag p.i. über die Fäzes wieder ausgeschieden (Olias et al. 2010a). Es wird vermutet, dass Tauben diese Sporozysten über das mit dem Kot des Habichts verunreinigte Trinkwasser oder Futter aufnehmen.

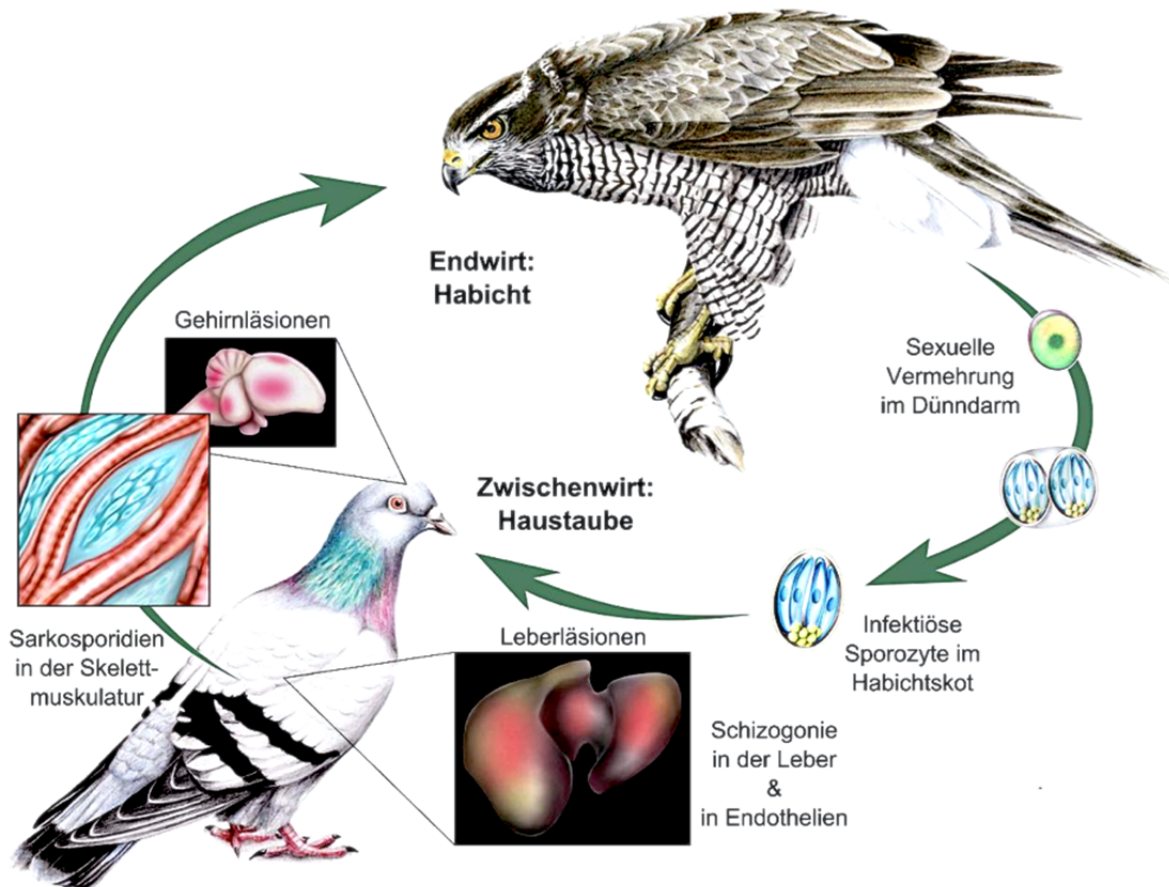


Abbildung 3. Überblick über den Lebenszyklus von *S. calchasi*

Habichte scheiden Sporozysten mit dem Kot aus ohne selbst zu erkranken. Die Sporozysten werden oral von Haustauben aufgenommen und führen während der Schizogonie des Erregers in einer ersten Erkrankungsphase zu massiven Organschäden vor allem in der Leber und der Milz. In einer darauffolgenden zweiten Phase der Erkrankung, die mit zentralnervösen Symptomen einhergeht, entstehen die für den Habicht infektiösen Zysten in der Skelettmuskulatur und im Herzmuskel. In dieser chronischen Phase zeigen Haustauben schwerwiegende massive Gehirnläsionen. Nach oraler Aufnahme von mit Zysten infizierter Muskulatur durch den Habicht entwickeln sich in der Lamina propria des Dünndarms durch sexuelle Rekombination Oozysten, welche zwei infektiöse Sporozysten mit jeweils vier Sporozoiten enthalten. Abbildung: P. Olias

2.5 Pathophysiologie der Sarkosporidiose

Einige Sarkosporidienarten sind für den Zwischenwirt hochvirulent. Unter den aviären Arten zeigen neben *S. calchasi* insbesondere *S. falcatula* und *S. neurona* eine hohe Virulenz mit oftmals fatalem Ausgang der Infektion (Clubb and Frenkel, 1992; Hillyer et al., 1991; MacKay, 1997; Olias, 2010a). Der Schweregrad der klinischen Erkrankung ist oftmals abhängig von der Dosis der aufgenommenen Sporozysten (Dubey, 2015; Olias, 2010a; Smith et al., 1990). Außerdem können Faktoren wie Stress, Ernährung, Wetter und das Immunsystem des Wirtstieres eine Rolle spielen (Dubey, 2015). Allgemein typische klinische Befunde der Sarkosporidiose beim Zwischenwirt sind Anorexie, Diarrhoe, Gewichtsverlust, Muskelzittern und Erschöpfung, die je nach Parasitenart mit einer hohen Letalität einhergehen können (Dubey, 2015). Auch neurologische Symptome können auftreten und sind insbesondere beim Pferd durch die durch *S. neurona* verursachte *Equine Protozoal Myeloencephalitis* (EPM) in den USA bekannt (Dubey et al., 2001a; MacKay, 1997).

An *S. calchasi* erkrankte Tauben zeigen einen biphasischen Krankheitsverlauf. Die erste Phase ist etwa 7 Tage p.i. durch einen verschlechterten Allgemeinzustand, Polyurie und Diarrhoe gekennzeichnet. In hohen Dosen aufgenommene Sporozysten wirken schon in der ersten Phase tödlich (Olias et al., 2010a). Histologisch zeigen die Tauben in der ersten Phase multifokale Nekrosen und eine mittel- bis hochgradige Infiltration von Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen in Leber und Milz. Wenige Tauben zeigten auch Entzündungen und Nekrosen in Lunge, Nieren, Knochenmark und in an Blutgefäße angrenzendem Bindegewebe zahlreicher Organe. Schizonten wurden vor allem in Leber, Milz und in oder neben den Endothelzellen zahlreicher anderer Organe beobachtet. In dieser zweiten Phase, die etwa 50 Tage p.i. einsetzt, treten dann neurologische Symptome wie Torticollis, Opisthotonus, Paralyse, Zittern und Muskelzittern auf (Olias et al., 2009). In einer

zweiten Phase zeigt das histologische Bild dann eine lymphoplasmazelluläre und granulomatöse Meningoenzephalitis mit Gliazellproliferation und Demyelinisierung der weißen Substanz. In der quergestreiften Muskulatur findet zur selben Zeit bereits ein Abbau von Zysten statt. Im umliegenden Gewebe findet sich eine lymphohistiozytäre und eosinophile Myositis und Rhabdomyolyse. Wenige Zysten finden sich auch in Herzmuskelzellen mit jedoch nur minimaler oder nicht vorhandener Myokarditis. Teilweise zeigen die Tiere auch eine lymphohistiozytäre und eosinophile, interstitielle Nephritis sowie eine folliculäre Hyperplasie der Milz (Olias et al., 2010a).

Im Gegensatz zum Zwischenwirt erkranken Endwirte von Sarkosporidien bei Aufnahme einer moderaten Infektionsdosis im Allgemeinen nicht, sie scheiden lediglich für den Zwischenwirt infektiöse Sporozysten mit den Fäzes aus. So zeigten auch Habichte nach einer Infektion mit *S. calchasi* keinerlei Klinik. Lediglich etwas dünnflüssiger Kot konnte ab dem 6. Tag p.i. über wenige Tage hin beobachtet werden. Wenige *Sarcocystis*-Arten scheinen dennoch in höheren Infektionsdosen ein für den Endwirt virulentes Potential zu haben. So entwickelten freiwillige Versuchspersonen, die *S. suihominis* infiziertes Fleisch verzehrt hatten, Diarrhoe und Erbrechen sowie Atemnot (Dubey, 2015).

2.6 Differentialdiagnosen zur zerebralen Sarkosporidiose der Taube

Die Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen zeigen die Notwendigkeit, beim Auftreten einer zentralnervösen Erkrankung einer Haustaube eine Infektion mit *S. calchasi* in Betracht zu ziehen (Olias, 2010; Olias et al., 2009). Erstaunlich ist, dass trotz der massiven Klinik und der eindeutig zu identifizierenden Muskelzysten die Erkrankung zuvor nicht beschrieben wurde. Möglicherweise wurde sie in Anbetracht der ähnlichen Symptomatik bedeutender Taubenkrankheiten wie der Paramyxovirose und Salmonellose oder auch der aviären

Influenza übersehen. Aus diesem Grund scheint es angebracht, diese Krankheiten hier kurz zu beschreiben.

Paramyxovirose

Aviäre Paramyxoviren sind behüllte, nicht segmentierte, einzel-strängige RNA-Viren (Marlier and Vindevogel, 2006). Gegenwärtig sind 9 Serotypen bekannt. Alle bisher aus Tauben isolierten Paramyxoviren gehören dem Serotyp 1 oder 7 an (Alexander, 1982; Gough und Alexander, 1983). Aviäre Paramyxoviren vom Serotyp 7 scheinen apathogen zu sein (Gough und Alexander, 1983; Kida und Yanagawa, 1979). Viren des Serotyps 1 hingegen verursachen *Newcastle Disease* (Alexander, 1982), eine Krankheit, die im zeitlichen und örtlichen Zusammenhang mit infizierten Hühnern steht und anzeige- und bekämpfungspflichtig ist. Man unterscheidet dabei zwischen klassischen Newcastle Disease Viren (NDV) und taubenspezifischen Paramyxoviren des Serotyps 1 (pPMV-1).

Die klassischen Newcastle Disease-Viren lassen sich entsprechend ihrer Pathogenität in velogene, mesogene und lentogene Viren unterteilen (Hanson und Brandly, 1955). Nach einer Infektion mit einem velogenen NDV zeigen Tauben typischerweise wässrige oder hämorrhagische Diarrhoe sowie respiratorische und neurologische Symptome wie Torticollis, Paralyse und Gleichgewichtsstörungen. Es zeigen sich petechiale und flächenhafte Blutungen im Magendarmtrakt, Tracheitis, Nephritis und Enzephalitis. Die Morbidität beträgt bis zu 70 %, die Mortalität bis zu 40 % (Marlier und Vindevogel, 2006). Während die Newcastle-Krankheit bei Tauben eher selten vorkommt, verursacht die taubenspezifische, hochkontagiöse Variante (aPMV-1) eine systemische Erkrankung in Haustauben aller Rassen und Altersstufen mit einem weltweiten Vorkommen und großer Bedeutung. Infektionen mit dem pAPMV-1 ähneln klinisch der neurotrophen Form der Newcastle-Krankheit mit einer Morbidität von 30 - 70 % und einer Mortalität von bis zu 10 % (Marlier und Vindevogel,

2006) Dabei überwiegen neurologische Symptome (Torticollis, Gleichgewichtsstörungen, Parese der Flügel und Ständer) und eine wässrige bis hämorrhagische Diarrhoe sowie während der akuten Phase eine Polydipsie. Eine kausale Therapie ist nicht möglich (Marlier und Vindevogel, 2006).

Salmonellose / Paratyphus

Paratyphus ist die bei Tauben am häufigsten vorkommende bakterielle Erkrankung und wird durch Salmonellen verursacht (Pasmans et al., 2008) Bei Tauben werden hauptsächlich *Salmonella* Typhimurium DT 2 und DT 99 nachgewiesen (Chitty und Lierz, 2008). Die Erkrankung verursacht eine Gastroenteritis mit Appetitverlust und Diarrhoe, Arthritis sowie Oophoritis beziehungsweise Orchitis. Granulomatöse Entzündungen in sämtlichen Organen führen zu einer hohen Mortalität (Faddoul und Fellows, 1965) Außerdem können ZNS-Symptome wie Verlust des Gleichgewichtssinns, Kopfschiefhaltung und Kreisen auftreten (Chitty und Lierz, 2008). An Salmonellose erkrankte Tauben zeigen in der Sektion eine granulomatöse und nekrotisierende Hepatitis sowie weitere Nekrosen in der Lunge, dem Intestinaltrakt, der Milz, dem Pankreas und den Nieren. Zudem kommt es zu einer purulenten Perikarditis und Arthritiden (Chitty und Lierz, 2008).

Hochpathogene Aviäre Influenza

Die klassische Geflügelpest ist eine durch hochpathogene Influenza-A (HPAI)-Viren der Hämagglutinin-Subtypen H5 und H7 hervorgerufene, meist akut verlaufende und hoch kontagiöse Erkrankung. Das Auftreten dieser Viren unterliegt der Anzeige- und Bekämpfungspflicht. Influenza-A-Viren aller Subtypen kommen bei freilebenden Vögeln relativ häufig vor und wurden bisher bei neun verschiedenen Ordnungen von Vögeln nachgewiesen, hauptsächlich jedoch bei Vögeln der Ordnungen Anseriformes (Gänse, Enten, Schwäne) und Charadriiformes (unter anderem Möwen, Seeschwalben und Schnepfenvögel)

(Starick und Werner, 2003). HPAI in substanziellem Umfang tritt hingegen vor allem bei Hühnern und Puten auf, jedoch sind auch andere Hühnervögel wie Wachteln und Perlhühner sowie Enten, Gänse, Laufvögel, Reiher, Sperlingsvögel und Greifvögel für HPAI empfänglich (Perkins und Swayne, 2002; Perkins und Swayne, 2003). Auch für Tauben wurde eine Empfänglichkeit für HPAI nachgewiesen (Kaleta und Hönicke, 2004; Klopfleisch et al., 2006; Narayan et al., 1970; Panigrahy et al., 1996; Perkins und Swayne, 2002; Perkins und Swayne, 2003). Klinisch zeigen experimentell infizierte Tauben Apathie, schwerwiegende neurologische Symptome (Parese und Paralyse der Flügel, Torticollis und Nystagmus) und eine hohe Mortalität (Klopfleisch et al., 2006). In der Sektion fielen subkutane Hämorrhagien, Hydroperikard und eine Malazie des Gehirns auf. Immunhistochemisch wurde ein Neurotropismus des Virus einhergehend mit einer hochgradigen Meningoenzephalitis deutlich (Klopfleisch et al., 2006).

2.7 Wirtsspezifität aviärer Sarkosporidien

Die Wirtsspezifität von *Sarcocystis*-Arten ist bei Vögeln sehr niedrig. Wenn Säugetiere als Zwischenwirte fungieren, nimmt sie von kleinen zu großen Säugetieren zu (Box und Smith, 1982; Mansfield et al., 2008). Allgemein ist die Wirtsspezifität in Zwischenwirten höher als in Endwirten. Bei einem vorliegenden niedrigen koevolutionären Anpassungsgrad erweitert sich das Wirtsspektrum meist um nah verwandte Spezies, die als zusätzliche Zwischen- oder Endwirte fungieren können. So ist beispielweise *S. bovicanis* nicht nur für Rinder infektiös, sondern auch für Wasserbüffel (*Bubalus bubalis*) und Bisons (*Bison bison*). Als Endwirt können zudem nicht nur der Hund dienen, sondern auch der Koyote (*Canis latrans*), der Wolf (*Canis lupus*), der Waschbär (*Procyon lotor*), der Schakal (*Canis aureus*) und der Fuchs (*Vulpini*; Dubey, 2015).

Unter den aviären *Sarcocystis*-Arten stellen *S. falcatula* und *S. neurona* zwei bekannte Beispiele mit besonders niedriger Wirtsspezifität dar (Dubey, 2015; Mansfield et al., 2008). Aufgrund ihrer generell niedrigen Wirtsspezifität und zum Teil hohen Virulenz stellen aviäre *Sarcocystis*-Arten eine Gefahr für zahlreiche Tierarten dar, da sie zusätzlich als Fehlwirte infiziert werden können. Die Ursachen für die verminderte Wirtsspezifität von aviären *Sarcocystis*-Arten sind gänzlich unbekannt. Theoretisch könnte über das sogenannte *host switching* der Parasit evolutionär die Fähigkeit erlangt haben, auf einen anderen Wirt zu wechseln (Johnson et al., 2003). Insbesondere Tierarten, die phylogenetisch oder in ihrer ökologischen Nische dem ursprünglichen Wirt nahestehen, bieten Parasiten hierbei die Voraussetzungen, die für seine Übertragung und damit sein Überleben notwendig sind (Poulin, 2007). Andererseits kann auch das Unvermögen des Parasiten zur scharf begrenzten Artbildung während seiner Evolution eine verminderte Wirtsspezifität nach sich gezogen haben (Johnson et al., 2002; Paterson und Banks, 2001). Diese Inkongruenz zwischen der Wirts- und Parasitenevolution kann zu einer steigenden Virulenz des Parasiten führen, wie sie beispielsweise für die aviäre Malaria bekannt ist. Neuere Erkenntnisse hingegen widersprechen dieser Hypothese und weisen darauf hin, dass Parasiten in neuen Wirten auch eine niedrigere Virulenz aufweisen können als in ihrem ursprünglichen Wirt (Poulin, 2007).

2.8 Speziesidentifikation der Sarkosporidien

Seit der Entdeckung der Sarkosporidien beruhte die Speziesidentifizierung traditionellerweise auf der Beschreibung der Primärhüllen der Gewebezysten und auf experimentellen Infektionsversuchen. In jüngerer Vergangenheit wurden diese Methoden um die molekularbiologische Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und DNA-Sequenzanalyse erweitert.

Primärhülle der Gewebezysten

Die Gewebezysten der *Sarcocystis*-Arten unterscheiden sich von denen aller anderen zystenbildenden Kokzidien insofern, als dass die Primärhüllen durch charakteristische, je nach Spezies variierende Fortsätze und Invaginationen gekennzeichnet sind und sie im Inneren durch Septen unterteilt sind (Dubey, 2015; Fayer, 2004). Hierdurch lassen sich theoretisch 37 verschiedene Primärhüllentypen unterscheiden (Dubey, 2015). Die Primärhüllen geben dabei einen, wenn auch nicht stringenten Hinweis, auf den Verwandtschaftsgrad verschiedener *Sarcocystis*-Arten. So wurden beispielsweise Zysten vom Typ 1 hauptsächlich bei kleinen Säugern gefunden, während der Typ 14 nur bei Schafen und Ziegen gefunden wurde. Zu beachten ist jedoch, dass einige Spezies identische Primärhüllen aufweisen können (Dubey, 2015; Levine, 1986; Mehlhorn und Heydorn, 1978). Beispielsweise haben die vier Schafe infizierenden *Sarcocystis*-Arten, *S. gigantea*, *S. tenella*, *S. medusiformis* und *S. arieticanis*, unterschiedliche Primärhüllen, während die Primärhüllen von *S. tenella* und *S. capracanis*, eine Art, die Ziegen befällt, identisch sind. Darüber hinaus variiert die Zystenstruktur je nach benutztem Fixativ und Erhaltungszustand des umliegenden Gewebes. Außerdem können die Ausstülpungen derart in die umgebende Muskelzelle eingebettet sein, dass sie mikroskopisch nicht eindeutig zu identifizieren sind. Letztlich variieren sowohl Form als auch Größe der Ausstülpungen und sie können sich auch mit dem Alter der Zyste verändern. So benötigen beispielsweise Zysten von *S. bertrami* und *S. medusiformis* vier Jahre, bis sie ihre maximale Länge von 15 mm erreicht haben, während die von *S. cruzi* innerhalb von vier Monaten ihre maximale Länge von 0,5 mm erreichen (Dubey, 2015). Die Bestimmung der Morphologie der Primärhülle wurde früher häufig in Kombination mit Kenntnissen über den Lebenszyklus der *Sarcocystis*-Art als Kriterium für Diagnostik und Klassifizierung herangezogen.

Experimentelle Infektion

Eine Speziesidentifizierung kann mithilfe von Infektionsversuchen erfolgen. Auf dieser Basis wurde in der Vergangenheit unter anderem zwischen *S. neurona* und *S. falcatula* unterschieden, indem einerseits Vögel und andererseits immunsupprimierte Mäuse infiziert wurden (Marsh et al., 1997). Dabei zeigte sich, dass immunsupprimierte Mäuse nach einer Infektion mit *S. neurona* neurologische Symptome entwickelten, wohingegen *S. falcatula* für Mäuse nicht infektiös war (Dubey and Lindsay, 1998). Pferde, die mit Sporozysten beider Arten aus natürlich infizierten Opossums infiziert wurden, entwickelten nur Antikörper gegen *S. neurona* und neurologische Symptome durch *S. neurona* (Fenger et al., 1997). Auf diese Weise können die so ermittelte Wirtsspezifität und der Lebenszyklus zur Aufklärung der Speziesidentität beitragen. Neben einer Charakterisierung neu entdeckter Arten und deren Wirtsspektrum und Lebenszyklus können Infektionsversuche auch dazu dienen, die Breite des Wirtsspektrums bereits bekannter *Sarcocystis*-Arten genauer zu untersuchen (Luznar et al., 2001; Olias, 2010a).

Polymerase Kettenreaktion (PCR) und DNA-Sequenzanalyse

Eine vergleichsweise sehr spezifische Methode der Diagnostik von *Sarcocystis*-Arten stellt die Analyse von variablen Regionen der ribosomalen Gene (rDNA) und der dazwischenliegenden *internal transcribed spacer* (ITS)-Regionen dar. Ribosomale RNA (rRNA) stellt das in der Zelle am häufigsten vorkommende Makromolekül dar; 90 - 95 % der gesamten zellulären RNA bestehen aus rRNA, wovon wiederum etwa 30 % *short subunit* (SSU) rRNA entsprechen. Mithilfe einer PCR können speziesspezifische Nukleotidsequenzen der rDNA detektiert werden (Gajadhar et al., 1992; Tenter et al., 1994). Für die Identifizierung von *Sarcocystis*-Arten eignen sich dabei neben der stark konservierten 18S insbesondere die variabelere und längere 28S rRNA-Gensequenz. Insbesondere mithilfe der hoch variablen ITS1-Region ist es möglich, zwischen phylogenetisch sehr nah verwandten

Sarcocystis-Arten zu unterscheiden (Marsh et al., 1999; Tanhauser et al., 1999) und derzeit eine Art genetisch am detailliertesten zu charakterisieren (Dubey et al., 2010; Kutkienė et al., 2010). Für phylogenetische Studien innerhalb der Familie Sarcocystidae wurde insbesondere die Sequenzierung der 18S und 28S rRNA-Gene sowie der ITS1-Region erfolgreich angewandt (Doležal et al., 1999; Elsheikha et al., 2005; Morrison und Ellis, 1997; Yabsley et al., 2009; Zhu et al., 2000). Zahlreiche Sequenzen dieser Genabschnitte stehen dadurch bereits für Vergleichsuntersuchungen in öffentlichen Datenbanken zur Verfügung.

Während die Identifizierung einer *Sarcocystis*-Art in der Vergangenheit also ausschließlich auf der Beschreibung der Primärhülle und langwierigen Infektionsversuchen beruhte, wurde diese in den letzten Jahren um schnelle und exakte molekularbiologische Methoden erweitert. Insbesondere dann, wenn speziesspezifische Methoden etabliert wurden, kann eine vergleichsweise sehr viel schnellere und genauere Diagnostik erfolgen und epidemiologische Untersuchungen können deutlich vereinfacht und zuverlässiger durchgeführt werden.

2.9 Zugrundeliegende Hypothese dieser Arbeit

In jüngerer Vergangenheit wurde *S. calchasi* als Auslöser einer hochvirulenten zentralnervösen Erkrankung bei Haustauben beschrieben und der Lebenszyklus zwischen Haustaube und Habicht aufgeklärt. Ungeklärt blieb bisher jedoch die Frage nach der Ursache für die ungewöhnlich hohe Virulenz des Parasiten. Andere hochvirulente *Sarcocystis* spp. wie etwa *S. neurona* und *S. falcatula* zeichnen sich durch eine niedrige Wirtsspezifität aus. Die Arbeitshypothese für die nachfolgenden Untersuchungen war daher: **Die hohe Virulenz von *S. calchasi* korreliert mit einer niedrigen Wirtsspezifität des Parasiten.** Um diese Hypothese zu testen, sollte in einem ersten Schritt die Wirtsspezifität von *S. calchasi* auf Seiten des Endwirts und des Zwischenwirts untersucht werden. Hierfür wurden die nächst

verwandten Vogelspezies des Habichts und der Haustaube auf eine Infektion mit *S. calchasi* untersucht und eine phylogenetische Einordnung zu den im Rahmen dieser Arbeit neu entdeckten *Sarcocystis* spp. vorgenommen. Basierend auf dem Sequenzvergleich zwischen diesen Sarkosporidien Arten wurde in Folge eine spezifische PCR entwickelt und getestet, die es ermöglicht, *S. calchasi* auch bei Doppelinfektionen mit mehreren Arten eindeutig zu identifizieren. Die Anwendbarkeit dieser neuen Methode wurde nachfolgend in einem größeren Rahmen getestet und gleichzeitig wurde eine erste Untersuchung zur Epidemiologie von *S. calchasi* bei Habichten und Sperbern durchgeführt. Mittels dieser entwickelten speziesspezifischen Methode wird es in Zukunft möglich sein, das Vorkommen von *S. calchasi* bei anderen Tierarten zu untersuchen und die Annahme einer niedrigen Wirtsspezifität des Parasiten wie in der Arbeitshypothese dargestellt weiter zu testen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Herkunft der Habichte, Ringeltauben und Sperber

Habicht (*Accipiter g. gentilis*) und Haustaube (*Columba livia f. domestica*) stellen Endbeziehungsweise Zwischenwirt von *S. calchasi* dar. Über das Vorkommen von *Sarcocystis* sp. bei mit beiden Wirten nah verwandten Vögeln war bisher nichts bekannt. Zur Untersuchung gelangten daher fünf Ringeltauben (*Columba palumbus*) aus der Jagdsaison 2008 sowie drei weibliche und zwei männliche tot aufgefundene Sperber (*Accipiter n. nisus*), die 2008 und 2009 in der Tierpathologie der FU Berlin seziert wurden. Für die molekulare Untersuchung dieser Tiere wurde eine PCR mit universellen Primern für Sarkosporidien verwendet (siehe Methoden).

Auch über die Häufigkeit von *S. calchasi* im Endwirt gab es bislang keine Information. Daher wurden 46 freilebende und vier aus falknerischer Haltung stammende Habichte, die zwischen 1997 und 2008 in der Tierpathologie der FU Berlin seziert worden waren, auf das Vorhandensein von *Sarcocystis* spp. untersucht. Hiervon waren 24 (48 %) weiblich und 26 (52 %) männlich. Darüber hinaus wurden 20 freilebende Sperber, die zwischen 1997 und 2009 seziert wurden, untersucht. Von diesen waren 11 (55 %) weiblich und 9 (45 %) männlich. Alle Vögel der Untersuchungen stammten aus Norddeutschland und verstarben aufgrund von Ursachen, die nicht im Zusammenhang mit den hier vorliegenden Untersuchungen stehen. In den meisten Fällen waren Traumata die Todesursache der

Greifvögel. Für diese Tiere wurde zum spezifischen Nachweis unterschiedlicher Sarkosporidien Arten eine semi-nested PCR entwickelt und verwendet (siehe Methoden).

3.1.2 Chemikalien und Reagentien

- 6x DNA Loading Dye, Thermo Fisher, Wilmington, DE, USA,
- Agarose NEEO Ultra-Qualität, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland,
- Borsäure (H_3BO_3) $\geq 99,8$ %, pulv., Carl Roth,
- Dinatrium-Ethylendiamin-Tetra-Azetat, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, > 99 %, p.a., Fluka Chemie, Buchs, Schweiz,
- dNTP-Mix, Fermentas GmbH, St. Leon-Roth, Deutschland,
- Ethanol 100 %, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland,
- Ethidiumbromid 1 %, Carl Roth,
- Formalin 37 %ig, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland,
- GelRed Nucleic Acid Gel Stain, Thermo Fisher,
- GeneRuler 50 bp DNA ladder, Thermo Fisher,
- GoTaq Flexi DNA Polymerase, Promega GmbH, Mannheim, Deutschland,
- MgCl_2 , Promega,
- Nukleasefreies Wasser, Promega,
- TRIS, Carl Roth,
- Xylol, TH. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland

3.1.3 Angesetzte Puffer

TBE-Puffer:

1,33 M TRIS

600 mM Borsäure

100 mM EDTA

5000 ml Aqua dest.

pH 8,8 einstellen, autoklavieren

3.1.4 Verbrauchsmaterialien

- NucleoSpin Extract II Kit, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland,
- NucleoSpin Tissue Kit, Macherey-Nagel,
- PCR Tubes: PCR-Einzelgefäße mit flachem Deckel 0,2 ml, Brand GmbH +Co KG, Wertheim, Deutschland,
- Pipettenspitzen: Biosphere Qualitäts-Pipettenspitzen ohne Filter 10 µl, 200 µl, 1000 µl; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland,
- SafeSeal Micro Tubes, Sarstedt

3.1.5 Geräte

- Autoklav, Systec, Wellenberg, Deutschland,
- Eindeckautomat: Leica CV5030, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland,
- Elektrophoresekammer: Model No. HU6, Carl Roth,

- Gelbetrachter: UV Transilluminator 2000, BioRad, München, Deutschland,
- Lichtmikroskop Zeiss IM 35, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland,
- Pipetman, P10, P20, P100, P200, P1000, Gilson International France S.A.S., Villiers-le-Bel, Frankreich,
- Rotationsmikrotom: Microm HM 325, Thermo Fisher,
- Paraffinstreckbad, Medax GmbH & Co.KG, Neumünster, Deutschland,
- pH-Meter Model Knick 761, Calimatic, Niederlande,
- Präzisionswaage VIC-711, ACCULAB Europa, Göttingen, Deutschland,
- Spektralphotometer: NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer, peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland,
- Thermocycler: T3000 Thermocycler 48, Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland,
- Thermomixer compact, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland,
- Tischzentrifuge: Micro Centrifuge, Carl Roth,
- Voltgerät Power PAC 300, BioRad,
- Vortex Mixer, neoLab, Heidelberg, Deutschland,
- Zentrifuge: Eppendorf Centrifuge 5417R, Eppendorf

3.1.6 Software

- CLUSTALW2
- GeneDoc Version 2.7
- GeneFisher 2.0
- Jellyfish Software Version 1.5
- NanoDrop 1000 V3.8.1
- MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Version 4.0.2

- NetPrimer – Primer Analysis Software
- PhyML
- PHYLIP

3.2 Methoden

3.2.1 Histopathologische Untersuchung

Zunächst wurde eine Untersuchung auf das Vorhandensein von neuen, bisher nicht charakterisierten *Sarcocystis* spp. der Ringeltaube und des Sperbers vorgenommen. Hierzu wurden Gewebeproben des Musculus gastrocnemius der Ringeltauben und Gewebeproben vom Darm der Sperber in 4 %-igem Phosphat-gepuffertem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Von jeder Gewebeprobe wurden drei Stufen in einer Dicke von 4 µm geschnitten und mit Haematoxylin und Eosin (HE) angefärbt. Die nachfolgend epidemiologisch ausgewerteten Proben aus dem Dünndarm der Habichte und Sperber wurden ebenfalls in 4 %-igem Formalin fixiert und als HE-Schnitt evaluiert.

3.2.2 Elektronenmikroskopische Untersuchung

Zur Untersuchung in der Elektronenmikroskopie wurden Muskelproben der Ringeltauben in 5 %-igem Glutaraldehyd mit 0,1 M Natrium Cacodylat Puffer (pH 7,2) bei 4 °C fixiert und anschließend nach Standardlabormethoden (Mehlhorn et al., 1999) folgendermaßen weiterverarbeitet: Die Osmolarität des Puffers wurde mittels Saccharose eingestellt. Nach einer ersten Fixierung wurden die Proben für weitere 2 Stunden in 2 %-iger Osmiumsäure nachfixiert und langsam mittels Aceton bei 0 °C entwässert. Die Gewebestücke wurden dann

in Epoxidharz einer geringen Viskosität eingebettet. Ultradünnschnitte wurden in der Folge mit Bleicitrat und Uranylacetat gefärbt und mittels eines Zeiss EM S2 Transmissionselektronenmikroskops analysiert.

3.2.3 DNA-Extraktion aus Gewebe und Parasiten

Als Gewebivorlage für die PCRs mit universellen Primern wie in Tabelle 1 angegeben dienten infizierte Beinmuskulatur der Ringeltauben sowie Sporozysten aus dem Dünndarm von Sperbern, die wie bei (Olias et al., 2010a) beschrieben extrahiert und aufgereinigt wurden. Hierzu wurde die Mukosa des Dünndarms mit einem stumpfen Skalpell abgekratzt und mit 0,25 %-iger Trypsinlösung (Difco Laboratories, Detroit, USA) in einem herkömmlichen Haushaltsmixer bei Raumtemperatur für 3 min zerkleinert. Die Sporozysten und Oozysten wurden anschließend mit einer Zinksulfatlösung floriert. Die aufliegenden Parasitenstadien wurden mittels einer Pipette aspiriert und dreimalig in destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die so aufgereinigten Sporozysten zentrifugiert und pelletiert. Ein anderer Teil der Gewebeproben stammte aus FFPE Material, welches über eine Xylen- und Ethanolbehandlung für eine DNA-Extraktion vorbereitet wurde.

Für die Extraktion von DNA aus Sporozysten, FFPE Material und infizierter Muskulatur der Ringeltauben wurden etwa 25 mg der Muskulatur mit einem Skalpell zerkleinert und diese sowie auch die Sporozysten über Nacht bei 56 °C mittels Proteinase K in T1 Puffer (NucleoSpin Tissue Kit) in einem Thermomixer (Eppendorf) inkubiert. Die Aufreinigung der DNA erfolgte dann am nächsten Tag gemäß dem Protokoll des kommerziell erhältlichen NucleoSpin Tissue Kits (Macherey-Nagel). Zunächst wurde Puffer B3 zugegeben und für 10 min bei 70 °C im Thermomixer inkubiert. Nach anschließender Zugabe von 96 %-igem Ethanol wurden die Proben gründlich durchmischt und jeweils auf eine Silicagel-Membran-

Säule geladen und bei $11.000 \times g$ zentrifugiert. Hierbei bindet die enthaltene genomische DNA an die Säule. Der Durchfluss der Säule wird dagegen verworfen. Nach zwei Waschschritten mit den Puffern BW und B5 wird die Säule durch erneutes Zentrifugieren getrocknet. In einem letzten einem Zentrifugationsschritt wurde die DNA dann mittels H_2O von der Säule eluiert.

3.2.4 Universelle Primer für PCR-Reaktionen

Zum Nachweis und zur Speziesbestimmung von *Sarcocystis* spp. wurden universelle Primer für *Sarcocystis* spp. verwendet. Für die PCR Amplifikation wurden die *first internal transcribed spacer region* (ITS-1) sowie die Gene der 18S rRNA und Teile der 28S rRNA mit den enthaltenen variablen D2 und D3 Domänen benutzt. Die benutzten Primerkombinationen waren wie auf der folgenden Seite in Tabelle 1 dargestellt. Einen Überblick über die Bindestellen der Primer gibt zudem Abbildung 7.

Um die Integrität der isolierten DNA zu beurteilen, wurde ein Teil der Sequenzen, die das Cytochrom B und das 28S rRNA Gen (Primer KL6a und KL6b) kodieren, mittels PCR amplifiziert (Mugridge et al., 1999). Als Positivkontrolle wurde DNA von *Frenkelia microti* und von einer Darmprobe eines Habichtes verwendet.

Tabelle 1. Universelle Primer für Amplifikation und Sequenzierung der ITS-1 Region, 18S und 28S rRNA Gene

Primer	Richtung	Zielsequenz	Primer Sequenz (5'-3')	Produkt-größe	Lokalisation	Referenz
ITS5	5'-3'	ITS-1	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	936 bp	18S	(White, 1990)
ITS2	3'-5'	ITS-1	GCTGCGTTCTTCATCGATGC		5.8S	(White, 1990)
Primer A	5'-3'	18S	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT	963 bp	1-963 bp	(Medlin et al., 1988)
3H	3'-5'	18S	GGCAAATGCTTTCGCAGTAG			(Yang et al., 2001)
S7	5'-3'	18S	GTAATTCCAGCTCCAATAGCG	977 bp	583-1559 bp	(Fischer und Odening, 1998)
S4	3'-5'	18S	TATCCCCATCACGATGCATAC			(Fischer und Odening, 1998)
S3	5'-3'	18S	TTGTAAAGACGAACTACTGCG	875 bp	930-1804 bp	(Fischer und Odening, 1998)
Primer B	3'-5'	18S	GATCCTTCTGCAGGTTACCTAC			(Medlin et al., 1988)
KL1	5'-3'	28S	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	1517 bp	1-1517 bp	(Mugridge et al., 1999)
KL3	3'-5'	28S	CCACCAAGATCTGCACTAG			(Mugridge et al., 1999)

3.2.5 Herstellung von PCR-Reaktionsgemisch

Für alle im Rahmen dieser Studie vorgenommenen PCR-Reaktionen wurde die GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega) in einem 50 μl Ansatz inklusive 5 μl Template von insgesamt etwa 100 ng verwendet. Die Konzentration der Templates wurde zuvor mittels nanodrop Messung bestimmt. Der 1 \times Mastermix setzte sich folgendermaßen zusammen:

Reagenzien	Mastermix
5 \times Green Go Taq Flexi Puffer	10 μl
MgCl ₂ (c = 25 mmol/ μl)	3 μl
dNTP Mischung (je 10 mmol/ μl)	1 μl
Primer A (c = 20 pmol/ μl)	1 μl
Primer B (c = 20 pmol/ μl)	1 μl
Go Taq Flexi Polymerase	0,25 μl
Ultra Pure H ₂ O	28,75 μl

3.2.6 PCR-Protokoll

Die PCR Reaktion wurde auf einem Thermocycler T3000 der Firma Biometra und dem folgendem Temperatur-Zeit-Profil durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95 °C	2 min
2. Denaturierung	95 °C	30 sec
3. Anlagerung	55 °C	30 sec
4. Verlängerung	72 °C	1 min
5. Finale Verlängerung	72 °C	7 min

40 × Wiederholung der Schritte 2. – 4.

3.2.7 Analyse der PCR-Produkte

Zur Kontrolle der PCR wurden die PCR-Produkte auf einem 2 %-igem Agarosegel aufgetrennt. Hierzu wurden 100 ml 1× TBE Puffer mit 2 g Agarose (Carl Roth) abgewogen und in einem Erlenmeyerkolben in einem Mikrowellenherd solange erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach Abkühlung wurden der Lösung 2 µl einer 1 %-igen Ethidiumbromidlösung zugesetzt. Anschließend wurde sie in die Gelkammer gegossen. Nach Aushärtung wurden jeweils 10 µl der PCR-Produkte in die vorbereiteten Geltaschen überführt. Als Laufpuffer diente 1 %-iges TBE. Anschließend wurden die Produkte elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt, wobei eine 50 bp Leiter (Fermentas) als

Größenstandard fungierte. Zur Visualisierung der DNA der Gele unter UV-Licht diente ein UV Transilluminator 2000 (Biorad).

Erfolgreich amplifizierte DNA, die dem erwarteten Größenprofil entsprach, wurde jeweils aus dem restlichen 40 µl PCR-Produkt mittels des NucleoSpin Extract II Kits (Macherey-Nagel) entsprechend des beiliegenden Protokolls aufgereinigt und unter Zugabe der jeweiligen Primer in beide Richtungen durch einen kommerziellen Sequenzierservice (Seqlab GmbH, Göttingen) sequenziert.

3.2.8 Phylogenetische Analyse der sequenzierten PCR-Produkte

Die so generierten DNA-Sequenzen der ITS-1 Region sowie eine fusionierte Sequenz aus 1630 bp des 18S rRNA Gens und 1278 bp des 28S rRNA Gens wurden mit zuvor in der NCBI Datenbank veröffentlichten Sequenzen von *Sarcocystis* spp. verglichen. Als Analysetool für das Sequenzalignment diente das Programm ClustalW2 (Larkin et al., 2007). Zur Darstellung der evolutionären Zugehörigkeit der Sarkosporidienspezies wurde nachfolgend eine phylogenetische Untersuchung durchgeführt. In der phylogenetischen Auswertung wurden die Nukleotidabstände zwischen den einzelnen Sequenzen durch ein *maximum likelihood* (ML) Model mittels PhyML und dem HKY Substitutionsverfahren anhand von Basenfrequenzschätzungen berechnet und dargestellt (Guindon and Gascuel, 2003) (Hasegawa et al., 1985) unter der Einstellung: Schätzung der Rate von unveränderten Stellen und Gammaverteilung (Anzahl der Substitutionsraten-Kategorien = 4). Der phylogenetische Stammbaum wurde mittels des BIONJ Algorithmus in PhyML dargestellt. Der *maximum parsimony* (MP) Stammbaum wurde mittels PHYLIP berechnet (Felsenstein, 2005). *Bootstrapping* (1000 Replikate) wurde mittels seqboot durchgeführt und das daraus resultierende Alignment-Set wurde mit DNAPars und *ordinary parsimony* analysiert.

Besnoitia besnoiti wurde als *outgroup* festgelegt. Anschließend wurde ein *extended majority-rule consensus* Stammbaum berechnet und letztlich im newick-Format mittels MEGA4 verarbeitet und visualisiert (Kumar et al., 2008; Tamura et al., 2007). Dasselbe Programm diente zur Berechnung der prozentualen Identität zwischen *S. calchasi*, *Sarcocystis columbae* sp. nov. und *Sarcocystis* sp. ex *A. nesus* ausgehend von *uncorrected pairwise distance* (*p-distance*) Werten.

3.2.9 Entwicklung einer speziesspezifischen semi-nested PCR

Ziel war es, eine speziesspezifische PCR zu entwickeln, die auch auf FFPE Material funktioniert und hieraus auch geringe Mengen DNA detektiert. Spezifische Primerbindestellen wurden anhand eines Vergleichs der ITS-1 Regionen von *S. calchasi*, *S. columbae* sp. nov. und *Sarcocystis* sp. ex *A. nesus* (GenBank accession no FJ232948; GU253885; GU253886) identifiziert. Hierzu wurden die Sequenzen mittels CLUSTALW und MEGA4 übereinandergelegt und in Übereinstimmung gebracht. Anhand dieser Information wurden PCR Primer mittels der GeneFisher 2.0 Software designed. Hierbei wurde insbesondere darauf geachtet, dass die Primerbindestellen in variablen Teilen der Einzelsequenzen liegen. Statt klassischer nested PCR wurde aufgrund der wenigen Alternativen an variablen Primerbindestellen in den Sequenzen eine semi-nested PCR etabliert. Diese benutzt jeweils den selben sense Primer für die erste und zweite PCR Reaktion, während der antisense Primer wechselt. Ein Überblick über die Primerkombinationen gibt die nachfolgende Tabelle 2. Abbildung 10 weiter unten gibt zudem einen Überblick über die genauen Bindestellen der Primer.

Tabelle 2. Primer der semi-nested PCR

Spezifität	Primer	Sequenz 5'-3'	Bindestelle	Orientierung
<i>S. calchasi</i>	SCa1	CTCCTTGCTCGAGAATGAACATGAG	276–300 bp	Sense
<i>S. calchasi</i>	SCa2	GATCATCTTTTCGACGACAATATCG	474–498 bp	Antisense
<i>S. calchasi</i>	SNCa3	TCCAGAGAAGATCCCCTGGCTAC	389–411 bp	Antisense
<i>S. columbae</i> sp. nov	SCo1	TTCCTCGCTTGAGGATGAATAAG	281–303 bp	Sense
<i>S. columbae</i> sp. nov	SCo2	TGACCTCCCCTCGACGATAATAA	471–492 bp	Antisense
<i>S. columbae</i> sp. nov	SNCo3	TCCAGGGATGATTTTCATGGTTACAC	385–409 bp	Antisense
<i>Sarcocystis</i> sp. ex <i>Acciptier nesus</i>	SNi1	CGCGCAGAAAGATGAACAACGA	294–315 bp	Sense
<i>Sarcocystis</i> sp. ex <i>Acciptier nesus</i>	SNi2	AAAGGACAATGCCACCCGAAG	435–455 bp	Antisense
<i>Sarcocystis</i> sp. ex <i>Acciptier nesus</i>	SNNi3	GATCTCCCTGGCTACACCATCCTA	394–417 bp	Antisense

3.2.10 Durchführung der speziesspezifischen semi-nested PCR

Für jede Probe wurden jeweils drei *semi-nested* PCRs durchgeführt. Die initiale Amplifikation erfolgte durch Primerpaare SCa1/SNCa2, SCo1/SNCo2 und SNi1/SNi2. Für die nachfolgende Amplifikation mit den Primerpaaren SCa1/SNCa3, SCo1/SNCo3 und SNi1/SNNi3 wurden die PCR-Produkte der ersten Reaktion 1:500 verdünnt. Die kalkulierte Größe der PCR-Produkte betrug für *S. calchasi* 136 bp, für *S. columbae* 129 bp und für *Sarcocystis* sp. ex *A. nisus* 124 bp. Alle Amplifikationen wurden in einer 50 µl Lösung wie in 3.2.5 angegeben durchgeführt, wobei die PCR dem Temperatur-Zeit-Profil wie in 3.2.6 folgte. Als Negativkontrollen wurden nukleasefreies Wasser, in Paraffin eingebettetes Gewebe eines Hundes und DNA der genetisch eng verwandten Parasiten *F. microti* und *F. glareoli* benutzt. Die *Frenkelia* DNA stammte aus aufgereinigten Sporozysten von natürlich infizierten und aus Norddeutschland stammenden Mäusebussarden (*Buteo buteo*) und Turmfalken (*Falco tinnunculus*). Zusätzlich wurden aufgereinigte DNA von *S. calchasi* Sporozysten sowie von *S. columbae* sp. nov. infestiere Muskulatur von Ringeltauben als weitere Positiv- und Negativkontrollen eingesetzt (Olias, 2010).

3.2.11 Analyse der semi-nested PCR-Produkte

Die PCR Produkte wurden wie in 3.2.7 beschrieben auf einem 2 %-igem Agarosegel unter UV-Licht analysiert. Alle PCR-Produkte von korrekter Größe wurden nachfolgend aufgereinigt und wie oben beschrieben sequenziert. Eine BLAST Analyse (ALTSCHUL et al., 1990) diente dem Abgleich der generierten Sequenzen mit bereits publizierten Sequenzen. Mittels CLUSTALW und MEGA4 wurde nach Sequenzunterschieden untereinander gesucht.

4. Ergebnisse

4.1 Histopathologische und elektronenmikroskopische Charakterisierungen einer neuen *Sarcocystis* spp. aus der Muskulatur von Ringeltauben

In der lichtmikroskopischen Untersuchung der HE-angefärbten Gewebeschnitte fand sich in allen untersuchten Beinmuskeln der Ringeltauben ($n = 5$) ein geringgradiger Befall mit Sarkosporidien-Zysten. Interessanterweise zeigten die histologisch dargestellten Zysten eine unterschiedliche Morphologie insbesondere im Hinblick auf ihren Durchmesser. Im Mittel wurde ein Durchmesser von $106 \mu\text{m}$ ($\pm 50 \mu\text{m}$; mean \pm SD; $n = 20$) bestimmt. Allerdings konnten sowohl sehr schlanke als auch im Durchmesser weitaus dickere Zysten dargestellt werden. Lichtmikroskopisch konnten keine auffälligen Fortsätze in der Zystenwand gefunden werden (Abbildungen 4 A, B und 5). Einige größere Zysten zeigten zentral prominente dünnwandige Kammern, oftmals leer von Zystozoitien (Abbildung 4 C). Im Gegensatz dazu zeigten sich Zysten von *S. calchasi* sowohl in Wild- als auch in Laborinfektionen in der Muskulatur von Tauben immer von einem schlanken Phänotyp. Möglicherweise stellen die größeren Zysten eine ältere Generation derselben Spezies dar. Hinweise auf eine Doppelinfektion verschiedener *Sarcocystis* Arten fanden sich auch in den folgenden Untersuchungen nicht. Nur in einem Fall fand sich neben einer Zyste ein Areal in der Muskulatur mit einer hochgradigen lymphohistiozytären Rhabdomyositis (Abbildung 4 D). In allen anderen Fällen lagen die Zysten areaktiv in der Muskulatur.

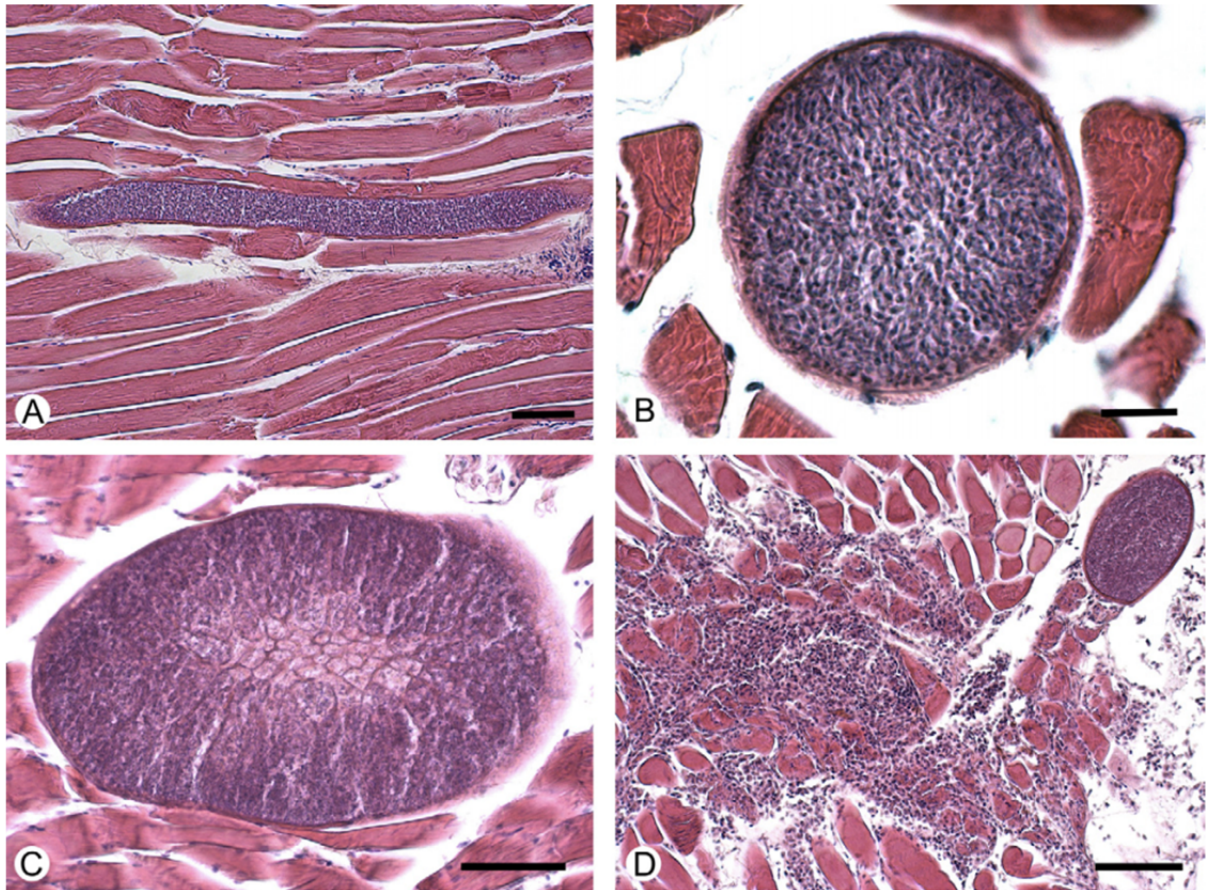


Abbildung 4. Sarkosporidienzysten in der Skelettmuskulatur von Ringeltauben

Die Zysten finden sich zentral in den Muskelfasern (A, Längsschnitt, B, Querschnitt) und sind mit Zystozoen gefüllt. Die Zystenwand zeigt keine auffälligen Fortsätze (B). Größere und damit vermutlich auch ältere Zysten zeigen zentral eine prominente Kammerung (C). Zystozoen sind zentral teils fehlend (C). Assoziiert zu den Zysten fand sich lediglich in einem Fall eine Entzündungsreaktion des umliegenden Muskelgewebes (D). Diese war charakterisiert als maßgeblich histiozytäre Infiltration und Rhabdomyolyse. HE-Färbung. Größenbalken: 50 μm (A, C), 10 μm (B) und 100 μm (D).

In der ultrastrukturellen Untersuchung fanden sich keine Unterschiede in der Morphologie der Zystenwand zwischen den Zysten aller fünf untersuchten Ringeltauben. Die Primärwand der Zyste hatte eine glatte, genoppte und leicht gewellte Oberfläche mit wenigen, eher wenig tiefreichenden Invaginationen (Abbildungen 5 und 6). Eine an die Primärwand anschließende elektronendichte Schicht (*ground substance*) setzte sich bis ins Innere der Zyste fort und formte Septen, welche die Zyste in Kammern unterteilte. Die Kammern waren mit Zystozoiten gefüllt (Abbildungen 5 und 6). In den Zystozoiten ließen sich zahlreiche für Apicomplexa typische Strukturen erkennen. So fanden sich *rhoptries*, *micronemes*, *conoid* und *dense bodies* (*dense granules*).

Beim Vergleich der Morphologie mit den Zysten von *S. calchasi* fielen einige Unterschiede insbesondere bezüglich der Größe und der Kammerung der Zysten auf. Es wurde jedoch deutlich, dass sich die Morphologie der Zystenwand nicht von der von *S. calchasi* unterscheidet und insofern nicht alleinig für eine Speziesbestimmung von Sarkosporidien geeignet ist. Einen Überblick zu den Gemeinsamkeiten und Unterschieden im Vergleich mit *S. calchasi* gibt im Folgenden Tabelle 3. Da keine experimentelle Infektion von potentiellen Endwirten mit zystenhaltiger Muskulatur der Ringeltaube vorgenommen wurde, fehlen Erkenntnisse zur Morphologie des Parasiten im Endwirt. Allerdings konnte durch die folgenden genetischen Untersuchungen (siehe unten) auf die etwaige Morphologie der Sporozysten dieses Parasiten (im Folgenden *Sarcocystis columbae* sp. nov. genannt) geschlossen werden (siehe dort).

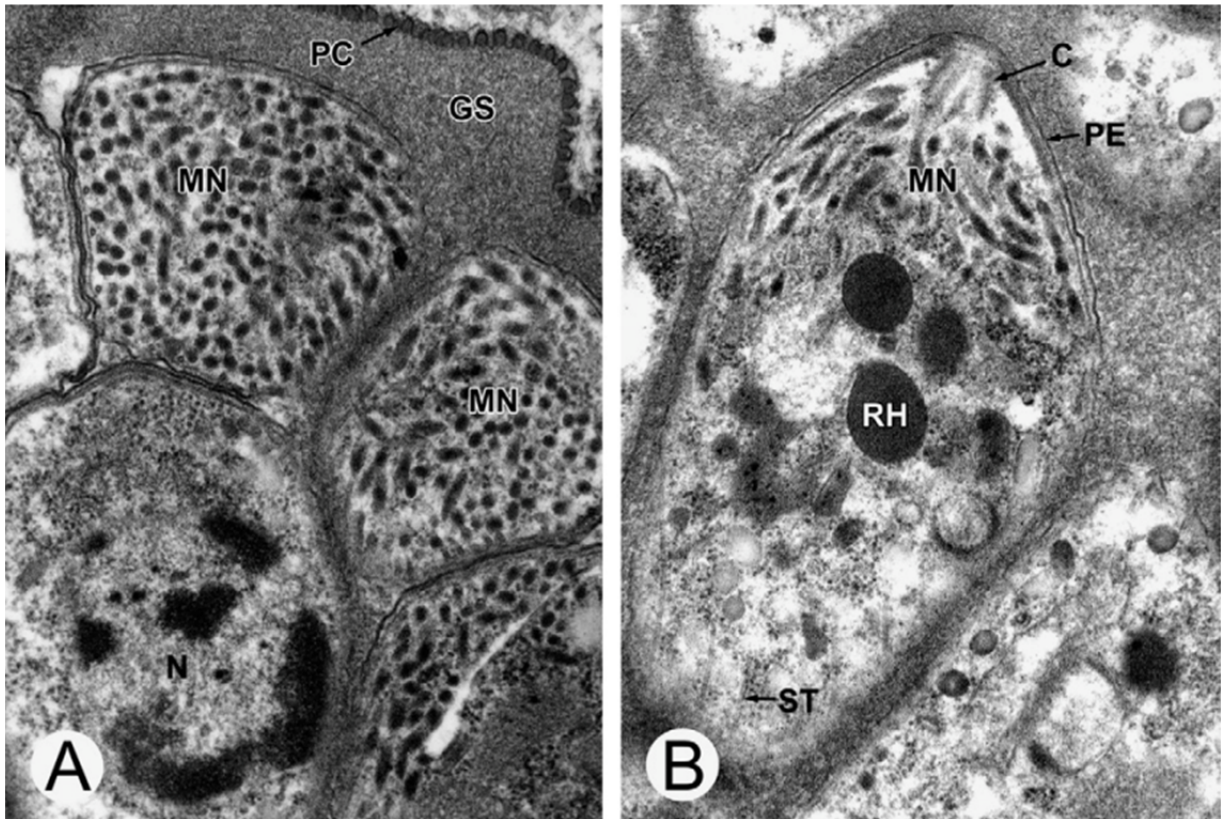


Abbildung 5. Ultrastrukturelle Details von *S. columbae* sp. nov. Zystozoit

Querschnitt (A) und Längsschnitt (B) durch Zystozoit der Parasiten in Muskelzysten zeigen Organellen und Strukturen, die typisch für einen Parasiten der Apicomplexa aus dem Genus sind.

Sarcocystis. N = Nukleus, MN = *micronemes*, PC = *primary cyst wall* (Zystenwand), GS = *ground substance*, RH = *rhoptries*, C = *conoid*, PE = *pellicle*, ST = *subpellicular microtubules*

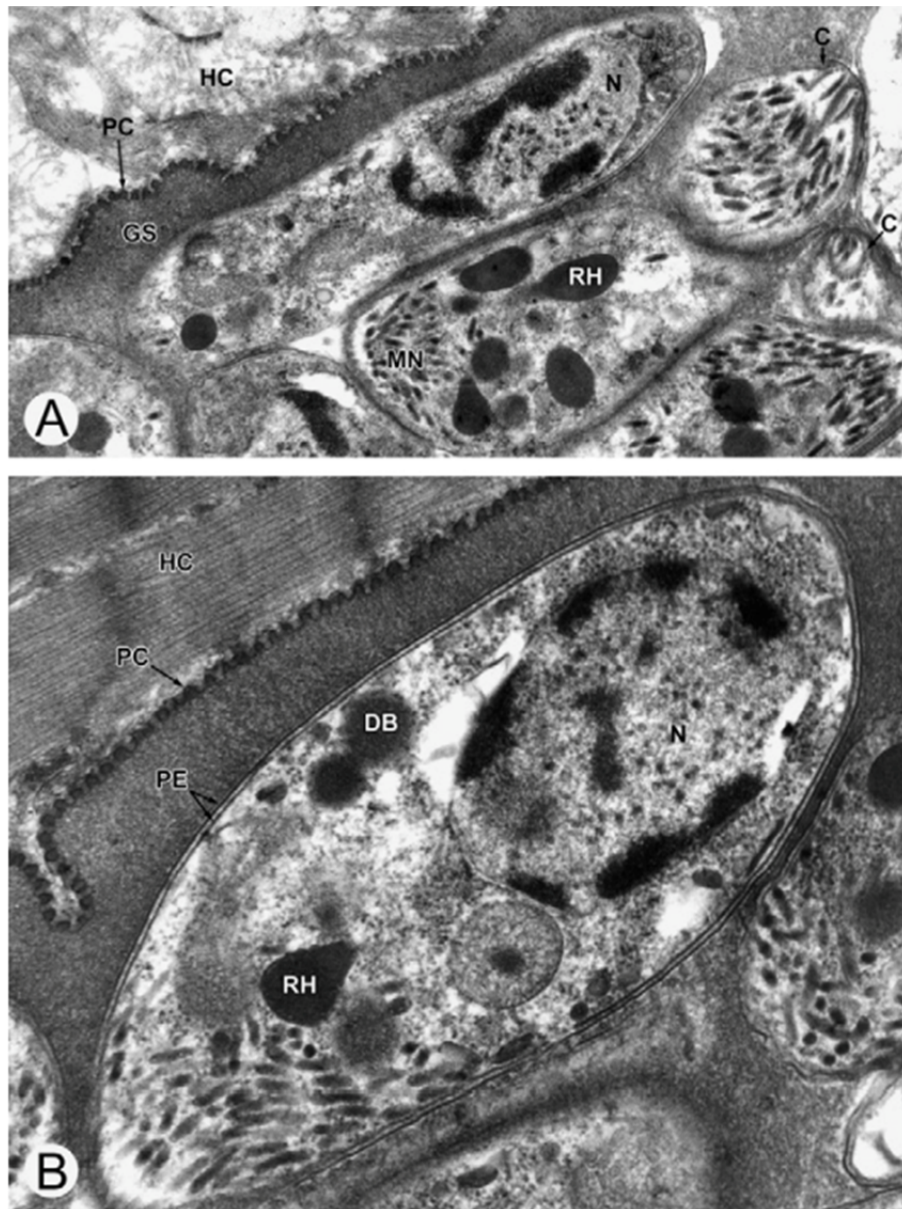


Abbildung 6. Ultrastrukturelle Details von *S. columbae* sp. nov. in der Muskulatur der Ringeltaube

Im Detail zeigt sich eine leicht gewellte Zystenwand (A) mit glatter, leicht genoppter Morphologie und wenigen Invaginationen (B), welche unmittelbar an die typischen Muskelstrukturen der Wirtszelle (*host cell*, HC) anliegt. Darunter findet sich eine elektronendichte *ground substance* (GS), in welche die Cystozoitien eingebettet liegen. N = Nukleus, MN = *micronemes*, PC = *primary cyst wall* (Zystenwand), RH = *rhoptries*, C = *conoid*, PE = *pellicle*

Tabelle 3. Vergleich zwischen *S. calchasi* und *Sarcocystis* sp. nov. aus Ringeltauben (n=5)

<i>Sarcocystis</i> Art	Endwirt	Zwischenwirt	Sporozysten	Zyste in Skelettmuskulatur	Fundort
<i>S. calchasi</i>	<i>Accipiter gentilis</i>	<i>Columba livia</i> f. dom.	Größe: 11,9 µm × 7,9 µm	<ul style="list-style-type: none"> • Länge bis zu 1-2 mm • Durchmesser 20-50 µm • Schlank und gekammert • Wand glatt ohne Fortsätze • Geringgradige Invaginationen 	Berlin, Deutschland
<i>S. columbae</i> sp. nov.	Unbekannt	<i>Columba palumbus</i>	Größe wie von <i>S. calchasi</i> (siehe unten)	<ul style="list-style-type: none"> • Durchmesser 106 µm (± 50 µm; n = 20) • Teils zentral mit großen leeren Kammern • Zystenwand wie bei <i>S. calchasi</i> 	Nord- deutschland

4.2 Morphologie von Sarkosporidienstadien im Darm von Sperbern

Zunächst wurden histologische Schnittpräparate des Dünndarms von fünf Sperbern (*Accipiter n. nisus*) aus Norddeutschland untersucht. Die Schnitte wurden mittels HE gefärbt und lichtmikroskopisch beurteilt. Dabei fand sich in der Lamina propria aller untersuchten Tiere ein gering- bis mittelgradiger Befall mit Sarkosporidien. In der Hauptsache konnten Oozysten mit enthaltenen Sporozysten identifiziert werden, regelmäßig auch Mikro- und Makrogamonten. Sexuelle Stadien fanden sich wenige. Im umliegenden Wirtsgewebe fanden sich keine Hinweise auf entzündliche Geschehen. So fanden sich insbesondere keine Entzündungszellinfiltrate wie etwa Makrophagen, Lymphozyten oder eosinophile Granulozyten.

Die Sporozysten innerhalb der Oozysten in der Lamina propria maßen $11,88 \mu\text{m} (\pm 0,80 \mu\text{m}) \times 8,34 \mu\text{m} (\pm 0,50 \mu\text{m})$ ($n = 20$). Ein genauerer Größenvergleich mit anderen Sarkosporidienarten war aufgrund der Natur der Messung nicht sicher vornehmbar. Dies liegt daran, dass Sporozysten in der Regel in Nativpräparaten vermessen werden und im vorliegenden Fall formalinfixierte, gewebeassoziierte Parasitenstrukturen vermessen wurden. Nichtsdestotrotz fiel im Größenvergleich zu *S. calchasi* kein signifikanter Unterschied auf. Insofern konnte mittels der lichtmikroskopischen Untersuchung nicht festgestellt werden, ob es sich um *S. calchasi* oder eine andere Sarkosporidienart handelt. Aufgrund dieser Tatsache wurde im Folgenden eine diagnostische PCR entwickelt, die eine belastbare Bestimmung der Sarkosporidienart zulässt.

4.3 Sequenzanalyse von Sarkosporidien aus Ringeltauben und Sperbern identifiziert zwei neue Spezies

Wie oben dargestellt, reichten morphologische Kriterien nicht aus, um die nachgewiesenen Sarkosporidien voneinander abzugrenzen. Sowohl lichtmikroskopische als auch ultrastrukturelle Merkmale können hier nur unterstützend wirken. Zur Analyse wurden daher mehrere PCR Reaktionen eingesetzt. Zielsequenzen waren Genomabschnitte mit bekannt höher variablen Regionen. Für die Abgrenzung zu nah verwandten Arten eignet sich hierfür insbesondere die variable ITS-1 Region und die D2 Domäne der 28S rRNA, während für eine phylogenetische Analyse in der Vergangenheit insbesondere die weniger variable 18S und Teile der 28S rRNA erfolgreich benutzt wurden (Abbildung 7). Der Vorteil dieser Region des Genoms ist auch, dass hierfür genügend Vergleichsequenzen in öffentlichen Datenbanken zugänglich sind.

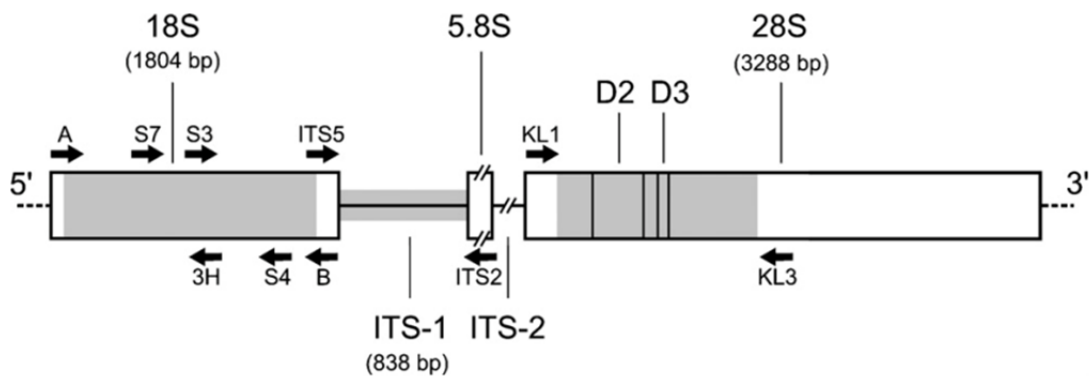


Abbildung 7. Schema zum rDNA Locus im Genom von *S. calchasi*

Dargestellt sind die 18S, 5.8S und 28S rRNA mit den stärker variablen D2 und D3 loop Domänen und den dazwischenliegenden variablen ITS1 und ITS2 Regionen. Universelle Primerbindestellen sind mittels Pfeilen gekennzeichnet (siehe auch Tabelle 1). In grauer Farbe dargestellt sind die Regionen, welche für die weiterführenden Analysen benutzt wurden.

Zunächst wurde daher DNA aus der mit Sarkosporidien infizierten Skelettmuskulatur der fünf oben erwähnten Ringeltauben isoliert, amplifiziert und sequenziert. Hierbei fanden sich klar von *S. calchasi* abgrenzbare Sequenzen (Tabelle 4 und 5; Abbildungen 8 und 9), welche zwischen den Proben zu 100 % identisch waren. Auch die PCR-Produkte des infizierten Dünndarms der fünf untersuchten Sperber (siehe oben) wiesen in der Sequenz eine 100 %-ige Übereinstimmung auf. In allen Fällen fanden sich mit dieser Methode keine Hinweise auf eine Doppelinfection mit mehreren Sarkosporidien Arten.

Die *p*-Distanz zwischen der ITS1-Region der Art aus der Ringeltaube (*S. columbae* sp. nov.) und der aus dem Sperber (*Sarcocystis* sp. ex *A. nisus*) betrug 0,184. Die *p*-Distanz zur ITS1-Region von *S. calchasi* betrug dagegen 0,165 für die Art aus der Ringeltaube und 0,195 für die Art aus dem Sperber (Tabelle 4).

Tabelle 4. Berechnung der *p*-Distanz zwischen der ITS-1 Region von *S. calchasi*, *S. columbae* sp. nov. und *Sarcocystis* sp. ex *A. nisus*

		1	2	3
1	<i>S. calchasi</i>		0,1653	0,1953
2	<i>S. columbae</i> sp. nov.	0,1653		0,1842
3	<i>Sarcocystis</i> sp. ex <i>A. nisus</i>	0,1953	0,1842	

Da die ITS-1 Region bisher von nur sehr wenigen Sarkosporidien sequenziert vorlag, wurde für einen Vergleich mit anderen, näher verwandten aviären Sarkosporidien die D2 loop Domäne der 28S rRNA herangezogen. Im Vergleich fand sich die größte Sequenzidentität zwischen *S. calchasi* und *S. wobeseri* aus der Blässgans (*Anser albifrons*), der Weisswangengans (*Branta leucopsis*) und der Stockente (*Anas platyrhynchos*) mit jeweils einer *p*-Distanz von nur 0,016 in der variablen D2-Region der 28S rDNA. Dagegen war die

p -Distanz zwischen *S. calchasi* und *S. columbae* sp. nov. mit 0,041 und zu *Sarcocystis* sp. ex *A. nisus* mit 0,032 etwas größer (Tabelle 5).

Tabelle 5. Berechnung der p -Distanz zwischen der D2 Domäne von *S. calchasi*, *S. columbae* sp. nov., *Sarcocystis* sp. ex *A. nisus* und dreier Arten aus Entenvögeln

		1	2	3	4	5	6
1	<i>S. calchasi</i>		0,0407	0,0322	0,0159	0,0159	0,0159
2	<i>S. columbae</i> sp. nov.	0,0407		0,0363	0,0240	0,0240	0,0240
3	<i>Sarcocystis</i> sp. ex <i>A. nisus</i>	0,0322	0,0363		0,0240	0,0240	0,0240
4	<i>Sarcocystis</i> sp. (I) ex <i>A. albifrons</i>	0,0159	0,0240	0,0240		0	0
5	<i>Sarcocystis</i> sp. (IV) ex <i>A. platyrynchos</i>	0,0159	0,0240	0,0240	0		0
6	<i>Sarcocystis</i> sp. (I) ex <i>Branta leucopsis</i>	0,0159	0,0240	0,0240	0	0	

Für alle oben erwähnten Arten wurde basierend auf den 18S und 28S rRNA Genen eine phylogenetische Analyse mittels *maximum-likelihood* und *maximum parsimony* Methode durchgeführt. In diese Analyse wurden außerdem 16 weitere *Sarcocystis*-Arten mit einbezogen. Die Auswahl der weiteren Spezies erfolgte anhand der veröffentlichten Sequenzen. Da diese vornehmlich die 18S rRNA und Teile der 28S rRNA Gene betrafen, wurde für die Analyse eine künstliche Fusion der beiden Abschnitte vorgenommen. Insgesamt wurde damit eine Sequenz von etwa 3 kb verglichen. *Besnoitia besnoiti*, ein nah verwandter Parasit, der Rinder befällt, diente als *outgroup* für die Herstellung der grafischen Darstellung. Beide *tree-building*-Methoden führten mit Ausnahme von *S. cruzi* zu einem nahezu identischen Ergebnis (Abbildungen 8 und 9). Der phylogenetische Baum mit der höchsten Wahrscheinlichkeit (*likelihood*; ln -9288.88) wurde mittels des *HKY nucleotide substitution model* Verfahrens ermittelt. Der *consensus maximum parsimony tree* unterstützte die mit diesem Verfahren getroffene phylogenetische Gruppierung und unterstrich die Eingliederung aller hier untersuchten Sarkosporidien Arten.

Prinzipiell zeigten die Ergebnisse eine Einteilung in drei Hauptgruppen. In einer Gruppe befanden sich *Sarcocystis*-Arten, welche Säugetiere befallen. Daneben zeigte sich eine zweite Gruppe um *S. neurona* und Arten, die Entenvögel infizieren. Eine dritte Gruppe von Sarkosporidien formte sich mit Arten, dessen derzeit bekannte Endwirte Greifvögel darstellen. In diese dritte Gruppe ordneten sich dann auch alle drei in dieser Studie untersuchten und identifizierten neuen Sarkosporidien Spezies ein.

Ausgehend von diesem Ergebnis lag es nahe anzunehmen, dass auch *S. columbae* sp. nov. einen Greifvogel als Endwirt nutzt. Innerhalb dieser Gruppe bildeten *Frenkelia*-Arten, die kleine Nager als Zwischenwirt und den Mäusebussard (*Buteo buteo*) beziehungsweise den Turmfalken (*Falco tinnunculus*) als Endwirt nutzen sowie *Sarcocystis*-Arten, die Vögel als

Zwischenwirt nutzen, eine Schwestergruppe. Basierend auf diesem Ergebnis erscheinen *Frenkelia* spp. genetisch als Sarkosporidien und nicht als eigenständiges Genus. Wie auch in der vorangegangenen solitären Untersuchung der D2 Domäne stellt *S. wobeseri* aus der Blässgans (*Anser albifrons*), der Weisswangengans (*Branta leucopsis*) und der Stockente (*Anas platyrhynchos*) die am nächsten verwandte Spezies zu *S. calchasi* dar. *S. columbae* sp. nov. ist dagegen am nächsten mit *S. calchasi* verwandt. Dagegen zeigte *Sarcocystis* sp. ex *Accipiter nisus* die größten Sequenzübereinstimmungen mit *Sarcocystis cornixi*, einem Parasiten, der die Nebelkrähe (*Corvus cornix*) als Zwischenwirt nutzt und dessen Endwirt noch nicht ermittelt ist.

Die entwickelten Phylogramme zeigten auch, dass alle Sarkosporidien, die Vögel entweder als End- oder Zwischenwirt nutzen, eng miteinander verwandt sind und eine große Distanz zu der Gruppe der Säugetiere infizierenden *Sarcocystis*-Arten aufweisen (Abbildungen 8 und 9). Bemerkenswert ist, dass *S. neurona*, ein Parasit, der klinische Bedeutung durch die Auslösung einer schwerwiegenden neurologischen Erkrankung bei Pferden erlangt hat, klar mit Sarkosporidien aus Vögeln gruppierte und nicht wie eigentlich zu erwarten mit Sarkosporidien, die Säugetiere infizieren.

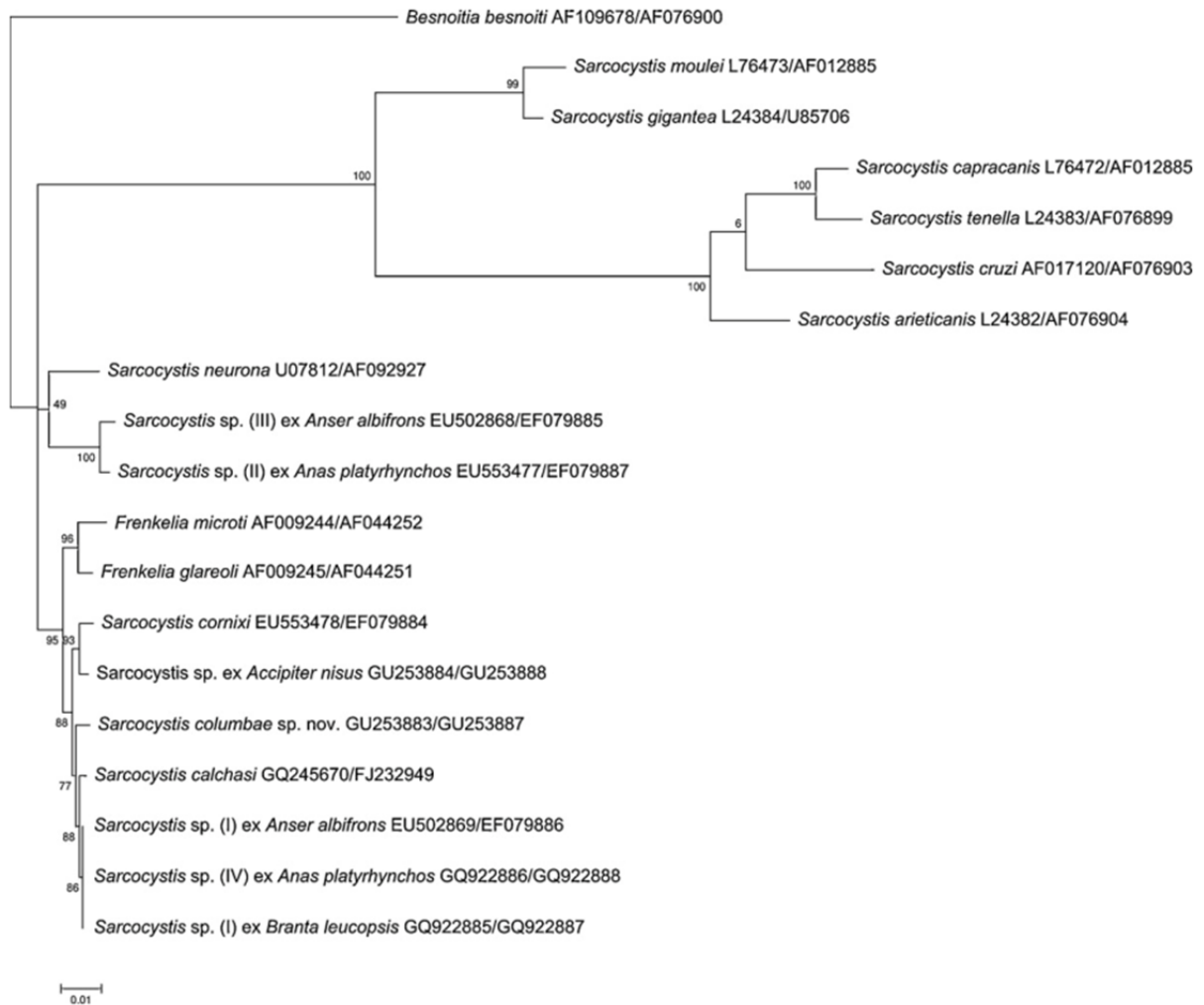


Abbildung 8. Phylogenetische Analyse mittels *maximum likelihood*-Methode

Zum Sequenzvergleich wurde eine künstlich generierte Fusion von Teilen der 18S rRNA und der 28S rRNA Gene benutzt. *S. calchasi* ist nahe verwandt mit der hier beschriebenen neuen Spezies *S. columbae* sp. nov. und *Sarcocystis* sp. ex *Accipiter nisus*. Die Astlänge zeigt sich proportional zu den angenommenen Veränderungen der Spezies im Laufe der Evolution. Die Unterstützung der Knotenpunkte wird durch die an den Aufzweigungen angegebenen und durch *bootstrapping* ermittelten Werte bei 1000 Wiederholungen dargestellt.

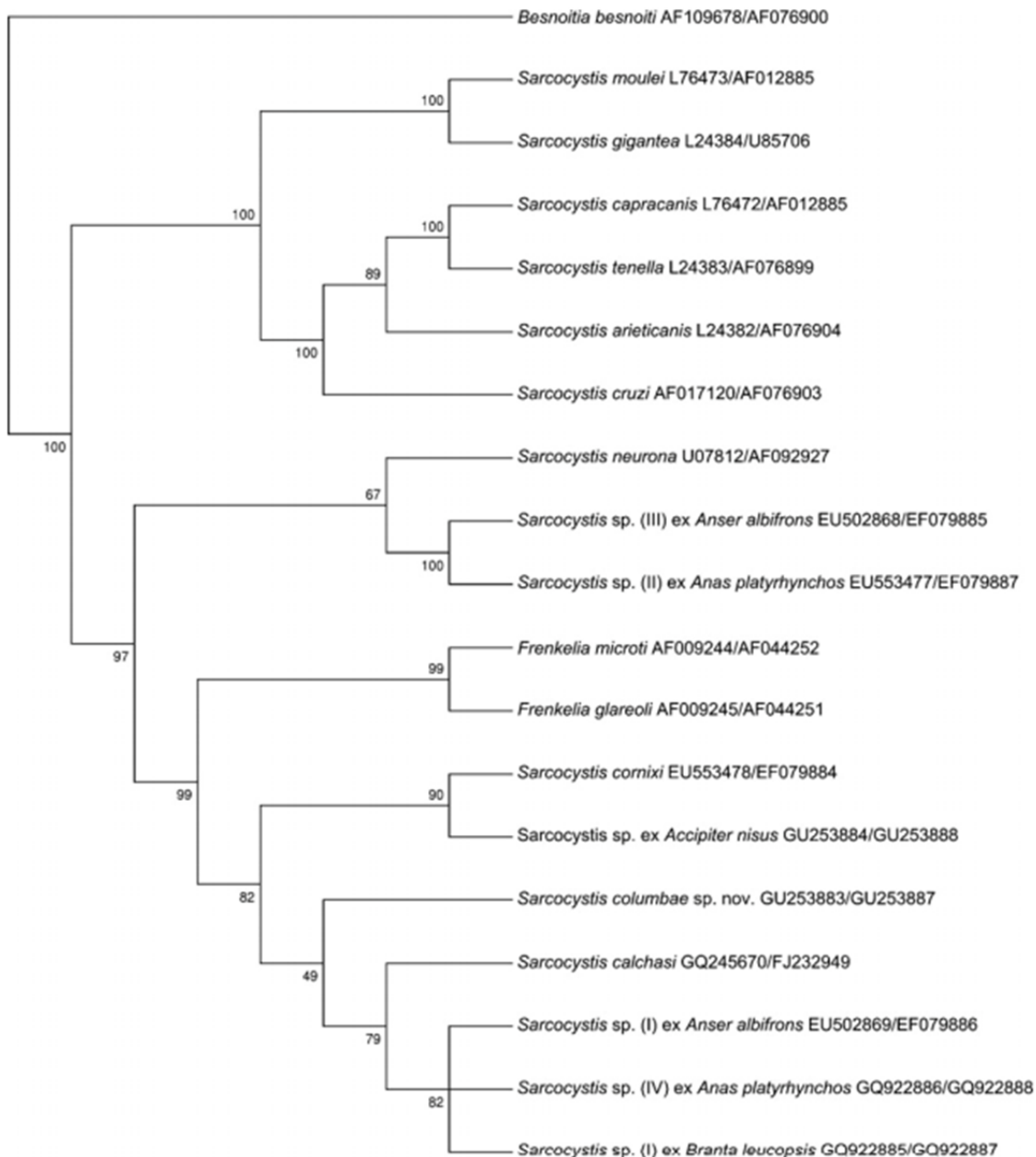


Abbildung 9. Phylogenetische Analyse mittels *maximum parsimony*-Methode

Wie in der maximum likelihood Methode wurde auch hier eine künstlich generierte Fusion aus Teilen der 18S rRNA und der 28S rRNA Gene für die Analyse herangezogen. Die Unterstützung für die Knotenpunkte wird auch hier mittels *bootstrapping* Werten bei 1000 Wiederholungen dargestellt.

4.4 Zusammenfassung der Taxonomie der hier beschriebenen Spezies aus Ringeltauben und Sperbern

Sarcocystis columbae sp. nov.

- I. Zwischenwirt: Ringeltaube (*Columba palumbus*), Herkunft: Norddeutschland
Etymologie: Der lateinische Name für Taube wurde für den Speziesnamen gewählt.
Größe der Gewebezysten in der Beinmuskulatur: 106 μm ($\pm 50 \mu\text{m}$; $n = 20$)
- II. Endwirt: unbekannt
- III. GenBank Zugangsnummern: GU253883 (18S rDNA); GU253885 (ITS1-Region); GU253887 (28S rDNA)

Sarcocystis sp. ex *Accipiter nisus*

- I. Zwischenwirt: unbekannt
- II. Endwirt: Sperber (*Accipiter nisus*), Herkunft: Norddeutschland
- III. GenBank Zugangsnummern: GU253884 (18S rDNA); GU253886 (ITS1-Region); GU253888 (28S rDNA)

Auf eine Namensgebung der Sarkosporidienspezies aus dem Darm des Sperbers wurde aufgrund fehlender morphologischer Charakteristika des Parasiten auf Seiten des weiterhin unbekanntem Zwischenwirts verzichtet.

4.5 Histologisch zeigen Habichte und Sperber eine hohe Befallsrate mit Sarkosporidien

Anschließend wurden weitere Dünndarmproben von Sperbern sowie Habichten auf das Vorkommen der neu entdeckten Sarkosporidienspezies und *S. calchasi* untersucht. Eine zunächst durchgeführte lichtmikroskopische Untersuchung von HE angefärbten histologischen Schnitten des Dünndarms zeigte eine Häufigkeit von Sporozysten in der Lamina propria von 76 % (38 von 50) bei Habichten und 45 % (9 von 20) bei Sperbern. Wie bereits bei den zuvor untersuchten Sperbern zeigte keiner der Vögel eine Entzündung in der Lamina propria, die mit Parasitenstadien assoziiert werden konnte.

Eine genauere Analyse der Sporozysten von zwei Habichten und zwei Sperbern, die gleichzeitig mit *S. calchasi*, *S. columbae* sp. nov. und *Sarcocystis* sp. ex *A. nisus* infiziert waren (siehe Ergebnisse der PCR unten), wiesen keine signifikanten Größenunterschiede auf (durchschnittlich $8,0 \times 11,9 \mu\text{m}$; $n = 20$ pro Vogel). Die Sporozysten des einzigen monoinfizierten Sperbers hatten ebenfalls eine Größe von durchschnittlich $8,0 \times 11,9 \mu\text{m}$ ($n = 20$ pro Vogel). Eine Unterscheidung von *S. calchasi*, *S. columbae* sp. nov. und *Sarcocystis* sp. ex *A. nisus* Sporozysten anhand ihrer Größenmorphologie war daher nicht möglich. DNA-basierte Methoden sind daher notwendig, um diese Arten im Endwirt zu differenzieren. Obige lichtmikroskopische und ultrastrukturelle Untersuchungen unterstreichen diese Feststellung und machen deutlich, dass *S. calchasi* morphologisch nicht von *S. columbae* sp. nov. abgrenzbar ist. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine speziesspezifische PCR entwickelt.

4.6 Neu entwickeltes nested-PCR Verfahren identifiziert *S. calchasi* und unterscheidet nächst verwandte Sarkosporidien

Da eine ausschließlich auf der Morphologie von Sporozysten beruhende Diagnose wegen gleicher Größenverhältnisse unter verschiedenen *Sarcocystis* Arten nicht möglich ist (siehe 4.5), wurde in der hier vorliegenden Studie eine *semi-nested*-PCR etabliert. Diese basiert auf der ITS1-Region und kann *S. calchasi* spezifisch von den am nächsten verwandten Spezies *S. columbae* und *Sarcocystis* sp. ex *A. nesus* sowie von weiteren, nah verwandten *Sarcocystis*-Arten wie *Frenkelia microti* und *Frenkelia glareoli* differenzieren. Hierzu wurden die Bindestellen der designten spezifischen Primer so gelegt, dass das PCR-Produkt auch nachträglich für eine Sequenzierung genügend Variabilität zwischen den Spezies aufweist um die *Sarcocystis* Arten mittels Sequenzvergleich differenzieren zu können (Abbildung 10). Insbesondere wurde darauf geachtet, dass die äußeren Primerpaare der PCR in variablen Regionen der ITS-1 Region binden.

Bisher war nichts zur Prävalenz von *S. calchasi* oder *S. columbae* und *Sarcocystis* sp. ex *A. nesus* in seinen Wirtstieren bekannt. Ziel war es daher, ein einfach zu benutzendes und verlässliches Analyseinstrument zu schaffen, welches epidemiologische Untersuchungen ermöglicht und zwischen nah verwandten aviären Sarkosporidien differenzieren kann. Da die Befallsdichte durch Sarkosporidien im Darm des Endwirts sehr gering sein kann und auch bereits archivierte, formalinfixierte und paraffineingebettete (FFPE) Proben untersucht werden sollten, wurde eine verschachtelte *semi-nested* PCR entwickelt. Die Primerbindestellen wurden dabei so gewählt, dass auch fragmentierte DNA aus FFPE Proben detektiert werden kann (Abbildung 10).

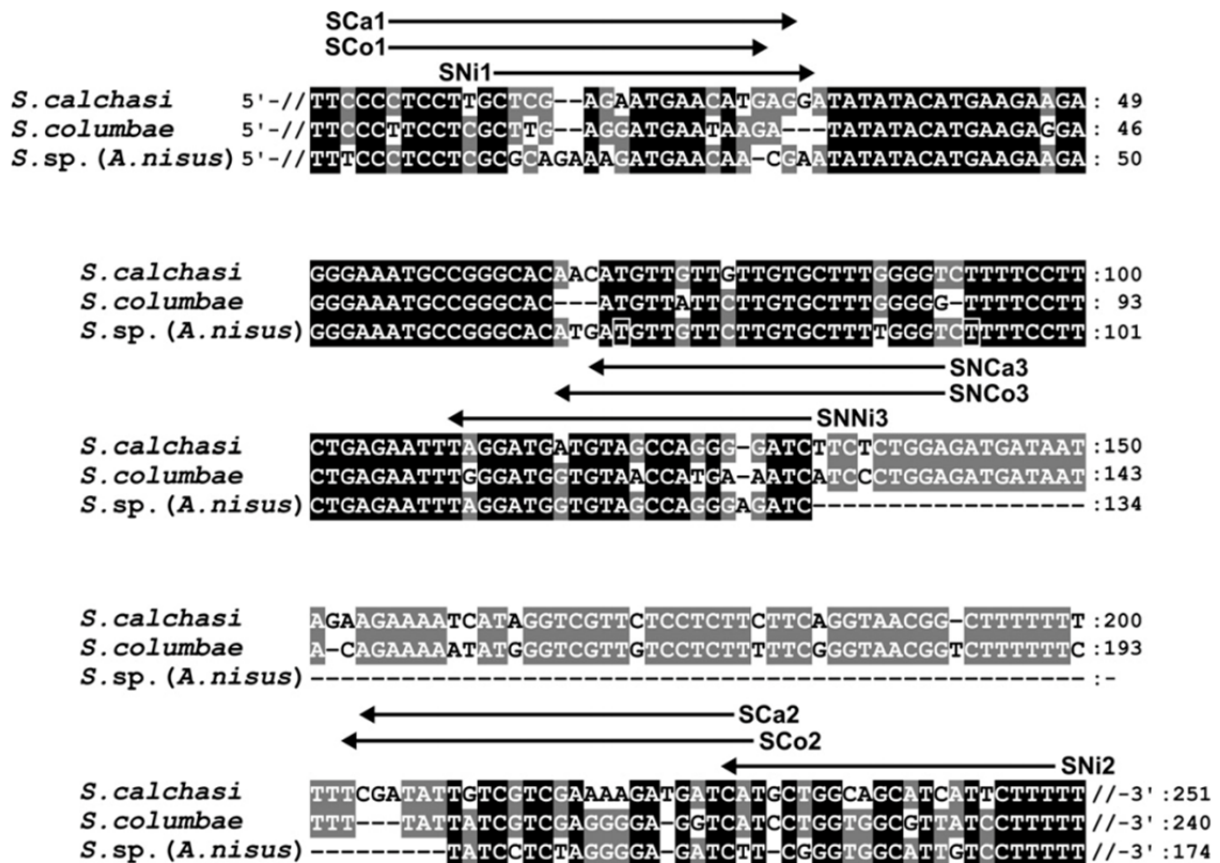


Abbildung 10. Sequenzvergleich eines Teils der ITS-1 Region von *S. calchasi*, *S. columbae* sp. nov. und *Sarcocystis* sp. ex *A. nesus*

Auffällig ist die Abwesenheit eines größeren Sequenzabschnittes in der ITS-1 Region von *Sarcocystis* sp. ex *A. nesus* im Vergleich zu den anderen beiden Spezies. Alle Primerbindestellen sind mittels Pfeilen dargestellt. Die Primer SCa1, SCa2 und SNa3 binden spezifisch die Sequenz von *S. calchasi*, während die Primer SCo1, SCo2 und SNe3 spezifisch die Sequenz von *S. columbae* sp. nov. binden. Dagegen binden die Primer SNI1, SNI2 und SNI3 spezifisch *Sarcocystis* sp. ex *A. nesus*.

Zu Beginn der Versuche wurden alle Primerpaare validiert. In keiner PCR-Reaktion wurden Kreuzreaktionen mit der DNA von *F. microti* und *F. glareoli* festgestellt. Die jeweils speziesspezifischen Primer zeigten keine Kreuzreaktion mit DNA-Proben von *S. calchasi* und *S. columbae ex Accipiter nisus*. Um sicher zu stellen, dass spezifische DNA von *Sarcocystis* spp. aus Habichten amplifiziert wurden, wurden neun zufällig gewählte anfängliche PCR-Produkte (*S. calchasi*, Proben 23, 35, 39; *S. columbae* sp. nov., Proben 7, 21, 23; *Sarcocystis* sp. ex *A. nisus*, Proben 7, 23, 41) und neun zufällig gewählte semi-nested PCR-Produkte (*S. calchasi*, Proben 5, 16, 22; *S. columbae*, Proben 35, 39, 43; *Sarcocystis* sp. ex *A. nisus*, Proben 27, 33, 50) aufgereinigt und anschließend mittels desselben *forward* und *reverse* Primers sequenziert. Auf gleiche Weise wurden spezifische DNA-Produkte von *Sarcocystis* spp. des Sperbers mittels neun zufällig gewählter *semi-nested* PCR-Produkte (*S. calchasi*, Proben 3, 10, 17; *S. columbae*, Proben 1, 3, 15; *Sarcocystis* sp. ex *A. nisus*, Proben 4, 8, 20) bestätigt.

4.7 Hohe Befallsrate von Habichten und Sperbern mit drei verschiedenen Sarkosporidienarten

Für die eigentliche epidemiologische Untersuchung wurden archivierte Darmproben aus den Jahren 1997 bis 2009 von 50 Habichten beziehungsweise 20 Sperbern untersucht, welche bereits lichtmikroskopisch untersucht worden waren.

Durch den molekularen Nachweis von DNA der ITS1-Region mittels der neu entwickelten spezifischen *semi-nested* PCR für die drei *Sarcocystis* spp. *S. calchasi*, *S. columbae* sp. nov. und *Sarcocystis* sp. ex *Accipiter nisus* konnte eine sehr hohe totale Befallsrate der Habichte (92 %) und der Sperber (100 %) nachgewiesen werden. Es zeigte sich damit im Vergleich zu der lichtmikroskopischen Untersuchung eine höhere Sensitivität. Signifikante Unterschiede

im Befall zwischen männlichen und weiblichen Tieren fanden sich nicht ($P < 0,05$; χ^2 -Test). Alle drei *Sarcocystis* Arten konnten auch in falknerisch gehaltenen Habichten identifiziert werden. Keiner der falknerisch gehaltenen Habichte war frei von Sarkosporidien. Der früheste Nachweis von *S. calchasi* beim Habicht und Sperber gelang für das Jahr 1999 beziehungsweise 1997. Im Einzelnen werden die Ergebnisse der Untersuchung in den folgenden Tabellen dargestellt (Tabellen 6 und 7).

Interessanterweise war die Hälfte der Habichte (25/50) und 45 % der Sperber (9/20) gleichzeitig positiv für DNA aller drei *Sarcocystis* spp. im Darm. Eine Übersicht zu den Einzelergebnissen gibt Tabelle 8.

Tabelle 6. Häufigkeit von *S. calchasi*, *S. columbae* sp. nov. und *Sarcocystis* sp. Ex *Accipiter nisus* im Darm von Habichten aus Norddeutschland der Jahre 1997-2008

Anzahl positiv / Anzahl getestet					
Prozent					
95% Konfidenzintervall					
Anzahl untersuchter Vögel		<i>Sarcocystis</i> spp.	<i>S. calchasi</i>	<i>S. columbae</i> sp nov.	<i>Sarcocystis</i> sp. ex <i>Accipiter nisus</i>
Habichte gesamt	50	46/50 92 84-100	31/50 62 48-76	42/50 84 74-94	36/50 72 59-85
Freilebend	46	42/46 91 83-100	28/46 61 47-75	41/46 89 80-98	34/46 74 61-87
Falknerisch gehalten	4	4/4 100 100-100	3/4 75 26-100	1/4 25 0-74	2/4 50 0-90
Männlich	26	24/26 92 82-100	16/26 62 42-81	22/26 85 70-99	20/26 77 60-93
Weiblich	24	22/24 92 80-100	15/24 63 43-82	20/24 83 68-99	17/24 71 52-89

Tabelle 7. Häufigkeit von *S. calchasi*, *S. columbae* sp. nov. und *Sarcocystis* sp. ex *A. nisus* im Darm von freilebenden Sperbern aus Norddeutschland der Jahre 1997- 2009

Anzahl positiv / Anzahl getestet					
Prozent					
95% Konfidenzintervall					
Anzahl untersuchter Vögel		<i>Sarcocystis</i> spp.	<i>S. calchasi</i>	<i>S. columbae</i> sp nov.	<i>Sarcocystis</i> sp. ex <i>Accipiter nisus</i>
Sperber gesamt	20	20/20 100 100-100	14/20 71,4 49-91	17/20 85 69-100	17/20 85 69-100
Männlich	9	9/9 100 100-100	7/9 77,8 49-100	9/9 100 100-100	8/9 88,9 67-100
Weiblich	11	11/11 100 100-100	7/11 63,6 34-93	8/11 72,7 45-100	9/11 81,8 58-100

Tabelle 8. Häufigkeit von Einzel- und Koinfektionen mit *Sarcocystis* spp. in Habichten und Sperbern aus Norddeutschland ermittelt durch speziesspezifische *semi-nested* PCR

	Anzahl positiv / Anzahl getestet Prozent 95% Konfidenzintervall	
	Habicht	Sperber
<i>S. calchasi</i> (A) Einzelfektion	31/50 62 48-76	14/20 70 49-91
<i>S. columbae</i> sp. nov. (B) Einzelfektion	42/50 84 74-94	17/20 85 69-100
<i>Sarcocystis</i> sp. ex <i>A. nisus</i> (C) Einzelfektion	36/50 72 59-85	17/20 85 69-100
A + B	29/50 58 44-72	12/20 60 38-82
A + C	26/50 52 38-66	11/20 55 33-77
B + C	33/50 66 53-79	14/20 70 49-91
A + B + C	25/50 50 36-64	9/20 45 23-67

4.8 *Sarcocystis* sp. ex *A. nisus* kommt in verschiedenen Sequenzvarianten vor

Alle neun mittels der *semi-nested* PCR amplifizierten und sequenzierten Abschnitte der ITS1-Regionen von *S. calchasi* beziehungsweise *S. columbae* sp. nov waren zu 100 % identisch mit denen der zuvor identifizierten Sequenzen dieser Parasiten (siehe 4.3 bzw. GenBank Sequenzcodes: FJ232948 und GU253885). Die amplifizierten ITS1-Sequenzen von *Sarcocystis* sp. ex *A. nisus* waren mit Ausnahme von zwei *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) sowohl untereinander identisch als auch mit der zuvor identifizierten Sequenz (siehe 4.3 bzw. GenBank Sequenzcode: GU253886). Beim Sequenzvergleich von *Sarcocystis* sp. ex *A. nisus* zeigten sich Substitutionen bei PCR-Produkten in Position 71 (T zu C) bei zwei Habichten (# 33 und 50) und in Position 94 (T zu A) bei einem weiteren Habicht (# 23) und bei zwei Sperbern (# 4 und 8) (Abbildung 11).

```

GU253886.1      ATATATACATGAAGAAGAGGGAAATGCCGGGCACATGATGTTGT
HM008675.1      ATATATACATGAAGAAGAGGGAAATGCCGGGCACATGACGTTGT
HM008676.1      ATATATACATGAAGAAGAGGGAAATGCCGGGCACATGATGTTGT
*****

GU253886.1      TCTTGTGCTTTTGGGTCTTTTCCTTCTGAGAATTTAGGATGGTGTAGCCAGGGAGATCTA
HM008675.1      TCTTGTGCTTTTGGGTCTTTTCCTTCTGAGAATTTAGGATGGTGTAGCCAGGGAGATCTA
HM008676.1      TCTTGTGCTTTTGGGTCAATTTTCCTTCTGAGAATTTAGGATGGTGTAGCCAGGGAGATCTA
*****

```

Abbildung 11. Sequenzvergleich unterschiedlicher ITS-1 Sequenzen von *Sarcocystis* sp. ex *Accipiter nisus* aus Habichten und Sperbern

SNPs fanden sich in zwei Positionen in mehreren Fällen. Die jeweilige Position ist rot umrandet. Die Sequenzierungsergebnisse wurden unter den GenBank Sequenzcodes HM008675 und HM008676 hinterlegt.

5. DISKUSSION

5.1 Erkenntnisse aus der phylogenetischen Analyse aviärer Sarkosporidien

In dieser Dissertation wurden auf phylogenetischen Untersuchungen basierende erste Erklärungsansätze für die ungewöhnlich hohe Virulenz von *Sarcocystis calchasi* für Haustauben (*Columba livia* f. *domestica*) gesucht. Auf dieser Grundlage sollten weitere Untersuchungen zur Wirtsspezifität des Parasiten durchgeführt werden, welche möglicherweise in enger Beziehung zur hohen Virulenz steht. Zwei Gründe gaben Anlass zu dieser Annahme: Erstens wird vogelinfizierenden *Sarcocystis*-Arten allgemein eine niedrigere Wirtsspezifität als Säugetiere-infizierenden Arten zugeschrieben (Dubey, 2015). Zweitens wird davon ausgegangen, dass an den Wirtsorganismus weniger angepasste oder in eine Population neu eingeschleppte Parasiten eine gesteigerte und oftmals fatale Virulenz aufweisen können. Stellen Haustauben also nur einen von vielen möglichen Zwischenwirten für *S. calchasi* dar oder sind sie als Fehlwirte anzusehen und erklärt das die hohe Virulenz des Parasiten? Um sich den Antworten dieser offenen Fragen zu nähern, wurden zunächst phylogenetische Untersuchungen durchgeführt. In weiteren auf diesen Ergebnissen aufbauenden Schritten wurden Untersuchungen zur Wirtsspezifität und zur Verbreitung des Parasiten auf der Seite des Endwirtes in der Region der ersten Ausbrüche unternommen.

In der Phylogenetik wird sich morphologischer, biologischer und genetischer Merkmale eines Organismus bedient, um einen stammesgeschichtlichen Verwandtschaftsnachweis zu führen. Während früher für die Identifizierung von *Sarcocystis*-Arten und ihrer phylogenetischen Einordnung maßgeblich die ultrastrukturelle Analyse der Zystenwand sowie die

experimentelle Zyklusuntersuchung dienen, ist heutzutage die molekulargenetische Analyse als entscheidender Schritt hinzugekommen. Mit ihr kann in den meisten Fällen eine belastbare Einordnung eines Organismus in ein verwandtschaftliches Beziehungsgeflecht bei gleichzeitiger substantieller Abgrenzung im Sinne eines Artbegriffs vorgenommen werden. Um weitere Hinweise zur Wirtsspezifität von *S. calchasi* zu erhalten, schien es notwendig, neben einer tiefgehenden genetischen Analyse des Parasiten im Speziellen auch morphologische und biologische Fakten zu betrachten. In einem ersten Schritt wurden weniger konservierte ribosomale Strukturelemente der DNA sowie die ITS1-Region für eine Analyse ausgewählt. Mittels BLAST-Algorithmus wurden diese auf Übereinstimmungen mit bereits publizierten Sequenzfragmenten überprüft (Altschul et al., 1990). Die identifizierten Genom-Abschnitte wurden dann mit phylogenetischen Methoden weiter untersucht. Interessanterweise wurde so deutlich, dass *S. calchasi* eine sehr nahe Verwandtschaft zu der erst kürzlich beschriebenen Art *S. wobeseri* aus Entenvögeln (Anatidae) und zu *S. cornixi* aus Krähenvögeln (Corvidae) aufweist (Kutkienė et al., 2010). Beide Arten besitzen wie *S. calchasi* ebenfalls eine glatte Zystenwand. Die nahe Verwandtschaft erscheint insofern ungewöhnlich, als dass die Ordnungen Anatidae und Corvidae phylogenetisch erstens sehr weit von Tauben und zweitens auch untereinander weit voneinander entfernt sind (Hackett et al., 2008). Da die Endwirte beider Spezies nicht bekannt sind und diese neben *S. calchasi* mit beiden Frenkelien-Arten aus Turmfalke (*Falco tinnunculus*) und Mäusebussard (*Buteo buteo*) clustern (siehe Phylogramm), erscheint diese Inkongruenz in der Kophylogenie zum Wirtsorganismus möglicherweise nur auf Seiten der Zwischenwirte zu bestehen. Möglicherweise erfolgte innerhalb dieses phylogenetischen Stammes evolutionär eine an den jeweiligen Endwirt unter den Accipitriformes angepasste Entwicklung, während diese auf Seiten der Zwischenwirte ausblieb oder es zu Verschiebungen kam.

In einem nächsten Schritt wurde daher untersucht, ob nahe Verwandte von Haustaube und Habicht ebenfalls durch *Sarcocystis*-Arten infiziert werden können und wie sich diese phylogenetisch einordnen lassen. Lichtmikroskopische und ultrastrukturelle Untersuchungen von Sperbern (*Accipiter n. nisus*) und Ringeltauben (*Columba palumbus*) ließen das Vorkommen von bislang unbekanntem *Sarcocystis* spp. bereits vermuten. Als Zwischenwirt fungierend zeigten Ringeltauben interessanterweise eine hohe Prävalenz von in der Muskulatur vorkommenden Zystenstrukturen, die jedoch in ihrer Größe teilweise einen deutlichen Unterschied zu *S. calchasi* aufwiesen. Zudem fanden sich kaum entzündliche Veränderungen in der Muskulatur und keine klinische Symptomatik, die auf eine durch den Parasiten induzierte Pathologie des ZNS hindeuten würde. Somit ergaben sich sowohl morphologische als auch biologische Hinweise, die auf eine eigene *Sarcocystis*-Art in der Ringeltaube hindeuteten, auch wenn sich die Ultrastruktur der Zystenwand kaum von derjenigen von *S. calchasi* unterscheiden ließ. Auf Seiten des Endwirts zeigten die untersuchten Sperber einen typisch areaktiven Befall der Lamina propria des Dünndarms mit Sporozysten von identischer Größe wie *S. calchasi*. Wegen der unzureichenden oder nicht vorhandenen morphologischen Unterschiede der parasitären Strukturen in Ringeltaube und Sperber erbrachte erst die genetische Untersuchung eine eindeutige Abgrenzung zu *S. calchasi* im Sinne eigenständiger Arten. Mittels phylogenetischer Sequenzanalyse basierend auf der *maximum likelihood*-Methode und der *parsimony tree building*-Methode zeigte sich dann auch, dass die zwei neu entdeckten *Sarcocystis*-Arten sich zwar eindeutig von *S. calchasi* unterscheiden, gleichzeitig jedoch eine sehr nahe Verwandtschaft untereinander aufweisen. Zudem konnte in der Analyse gezeigt werden, dass die drei *Sarcocystis*-Arten eine eigene Gruppe mit anderen, teils oben bereits erwähnten vogelinfizierenden Arten bilden. Aufgrund der hinreichenden morphologischen, biologischen und genetischen Daten der *Sarcocystis*-Art aus der Ringeltaube wurde diese als eigenständige Spezies nach dem lateinischen Begriff für Taube (*“columba“*), *Sarcocystis columbae*, benannt. Auf eine

Namensgebung der aus den Sperbern isolierten Art wurde zunächst verzichtet, da aufgrund der fehlenden morphologischen Charakteristika des Parasiten auf Seiten des Zwischenwirts eine Benennung noch nicht angebracht erschien.

5.2 Speziesspezifische *semi-nested* PCR als Grundlage für retrospektive, epidemiologische und diagnostische Untersuchungen

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, ein Nachweisverfahren zu etablieren, mit dem sich *S. calchasi* eindeutig von nah verwandten *Sarcocystis*-Arten abgrenzen lässt. Gleichzeitig bestand die Notwendigkeit, mittels einer hohen Sensitivität auch einen geringen Befall im Wirtsorganismus nachzuweisen. Zudem sollte das Verfahren es ermöglichen, die Untersuchung auf archiviertes und damit häufig zuvor formalinfixiertes und paraffineingebettetes (FFPE) Material für retrospektive Untersuchungen auszudehnen. Wesentliche Elemente sollten später auch für diagnostische *realtime*-PCR-Untersuchungen eingesetzt werden können. Für die gebotene Spezifität bei gleichzeitig hoher Sensitivität des Verfahrens wurde daher eine *nested*-PCR entwickelt. Grundlage waren die zuvor mit universellen Primern amplifizierten Sequenzen von *S. calchasi*, *S. columbae* und *Sarcocystis* sp. ex *A. nissus*. Zur Erreichung des Ziels war es notwendig, diskriminierende Primerbindestellen zu finden, die eine Differenzierung untereinander ermöglichen. Gleichzeitig durfte die Länge des PCR-Produkts des äußeren Primerpaares nur etwa 200 bp betragen, um sowohl für eine Analyse von FFPE-Material geeignet zu sein als auch in einem späteren Schritt als diagnostische PCR zum Nachweis von *S. calchasi* Verwendung finden zu können.

Mittels genetischer Distanzmatrix-Analyse zeigten sich in der ITS1-Region die größten Unterschiede zwischen den *Sarcocystis*-Arten, während die ribosomale DNA auch in der

D2-Region nur 3 bis 4 % Sequenzunterschiede aufwies und bei ihrer kurzen Länge kaum Primerbindestellen für eine *nested*-PCR bot. Um ausreichende Unterschiede in der Sequenz sowohl in den Primerbindestellen als auch in den Amplifikaten für eine Diskriminierung nutzen zu können, wurde daher die ITS1-Region gewählt und aufgrund der inhomogenen Verteilung der variablen Sequenzregionen eine *semi-nested*-PCR mit jeweils drei Primerbindestellen etabliert. Es waren zwar zwischen den Arten geringe Unterschiede in den amplifizierten Genprodukten vorhanden, doch enthielten sie mehrere Motive, die für die in der Etablierung wichtigen Überprüfung der Spezifität der PCR mittels Sequenzierung eine ausreichende Basen-Variabilität gewährleisteten.

Die *nested*-PCR-Methode zeigt aufgrund einer nachgeschalteten Amplifikation eine generell höhere Spezifität als eine konventionelle PCR und hat gleichzeitig den Vorteil, selbst kleine Mengen an DNA ausreichend zu amplifizieren (Heckerroth und Tenter, 1999). Dies erschien insbesondere für die nachträgliche Auswertung von archiviertem Material notwendig. Auf diese Weise konnte aus archivierten Proben von 1996 noch ausreichend DNA amplifiziert werden. Besondere Aufmerksamkeit bei der Durchführung von nachgeschalteten PCR-Systemen muss der Vermeidung von Kontaminationen untereinander gewidmet werden. Dies wurde durch die Mitführung von Prozessierungs-Kontrollen gewährleistet.

5.3 Analyse der Wirtsspezifität als Schlüssel zum Verständnis der hohen Virulenz von *S. calchasi*

Gegenwärtig wird davon ausgegangen, dass vogelinfizierende *Sarcocystis*-Arten im Gegensatz zu Arten, die Säugetiere infizieren, eine niedrigere Wirtsspezifität aufweisen (Dubey, 2015). Dies trifft insbesondere auf die miteinander sehr nah verwandten Spezies *S. neurona* und *S. falcatula* zu. In ersten Sequenzvergleichen der ITS1-Region sowie

phylogenetischen Analysen der ribosomalen gDNA wurde deutlich, dass *S. calchasi* mit *S. neurona* und *S. falcatula* einen gemeinsamen Ast vogelinfizierender *Sarcocystis*-Arten bildet. Diese nahe Verwandtschaft ließ vermuten, dass *S. calchasi* in ähnlicher Weise über ein weites Wirtsspektrum verfügen könnte. Einen weiteren Hinweis gab die extrem hohe Virulenz von *S. calchasi* für Haustauben. Im ausbalancierten Funktionssystem Wirt-Parasit erscheint dieses übersteigerte Virulenzpotential für das Überleben des Parasiten negativ und daher evolutionär betrachtet unverhältnismäßig. Es mag zwei evolutionären Theorien genügen: Neben einer Fehlanpassung des Parasiten an den Wirtsorganismus (*failure to speciate*) kommt ebenso das Konzept eines unvollständigen Wirtswechsels (*incomplete host-switching*) in Frage (Banks und Paterson, 2005). Da in Infektionsversuchen bereits gezeigt werden konnte, dass Sporozysten von *S. calchasi* nach oraler Infektion bei zahlreichen Säugetieren keine Klinik auslösen (Olias, 2010a), ließ sich schlussfolgern, dass die Infektiösität ähnlich wie bei *S. falcatula* und im Gegensatz zu *S. neurona* auf Vögel beschränkt sein könnte.

Als ersten Schritt zur Überprüfung dieser Annahme wurden Ringeltauben (*Columba palumbus*) und Sperber (*Accipiter n. nisus*) als mit Haustauben und Habichten am nächsten verwandte Spezies auf eine Infektion mit *S. calchasi* hin untersucht. Mittels Sequenzanalyse der durch Universalprimer amplifizierten 18S und 28S rDNA-Produkte konnten sowohl in der Ringeltaube als auch im Sperber bisher unbekannte *Sarcocystis*-Arten nachgewiesen werden. In der phylogenetischen Analyse zeigte sich, dass die nun als *S. columbae* benannte Spezies aus der Ringeltaube und *Sarcocystis* sp. ex *Accipiter nisus* untereinander und zu *S. calchasi* nur sehr geringe Sequenzunterschiede aufweisen und ihre *p*-Distanz der ITS1-Region zu *S. calchasi* 0,165 beziehungsweise 0,195 beträgt. Zusammen formen diese drei Spezies einen Ast mit *Sarcocystis wobeseri*, *S. cornixi*, *S. neurona*, *F. microti* und *F. glareoli*. Interessanterweise zeigte sich die nächste Verwandtschaft zu *S. wobeseri*, eine Art, die zahlreiche Entenvögel befällt und damit wie *S. rileyi* über ein breites Wirtsspektrum verfügt.

Aufbauend auf diesen Sequenzvergleichen wurde es möglich, für *S. calchasi*, *S. columbae* und *Sarcocystis* spp. ex *A. nisus* jeweils artspezifische Primer zu etablieren. Damit konnten dann in einer *semi-nested* PCR bei Habichten und Sperbern alle drei Parasiten in einer hohen Prävalenz nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass mit der verfeinerten Methode *S. calchasi* auch bei Sperbern in einer hohen Prävalenz von 71,4 % nachgewiesen werden konnte, wirft erneut die Frage nach der Wirtsspezifität des Parasiten auf. Da Sperber sich in der Regel nicht von Tauben ernähren, scheint es, unterstützt von den Daten zum Zwischenwirtsspektrum nah verwandter *Sarcocystis*-Arten (siehe oben), sehr wahrscheinlich, dass der Parasit auch bei Singvögeln vorkommt, die ins Beutespektrum des Sperbers fallen (Opdam, 1979). Im Allgemeinen steht die Größe eines Beutetieres immer in Relation zu seinem Räuber. Bei denen dem sexuellen Dimorphismus unterliegenden *Accipiter*-Arten fangen die kleineren männlichen Tiere auch kleinere Beutetiere als die größeren weiblichen Tiere (Storer, 1966). Die Tatsache, dass *S. calchasi* beim Sperber gleichermaßen bei männlichen und weiblichen Tieren nachgewiesen werden konnte, lässt weiterhin vermuten, dass die Brieftaube nicht der einzige Zwischenwirt von *S. calchasi* sein kann und dass auch andere, kleinere Vögel in Betracht kommen müssen. Gleiches gilt auch für *S. columbae*, nachdem auch dieser Parasit im Sperber nachgewiesen wurde. Zudem stellt sich auch für die im Sperber gefundene, bisher unbenannte *Sarcocystis*-Art die Frage nach der Wirtsspezifität bzw. des Wirtsspektrums. In anderen Studien wurde der Sperber bereits als Endwirt von *Sarcocystis*-Arten beschrieben (Cerna et al., 1978; Svobodová, 1997), ohne dass jedoch die morphologischen oder genetischen Charakteristika beschrieben wurden. Die in dieser Studie untersuchten Sporozysten aus den Sperbern stammen zwar aus unterschiedlichen Regionen Norddeutschlands, waren jedoch genetisch identisch, so dass der Verdacht zunächst nahelag, dass der Sperber Endwirt für nur eine *Sarcocystis*-Art darstellt. Allerdings wurde in dieser initialen Studie in der PCR ein universelles Primerpaar für Apicomplexa-Arten benutzt, so dass nur die dominierende *Sarcocystis*-Art amplifiziert wurde und detektiert werden konnte.

In der zweiten Untersuchung, die dann mithilfe der spezifischen *semi-nested*-PCR erfolgen konnte, konnte neben *S. calchasi* auch *S. columbae* nachgewiesen werden. Des Weiteren ist in einer anderen Studie der nah verwandte Rundschwanzsperber in den USA als Endwirt mehrerer genetisch verschiedener Sarkosporidien beschrieben worden (Yabsley et al., 2009), so dass die Vermutung bestehen bleibt, dass auch die Sperber der hier vorliegenden Studie für mehr als zwei *Sarcocystis*-Arten als Endwirte dienen können. Dabei liegt es nahe, als Zwischenwirt einen kleineren Singvogel in Betracht zu ziehen, da Sperber sich hauptsächlich von diesen ernähren.

5.4 Prävalenz von *S. calchasi* im Endwirt

Aufbauend auf der im Rahmen dieser Dissertation etablierten *semi-nested*-PCR wurde stichprobenartig die Prävalenz von *S. calchasi* im Endwirt untersucht. Neben Habichten wurden frische sowie FFPE-Proben von Sperbern (*Accipiter n. nisus*) auf das Vorkommen von *S. calchasi*-DNA im Darm untersucht. Ziel war es auch, erste Daten über die mögliche Verbreitung des Parasiten in Deutschland zu generieren. Überraschenderweise zeigten die Untersuchungsergebnisse mit 62 % eine sehr hohe Befallsrate von Habichten in Norddeutschland. Auch wenn dieses Ergebnis nicht als repräsentativ für ganz Deutschland gelten kann, deutet es doch auf eine hohe Prävalenz von *S. calchasi* in Habichten hin. Noch überraschender war, dass 71,4 % der Sperber in der PCR ebenfalls positiv getestet wurden.

Habichte und Sperber sind die einzigen *Accipiter*-Arten, die in Europa weit verbreitet sind. Während die verschiedenen Unterarten des Habichts in der gesamten nördlichen Holarktis verbreitet sind, finden sich keine Sperber in der Nearktis (Ferguson-Lees, 2001; Sargatal, 1997). Ihr Verbreitungsgebiet liegt in Europa und Asien und überlagert sich dort in weiten Teilen mit dem des Habichts. Allerdings kommt der Sperber im Gegensatz zum Habicht auch

im östlichen Nordafrika und in der Türkei, im Iran, in Indien, in China und im gesamten südlichen Asien vor. Sowohl Habichte als auch Sperber ernähren sich in den Waldregionen der Paläarktis hauptsächlich von Vögeln (Ferguson-Lees, 2001). Dabei stellen Haus- und Ringeltauben die wichtigsten Beutetiere für den Habicht dar (Altenkamp, 2001; Opdam et al., 1977; Penteriani, 1997). Auch in deutschen Großstädten wurden Tauben als ein Hauptnahrungsbestandteil des Habichts identifiziert (Altenkamp, 2001; Rutz, 2004). Bei in Hamburg untersuchten Brutpaaren bestanden 30 - 40 % der Beutetiere aus Stadt- und Ringeltauben (Rutz, 2004). In Berlin waren 30,1 % der Beutetiere Haustauben und 8,7 % Ringeltauben (Altenkamp, 2001).

Haustauben und Habichte kommen in weiten Teilen Europas, aber auch in den USA und einigen Teilen Asiens gemeinsam vor (Abbildung 12). Hierdurch ergibt sich die theoretische Möglichkeit einer Ausbreitung der durch *S. calchasi* in der Haustaube verursachten Erkrankung über weite Teile der Holarktis. Noch größere Überschneidungen mit dem Verbreitungsgebiet der Haustaube bestehen für den Sperber, der in weiten Teilen des südasiatischen Raums überwintert.

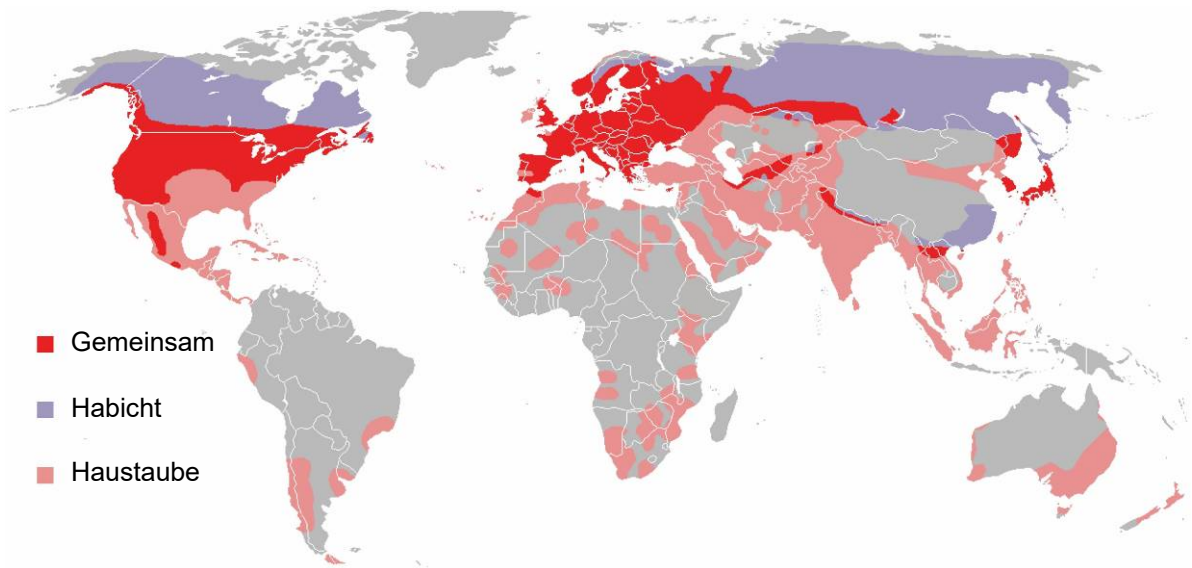


Abbildung 12. Großflächige Überschneidung der Verbreitungsgebiete von Habicht und Haustaube in der nördlichen Hemisphäre. Karte von Kravtchenko (2008), (http://en.wikipedia.org/wiki/File:Columba_livia_distribution_map.png), modifiziert und benutzt unter *GNU Free Documentation License*.

Aufgrund seines ausgeprägteren Zugverhaltens gegenüber dem Habicht erscheint daher insbesondere der Sperber geeignet, den Parasiten in Nord-Süd-Richtung zu verbreiten. Dagegen ist über ein natürliches transatlantisches Zugverhalten von *Accipiter*- und Tauben-Arten nichts bekannt. Vielmehr müssen die in dieser Studie positiv getesteten und als Beizvögel eingesetzten Habichte Anlass geben, über eine anthropogene Verbreitung der Erkrankung durch die Falknerei nachzudenken. Noch viel bedeutender dürfte in diesem Zusammenhang jedoch eine mögliche Verbreitung durch den Taubensport ausfallen. Jedes Jahr werden Tausende in Deutschland gezüchtete Brieftauben unkontrolliert rund um den Globus verschickt.

Alle *Accipiter*-Arten der Holarktis ernähren sich vornehmlich von Vögeln. Die im Rahmen dieser Arbeit angefertigten phylogenetischen Untersuchungen von Habichten und Sperbern zeigen eine nahe Verwandtschaft beider Vogelarten zueinander (Abbildung 13).

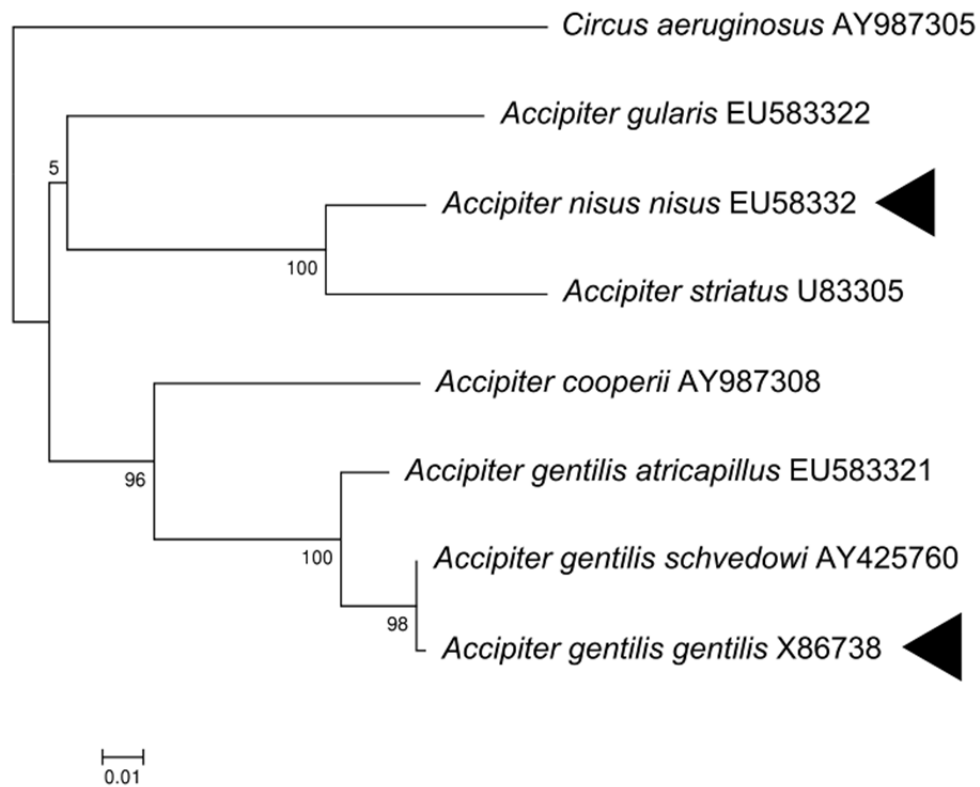


Abbildung 13. Verwandtschaftsverhältnisse von Habicht (*A. g. gentilis*) und Sperber (*A. n. nisus*)

Maximum likelihood-Analyse basierend auf 1001 bp des Cytochrom *b*-Gens von *Accipiter gentilis*-Subspezies und allen *Accipiter* spp., deren Verbreitungsgebiet sich in großen Teilen der Holarktis mit dem der Haustaube überschneidet. Die Subspezies des Habichts, *Accipiter g. atricapillus*, ist zusammen mit dem Rundschwanzsperber (*Accipiter cooperii*) und dem Eckschwanzsperber (*Accipiter striatus*) in Nordamerika heimisch. Die Subspezies *Accipiter g. schvedowi* repräsentiert den Habicht im ostasiatischen Raum, wo auch der Trillersperber (*Accipiter gularis*) heimisch ist. Die Rohrweihe (*Circus aeruginosus*) dient als Wurzel des phylogenetischen Baums, dessen Astlänge proportional dem Grad der phylogenetischen

Distanz der Spezies entspricht. Die Nummern der Knotenpunkte geben die *bootstrap*-Werte (1000 *replicates*) an. ◀: Habicht (*A. g. gentilis*) und Sperber (*A. n. nisus*).

Abbildung: L. Olias

Anzumerken bleibt allerdings, dass basierend auf dieser Untersuchung auch andere in der Holarktis heimische *Accipiter* spp. als potentielle Endwirte in Frage kommen könnten. In dieser Hinsicht bleibt jedoch zu beachten, dass neben den Unterarten des Habichts nur für den Rundschwanzsperber (*Accipiter cooperi*), der in Nordamerika und im nördlichen Mittelamerika vorkommt, Haustauben und andere Taubenarten als zentrales Beutetier beschrieben werden. So machten in einer Untersuchung in Nordamerika die Carolinataube (*Zenaida macroura*) und die Haustaube 24 % bzw. 19 % der Beute des Rundschwanzsperbers aus (Roth and Lima, 2003). Der Sperber dagegen ernährt sich vorwiegend von kleineren Singvögeln, während ihm Tauben nur gelegentlich als Beute dienen (Opdam, 1979). Umso erstaunlicher erscheint die im Rahmen dieser Studie festgestellte hohe Befallsrate des Sperbers durch *S. calchasi*. Unter dem Eindruck dieses Ergebnisses liegt es nahe, sich die Frage zu stellen, ob nicht etwa Singvögel als weitere Zwischenwirte für *S. calchasi* fungieren. Möglicherweise könnte darüber die hohe Virulenz des Parasiten für Haustauben über den Aspekt einer Fehlanpassung des Parasiten an diesen Zwischenwirt erklärt werden. In ähnlicher Weise lässt sich die hohe Virulenz von *S. neurona* für zahlreiche Tierarten erklären. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass der eigentliche Zwischenwirt von *S. neurona* offenbar der Braunkopf-Kuhstärling (*Moluthrus ater*) ist, für den der Parasit apathogen ist (Mansfield et al., 2008). Für *S. calchasi* scheint eine belastbare wissenschaftliche Aussage darüber erst nach weiteren Infektionsversuchen und epidemiologischen Untersuchungen weiterer potentieller End- und Zwischenwirte möglich.

5.5 Ausblick

Während Sarkosporidien im Allgemeinen als wirtsspezifisch betrachtet werden können, sind einige aviäre Arten wie *S. neurona*, *S. falcatula* oder auch *S. dispersa* für ihre niedrige Wirtsspezifität bekannt. In dieser Studie wurden mittels einer auf universellen (pan-*Sarcocystis*) Primern basierenden PCR gezeigt, dass Habichtsartige (*Accipiter* spp.) als Endwirte sowohl für *S. calchasi* als auch seine im Zuge dieser hier vorliegenden Studie identifizierten nahe verwandten *Sarcocystis* spp. in Frage kommen. Es bleibt abzuwarten, wie weit das Wirtsspektrum im Bereich des Zwischenwirts für diese *Sarcocystis* Arten ist und ob es Unterschiede in der Virulenz gibt. Eine Infektionsempfänglichkeit von Papageienartigen durch *S. calchasi* kann in der Zwischenzeit als gesichert angesehen werden (Olias et al., 2014; Rimoldi et al., 2013). Die in dieser Studie entwickelte, spezifische *semi-nested*-PCR kann dabei sowohl als Diagnostikmittel als auch bei epidemiologischen Untersuchungen helfen. Den Erkenntnissen aus der vorliegenden Arbeit folgend ist in Deutschland von einer hohen Prävalenz von *S. calchasi* und nah verwandter Arten im Endwirt auszugehen. Welche Häufigkeit die Erreger in der Gesamtpopulation der Zwischen- und Endwirte spielen, wird das Ziel zukünftiger Studien sein. Auch bleibt zu beleuchten, welchen Einfluss Vogelbewegungen in der Verbreitung der Erreger spielen.

In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass Sarkosporidien durch infizierte Zugvögel über weite Distanzen verbreitet werden können. Beispielsweise wurde beim Braunkopf-Kuhstärling (*Molothrus ater*) eine Persistenz infektiöser Zysten von mindestens 40 Wochen p.i. nachgewiesen, so dass die Parasiten die gesamte Zugroute überdauern können (Luznar et al., 2001). Habichte deutschen Ursprungs gelten dagegen als ortsgebunden. Nordeuropäische Sperber hingegen überwintern in Zentral- und Südeuropa sowie Nordafrika (Ferguson-Lees, 2001), so dass eine natürliche Verbreitung von *S. calchasi* durch Zugvögel

aus Nordeuropa gen Süden zumindest wahrscheinlich ist. Zugscheiden in Ost-West-Richtung bzw. über den Atlantik hinweg sind für Habichte hingegen nicht bekannt.

Im Gegensatz dazu werden Brieftauben in großer Anzahl zu Taubensportzwecken weltweit verschifft, insbesondere in die USA, nach Südafrika und in den fernen Osten. Neben wertvollen Zuchttieren handelt es sich hierbei maßgeblich um Tauben, die im Rahmen der in den letzten Jahren in Mode gekommenen *one-loft races* eingesetzt werden. Hierbei werden tausende Tauben weltweit versandt und in großen Flugwettbewerben gleichzeitig freigelassen. Werden infizierte Tauben über diesen Weg in Gebieten freigelassen, in denen Habicht und Sperber vorkommen, erscheint eine Verschleppung der Erkrankung in die dort vorkommende Taubenpopulation möglich. Diese bisher nicht überwachten Transporte können eine Gefahr für die weitere Verbreitung von *S. calchasi* darstellen und zu einem enzootischen Vorkommen des Parasiten in den dortigen Vogelpopulationen führen. Angesichts der Tatsache, dass auch bei falknerisch gehaltenen Vögeln *S. calchasi* nachgewiesen wurde, kann man davon ausgehen, dass auch die Falknerei ein potentielles Risiko für die Weiterverbreitung des Parasiten darstellt.

Da *S. calchasi* nun bei zwei verschiedenen *Accipiter* spp. nachgewiesen werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass auch andere, vor allem auch näher verwandte Habichtsartige der Holarktis, für *S. calchasi* empfänglich sind. Während von der Haustaube als Hauptbeutetier im Speziellen nur vom Rundschwanzsperber (*Accipiter cooperii*) im nordamerikanischen Raum berichtet wurde (Roth and Lima, 2003), ist von *Accipiter* spp. der Holarktis bekannt, dass sie sich hauptsächlich von Vögeln ernähren (Ferguson-Lees, 2001). Hier stellt sich erneut die Frage der Wirtsspezifität von *S. calchasi*. Der Vermutung, dass auch andere *Accipiter*-Arten für *S. calchasi* empfänglich sind, kann nur durch weiterführende Infektionsversuche oder über eine umfangreiche epidemiologische Untersuchung

nachgegangen werden. Hierfür stellt die hier etablierte *semi-nested*-PCR ein mögliches Mittel dar, mithilfe dessen darüber hinaus auch retrospektive Studien von archivierten Proben durchgeführt werden könnten. Auf diese Weise konnte bereits der Verdacht bestätigt werden, dass *S. calchasi* nicht neu in den Berliner Raum eingeführt wurde, sondern seit mindestens 1997 dort präsent ist. Es ist daher wahrscheinlich, dass Infektionen mit *S. calchasi* in der Vergangenheit vor allem dann übersehen wurden, wenn andere Krankheitsursachen wie Salmonellen, Paramyxoviren oder hochpathogene aviäre Influenzaviren angenommen wurden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Erster Nachweis von *Sarcocystis calchasi* bei Habichten (*Accipiter gentilis*) und Sperbern (*Accipiter nisus*) in Norddeutschland und Beschreibung zweier neuer, nah verwandter *Sarcocystis*-Arten

Mit *Sarcocystis calchasi* wurde 2009 ein Parasit der Apicomplexa bekannt, der bei Haustauben zu einer schwerwiegenden zentralnervösen Erkrankung und fatalen Verlusten in Brieftaubenbeständen führt. Klinisch ähnelt die Krankheit stark den beiden bedeutenden Taubenkrankheiten Paramyxovirose und Salmonellose. Kürzlich wurde der zweiwirtige Zyklus von *S. calchasi* zwischen dem Habicht als Endwirt und der Haustaube als Zwischenwirt aufgeklärt. Der Nachweis des Parasiten war bislang auf Haustauben im Berliner Raum beschränkt. Aus diesem Grund sollte im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation das Vorkommen des Parasiten in Habichten und in phylogenetisch am nächsten verwandten Wirten stichprobenartig untersucht werden.

Da vogelinfizierende Sarkosporidien allgemein für ihre geringe Wirtsspezifität bekannt sind, lag der Fokus der Arbeit zunächst darauf, möglichen weiteren End- und Zwischenwirten von *S. calchasi* nachzugehen. Dafür wurde in einer ersten Studie mittels PCR evaluiert, ob beim Sperber (*Accipiter n. nisus*) und der Ringeltaube (*Columba palumbus*) ebenfalls *S. calchasi* nachgewiesen werden können. Mittels speziesübergreifenden Primern wurden damit in beiden Vogelspezies zwei bisher nicht beschriebene *Sarcocystis*-Arten gefunden, die anschließend per Lichtmikroskopie, Elektronenmikroskopie, PCR mit anschließender Sequenzierung der ITS1-Region sowie der 18S und 28S rRNA-Gene und phylogenetischer Analyse umfangreich charakterisiert wurden und anschließend als *S. columbae* sp. nov. und *Sarcocystis* sp. ex *A. nisus* benannt wurden. Deutlich wurde dabei, dass beide neu entdeckten *Sarcocystis*-Arten

nahe mit *S. calchasi* verwandt sind und phylogenetisch eine Gruppe mit anderen *Sarcocystis*-Arten bilden, die Greifvögel als Endwirte nutzen.

Basierend auf den Sequenzen der neu beschriebenen *Sarcocystis*-Arten und aller in öffentlichen Datenbanken zugänglichen Sequenzen wurde in einem nächsten Schritt jeweils eine speziesspezifische *semi-nested*-PCR für *S. calchasi* sowie *S. columbae* und *Sarcocystis* sp. ex *A. nisus* etabliert. Aufgrund der nachgeschalteten Amplifikation bietet diese Methode eine hohe Spezifität und Sensitivität, so dass auch kleine Mengen DNA amplifiziert werden können und retrospektive Studien anhand von archiviertem Material ermöglicht werden. Überraschenderweise wurde damit beim Habicht bzw. beim Sperber ein Befall mit mindestens einer der drei *Sarcocystis*-Arten in einer Häufigkeit von 92 % bzw. 100 % festgestellt; etwa die Hälfte der Vögel war sogar mit allen drei Arten gleichzeitig infiziert. Bereits für das Jahr 1997 konnte das Vorkommen von *S. calchasi* bei Habichten in Berlin nachgewiesen werden. Da Tauben im Allgemeinen nicht zum Beutespektrum des Sperbers gehören, legen die Ergebnisse den Verdacht nahe, dass das Wirtsspektrum von *S. calchasi* und *S. columbae* größer ist und beispielsweise auch Singvögel umfassen könnte. Angesichts der Verbreitungsgebiete von Haustauben, Ringeltauben, Sperbern und Habichten, die sich in weiten Teilen überschneiden, dürfte *S. calchasi* weitaus weiter verbreitet sein als bisher angenommen. Dies bedarf einer Klärung in epidemiologischen Studien. Welche Rolle eine anthropogene Beteiligung über die Falknerei und den Brieftaubensport bei der Verbreitung des Parasiten spielt, bleibt ebenfalls zu untersuchen.

7. SUMMARY

First description of *Sarcocystis calchasi* in Northern goshawks (*Accipiter gentilis*) and European sparrowhawks (*Accipiter nisus*) from Northern Germany and description of two closely related novel *Sarcocystis* species

Sarcocystis calchasi was first described in 2009. This apicomplexan parasite is known as the causative agent of a severe central nervous disease in domestic pigeons (*Columba livia* f. *domestica*) with fatal losses in lofts of racing pigeons. Clinically, the disease is highly similar to important diseases of pigeons, such as paramyxovirus and salmonellosis. Recently, the Northern Goshawk (*Accipiter g. gentilis*) and the domestic pigeon have been identified as final and intermediate hosts, respectively, in a two-host life cycle. So far, the parasite has only been found in pigeons in the Berlin area. For this reason, this thesis project aimed at understanding the prevalence of *S. calchasi* in goshawks and phylogenetically closest related hosts.

Since avian *Sarcocystis* species are generally known for their low host specificity, the focus of this work was, first, to identify further potential final and intermediate hosts of *S. calchasi*. Therefore, it was evaluated by the use of cross-*Sarcocystis* PCR, whether European sparrowhawks (*Accipiter n. nisus*) and wood pigeons (*Columba palumbus*) may also harbour *S. calchasi*. Two so far unknown *Sarcocystis* species were discovered and further characterized by light and electron microscopy, PCR and sequencing of the ITS1-region, the 18S and 28S rRNA genes and phylogenetic analysis. They were subsequently named *Sarcocystis columbae* sp. nov. and *Sarcocystis* sp. ex *A. nisus*. In comparison, both parasites were closely related to *S. calchasi* and form a clade in phylogenetic analysis with other species using birds of prey as their final hosts.

In a next step based on the sequences of the newly described *Sarcocystis* species and all publically available sequences, species-specific semi-nested PCRs for *S. calchasi*, *S. columbae* and *Sarcocystis* sp. ex *A. nisus* were established. This method offers a high sensitivity and specificity and even small amounts of DNA can be amplified as needed for retrospective studies of archived material. Surprisingly, 92% of the goshawks and 100% of the sparrowhawks tested positive for at least one *Sarcocystis* species and about 50% of all birds were infected with all three species. *S. calchasi* was detected in goshawks from Berlin already in 1997. Since pigeons are generally not preyed by sparrowhawks, it is tempting to speculate that the host range of *S. calchasi* and *S. columbae* is larger and may also comprise songbirds. Given the largely overlapping distribution areas of domestic pigeons, wood pigeons, goshawks and sparrowhawks, *S. calchasi* might be much more widespread than previously thought and requires further clarification in epidemiological studies. Moreover, the anthropogenic contribution to the spread of the parasite by falconry and pigeon sport should also be addressed in future studies.

8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Phylogenetischer Stammbaum der Apicomplexa	3
Abb. 2:	Ultrastrukturelle Charakteristika der Apicomplexa am Beispiel eines Tachyzoiten von <i>Toxoplasma gondii</i>	4
Abb. 3:	Überblick über den Lebenszyklus von <i>S. calchasi</i>	16
Abb. 4:	Sarkosporidienzysten in der Skelettmuskulatur von Ringeltauben	42
Abb. 5:	Ultrastrukturelle Details von <i>S. columbae</i> sp. nov. Zystozoit	44
Abb. 6:	Ultrastrukturelle Details von <i>S. columbae</i> sp. nov. in der Muskulatur der Ringeltaube	45
Abb. 7:	Schema zum rDNA Lokus im Genom von <i>S. calchasi</i>	48
Abb. 8:	Phylogenetische Analyse mittels <i>maximum likelihood</i> -Methode	53
Abb. 9:	Phylogenetische Analyse mittels <i>maximum parsimony</i> -Methode	54
Abb. 10:	Sequenzvergleich eines Teils der ITS-1 Region von <i>S. calchasi</i> , <i>S. columbae</i> sp. nov. und <i>Sarcocystis</i> sp. ex	58
Abb. 11:	Sequenzvergleich unterschiedlicher ITS-1 Sequenzen von <i>Sarcocystis</i> sp. ex <i>Accipiter nisus</i> aus Habichten und Sperbern	64
Abb. 12:	Großflächige Überschneidung der Verbreitungsgebiete von Habicht und Haustaube in der nördlichen Hemisphäre	74
Abb. 13:	Verwandtschaftsverhältnisse von Habicht (<i>A. g. gentilis</i>) und Sperber (<i>A. n. nisus</i>)	75

9. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Universelle Primer für Amplifikation und Sequenzierung der ITS-1 Region, 18S und 28S rRNA Gene	34
Tabelle 2:	Primer der semi-nested PCR	39
Tabelle 3:	Vergleich zwischen <i>S. calchasi</i> und <i>Sarcocystis</i> sp. nov. der Ringeltaube	46
Tabelle 4:	Berechnung der p-Distanz zwischen der ITS-1 Region von <i>S. calchasi</i> , <i>S. columbae</i> sp. nov. und <i>Sarcocystis</i> sp. ex <i>A. nisus</i>	49
Tabelle 5:	Berechnung der p-Distanz zwischen der D2-Domäne von <i>S. calchasi</i> , <i>S. columbae</i> sp. nov., <i>Sarcocystis</i> sp. ex <i>A. nisus</i> und dreier Arten aus Entenvögeln	50
Tabelle 6:	Häufigkeit von <i>S. columbae</i> , <i>S. columbae</i> sp. nov. und <i>Sarcocystis</i> sp. ex <i>A. nisus</i> im Darm von Habichten aus Norddeutschland (1997-2008)	61
Tabelle 7:	Häufigkeit von <i>S. calchasi</i> , <i>S. columbae</i> sp. nov. und <i>Sarcocystis</i> sp. ex <i>A. nisus</i> im Darm von freilebenden Sperbern aus Norddeutschland der Jahre 1997- 2009	62
Tabelle 8:	Häufigkeit von Einzel- und Koinfektionen mit <i>Sarcocystis</i> spp. in Habichten und Sperbern aus Norddeutschland ermittelt durch speziesspezifische <i>semi-nested</i> PCR	63

10. LITERATUR

- Aguilar, R.F., Shaw, D.P., Dubey, J.P., Redig, P., 1991, *Sarcocystis*-associated encephalitis in an immature Northern Goshawk (*Accipiter gentilis*). Journal of Zoo and Wildlife Medicine 22, 466-469.
- Alexander, D.J., 1982, Avian paramyxoviruses other than Newcastle Disease Virus. World's Poultry Science Journal 38, 97-104.
- Altenkamp, R., 2001, Habicht *Accipiter gentilis*. Natur & Text, Rangsdorf.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990, Basic Local Alignment Search Tool. Journal of Molecular Biology 215, 403-410.
- Banks, J.C., Paterson, A.M., 2005, Multi-host parasite species in cophylogenetic studies. International Journal For Parasitology 35, 741–746.
- Barrows, P.L., Hayes, F.A., 1977, Studies of endoparasites of the mourning dove (*Zenaidura macroura*) in the southeast United States. Journal of Wildlife Diseases 13, 24-28.
- Bartošová-Sojková, P., Oppenheim, R.D., Soldati-Favre, D., Lukeš, J., 2015, Epicellular Apicomplexans: Parasites “On the Way In”. PLOS Pathogens 11, e1005080.
- Bentz, B.G., Granstrom, D.E., Stamper, S., 1997, Seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in horses residing in a county of southeastern Pennsylvania. Journal of the American Veterinary Medical Association 210, 517-518.
- Box, E.D., Duszynski, D.W., 1978, Experimental transmission of *Sarcocystis* from Icterid birds to sparrows and canaries by sporocysts from the opossum. The Journal of Parasitology 64, 682-688.
- Box, E.D., Meier, J.L., Smith, J.H., 1984, Description of *Sarcocystis falcatula* Stiles, 1893, a parasite of birds and opossums. Journal of Protozoology 31, 521-524.
- Box, E.D., Smith, J.H., 1982, The intermediate host spectrum in a *Sarcocystis* species of birds. Journal of Parasitology 68, 668-673.

- Butkauskas, D., Sruoga, A., Kutkiene, L., Prakas, P., 2007, Investigation of the phylogenetic relationships of *Sarcocystis* spp. from Greylag (*Anser anser*) and White-fronted (*Anser albifrons*) geese to other cyst forming coccidia using 18s and 28s rRNA gene sequences. *Acta Zoologica Lituanica* 17, 124-128.
- Cerna, Z., Kolarova, I., Sulc, P., 1978, Contribution to the problem of cyst-producing coccidians. *Folia Parasitologica* 25, 9-16.
- Cerna, Z., Kvasnovska, Z., 1986, Life-cycle involving bird-bird relation in *Sarcocystis*-Coccidia with the description of *Sarcocystis accipitris* sp. n. *Folia Parasitologica* 33, 305.
- Chabareck, E.H., 1973. Sarcosporidiosis in ducks in Louisiana. In: North American Wildlife and Natural Resources Conference, 1973, p. 174.
- Cheadle, M.A., Tanhauser, S.M., Scase, T.J., Dame, J.B., Mackay, R.J., Ginn, P.E., Greiner, E.C., 2001, Viability of *Sarcocystis neurona* sporocysts and dose titration in gamma-interferon knockout mice. *Veterinary Parasitology* 95, 223-231.
- Checkley, W., White, A.C., Jaganath, D., Arrowood, M.J., Chalmers, R.M., Chen, X.-M., Fayer, R., Griffiths, J.K., Guerrant, R.L., Hedstrom, L., Huston, C.D., Kotloff, K.L., Kang, G., Mead, J.R., Miller, M., Petri, W.A., Priest, J.W., Roos, D.S., Striepen, B., Thompson, R.C.A., Ward, H.D., Voorhis, W.A.V., Xiao, L., Zhu, G., Houpt, E.R., 2015, A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*. *The Lancet Infectious Diseases* 15, 85-94.
- Chitty, J., Lierz, M., 2008, BSAVA Manual of Raptors, Pigeons and Passerine Birds. British Small Animal Veterinary Association, 352 p.
- Clubb, S.L., Frenkel, J.K., 1992, *Sarcocystis falcatula* of opossums: transmission by cockroaches with fatal pulmonary disease in psittacine birds. *Journal of Parasitology*, 116-124.

- Conti, J.A., Forrester, D.J., 1981, Interrelationships of parasites of White-winged doves and Mourning doves in Florida. *Journal of Wildlife Diseases* 17, 529-536.
- Doležel, D., Koudela, B., Jirku, M., Hypsa, V., Obornik, M., Votýpka, J., Modry, D., Šlapeta, J.R., Lukes, J., 1999, Phylogenetic analysis of *Sarcocystis* spp. of mammals and reptiles supports the coevolution of *Sarcocystis* spp. with their final hosts. *International Journal for Parasitology* 29, 795–798.
- Drouin, T.E., Mahrt, J.L., 1979, The prevalence of *Sarcocystis* Lankester, 1882, in some bird species in western Canada, with notes on its life cycle. *Canadian Journal of Zoology* 57, 1915-1921.
- Dubey, J.P., 2001, Migration and development of *Sarcocystis neurona* in tissues of interferon gamma knockout mice fed sporocysts from a naturally infected opossum. *Veterinary Parasitology* 95, 341-351.
- Dubey, J.P., 2015, *Sarcocystosis of animals and humans*, second edition. CRC Press, Boca Raton, FL, 481 p.
- Dubey, J.P., Benson, J., Larson, M.A., 2003a, Clinical *Sarcocystis neurona* encephalomyelitis in a domestic cat following routine surgery. *Veterinary parasitology* 112, 261-267.
- Dubey, J.P., Cawthorn, R.J., Speer, C.A., Wobeser, G.A., 2003b, Redescription of the sarcocysts of *Sarcocystis rileyi* (Apicomplexa: Sarcocystidae). *Journal of Eukaryotic Microbiology* 50, 476-482.
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., 1998, Isolation in immunodeficient mice of *Sarcocystis neurona* from opossum (*Didelphis virginiana*) faeces, and its differentiation from *Sarcocystis falcatula*. *International Journal for Parasitology* 28, 1823-1828.
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Saville, W.J., Reed, S.M., Granstrom, D.E., Speer, C.A., 2001a, A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). *Veterinary Parasitology* 95, 89-131.

- Dubey, J.P., Rosenthal, B.M., Felix, T.A., 2010, Morphologic and molecular characterization of the sarcocysts of *Sarcocystis rileyi* (Apicomplexa: Sarcocystidae) from the mallard duck (*Anas platyrhynchos*). *Journal of Parasitology* 96, 765-770.
- Dubey, J.P., Rosenthal, B.M., Morales, J.A., Alfaro, A., 2006, Morphologic and genetic characterization of *Sarcocystis* sp from the African grey parrot, *Psittacus erithacus*, from Costa Rica. *Acta Parasitologica* 51, 161-168.
- Dubey, J.P., Rudback, E., Topper, M.J., 1998, Sarcocystosis in Capercaillie (*Tetrao urogallus*) in Finland: description of the parasite and lesions. *Journal of Parasitology* 84, 104-108.
- Dubey, J.P., Speer, C.A., 1991, *Sarcocystis canis* n. sp. (Apicomplexa: Sarcocystidae), the etiologic agent of generalized coccidiosis in dogs. *Journal of Parasitology* 77, 522-527.
- Dubey, J.R., Johnson, G.C., Bermudez, A., Suedmeyert, K.W., Fritz, D.L., 2001b, Neural sarcocystosis in a straw-necked ibis (*Carphibis spinicollis*) associated with a *Sarcocystis neurona*-like organism and description of muscular sarcocysts of an unidentified *Sarcocystis* species. *Journal of Parasitol* 87, 1317-1322.
- Duszynski, D.W., Box, E.D., 1978, The opossum (*Didelphis virginiana*) as a host for *Sarcocystis debonei* from cowbirds (*Molothrus ater*) and grackles (*Cassidix mexicanus*, *Quiscalus quiscula*). *Journal of Parasitology* 64, 326-329.
- Ecco, R., Luppi, M.M., Malta, M.C.C., Araújo, M.R., Guedes, R.M.C., Shivaprasad, H.L., 2008, An outbreak of sarcocystosis in psittacines and a pigeon in a zoological collection in Brazil. *Avian Diseases* 52, 706-710.
- Elsheikha, H.M., Murphy, A.J., Mansfield, L.S., 2005, Phylogenetic congruence of *Sarcocystis neurona* Dubey et al., 1991 (Apicomplexa : Sarcocystidae) in the United States based on sequence analysis and restriction fragment length polymorphism (RFLP). *Systematic Parasitology* 61, 191-202.

- Faddoul, G.P., Fellows, G.W., 1965, Clinical manifestations of paratyphoid infection in pigeons. *Avian Diseases* 22, 377-381.
- Fayer, R., 2004, *Sarcocystis* spp. in human infections. *Clinical Microbiology Review* 17, 894-902.
- Fayer, R., Johnson, A.J., 1973, Development of *Sarcocystis fusiformis* in calves infected with sporocysts from dogs. *Journal of Parasitology* 59, 1135-1137.
- Fayer, R., Xiao, L., 2007, *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis, second edition. CRC Press, Boca Raton, USA, 576 p.
- Fedynich, A.M., Pence, D.B., 1992, *Sarcocystis* in mallards on the southern high plains of Texas. *Avian Diseases* 36, 1067-1069.
- Felsenstein, J., 2005, Using the quantitative genetic threshold model for inferences between and within species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 360, 1427-1434.
- Fenger, C.K., Granstrom, D.E., Gajadhar, A.A., Williams, N.M., McCrillis, S.A., Stamper, S., Langemeier, J.L., Dubey, J.P., 1997, Experimental induction of equine protozoal myeloencephalitis in horses using *Sarcocystis* sp. sporocysts from the opossum (*Didelphis virginiana*). *Veterinary Parasitology* 68, 199-213.
- Ferguson-Lees, J., 2001, *Raptors of the world: An identification guide to the birds of prey of the world*. Houghton Mifflin Harcourt, Boston MA, 992 p.
- Fischer, S., Odening, K., 1998, Characterization of bovine *Sarcocystis* species by analysis of their 18S ribosomal DNA sequences. *Journal of Parasitology* 84, 50-54.
- Gajadhar, A.A., Marquardt, W.C., Blair, C.D., 1992, Development of a model ribosomal RNA hybridization assay for the detection of *Sarcocystis* and other coccidia. *Canadian Journal of Veterinary Research* 56, 208-213.

- Gardiner, C.H., Fayer, R., Dubey, J.P., 1999, An atlas of protozoan parasites in animal tissues, 2nd ed., Vol 46. Registry of Veterinary Pathology, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, 84 p.
- Gardner, M.J., Bishop, R., Shah, T., Villiers, E.P.d., Carlton, J.M., Hall, N., Ren, Q., Paulsen, I.T., Pain, A., Berriman, M., Wilson, R.J.M., Sato, S., Ralph, S.A., Mann, D.J., Xiong, Z., Shallom, S.J., Weidman, J., Jiang, L., Lynn, J., Weaver, B., Shoaibi, A., Domingo, A.R., Wasawo, D., Crabtree, J., Wortman, J.R., Haas, B., Angiuoli, S.V., Creasy, T.H., Lu, C., Suh, B., Silva, J.C., Utterback, T.R., Feldblyum, T.V., Perteza, M., Allen, J., Nierman, W.C., Taracha, E.L.N., Salzberg, S.L., White, O.R., Fitzhugh, H.A., Morzaria, S., Venter, J.C., Fraser, C.M., Nene, V., 2005, Genome sequence of *Theileria parva*, a bovine pathogen that transforms lymphocytes. *Science* 309, 134-137.
- Godoy, S.N., De Paula, C.D., Cubas, Z.S., Matushima, E.R., Catão-Dias, J.L., 2009, Occurrence of *Sarcocystis falcatula* in captive psittacine birds in Brazil. *Journal of Avian Medicine and Surgery* 23, 18-23.
- Gottschalk, C., 1972, Beitrag zur Faunistik der Vogelkokzidien Thüringens und Sachsens. *Beiträge zur Vogelkunde* 18, 61-69.
- Gough, R.E., Alexander, D.J., 1983, Isolation and preliminary characterisation of a paramyxovirus from collared doves (*Streptopelia decaocto*). *Avian Pathology* 12, 125-134.
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003, A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systemic Biology* 52, 696-704.
- Hackett, S.J., Kimball, R.T., Reddy, S., Bowie, R.C.K., Braun, E.L., Braun, M.J., Chojnowski, J.L., Cox, W.A., Han, K.-L., Harshman, J., Huddleston, C.J., Marks, B.D., Miglia, K.J., Moore, W.S., Sheldon, F.H., Steadman, D.W., Witt, C.C., Yuri, T.,

- 2008, A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. *Science* 320, 1763-1768.
- Hanson, R.P., Brandly, C.A., 1955, Identification of vaccine strains of Newcastle disease virus. *Science* 122, 156-157.
- Hasegawa, M., Iida, Y., Yano, T., Takaiwa, F., Iwabuchi, M., 1985, Phylogenetic relationships among eukaryotic kingdoms inferred from ribosomal RNA sequences. *Journal of Molecular Evolution* 22, 32-38.
- Heckerth, A.R., Tenter, A.M., 1999, Development and validation of species-specific nested PCRs for diagnosis of acute sarcocystiosis in sheep. *International Journal for Parasitology* 29, 1331-1349.
- Heydorn, A.O., 1977, Life-cycle of sarcosporidia. IX. Developmental cyclus of *Sarcocystis sui hominis* n. spec. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 90, 218-224.
- Hillyer, E.V., Anderson, M.P., Greiner, E.C., Atkinson, C.T., Frenkel, J.K., 1991, An outbreak of *Sarcocystis* in a collection of psittacines. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 22, 434-445.
- Hodo, C.L., Whitley, D.B., Hamer, S.A., Corapi, W.V., Snowden, K., Heatley, J.J., Hoffmann, A.R., 2016, Histopathologic and molecular characterization of *Sarcocystis calchasi* encephalitis in white-winged doves (*Zenaida asiatica*) and Eurasian collared doves (*Streptopelia decaocto*), East-central Texas, USA, 2010-13. *Journal of Wildlife Diseases* 52, 395-399.
- Holling, J., Fowle, C.D., 1955, *Isospora buteonis* Henry in the Goshawk (*Accipiter gentilis*). *Journal of Parasitology* 41, 638-639.
- Jacobson, E.R., Gardiner, C.H., Nicholson, A., Page, C.D., 1984, *Sarcocystis encephalitis* in a cockatiel. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 185, 904-906.
- Janouškovec, J., Tikhonenkov, D.V., Burki, F., Howe, A.T., Kolísko, M., Mylnikov, A.P., Keeling, P.J., 2015, Factors mediating plastid dependency and the origins of

- parasitism in apicomplexans and their close relatives. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 10200-10207.
- Johnson, K.P., Adams, R.J., Page, R.D.M., Clayton, D.H., 2003, When do parasites fail to speciate in response to host speciation? *Systematic Biology* 52, 37-47.
- Johnson, K.P., Williams, B.L., Drown, D.M., Adams, R.J., Clayton, D.H., 2002, The population genetics of host specificity: genetic differentiation in dove lice (Insecta: Phthiraptera). *Molecular Ecology* 11, 25-38.
- Kaiser, I.A., 1983, *Sarcocystis* infection in wild Southern African birds. *South African Journal of Science* 79, 470-471.
- Kaleta, E.F., Hönicke, A., 2004, Review of the literature on avian influenza A viruses in pigeons and experimental studies on the susceptibility of domestic pigeons to influenza A viruses of the haemagglutinin subtype H7. *DTW. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 111, 467-472.
- Kida, H., Yanagawa, R., 1979, Isolation of a new avian paramyxovirus from a rock pigeon (*Columba livia*). *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten Und Hygiene* 245, 421-428.
- Kim, K., Weiss, L., 2013, *Toxoplasma gondii* - 2nd edition. Academic Press, London, UK, 1160 p.
- Klopfleisch, R., Werner, O., Mundt, E., Harder, T., Teifke, J.P., 2006, Neurotropism of highly pathogenic avian influenza virus A/Chicken/Indonesia/2003 (H5N1) in experimentally infected pigeons (*Columbia livia* f. *domestica*). *Veterinary Pathology Online* 43, 463-470.
- Klumpp, S.A., Anderson, D.C., McClure, H.M., Dubey, J.P., 1994, Encephalomyelitis due to a *Sarcocystis neurona*-like protozoan in a rhesus monkey (*Macaca mulatta*) infected with simian immunodeficiency virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 51, 332-338.

- Kolarova, L., 1986, Mouse (*Mus musculus*) as intermediate host of *Sarcocystis* sp. from the goshawk (*Accipiter gentilis*). *Folia Parasitologica* 33, 15-19.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., TAMURA, K., 2008, MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinformatics* 9, 299-306.
- Kutkienė, L., Prakas, P., Sruoga, A., Butkauskas, D., 2010, The mallard duck (*Anas platyrhynchos*) as intermediate host for *Sarcocystis wobeseri* sp. nov. from the barnacle goose (*Branta leucopsis*). *Parasitology Research* 107, 879-888.
- Kutkienė, L., Prakas, P., Sruoga, A., Butkauskas, D., 2011, Identification of *Sarcocystis rileyi* from the mallard duck (*Anas platyrhynchos*) in Europe: cyst morphology and results of DNA analysis. *Parasitology Research* 108, 709-714.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007, Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
- Levine, N.D., 1986, The taxonomy of *Sarcocystis* (Protozoa, Apicomplexa) species. *Journal of Parasitology* 72, 372-382.
- Levine, N.D., 1988, The protozoan phylum Apicomplexa, Vol 2. CRC Press, Boca Raton, FL. 154 p.
- Lindsay, D.S., Blagburn, B.L., 1999, Prevalence of encysted apicomplexans in muscles of raptors. *Veterinary Parasitology* 80, 341-344.
- Luznar, S.L., Avery, M.L., Dame, J.B., MacKay, R.J., Greiner, E.C., 2001, Development of *Sarcocystis falcatula* in its intermediate host, the brown-headed cowbird (*Molothrus ater*). *Veterinary Parasitology* 95, 327-334.
- MacKay, R.J., 1997, Equine protozoal myeloencephalitis. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice* 13, 79-96.

- Mansfield, L.S., Mehler, S., Nelson, K., Elsheikha, H.M., Murphy, A.J., Knust, B., Tanhauser, S.M., Gearhart, P.M., Rossano, M.G., Bowman, D.D., Schott, H.C., Patterson, J.S., 2008, Brown-headed cowbirds (*Molothrus ater*) harbor *Sarcocystis neurona* and act as intermediate hosts. *Veterinary Parasitology* 153, 24-43.
- Marlier, D., Vindevogel, H., 2006, Viral infections in pigeons. *The Veterinary Journal* 172, 40-51.
- Marsh, A.E., Barr, B.C., Tell, L., Bowman, D.D., Conrad, P.A., Ketcherside, C., Green, T., 1999, Comparison of the internal transcribed spacer, ITS-1, from *Sarcocystis falcatula* isolates and *Sarcocystis neurona*. *The Journal of Parasitology* 85, 750-757.
- Marsh, A.E., Barr, B.C., Tell, L., Koski, M., Greiner, E., Dame, J., Conrad, P.A., 1997, *In vitro* cultivation and experimental inoculation of *Sarcocystis falcatula* and *Sarcocystis neurona* merozoites into budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Journal of Parasitology* 83, 1189–1192.
- Medlin, L., Elwood, H.J., Stickel, S., Sogin, M.L., 1988, The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene* 71, 491-499.
- Mehlhorn, H., Heydorn, A.O., 1978, The sarcosporidia (Protozoa, Sporozoa): life cycle and fine structure. *Advances in Parasitology* 16, 43-91.
- Mehlhorn, H., Mencke, N., Hansen, O., 1999, Effects of imidacloprid on adult and larval stages of the flea *Ctenocephalides felis* after in vivo and in vitro application: a light- and electron-microscopy study. *Parasitology Research* 85, 625-637.
- Miescher, F., 1843, Über eigenthümliche Schläuche in den Muskeln einer Hausmaus. Bericht über die Verhandlungen der naturforschenden Gesellschaft in Basel 5, 198–202.
- Miller, L.H., Ackerman, H.C., Su, X.-z., Wellems, T.E., 2013, Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nature Medicine* 19, 156-167.

- Morrison, D.A., Ellis, J.T., 1997, Effects of nucleotide sequence alignment on phylogeny estimation: a case study of 18S rDNAs of apicomplexa. *Molecular Biology and Evolution* 14, 428-441.
- Morrisette, N.S., Sibley, L.D., 2002, Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 21-38.
- Mugridge, N.B., Morrison, D.A., Johnson, A.M., Luton, K., Dubey, J.P., Votýpka, J., Tenter, A.M., 1999, Phylogenetic relationships of the genus *Frenkelia*: a review of its history and new knowledge gained from comparison of large subunit ribosomal ribonucleic acid gene sequences. *International Journal for Parasitology* 29, 957-972.
- Munday, B.L., Barker, I.K., Rickard, M.D., 1975, The developmental cycle of a species of *Sarcocystis* occurring in dogs and sheep, with observations on pathogenicity in the intermediate host. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 46, 111-123.
- Mutalib, A., Keirs, R., Maslin, W., Topper, M., Dubey, J.P., 1995, *Sarcocystis*-associated encephalitis in chickens. *Avian Diseases* 39, 436-440.
- Narayan, O., Rouse, B.T., Lang, G., 1970, A new influenza A virus infection in turkeys. VI. artificial immunization against the malignant virus strain turkey-Ontario 7732-66. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 34, 72-79.
- Odening, K., 1998, The present state of species-systematics in *Sarcocystis* Lankester, 1882 (Protista, Sporozoa, Coccidia). *Systematic Parasitology* 41, 209-233.
- Olias, P., Gruber, A.D., Kohls, A., Hafez, H.M., Heydorn, A.O., Mehlhorn H., Lierz, M. 2010a, *Sarcocystis* species lethal for domestic pigeons. *Emerging Infectious Diseases* 16, 497-499.
- Olias, P., Gruber, A.D., Heydorn, A.O., Kohls, A., Hafez, H.M., Lierz, M., 2010b, Unusual biphasic disease in domestic pigeons (*Columba livia* f. *domestica*) following experimental infection with *Sarcocystis calchasi*. *Avian Dis* 54, 1032-1037.

- Olias, P., Gruber, A.D., Heydorn, A.O., Kohls, A., Mehlhorn, H., Hafez, H.M., Lierz, M., 2009, A novel *Sarcocystis*-associated encephalitis and myositis in racing pigeons. *Avian Pathology* 38, 121.
- Olias, P., Maier, K., Wuenschmann, A., Reed, L., Armien, A.G., Shaw, D.P., Gruber, A.D., Lierz, M., 2014, *Sarcocystis calchasi* has an expanded host range and induces neurological disease in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) and North American rock pigeons (*Columbia livia* f. *dom.*). *Veterinary Parasitology* 200, 59-65.
- Olson, E.J., Wünschmann, A., Dubey, J.P., 2007, *Sarcocystis* sp.-associated meningoencephalitis in a bald eagle (*Haliaeetus leucocephalus*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19, 564-568.
- Opdam, P., 1979, Feeding ecology of a sparrowhawk population (*Accipiter nisus*). *Ardea* 66, 137-155.
- Opdam, P., Thissen, J., Verschuren, P., Mueskens, G., 1977, Feeding ecology of a population of goshawk *Accipiter gentilis*. *Journal für Ornithologie* 118, 35-51.
- Panigrahy, B., Senne, D.A., Pedersen, J.C., Shafer, A.L., Pearson, J.E., 1996, Susceptibility of pigeons to avian influenza. *Avian Diseases* 40, 600-604.
- Pasmans, F., Baert, K., Martel, A., Bousquet-Melou, A., Lanckriet, R., De Boever, S., Van Immerseel, F., Eeckhaut, V., de Backer, P., Haesebrouck, F., 2008, Induction of the carrier state in pigeons infected with *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium PT99 by treatment with Florfenicol: a matter of pharmacokinetics. *Antimicrobial Agents in Chemotherapy* 52, 954-961.
- Paterson, A.M., Banks, J., 2001, Analytical approaches to measuring cospeciation of host and parasites: through a glass, darkly. *International Journal for Parasitology* 31, 1012-1022.
- Pawlowski, J., Audic, S., Adl, S., Bass, D., Belbahri, L., Berney, C., Bowser, S.S., Cepicka, I., Decelle, J., Dunthorn, M., Fiore-Donno, A.M., Gile, G.H., Holzmann, M., Jahn, R.,

- Jirků, M., Keeling, P.J., Kostka, M., Kudryavtsev, A., Lara, E., Lukeš, J., Mann, D.G., Mitchell, E.A.D., Nitsche, F., Romeralo, M., Saunders, G.W., Simpson, A.G.B., Smirnov, A.V., Spouge, J.L., Stern, R.F., Stoeck, T., Zimmermann, J., Schindel, D., Vargas, C.d., 2012, CBOL Protist Working Group: barcoding eukaryotic richness beyond the animal, plant, and fungal kingdoms. *PLOS Biology* 10, e1001419.
- Penteriani, V., 1997, Long-term study of a goshawk breeding population on a Mediterranean mountain (Abruzzi apennines, central Italy): Density, breeding performance and diet. *Journal of Raptor Research* 31, 308-312.
- Perkins, L.E.L., Swayne, D.E., 2002, Pathogenicity of a Hong Kong-origin H5N1 highly pathogenic avian influenza virus for emus, geese, ducks, and pigeons. *Avian Diseases* 46, 53-63.
- Perkins, L.E.L., Swayne, D.E., 2003, Varied pathogenicity of a Hong Kong-origin H5N1 avian influenza virus in four passerine species and budgerigars. *Veterinary Pathology* 40, 14-24.
- Porter, R.A., Ginn, P.E., Dame, J.B., Greiner, E.C., 2001, Evaluation of the shedding of *Sarcocystis falcatula* sporocysts in experimentally infected Virginia opossums (*Didelphis virginiana*). *Veterinary Parasitology* 95, 313-319.
- Poulin, R., 2007, Evolutionary ecology of parasites. Princeton University Press. Princeton, NJ, 360 p.
- Rimoldi, G., Speer, B., Wellehan, J.F., Jr., Bradway, D.S., Wright, L., Reavill, D., Barr, B.C., Childress, A., Shivaprasad, H.L., Chin, R.P., 2013, An outbreak of *Sarcocystis calchasi* encephalitis in multiple psittacine species within an enclosed zoological aviary. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 25, 775-781.
- Rossano, M.G., Kaneene, J.B., Marteniuk, J.V., Banks, B.D., Schott, H.C., Mansfield, L.S., 2001, The seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in Michigan equids. *Preventive Veterinary Medicine* 48, 113-128.

- Roth, T.C., Lima, S.L., 2003, Hunting behaviour and diet of Cooper's hawks: an urban view of the small-bird-in-winter paradigm. *The Condor* 105, 474-483.
- Ruiz, A., Frenkel, J.K., 1976, Recognition of cyclic transmission of *Sarcocystis muris* by cats. *Journal of Infectious Diseases* 133, 409-418.
- Rutz, C., 2004, Breeding season diet of Northern goshawks *Accipiter gentilis* in the city of Hamburg, Germany. *Corax* 19, 311-322.
- Salt, W.R., 1958, *Sarcocystis rileyi* in sage grouse. *Journal of Parasitology* 44, 511-511.
- Sargatal, J., 1997, Handbook of the birds of the world. Volume 4: Sandgrouse to Cuckoos, 1 Edition. Lynx Edicions. 679 p.
- Saville, W.J., Reed, S.M., Granstrom, D.E., Hinchcliff, K.W., Kohn, C.W., Wittum, T.E., Stamper, S., 1997, Seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in horses residing in Ohio. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 210, 519-524.
- Senaud, 1967, Contribution a l'étude des sarcosporidies et des toxoplasmes *Toxoplasma*. *Protistologica* 3, 169-232.
- Sharman, P.A., Smith, N.C., Wallach, M.G., Katrib, M., 2010, Chasing the golden egg: vaccination against poultry coccidiosis. *Parasite Immunology* 32, 590-598.
- Smith, J.H., Neill, P.J., Dillard, E.A., Box, E.D., 1990, Pathology of experimental *Sarcocystis falcatula* infections of canaries (*Serinus canarius*) and pigeons (*Columba livia*). *Journal of Parasitology* 76, 59-68.
- Spalding, M.G., Yowell, C.A., Lindsay, D.S., Greiner, E.C., Dame, J.B., 2002, *Sarcocystis* meningoencephalitis in a Northern gannet (*Morus bassanus*). *Journal of Wildlife Diseases* 38, 432-437.
- Starick, E., Werner, O., 2003, Detection of H7 avian influenza virus directly from poultry specimens. *Avian Diseases* 47, 1187-1189.

- Storer, R.W., 1966, Sexual dimorphism and food habits in three North American *Accipiters*.
The Auk 83, 423-436.
- Suedmeyer, W.K., Bermudez, A.J., Barr, B.C., Marsh, A.E., 2001, Acute pulmonary
Sarcocystis falcatula-like infection in three Victoria crowned pigeons (*Goura victoria*)
housed indoors. Journal of Zoo and Wildlife Medicine 32, 252-256.
- Svobodová, M., 1997, Heteroxenous coccidia of raptors and owls from the Czech and Slovak
republics. Buteo 9, 35-42.
- Svobodová, M., Vorišek, P., Votýpka, J., Weidinger, K., 2004, Heteroxenous coccidia
(Apicomplexa : Sarcocystidae) in the populations of their final and intermediate hosts:
European buzzard and small mammals. Acta Protozoologica 43, 251-260.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007, MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics
Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24,
1596-1599.
- Tanhauser, S.M., Yowell, C.A., Cutler, T.J., Greiner, E.C., MacKay, R.J., Dame, J.B., 1999,
Multiple DNA markers differentiate *Sarcocystis neurona* and *Sarcocystis falcatula*.
Journal of Parasitology 85, 221-228.
- Teglas, M.B., Little, S.E., Latimer, K.S., Dubey, J.P., 1998, *Sarcocystis*-associated
encephalitis and myocarditis in a wild turkey (*Meleagris gallopavo*). Journal of
Parasitology 84, 661-663.
- Tenter, A.M., Luton, K., Johnson, A.M., 1994, Species-specific identification of *Sarcocystis*
and *Toxoplasma* by PCR amplification of small subunit ribosomal RNA gene
fragments. Applied Parasitology 35, 173-188.
- Trupkiewicz, J.G., Calero-Bernal, R., Verma, S.K., Mowery, J., Davison, S., Habecker, P.,
Georoff, T.A., Ialeggio, D.M., Dubey, J.P., 2016, Acute, fatal *Sarcocystis calchasi*-
associated hepatitis in roller pigeons (*Columba livia* f. *dom.*) at Philadelphia Zoo.
Veterinary Parasitology 216, 52-58.

- Ushio, N., Watanabe, K., Chambers, J.K., Shibato, T., Nakayama, H., Uchida, K., 2015, *Sarcocystis calchasi* encephalitis in a rock pigeon. *Journal of Veterinary Medical Sciences* 77, 1523-1526.
- Villar, D., Krämer, M., Howard, L., Hammond, E., Cray, C., Latimer, K., 2008, Clinical presentation and pathology of sarcocystosis in psittaciform birds: 11 cases. *Avian Diseases* 52, 187-194.
- Weiss, L.M., Dubey, J.P., 2009, Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *International Journal for Parasitology* 39, 895-901.
- White, T., 1990, Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. in *PCR protocols: a guide to methods and applications*. eds Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. (Academic Press, New York, N.Y), pp. 315–322.
- Wünschmann, A., Armien, A.G., Reed, L., Gruber, A.D., Olias, P., 2011, *Sarcocystis calchasi*-associated neurologic disease in a domestic pigeon in North America. *Transboundary and Emerging Diseases* 58, 526–530.
- Yabsley, M.J., Ellis, A.E., Stallknecht, D.E., Howerth, E.W., 2009, Characterization of *Sarcocystis* from four species of hawks from georgia, USA. *Journal of Parasitology* 95, 256-259.
- Yang, Z.Q., Zuo, Y.X., Yao, Y.G., Chen, X.W., Yang, G.C., Zhang, Y.P., 2001, Analysis of the 18S rRNA genes of *Sarcocystis* species suggests that the morphologically similar organisms from cattle and water buffalo should be considered the same species. *Molecular Biochemical Parasitology* 115, 283-288.
- Zhu, G., Keithly, J.S., Philippe, H., 2000, What is the phylogenetic position of *Cryptosporidium*? *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 1673-1681.

11. PUBLIKATIONEN AUS DIESER ARBEIT IN FACHZEITSCHRIFTEN MIT PEER REVIEW-SYSTEM

Olias P*, **Olias L***, Lierz M, Mehlhorn H, Gruber AD. (2010) *Sarcocystis calchasi* is distinct to *Sarcocystis columbae* sp. nov. from the wood pigeon (*Columba palumbus*) and *Sarcocystis* sp. from the sparrowhawk (*Accipiter nisus*). *Veterinary Parasitology* 171:7-14.

DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.03.021

Eigener Anteil an der Publikation: Selbständige Planung aller Untersuchungen; histopathologische Untersuchung der Gewebeschnitte; Auswertung der PCR und Sequenzierungsergebnisse; Darstellung der phylogenetischen Stammbäume.

Olias P*, **Olias L***, Krücken J, Lierz M, Gruber AD. (2011) High prevalence of *Sarcocystis calchasi* sporocysts in European *Accipiter* hawks. *Veterinary Parasitology* 175:230-236.

DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.10.025

Eigener Anteil an der Publikation: Probenorganisation; selbständige Planung dargestellter PCR und Sequenzierungsuntersuchungen; Auswertung der PCR und Sequenzierungsergebnisse; grafische Darstellung.

**Beide Autoren haben zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit beigetragen.*

12. DANKSAGUNG

Herrn Professor Achim D. Gruber, Ph.D., Geschäftsführender Direktor des Instituts für Tierpathologie der Freien Universität Berlin, möchte ich ganz besonders danken für die Überlassung des interessanten Themas und die stets verlässliche Unterstützung.

Herrn Professor Dr. Alfred Otto Heydorn aus dem Institut für Parasitologie der Freien Universität Berlin danke ich herzlich für die stete Hilfe in allen Fragen rund um Sarkosporidien und darüber hinaus. Herrn PD Dr. Jürgen Krücken danke ich insbesondere für die wertvolle Beratung bei den phylogenetischen Untersuchungen. Frau Katharina Seidl danke ich sehr herzlich für die technische Unterstützung und die fotografische Begleitung.

Herrn Professor Dr. Heinz Mehlhorn von der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf gilt mein Dank für die Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen. Herrn Professor Dr. Michael Lierz, Leiter der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische der Justus-Liebig-Universität in Gießen danke ich für die freundliche Bereitstellung von Gewebeproben.

All meinen Freunden bin ich sehr dankbar für die wertvollen Auszeiten; insbesondere danke ich meiner lieben Berit dafür, dass es sie seit über 25 Jahren in meinem Leben gibt. Ohne Miriam, Nina, Ann-Marijke und ihren unerschütterlichen Humor wären der lange Weg durch das Studium und der Weg zur Doktorarbeit nicht halb so schön gewesen. Danke für diese schönen gemeinsamen Jahre!

Meinen Eltern und meinen Schwestern gilt ein ganz großer Dank für ihre ständige Unterstützung, vor allem aber für ihre bedingungslose Liebe und das immerwährende Vertrauen in mich. Ganz besonders danke ich meinem lieben Mann Philipp für seine niemals endende Ausdauer, seine Geduld, seine Unterstützung, seine Liebe und seinen Glauben an mich. Und meinen vier wunderbaren Kindern danke ich von ganzem Herzen dafür, dass sie seit so vielen Jahren jeden Tag zu einem glücklichen Tag machen.

13. 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.

Lena Olias

Berlin, 26.09.2018



9 783863 879365
mbvberlin | mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-86387-936-5