

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

in Kooperation mit  
Dr. Matthias Todte und Dr. Stefan Müller-Molenar,  
Geschäftsführer der Tierarztpraxis MMT in Köthen  
und der  
Wimex Agrarprodukte Import und Export GmbH  
in Regenstauf

**Untersuchungen zum Vorkommen von *Histomonas  
meleagridis* bei Masteltern und Einfluss eines  
positiven Nachweises mittels Real-time PCR auf die  
Produktionsparameter der Herde**

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

vorgelegt von  
Monique Necke  
Tierärztin aus Potsdam

Berlin 2023  
Journal-Nr.: 4378







**Aus dem Institut für Geflügelkrankheiten  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin**

**in Kooperation mit  
Dr. Matthias Todte und Dr. Stefan Müller-Molenar,  
Geschäftsführer der Tierarztpraxis MMT in Köthen  
und der  
Wimex Agrarprodukte Import und Export GmbH  
in Regenstauf**

**Untersuchungen zum Vorkommen von *Histomonas meleagridis* bei Mastelertieren  
und Einfluss eines positiven Nachweises mittels Real-time PCR auf die  
Produktionsparameter der Herde**

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

**vorgelegt von  
Monique Necke  
Tierärztin aus Potsdam**

**Berlin 2023  
Journal-Nr.: 4378**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Hafez Mohamed Hafez  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Georg von Samson-Himmelstjerna  
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Peter-Henning Clausen

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

broilers, histomonas meleagridis, prevalence, caecum, faeces collection, samples,  
polymerase chain reaction, typhlitis, serositis, mortality, laying performance

Tag der Promotion: 17.04.2023

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: 978-3-96729-209-1

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2023**

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 2023 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

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

**den Tieren gewidmet**



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Ziele der Arbeit.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht.....</b>	<b>2</b>
2.1	Geschichte .....	2
2.2	Vorkommen und Bedeutung.....	3
2.3	Ätiologie .....	3
2.3.1	Taxonomie .....	3
2.3.2	Morphologie .....	4
2.3.3	Genom .....	6
2.3.4	Pathogenität.....	6
2.3.5	Widerstandskraft gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen.....	9
2.4	Pathogenese und Epidemiologie.....	10
2.4.1	Wirtsspektrum .....	10
2.4.1.1	Huhn.....	10
2.4.1.2	Pute .....	12
2.4.1.3	Andere Spezies .....	12
2.4.2	Übertragung .....	14
2.4.2.1	Direkte Übertragung .....	14
2.4.2.2	Indirekte Übertragung.....	17
2.4.3	Klinische Symptome.....	18
2.4.4	Pathologisch-anatomische Veränderungen.....	19
2.4.5	Pathohistologische Veränderungen.....	20
2.4.6	Mortalität .....	21
2.4.7	Immunität .....	22
2.4.7.1	Angeborene Immunität.....	22
2.4.7.2	Adaptive Immunantwort .....	23
2.4.7.2.1	Pathogen-spezifische Antikörper .....	23
2.4.7.2.2	Zell-vermittelte Immunantwort .....	24

## Inhaltsverzeichnis

---

2.5	Diagnose .....	25
2.5.1	Erregernachweis .....	25
2.5.1.1	Mikroskopie .....	25
2.5.1.2	Histopathologie .....	25
2.5.1.3	Anzucht .....	25
2.5.1.4	Polymerase chain reaction (PCR) .....	27
2.5.1.5	In-situ Hybridisierung .....	27
2.5.1.6	Immunhistochemie .....	28
2.5.2	Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) .....	28
2.5.3	Veränderungen des Blutes .....	29
2.5.4	Genotypisierung .....	29
2.6	Prävention und Kontrolle .....	30
2.6.1	Herdenmanagement .....	30
2.6.2	Impfung .....	32
2.6.3	Rechtslage .....	33
2.6.4	In der Prophylaxe und Therapie eingesetzte Wirkstoffe .....	33
2.6.4.1	Antibiotika und andere chemische Wirkstoffe .....	33
2.6.4.2	Pflanzliche Wirkstoffe .....	34
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>36</b>
3.1	Material .....	36
3.1.1	Mastelterntier-Herden .....	36
3.1.2	Haltungssystem während Aufzucht und Produktion .....	38
3.1.3	Verbrauchsmaterialien und Geräte .....	42
3.1.3.1	Probenmaterial .....	42
3.1.3.2	Präparation der DNA .....	42
3.1.3.3	Real-time PCR (qPCR) .....	43
3.1.4	Puffer .....	44
3.1.5	Kits .....	44

## Inhaltsverzeichnis

---

3.1.6	Positivkontrollen für die Real-time PCR.....	44
3.1.7	Software.....	44
3.2	Methoden .....	44
3.2.1	Herkunft der Produktionsparameter.....	44
3.2.1.1	Tierverlustdaten.....	45
3.2.1.2	Legeleistung .....	45
3.2.1.3	Sektionsbefunde.....	46
3.2.2	Durchführung der Probenahme .....	46
3.2.3	DNA-Extraktion .....	50
3.2.3.1	Extraktion aus Blinddarmtupfern .....	50
3.2.3.2	Extraktion aus Sockentupfern .....	51
3.2.3.3	Extraktion aus Wischproben .....	51
3.2.4	Real-time PCR (qPCR) .....	51
3.2.5	Statistik .....	52
3.2.5.1	Untersuchung der Einflussfaktoren .....	55
3.2.5.1.1	Probenahmezeitpunkt .....	55
3.2.5.1.2	Tränkewasser.....	55
3.2.5.1.3	Region.....	56
3.2.5.1.4	Herkunft der Tiere .....	56
3.2.5.1.5	Probenmaterial.....	57
3.2.5.2	Untersuchung der Korrelation von qPCR-Ergebnissen und Sektionsbefunden .....	57
3.2.5.2.1	Zusammenhang zwischen positiven qPCR-Ergebnissen und Typhlitis ...	57
3.2.5.2.2	Zusammenhang zwischen positiven qPCR-Ergebnissen und Polyserositis .....	58
3.2.5.3	Untersuchung der Korrelation von qPCR-Ergebnissen und Produktionsparametern (Legeleistung Gelege und Abgänge) .....	59
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>60</b>
4.1	Untersuchungen zum möglichen Infektionszeitpunkt.....	60

## Inhaltsverzeichnis

---

4.2	Ergebnisse des Histomonaden-DNA Nachweises mittels qPCR in Bezug auf verschiedene Einflussfaktoren.....	61
4.2.1	Probenahmezeitpunkt .....	61
4.2.2	Tränkewasser.....	64
4.2.3	Region .....	65
4.2.4	Herkunft der Tiere .....	67
4.2.5	Probenmaterial.....	68
4.3	Zusammenhang zwischen qPCR-Ergebnissen und Sektionsbefunden .....	70
4.3.1	Zusammenhang zwischen positiven qPCR-Ergebnissen und Typhlitis bezogen auf die Herkunft der Tiere.....	70
4.3.2	Zusammenhang zwischen positiven qPCR-Ergebnissen und Polyserositis bezogen auf die Herkunft der Tiere .....	72
4.4	Zusammenhang zwischen positiven qPCR-Ergebnissen und Produktionsparametern .....	75
4.4.1	Zusammenhang zwischen positiven qPCR-Ergebnissen und der Legeleistung.. ..	75
4.4.2	Zusammenhang zwischen positiven qPCR-Ergebnissen und den Abgängen..	76
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>78</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>98</b>
<b>7</b>	<b>Summary.....</b>	<b>100</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>102</b>
<b>9</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>126</b>

### Abkürzungsverzeichnis

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Abkürzungen verwendet:

AAAP	American Association of Avian Pathologists
$\alpha$	Irrtumswahrscheinlichkeit
AST	Asparaginsäureaminotransferase
BDT	Blinddarmtupfer
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
CD	Immunphänotypische Oberflächenmerkmale von Zellen (Cluster of Differentiation)
cm	Zentimeter
Ct-Wert	Schwellenzyklus (Treshold cycle)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
et al.	und Mitarbeiter
EtOH abs.	Ethanol absolut
EU	Europäische Union
GLDH	Glutamatdehydrogenase
H <sub>0</sub>	Nullhypothese
H <sub>1</sub>	Alternativhypothese
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
ID	Identifikationsnummer
IFN- $\gamma$	Interferon-Gamma
Ig	Immunglobulin

## Abkürzungsverzeichnis

---

IL	Interleukin
ITS	Nukleotidsequenz (Internal transcribed spacer)
$\kappa$	Kappa-Koeffizient nach Cohen
KCl	Kaliumchlorid
$K_3PO_4$	Kaliumphosphat
kum.	kumuliert
l	Liter
LAMP	isothermale DNA-Amplifikation (Loop-mediated isothermal amplification assay)
LDH	Laktatdehydrogenase
LKW	Lastkraftwagen
LW	Lebenswoche
MDH	Malatdehydrogenase
mg	Milligramm
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
$Na_3PO_4$	Natriumphosphat
n. n.	nicht nachweisbar
§	Paragraph
PAS	Perjodsäure Schiffreagenz Reaktion (Periodic acid-Schiff stain)
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung

## Abkürzungsverzeichnis

---

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
%	Prozent
pH	negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
p.i.	nach der Infektion (post infectionem)
pg	Pikogramm
pmol	Pikomol
POL	Stichtag für Berechnung der Legeleistung (Point of lay)
$p$	Signifikanzniveau
$\rho$	Korrelationskoeffizient nach Spearman
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion (Real-time Polymerase Chain Reaction)
$r$	Effektstärke
ROX	Carboxyrhodamine
rpb1	DNA-gerichtete RNA-Polymerase Untereinheit
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
s	Sekunde(n)
SOT	Sockentupfer
SPF	Spezifisch pathogen frei (Specific Pathogen Free)
ssu	kleine Untereinheit (small subunit)
Std.	Standard
USA	United States of America
vs.	versus
WP	Wischprobe
z-Wert	Standardteststatistik

### Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Filteranlage mit Brunnenpumpen (Bsp. Betrieb 6).....	38
<b>Abbildung 2:</b> Brunnen von außen (Bsp. Betrieb 6).....	38
<b>Abbildung 3:</b> mäanderförmiges Ablaufen des Stalls mit Sockentupfern (schematisch) .....	48
<b>Abbildung 4 (a-c):</b> Ablauf der Probenahme Sockentupfer.....	48
<b>Abbildung 5:</b> Probenmaterial zur Sicherung der Feldproben.....	49
<b>Abbildung 6 (a+b):</b> Ablauf der Probenahme Blinddarmtupfer.....	49
<b>Abbildung 7:</b> Prozentualer Anteil aller Proben in Bezug auf die Jahreszeiten .....	61
<b>Abbildung 8:</b> Prozentualer Anteil positiver und negativer qPCR-Ergebnisse der Wischproben in Bezug auf die Jahreszeiten.....	62
<b>Abbildung 9:</b> Prozentualer Anteil positiver und negativer qPCR-Ergebnisse der Blinddarmtupfer in Bezug auf die Jahreszeiten.....	63
<b>Abbildung 10:</b> Prozentualer Anteil positiver und negativer qPCR-Ergebnisse der Sockentupfer in Bezug auf die Jahreszeiten.....	63
<b>Abbildung 11:</b> Prozentualer Anteil positiver und negativer qPCR-Ergebnisse in Bezug auf die Tränkewasserherkunft.....	64
<b>Abbildung 12:</b> Geographische Lage der Betriebe .....	65
<b>Abbildung 13:</b> Vergleich der Ct-Werte der Histomonaden-qPCR (Sockentupfer) in Bezug auf die Region.....	66
<b>Abbildung 14:</b> Prozentualer Anteil positiver qPCR-Ergebnisse getrennt nach Herkunft der Tiere (A vs. B) und Probenmaterial.....	68
<b>Abbildung 15:</b> Gegenüberstellung positiver und negativer qPCR-Ergebnisse beider Probenmaterialien bei identischem Probenahmezeitpunkt in %.....	69
<b>Abbildung 16:</b> Inhalt eines Blinddarms mit fibrinös-diphtheroider Typhlitis .....	71
<b>Abbildung 17:</b> eröffneter Blinddarm mit fibrinös-diphtheroider Typhlitis.....	71
<b>Abbildung 18:</b> Prozentualer Anteil positiver und negativer qPCR-Ergebnisse der Blinddarmtupfer in Bezug auf das zeitgleiche Vorliegen einer Polyserositis bei Tieren der Herkunft A.....	72
<b>Abbildung 19:</b> Prozentualer Anteil positiver und negativer qPCR-Ergebnisse der Blinddarmtupfer in Bezug auf das zeitgleiche Vorliegen einer Polyserositis bei Tieren der Herkunft B .....	73

## Abbildungsverzeichnis

---

<b>Abbildung 20:</b> Zusammenhang zwischen prozentualem Anteil einer Polyserositis und Summe der Ct-Werte der Sockentupfer bei Tieren der Herkunft A mit Trendlinie .....	74
<b>Abbildung 21:</b> Zusammenhang zwischen prozentualem Anteil einer Polyserositis und Summe der Ct-Werte der Sockentupfer bei Tieren der Herkunft B mit Trendlinie .....	74
<b>Abbildung 22:</b> Zusammenhang zwischen der Legeleistung Gelege in % Resthenne und der Summe der Ct-Werte der Blinddarmtupfer mit Trendlinie .....	75
<b>Abbildung 23:</b> Zusammenhang zwischen der Legeleistung Gelege in % Resthenne und der Summe der Ct-Werte der Sockentupfer mit Trendlinie.....	76
<b>Abbildung 24:</b> Zusammenhang zwischen den Abgängen in % POL und der Summe der Ct-Werte in Bezug auf die Blinddarmtupfer mit Trendlinie .....	77
<b>Abbildung 25:</b> Zusammenhang zwischen den Abgängen in % POL und der Summe der Ct-Werte in Bezug auf die Sockentupfer mit Trendlinie .....	77
<b>Abbildung 26:</b> Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb 1 .....	126
<b>Abbildung 27:</b> Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb 2.....	127
<b>Abbildung 28:</b> Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb 3.....	128
<b>Abbildung 29:</b> Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb 4.....	129
<b>Abbildung 30:</b> Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb 5.....	130
<b>Abbildung 31:</b> Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb 6.....	131
<b>Abbildung 32:</b> Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb 7.....	132
<b>Abbildung 33:</b> Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb 9.....	133
<b>Abbildung 34:</b> Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb 10.....	134
<b>Abbildung 35:</b> Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb 11.....	135

## Abbildungsverzeichnis

---

<b>Abbildung 36:</b> Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb 12.....	136
<b>Abbildung 37:</b> Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb 13.....	137
<b>Abbildung 38:</b> Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb 14.....	138
<b>Abbildung 39:</b> Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb 15.....	139
<b>Abbildung 40:</b> Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb 16.....	140
<b>Abbildung 41:</b> Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb 17.....	141
<b>Abbildung 42:</b> Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb 18.....	142
<b>Abbildung 43:</b> Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb 19.....	143
<b>Abbildung 44:</b> Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb 20.....	144

### Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Standort der Produktionsbetriebe nach Herkunft und Bundesland .....	36
<b>Tabelle 2:</b> Standort von Aufzucht- und dazugehörigem Produktionsbetrieb .....	37
<b>Tabelle 3:</b> Zuordnung Futtermittelhersteller und Tränkewasser zu Betrieb und Herkunft .....	40
<b>Tabelle 4:</b> Anzahl der Hennen und Hähne je beprobtem Stall am Einstallungstag .....	41
<b>Tabelle 5:</b> Probenmaterial zur Sicherung der entnommenen Proben .....	42
<b>Tabelle 6:</b> Material und Geräte für die DNA-Präparation .....	42
<b>Tabelle 7:</b> Material und Geräte für die Real-time PCR (qPCR) .....	43
<b>Tabelle 8:</b> Überblick über die in der qPCR verwendeten Primer (Hauck und Hafez 2012) ...	52
<b>Tabelle 9:</b> In der qPCR verwendete Sonde (Hauck und Hafez 2012).....	52
<b>Tabelle 10:</b> Temperaturprofil des Thermocyclers .....	52
<b>Tabelle 11:</b> Übersicht über die statistischen Methoden mit Fragestellungen .....	54
<b>Tabelle 12:</b> Ergebnisse der qPCR von Wischproben (WP) und Blinddarmtupfern (BDT) bei Einstellung in die Produktionsfarm getrennt nach Herkunft der Tiere.....	60
<b>Tabelle 13:</b> Ausgewählte Lage- und Streuparameter der die Ct-Werte darstellenden Boxplots aus Abbildung 13.....	67
<b>Tabelle 14:</b> Vergleich statistischer Maßzahlen in Bezug auf die Ct-Werte von Blinddarm- und Sockentupfern .....	69
<b>Tabelle 15:</b> Prozentualer Anteil von Polyserositis und Typhlitis an allen über den Produktionszeitraum erhobenen Sektionsbefunden bis zur 56. Lebenswoche.....	70
<b>Tabelle 16:</b> Produktionsparameter Betrieb 1 .....	126
<b>Tabelle 17:</b> Produktionsparameter Betrieb 2 .....	127
<b>Tabelle 18:</b> Produktionsparameter Betrieb 3 .....	128
<b>Tabelle 19:</b> Produktionsparameter Betrieb 4 .....	129
<b>Tabelle 20:</b> Produktionsparameter Betrieb 5 .....	130
<b>Tabelle 21:</b> Produktionsparameter Betrieb 6 .....	131
<b>Tabelle 22:</b> Produktionsparameter Betrieb 7 .....	132
<b>Tabelle 23:</b> Produktionsparameter Betrieb 9 .....	133

## Tabellenverzeichnis

---

<b>Tabelle 24:</b> Produktionsparameter Betrieb 10 .....	134
<b>Tabelle 25:</b> Produktionsparameter Betrieb 11 .....	135
<b>Tabelle 26:</b> Produktionsparameter Betrieb 12 .....	136
<b>Tabelle 27:</b> Produktionsparameter Betrieb 13 .....	137
<b>Tabelle 28:</b> Produktionsparameter Betrieb 14 .....	138
<b>Tabelle 29:</b> Produktionsparameter Betrieb 15 .....	139
<b>Tabelle 30:</b> Produktionsparameter Betrieb 16 .....	140
<b>Tabelle 31:</b> Produktionsparameter Betrieb 17 .....	141
<b>Tabelle 32:</b> Produktionsparameter Betrieb 18 .....	142
<b>Tabelle 33:</b> Produktionsparameter Betrieb 19 .....	143
<b>Tabelle 34:</b> Produktionsparameter Betrieb 20 .....	144
<b>Tabelle 35:</b> Ct-Werte Histomonaden-qPCR .....	145

### 1 Einleitung und Ziele der Arbeit

Die Histomonose, auch Schwarzkopfkrankheit, Blackhead Disease, Histomoniasis, infektiöse Typhlohepatitis oder Infektiöse Enterohepatitis genannt, wird verursacht durch das begeißelte Protozoon *Histomonas meleagridis*. Während die Erkrankung bei Puten zumeist zu hohen Verlusten führt, gelten Hühner vor allem als Reservoir für die Verbreitung des Erregers (Hess 2017). Jedoch sind auch bei dieser Spezies unter anderem erhöhte Mortalität und Einbrüche in der Legeleistung als Folge einer Infektion mit *H. meleagridis* beschrieben.

Obgleich sich bei Hühnern die meisten Berichte auf in Freiland gehaltene Tiere beziehen, in denen der Eintrag von *H. meleagridis* durch Beteiligung entsprechender Vektoren wie Regenwürmer oder Heterakiden erklärt werden kann, wurden in Bezug auf kommerziell gehaltene Mastelertier-Herden, in denen hohe Hygieneanforderungen obligatorisch sind, bisher nur wenige Fälle einer Infektion mit *H. meleagridis* ausreichend dokumentiert und zur Veröffentlichung gebracht (Cortes et al. 2004; Ganapathy et al. 2000).

Daher sollen im Rahmen dieser Dissertation, mittels einer breit angelegten Verlaufsuntersuchung im Feld, folgende Fragestellungen näher beleuchtet werden:

- Inwieweit sind Mastelertier-Herden trotz erhöhter Biosicherheitsmaßnahmen von einer Infektion mit *H. meleagridis* betroffen? Zu welchem Zeitpunkt kann mittels Real-time PCR (qPCR) erstmalig eine Infektion nachgewiesen werden?
- Haben Faktoren wie die Jahreszeit, die Herkunft des Tränkwassers oder die Region, in der sich der Betrieb befindet, einen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit für einen positiven Nachweis mittels Histomonaden-qPCR?
- Unterscheidet sich die Prävalenz einer Infektion mit *H. meleagridis* zwischen zwei unterschiedlichen genetischen Tier-Herkünften A und B?
- Inwieweit korrelieren die Ergebnisse der qPCR von Socken- und Blinddarmpuffern? Lassen sich anhand der Ergebnisse Rückschlüsse auf die Eignung beider Probenmaterialien für Verlaufsuntersuchungen ziehen?
- Korreliert ein positiver Histomonaden-Nachweis mittels Histomonaden-qPCR mit dem Vorkommen einer Typhlitis oder dem prozentualen Anteil an Polyserositiden in der Herde?
- Haben die Nachweise von *H. meleagridis*-DNA mittels Histomonaden-qPCR einen Einfluss auf die Wirtschaftlichkeit der Herde in Bezug auf die Produktionsparameter Legeleistung und Abgänge?

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Geschichte

Obwohl die Erkrankung Histomonose, auch als Histomoniasis, Blackhead Disease, Schwarzkopfkrankheit oder Infektiöse Typhlohepatitis bekannt, bereits vor mehr als 125 Jahren erstmalig auf Rhode Island beschrieben wurde (Cushman 1893), sind viele Fragen über den Erreger *Histomonas meleagridis* bis heute ungeklärt. In den auf ihre Entdeckung folgenden Jahren breitete sich die Erkrankung mit verheerenden Auswirkungen auf die Geflügelproduktion, insbesondere auf die Produktion von Putenfleisch, aus (Curtis 1907).

Im Jahre 1895 berichtete Smith über das Vorkommen des Protozoon *Amoeba meleagridis* in klinisch veränderten Blinddärmen und Lebern als Verursacher der Erkrankung, während wenig später auch Kokzidien (Cole und Hadley 1908) sowie Trichomonaden (Jowett 1911) als kausatives Agens diskutiert wurden. 1920 berichtete Tyzzer (1920) über rhythmische, pulsatile Bewegungen des Erregers, so dass er eine Reklassifizierung vornahm und *H. meleagridis* als Verursacher der Schwarzkopfkrankheit benannte. Über die Komplexität des Erregers und seines Pathomechanismus wurde von Franker und Doll (1964) publiziert. Die Autoren zeigten, dass *H. meleagridis* seine volle Virulenz nur in Anwesenheit bestimmter Bakterien ausprägen konnte.

Über einen Ausbruch der Schwarzkopfkrankheit bei Hühnern berichteten erstmals Chester und Robin (1900). Nach den Angaben von Lund (1967) zeigten sich erste wirtschaftliche Auswirkungen einer Histomoniasis bei dieser Spezies ab 1908. Mittlerweile sind klinische Ausbrüche bei Hühnern weit verbreitet (Esquenet et al. 2003; Ganapathy et al. 2000), wobei sowohl über Fälle mit geringen klinischen Symptomen und moderaten Verlustraten als auch über Fälle mit deutlich erhöhter Mortalität berichtet wurde (Muller 1990; Hungerford 1937). Die Tatsache, dass Hühner aufgrund einer zumeist geringeren Ausprägung der Erkrankung als Reservoir für *H. meleagridis* gelten, wurde schnell als Ansatz für die Vermeidung der Verbreitung genutzt. So wird bis heute empfohlen, Puten und Hühner nicht zusammen auf einem Betrieb bzw. Puten nicht auf einer Fläche zu halten, die in den Jahren davor für die Haltung von Hühnern genutzt wurde (Tyzzer und Fabyan 1922).

Auch die Rolle des Blinddarmwurms *Heterakis gallinarum* als Überträger der Schwarzkopfkrankheit wurde schon früh erkannt und publiziert (Tyzzer et al. 1921). So berichteten Adams et al. (1986), dass die Wahrscheinlichkeit für eine Infektion mit *Histomonas meleagridis* in den Regionen größer ist, in denen auch der Blinddarmwurm *H. gallinarum* sowie Spezies unterschiedlicher Regenwürmer vorkommen.

Bereits um 1926 hatte sich die Schwarzkopfkrankheit bis nach Europa, Ostasien und Australien ausgebreitet (Krijgsman 1929), mit Beginn des 21. Jahrhunderts wurden Berichte über *H. meleagridis* weltweit veröffentlicht (Mc Dougald 2005).

### 2.2 Vorkommen und Bedeutung

Die Histomonose ist eine weltweit verbreitete, parasitäre Erkrankung, verursacht durch das Protozoon *Histomonas meleagridis*. Eine Infektion ist insbesondere durch Läsionen der Blinddarmschleimhaut sowie des Lebergewebes gekennzeichnet, der Erreger kann jedoch auch in anderen Organen nachgewiesen werden (Huber et al. 2006). Besonders Puten sind empfänglich, jedoch infizieren sich auch Hühner und eine Vielzahl anderer Vogelarten. Im Allgemeinen gelten besonders Jungputen in Auslaufhaltung sowie gemischte Haltungen von Hühnern und Puten als besonders gefährdet (Salisch und Behr 2012). Während in den späten 1960er Jahren die Berichte über klinische Ausbrüche insgesamt aufgrund des Einsatzes hoch effizienter Wirkstoffe in Prophylaxe und Therapie zurückgingen (Mc Dougald 2005), wurden dennoch schwere Fälle verbunden mit Mortalitätsraten bis zu 85 % dokumentiert. So berichtete Shivaprasad et al. (2002) über Ausbrüche in 15 Betrieben in Kalifornien, die in keinem regionalen Zusammenhang standen. Anfang der 90er Jahre kam es dann in Europa zu arzneimittelrechtlichen Einschränkungen mit einem daraus resultierenden Therapie- und Prophylaxenotstand, der eine Zunahme der Histomonose-Ausbrüche mit teils sehr hohen Mortalitäten bei Puten zur Folge hatte (Hauck et al. 2010a; Hafez et al. 2005b). Im Zuge dessen breiteten sich die Verluste in Zusammenhang mit der Histomonose auch bei Hühnern aus (Dolka et al. 2015), wobei die Angaben über die Mortalitätsraten mit einer Spanne von zwei bis drei Prozent (Homer und Butcher 1991) bis hin zu 50 % bei Mischinfektionen mit *Erysipelothrix rhusiopathiae* und *Escherichia coli* stark divergieren (Hafez et al. 2001). Es wurde vermutet, dass die wirtschaftlichen Verluste bei Hühnern angesichts einer Infektion mit *H. meleagridis* wegen der größeren Tierzahlen und der höheren Anzahl an Betrieben sogar größer sein könnten als die bei Puten (AAAP 1986).

### 2.3 Ätiologie

#### 2.3.1 Taxonomie

Die taxonomische Einordnung des Protozoon *H. meleagridis* war in den Jahren nach seiner Entdeckung stetigen Änderungen unterworfen. So wurde der Erreger von Smith (1895) erstmals als *Amoeba meleagridis* beschrieben, da zu diesem Zeitpunkt die Existenz

begeißelter Stadien noch nicht bekannt war. 1920 veröffentlichte Tyzzer seine Ergebnisse über umfangreiche Untersuchungen, bestätigte die enge Verwandtschaft des Erregers mit Trichomonaden und führte den Genus *Histomonas meleagridis* ein (Tyzzer 1920). Später konnte die antigenetische Beziehung zwischen *H. meleagridis*, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba invadens*, *Trichomonas gallinae* und *Dientamoeba fragilis* (Dwyer 1974), (Dwyer 1972a), (Dwyer 1972b) hergestellt werden. Die enge phylogenetische Verwandtschaft zu *Dientamoeba fragilis* wurde durch Untersuchungen des ssu-rRNA-Gens bestätigt (Gerbod et al. 2001).

Die noch heute gültige taxonomische Einordnung von *H. meleagridis* basiert auf den molekularbiologischen Ergebnissen von Cepicka et al. (2010):

Reich:	Protozoen
Stamm:	Parabasalia
Klasse:	Tritrichomonadea
Ordnung:	Tritrichomonadida
Familie:	Dientamoebidae
Gattung:	<i>Histomonas</i>
Art:	<i>Histomonas meleagridis</i>

Nach den Angaben von Cavalier-Smith (1998) gehören die Histomonaden den Parabasalia an. Dabei handelt es sich um anaerobe Protisten mit einem Parabasalkörper, Hydrogenosomen (Mazet et al. 2008), einem Axostyl-Pelta-Komplex als Axialskelett (Schuster 1968), außerhalb des Kerns befindlichen Mitosespindeln und einem Parabasal-Filament. Im Jahre 1963 stellte Lund fest, dass die apathogene Histomonaden-Art *H. wenrichi* vier Geißeln besitzt, heute wird diese Art als *Parahistomonas wenrichi* beschrieben.

### 2.3.2 Morphologie

Die Morphologie von *H. meleagridis* ist abhängig von der Lokalisation. So besitzt die im Darmlumen vorkommende, invasive Form eine sphärische Gestalt mit einem Flagellum, wobei es zu einem frühen Zeitpunkt während der Zellteilung zuweilen zur Ausbildung einer zweiten Geißel kommen kann (Honigberg und Bennett 1971). Diese Form verdaut Gewebepartikel extrazellulär durch Sekretion von Enzymen vor, um sie anschließend per Pinozytose oder auch über Diffusion aufzunehmen (Lee et al. 1969). Die zweite Form wird als Gewebeform bezeichnet. Sie weist ein nahezu rundes Aussehen auf, ist unbegeißelt mit amöboider Struktur,

bildet bei 40°C Pseudopodien aus (McDougald und Reid 1978), ernährt sich mittels phagozytotischer Prozesse und vermehrt sich ebenfalls durch Zweiteilung (Honigberg und Kuldova 1969).

Die einzelne Histomonaden-Zelle ist von einer einfachen Membran umgeben (Lee et al. 1969). Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen von in vitro Kulturen zeigten eine Zellgröße von 10 bis 20 µm und einen 1,5 bis 2 µm großen oval- bis u-förmigen Nukleus, der von einer Doppelmembran umfasst ist (Schuster 1968). Die mikrotubulären Strukturen des Spindelapparates sind mit dem Nukleus verbunden, in Kernnähe befindet sich ein Golgi-Apparat (Mielewczik et al. 2008). Nachdem bereits Schuster (1968) und Lee et al. (1969) mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen Aussagen zu Inhalten des Cytoplasmas treffen konnten, zeigten ferner Mielewczik et al. (2008), dass das Cytoplasma das glatte endoplasmatische Retikulum, mehrere Golgi -Apparate, 0,3 bis 0,5 µm große, sphärische Hydrogenosome, Glykogengranula, freie Ribosomen sowie Nahrungsvakuolen enthält, die ingestierte Bakterien und Reisstärke einschließen. Das raue endoplasmatische Retikulum ist nicht vorhanden und Mitochondrien fehlen ebenfalls (Lee et al. 1969). Dafür übernehmen Hydrogenosome deren Funktion und wandeln in anaerober Umgebung Pyruvat zu Acetat zur Produktion von Energie in Form von Adenosintriphosphat um, während im inneren Kompartiment der Organelle Wasserstoff gebildet wird (Embley und Martin 2006).

Spindelapparat und Geißel bestehen aus Mikrotubuli in 9x2+2 -Anordnung (Lee et al. 1969), zudem besitzt *H. meleagridis* einen Parabasal-Apparat, der aus einem Parabasalkörperchen in V-Form sowie einem Parabasal -Filament zusammengesetzt ist (Honigberg und Bennett 1971).

Viele Jahre wurde die Meinung vertreten, dass *H. meleagridis* keine Zysten-Form ausbilden würde und ohne den Schutz eines Zwischenwirtes, wie beispielsweise *Heterakis gallinarum*, nicht überleben könnte (Lund und Chute 1974b; Graybill und Smith 1920). Munsch et al. (2009a) und Zaragatzki et al. (2010a), (2010b) konnten jedoch zystenartige Stadien von *H. meleagridis* nachweisen. Diese sphärischen Gebilde weisen eine Größe von 4 bis 14 µm auf, enthielten eine Vielzahl an Nahrungsvakuolen und einen einzelnen Nukleus. Es traten sowohl Stadien mit einer einzelnen Hülle, als auch Stadien mit einer Doppelmembran auf, wobei sich die letztgenannten Stadien nur dann bildeten, wenn die Kultur ungünstigen Bedingungen ausgesetzt wurde. Die Autoren nahmen an, dass diese zystenartigen Stadien aufgrund ihrer geringen Anzahl bisher übersehen wurden und dass sie, ähnlich den Zysten der Flagellaten *Blastocrithia triatomae*, eine Möglichkeit darstellten, das saure Milieu des Magens zu überleben und sie somit eine Rolle bei der Übertragung von Bestand zu Bestand spielen könnten.

### 2.3.3 Genom

Detaillierte Informationen über das Genom von *H. meleagridis* sind noch immer stark limitiert. Gerbod et al. (2001) sequenzierten das small subunit rRNA-Gen und wiesen damit eine nahe phylogenetische Verwandtschaft zu *Dientamoeba fragilis* nach. Van der Heijden et al. (2006) untersuchten ebenfalls das small subunit rRNA-Gen, insbesondere die nicht kodierende Nukleotidsequenz Internal transcribed spacer 1 (ITS-1). Mittels C-Profilings wurden so diverse Isolate genotypisiert und drei Subtypen, Typ I–III, zugeordnet. Die Isolate des Typ II stammten aus drei Hühnerbetrieben. In einer Arbeit von Hauck et al. (2010b) wurde das Verfahren des C-Profilings modifiziert und vier verschiedene Profile (Typ A – D) innerhalb der ITS-1 Region des ssu rRNA-Gens von *H. meleagridis* eruiert, wobei es keine Ähnlichkeiten zu den im Jahr 2006 von van der Heijden et al. veröffentlichten Profilen gab. Hauck et al. (2010b) konnten eine ähnlich häufige Zugehörigkeit von Proben aus Hühnerbeständen zum Typ A und Typ B darstellen. Bilic et al. (2014) untersuchten die genetische Zugehörigkeit verschiedener Isolate von *H. meleagridis* anhand der Analyse drei genetischer Loci, dem 18S rRNA-Gen, dem alpha-Actinin 1-Gen und dem rpb1 Gen. In dieser phylogenetischen Analyse zeigten sich zwei Cluster, wobei Isolate aus Europa vornehmlich dem Genotypen 1 zugeordnet werden konnten und Genotyp 2 nur selten auftrat. Hauck und Hafez (2009) untersuchten, ob sich bei fünf verschiedenen Isolaten anhand von Sequenzen eines Teils des beta-Tubulin-Gens eine Zugehörigkeit zu verschiedenen Clustern darstellen lässt. Die Unterschiede waren jedoch so gering, dass das beta-Tubulin-Gen für eine Differenzierung nicht geeignet schien. Klodnicki et al. (2013) identifizierten 3425 vermeintliche *H. meleagridis*-Gene und ermittelten daraus 81 Gene, die für hydrogenosomale Proteine codieren. In einer anderen molekularbiologischen Studie konnte herausgefunden werden, dass die Malatdecarboxylase, die Alpha-succinyl-Coenzym A-Synthetase sowie die Eisen-Hydrogenase am anaeroben Stoffwechsel in den Hydrogenosomen von *H. meleagridis* beteiligt sind und einen interessanten Ansatz im Hinblick auf Zelldifferenzierung und Interaktion zwischen Wirt und Protozoon darstellen (Mazet et al. 2008).

### 2.3.4 Pathogenität

Die klinische Manifestation einer Infektion mit *Histomonas meleagridis* hängt maßgeblich von den Eigenschaften des Wirtes ab. Zu diesen Eigenschaften zählen unter anderem die Spezies, die Rasse, die bakterielle Begleitflora sowie der Status des Immunsystems bei zeitgleicher Infektion mit anderen Krankheitserregern. Variationen in der Pathogenität des Erregers selbst spielen eher eine untergeordnete Rolle (Mc Dougald 2008). So ist allgemein bekannt, dass Puten die für *H. meleagridis* empfänglichste Spezies sind und die wirtschaftlichen Auswirkungen der Erkrankung seit Einführung der arzneimittelrechtlichen Einschränkungen in

der EU und den USA durch enorme Tierverluste geprägt sind. Im Gegensatz dazu wurden Hühner in der Literatur lediglich als Reservoir-Wirte beschrieben, bei denen die Erkrankung häufig symptomlos abläuft (Liebhart und Hess 2019). Andere Berichte wiederum verdeutlichen die Relevanz der Histomonose bei Legehennen und Elterntieren (Dolka et al. 2015; Liebhart et al. 2013; Grafl et al. 2011; van der Heijden und Landman 2011).

Lund und Chute (1972a) infizierten verschiedene Spezies der Hühnervögel mit *H. meleagridis* und fanden heraus, dass die Intensität der klinischen Symptome wirtsspezifisch ist. Puten waren dabei am stärksten betroffen. Danach folgte der Pfau, das Chukar-Rebhuhn, andere Hühner und der Fasan (Lund und Chute 1972a). Aber auch Wachteln, Perlhühner, Enten sowie Strauße sollen für eine Infektion mit *H. meleagridis* empfänglich sein (Dolka et al. 2015).

In Bezug auf die genetische Resistenz gegenüber bestimmten Erkrankungen konnten beim Geflügel auch über die spezies-spezifischen Dispositionen hinaus oft große individuelle Unterschiede dargestellt werden (Lotfi und Hafez 2009). So wurde in einer Studie über den Vergleich der Empfänglichkeit bei verschiedenen Putenlinien gezeigt, dass die Mortalität nach intrakloakaler Infektion mit *H. meleagridis* bei der kanadischen Wildpute signifikant höher war als bei der Kelly-Bronze®-Pute und der B.U.T.6-Pute. Beide Linien wiesen jedoch höhere Leber-Läsions-Scores auf als die kanadische Wildpute.

Bei Hühnern konnte bereits 1967 durch Lund gezeigt werden, dass sich die Inzidenz nach der oralen Infektion mit *H. meleagridis* über infizierte, embryonierte Eier von *Heterakis gallinarum* bei vier verschiedenen Hühnerrassen voneinander unterschied. Sie lag zwischen 25 und 80 %. Die daraus resultierende Schlussfolgerung, dass es innerhalb der Hühnerrassen Unterschiede in der Empfänglichkeit gegenüber *H. meleagridis* gibt, wurde einige Jahre später auch durch Al-Khateeb und Hansen (1974) bestätigt. Nach experimenteller, intrakloakaler Infektion von Hühnern verschiedener Rassen zeigten sich unterschiedlich hohe Plasmaenzym-Werte und unterschiedlich stark ausgeprägte Läsionen in Lebern und Blinddärmen. Demgegenüber steht eine Veröffentlichung von Zahoor et al. (2011), in der nach experimenteller Infektion mit *H. meleagridis* kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen vier verschiedenen kommerziellen Hühnerrassen und dem Grad der Blinddarm- bzw. Leberläsionen hergestellt werden konnte. Auch in einer anderen Studie wurde kein signifikanter Unterschied in der Mortalität oder den Läsionsgraden von Blinddärmen und Lebern nach intrakloakaler Infektion von SPF-Eintagsküken einer Legelinie und SPF-Eintagsküken einer Mastlinie festgestellt (Lotfi 2011).

Die bakterielle Besiedlung des Blinddarms stellt ebenfalls einen sehr wichtigen Faktor für die Entwicklung einer manifesten Histomonose dar. Schon frühe Versuche mit gnotobiotischen

Hühnern und Puten zeigten, dass für *H. meleagridis* zur Ausprägung der vollen Pathogenität die Anwesenheit von Bakterien essenziell ist (Springer et al. 1970; Bradley und Reid 1966). Auch van der Heijden und Landman (2008a) konnten keine Vermehrung von *H. meleagridis* mehr verzeichnen, als sie dem Medium für die Anzucht Streptomycin hinzugaben. Springer et al. (1970) konnten nachweisen, dass die Kombination von *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptokokken* und *Clostridium perfringens* die Wachstumsbedingungen für *H. meleagridis* am positivsten beeinflussten. Auch Lesser (1964) bestätigte, dass die Kombination mehrerer Bakterien, beispielsweise *E. coli*, *Escherichia freundii* und *Proteus mirabilis*, für das Wachstum von *H. meleagridis* besser geeignet zu sein scheinen, als einzelne Bakterien. Im Gegensatz dazu wurde nachgewiesen, dass sich in gnotobiotischen Puten auch durch alleinige Infektion mit *E. coli* eine manifeste Histomonose induzieren lässt (Bradley und Reid 1966). Auch Stepkowski und Klimont (1980) konnten in monoxenischen Kulturen mit Enterobacteriaceae eine Vermehrung von *H. meleagridis* herbeiführen. Callait et al. (2002) gelang es sogar, *H. meleagridis* nach 48 Stunden in einer Kultur anzuzüchten, aus der die Bakterien entfernt worden waren. Lesser (1964) fand heraus, dass auch die Herkunft der Bakterien eine Rolle bei der Vermehrung von *H. meleagridis* spielten. Während das Wachstum des Erregers durch die Darmbakterien einer Pute sehr gut unterstützt wurde, gelang dieser Ansatz mit Darmbakterien aus Hühnern nur mit geringem Erfolg. Die Mischung aus Darmbakterien, die von einem mongolischen Gerbil und einem Goldhamster gewonnen wurden, führte kein Wachstum herbei.

Obwohl zahlreiche Veröffentlichungen über das Zusammenspiel von Histomonaden und Bakterien mittels *in vitro* Versuchen belegen, bleibt die Interaktion *in vivo* trotzdem unklar. So zeigen Untersuchungen, dass antibiotische Behandlungen bzw. Behandlungen gegen Kokzidien in therapeutischen Dosen nicht oder kaum zu einer Verminderung der Läsionen in Hühnern führen, wenngleich aber eine Gewichtszunahme erzielt werden konnte (Hu und McDougald 2002). Zudem wurde das Wachstum von *H. meleagridis* *in vitro* in Anwesenheit von hohen Dosen Gentamycin nachgewiesen (Mc Dougald 2005).

Allgemein bekannt ist, dass es bei zeitgleicher oder zeitnaher Infektion mit bakteriellen Krankheitserregern und *H. meleagridis* zu höheren Mortalitäten kommen kann (Hafez et al. 2001; Ganapathy et al. 2000). Jedoch ist dieser Zusammenhang bei Kokzidien, die ebenfalls als Trigger für andere Krankheiten fungieren können, aufgrund widersprüchlicher Versuchsergebnisse umstritten. So konnten McDougald und Hu (2001) darstellen, dass eine Co-Infektion mit *Eimeria tenella* bei Hühnern die Auswirkungen einer Histomonose im Hinblick auf den Schweregrad der Leber-Läsionen und Anzahl der Tiere, die diese Läsionen zeigen, verstärkt. Die Autoren vermuteten, dass *E. tenella* die Blinddarm-Mukosa schädigt und so das

Eindringen der Histomonaden in das Gewebe erleichtert. Andere Autoren wiederum konnten keinen Effekt einer Infektion mit *E. tenella* auf den Verlauf einer Histomonose bei Hühnern zeigen (Ohara und Reid 1961; Welter 1960). Darüber hinaus hat auch der Einsatz eines Kokzidiostatikums keine Auswirkung auf durch *H. meleagridis* verursachte Leber- und Blinddarm-Läsionen bei Hühnern (Hu und McDougald 2002). Bei Puten konnte bei zeitgleicher Infektion mit *E. adenoides* kein Einfluss auf den Krankheitsverlauf der Histomonose dargestellt werden (Hu et al. 2005; McDougald und Fuller 2005; McDougald und Hu 2001).

In einer Studie von Welter (1960) wurde der Einfluss einer Futterrestriktion auf den Verlauf der Histomonose bei Hühnern und Puten untersucht. Bei Puten, die man nach der Infektion hatte hungern lassen, zeigte sich im Vergleich zu den Puten, die nicht gehungert hatten, in Bezug auf die Leber-Läsionen eine höhere Inzidenz. Bei Hühnern konnten durch die Restriktion des Futters keine Unterschiede in Mortalität und Schweregrad der Leber- und Blinddarmläsionen eruiert werden. Liebhart und Hess (2009) hingegen imitierten den Anstieg des pH-Wertes bei hungernden Hühnern und Puten in Kropf, Muskelmagen und Duodenum mittels einer alkalischen Lösung und erhöhten damit die Anzahl der Tiere mit Histomonaden-typischen Läsionen auf 100%. Welter (1960) untersuchte den Einfluss weiterer stressinduzierender Faktoren auf den Verlauf der Histomonose bei Hühnern und Puten. In verschiedenen Versuchsgruppen wurden die Tiere entweder über eine Dauer von 20 Tagen täglich durchschnittlich 16,4 Stunden pro Tag Temperaturen von 4 °C und 38 °C ausgesetzt oder man injizierte ihnen täglich intramuskulär Cortisonacetat. In einem anderen Versuch wurden mit *H. meleagridis* infizierte Hühner und Puten eine Woche nach der Infektion mittels der Wing Web Methode gegen Pocken geimpft oder die Tiere wurden durch regelmäßigen Blutentzug über das Herz oder die mediale Flügelvene anämisch gemacht. In keinem dieser Versuche konnte ein Unterschied im Verlauf der Erkrankung im Vergleich zu den Kontrollgruppen festgestellt werden (Welter 1960).

### **2.3.5 Widerstandskraft gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen**

Allgemein verbreitet ist die Annahme, dass eine einzelne Histomonaden-Zelle nicht sehr widerstandsfähig gegenüber äußeren Einflüssen ist. Spezifische Untersuchungen über die Widerstandskraft von *H. meleagridis* gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen beschränken sich jedoch auf wenige Fallberichte und auf Erkenntnisse, die durch *in vitro* Versuche gewonnen wurden. Veröffentlichungen über die Wirksamkeit von Reinigungs- oder Desinfektionsmitteln bzw. über die Effektivität verschiedener Reinigungsmaßnahmen in Ställen fehlen bisher.

Aka et al. (2011) berichteten über das Wiederauftreten eines Histomonose-Ausbruchs vier Jahre nach der ersten Infektion in einem Putenelternbetrieb. In diesem Fall wurden die Ställe nach jedem Durchgang gereinigt und mittels eines aldehydhaltigen und eines kresolhaltigen Desinfektionsmittels desinfiziert. Da durch Genotypisierung mittels C-Profiling der isolierte Histomonadenstamm beide Male dem Genotyp A zugeordnet werden konnte, kann ein Verbleiben der Histomonaden im Stall nach dem ersten Ausbruch nicht ausgeschlossen werden, wenngleich zwischen erstem und zweitem Ausbruch ein Histomonose-freier Durchgang lag.

Bei *in vitro*-Versuchen mit *H. meleagridis*, durch ungünstige Wachstumsbedingungen die Bildung zystenähnlicher Stadien zu induzieren, wurde nachgewiesen, dass bei einem rapiden Temperaturabfall in den Kulturen auf -22°C oder -196°C die Zellen lediglich bis zu 80 Minuten überleben konnten (Zaragatzki et al. 2010b). Im gleichen Versuch fand man ebenfalls heraus, dass *H. meleagridis* das Fehlen wichtiger Inhaltsstoffe in der Kultur bei 4°C nur kurz tolerierte und dass die Zugabe von NaCl und MgCl<sub>2</sub> in hohen Dosen zum Absterben der Trophoziten führte. Wurde dem Medium Salzsäure oder Natriumhypochlorit hinzugesetzt und damit der pH-Wert in der Kultur auf unter zwei abgesenkt, führte auch dies innerhalb einer Stunde zum Tod des Erregers. Hauck et al. (2010c) konnten in einer anderen Studie zeigen, dass auch die Zugabe von Glucose sowie die Anwesenheit von Sauerstoff einen negativen Effekt auf das Wachstum von *H. meleagridis* hatten.

## 2.4 Pathogenese und Epidemiologie

### 2.4.1 Wirtsspektrum

#### 2.4.1.1 Huhn

Wenige Jahre nach Entdeckung und Beschreibung der Schwarzkopfkrankheit bei Puten wurde *H. meleagridis* auch bei Hühnern (*Gallus gallus*) nachgewiesen (Chester und Robin 1900). Von einzelnen Ausbrüchen bei Hühnern mit hoher Mortalität (Eveleth 1943) abgesehen, konnte durch die Verfügbarkeit von hoch effektiven Wirkstoffen im Bereich der Prävention und Therapie der Histomonose lange Zeit hohen wirtschaftlichen Verlusten bei Hühnern vorgebeugt werden (Liebhart et al. 2017). Daher galten Hühner lange Zeit lediglich als Reservoir-Spezies für das Protozoon *H. meleagridis*. Die Änderung der Gesetzeslage und das damit verbundene Verbot aller gegen Histomonaden wirksamen Medikamente sowie die Entwicklung der Haltungsbedingungen von Käfighaltung hin zu alternativen Haltungssystemen führte jedoch dazu, dass mehr und mehr Fälle bei Hühnern publiziert wurden. Heute findet man unter anderem Veröffentlichungen zu Ausbrüchen der Histomonose bei Legehühnern in

Belgien (Esquenet et al. 2003), Österreich (Grafl et al. 2011), Dänemark (Stokholm et al. 2010) und den Niederlanden (Van der Heijden und Landman 2011).

Auch Fälle bei Broilern in verschiedenen Ländern weltweit wurden beschrieben. So unter anderem in Deutschland (Popp et al. 2011; Hafez et al. 2001), Malaysia (Ganapathy et al. 2000) und Indien (Patra et al. 2013) sowie Fälle über Elterntiere in Polen (Dolka et al. 2015) und Indien (Banerjee et al. 2006; Banerjee und Yadav 2002).

Im Vergleich zur Histomonose bei den Puten verläuft die Erkrankung bei Hühnern in der Regel milder und oft mit unspezifischen klinischen Symptomen wie Bewegungsunlust, Apathie, gestäubtem Gefieder und hängenden Flügeln (Dolka et al. 2015) Jedoch wurde auch berichtet, dass die Infektion mit *H. meleagridis* bei Hühnern einen negativen Einfluss auf die Produktionsparameter haben kann. McDougald (2005) veröffentlichte Berichte über schlechtere Uniformitäten und erhöhte Selektionszahlen. Liebhart et al. (2013) berichteten, dass nach einer experimentellen Infektion bei Legehennen eine starke Reduzierung der Legeleistung um bis zu 30 % festgestellt werden konnte. Gerth et al. (1985) beobachtete bei Tieren, die am Ende der Aufzucht mit *H. meleagridis* infiziert worden waren, eine verminderte Eischalenqualität und niedrigere Legeleistung über mehrere Wochen sowie eine erhöhte Mortalität. Liebhart und Hess (2019) gaben an, dass sich eine Histomonose bei Hühnern in einer durchschnittlich 2 % erhöhten Mortalität pro Woche in Verbindung mit einem geringeren Körpergewicht auswirken kann.

Während die Erkrankung bei Puten häufig sehr progressiv verläuft und die Tiere an der Kolonisierung und damit der Zerstörung der Leber durch das Protozoon verenden, konnte man bei Hühnern in vielen Studien lediglich pathologisch-anatomische Veränderungen in den Blinddärmen feststellen (Stokholm et al. 2010; Esquenet et al. 2003; Homer und Butcher 1991). Dies gilt als eine mögliche Erklärung für die eher moderaten Mortalitätsraten bei Hühnern im Vergleich zu Puten (Hess 2017). Auch Co-Infektionen mit *Escherichia coli*, die den Verlauf der Erkrankung negativ beeinflussen können, wurden beim Huhn beschrieben (Stokholm et al. 2010; Muller 1990). Zyanosen der Kopfanhänge, wie sie vielfach bei Puten beschrieben wurden, sind beim Huhn eher selten zu finden (Esquenet et al. 2003; Ganapathy et al. 2000).

Niedrige Biosicherheitsstandards in Broilerbeständen (Popp et al. 2011; Cortes et al. 2004; Ganapathy et al. 2000) sowie die Tatsache, dass Berichte über erhöhte Mortalitätsraten und Legeleistungseinbrüche bei Legehennen aufgrund einer Histomonose (Stokholm et al. 2010; Kaufmann-Bart und Hoop 2009; Esquenet et al. 2003; Hafez et al. 2001) sich größtenteils auf Betriebe mit Freilandhaltung beschränkten, schienen die steigende Prävalenz der Infektionen

zu erklären. Interessanterweise werden aber zunehmend auch Berichte über Histomonaden-Ausbrüche in Puten- und Hühnereltern-tierbetrieben veröffentlicht, in denen höhere Biosicherheitsstandards obligatorisch sind (Dolka et al. 2015; Banerjee et al. 2006).

### 2.4.1.2 Pute

**Die Pute** (*Meleagris gallopavo*) gilt allgemein hin als die empfänglichste Spezies für *H. meleagridis* mit einer hohen Morbidität. Die Histomonose verläuft bei Puten progressiv und kann aufgrund der Besiedelung und Zerstörung der Leber zu hohen Tierverlusten führen (Liebhart und Hess 2019). In Deutschland wurden in den Jahren 2004 bis 2008 mindestens 35 Ausbrüche bei Puten dokumentiert (Hauck et al. 2010b). Innerhalb von zweieinhalb Jahren verendeten bei 14 Ausbrüchen über 90.000 Tiere, wobei in den meisten Fällen Putenhähne zwischen der vierten und elften Lebenswoche betroffen waren (Hafez et al. 2005b). Wegen des Therapie- und Prophylaxenotstands sind umfassende Hygienemaßnahmen in den Betrieben, die Eliminierung von Blinddarmwürmern und Kokzidien, der Einsatz von pflanzlichen Produkten sowie die Kontrolle der intestinalen Mikroflora die einzigen Möglichkeiten, die Verbreitung von *H. meleagridis* von Farm zu Farm und die Ausprägung der vollen Pathogenität des Erregers zu verhindern, wenngleich auch mit unterschiedlichen Erfolgsaussichten (McDougald 2003).

### 2.4.1.3 Andere Spezies

**Der Fasan** (*Phasianus colchicus*) ist vermutlich der ursprüngliche, natürliche Wirt für *H. meleagridis*, die Einführung dieser Spezies in den USA koinzidiert mit dem Bekanntwerden der Erkrankung (Lollis et al. 2011). In einer Untersuchung von Lund und Chute (1972b) fand man heraus, dass Fasane wohl aufgrund ihrer Empfänglichkeit für den Blinddarmwurm *Heterakis gallinarum* eher eine Rolle bei der Verbreitung der Histomonaden über die Eier von *H. gallinarum* spielen. Der Fasan selbst scheint hingegen weniger anfällig für *H. meleagridis* zu sein, auch wenn Blinddarm- und Leberläsionen denen von Puten ähneln (Pennycott 2000).

Auch **Perlhühner** (*Numida meleagris*) sind empfänglich für eine Infektion mit Histomonaden, wobei sie nur wenig klinische Symptome ausprägen. Lund und Chute (1972c) schlossen daraus, dass diese Spezies somit lediglich als Reservoir und Ansteckungsquelle relevant ist.

**Wachteln** (*Coturnix coturnix*) zeigen im Allgemeinen eine geringere Mortalität als Puten und scheinen bei der Verbreitung der Histomonaden keine erwähnenswerte Rolle zu spielen (Lund und Chute 1974a). Demgegenüber steht die Auffassung, dass vor allem die eher geringe Mortalität von Wachteln nach Infektion mit *H. meleagridis* ein großes Potential zur Verbreitung

der Krankheit darstellt (Kellogg und Reid 1970). Während insbesondere für die japanische Wachtel (*Coturnix japonica*) bestätigt werden konnte, dass gegenüber der Infektion mit Histomonaden und Blinddarmwürmern keine besondere Affinität besteht (Lund und Ellis 1967), berichteten jedoch McDougald et al. (2012) über einen Ausbruch der Histomonose bei vier Wochen alten Virginia-Wachteln (*Colinus virginianus*). In diesem Fall lag die Mortalität bei 11 %, mit dem Höhepunkt der Tierverluste zwischen dem 8. und 14. Tag.

Auch der **Pfau** (*Pavo cristatus*) konnte durch die orale Aufnahme von mit *H. meleagridis* infizierten, embryonierten Heterakis-Eiern erfolgreich infiziert werden (Lund und Chute 1972a). In Bezug auf die Stärke der Empfänglichkeit konnte der Pfau dabei zwischen der Pute und dem Chukarhuhn (*Alectoris chukar*) positioniert werden. Letzteres konnte im Rahmen der gleichen Arbeit zum einen durch die orale Aufnahme von aus Hühnerbeständen stammenden embryonierten, mit *H. meleagridis* infizierten Heterakiden-Eiern und zum anderen durch die orale Gabe von Regenwürmern aus Fasanenbeständen infiziert werden. Auch Reis et al. (2009) konnten bei einem Chukarhuhn sowohl eine Infektion mit *H. meleagridis* als auch *Heterakis gallinarum* nachweisen.

Neben Hühnervögeln ist *H. meleagridis* zudem in der Lage, auch andere Spezies zu infizieren. So wurden in einer Arbeit **Moschusenten** (*Cairina moschata*) und **Mularden**, eine nicht fortpflanzungsfähige Kreuzung aus Hausente (*Anas platyrhynchos*) und Moschusente, intrakloakal mit Histomonaden infiziert (Callait-Cardinal et al. 2006). In diesem Versuch konnten keine klinischen Symptome oder Änderungen in Bezug auf die Gewichtszunahme im Vergleich zu nicht infizierten Enten induziert werden. Jedoch zeigten sich bei fünf Enten typische, makroskopisch erkennbare Blinddarm-Läsionen, wenn auch in deutlich geringerer Ausprägung als bei Puten. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die Ente kein vielversprechender Wirt für *H. meleagridis* zu sein scheint, wobei sie jedoch durchaus eine Rolle als Überträger spielen könnte. Auch Lund et al. (1974) kamen zu dieser Schlussfolgerung, nachdem sie erfolglos versuchten, bei Enten und Gänsen sowohl über die orale Aufnahme von embryonierten, mit Histomonaden infizierten Heterakis-Eiern als auch über die intrakloakale Applikation von 100.000 Histomonaden je Tier eine klinische Histomonose zu induzieren. In einer anderen Veröffentlichung wurde über den histologischen Nachweis von *H. meleagridis* in der Mukosa und Submukosa des Darms sowie im Lebergewebe bei Enten in einem Bestand mit 300 Tieren berichtet (Alkhalaf und Mahmoud 2009). Das klinische Bild war geprägt von blutiger Diarrhoe sowie Schwäche und Dehydratation. In diesem Fall wurde jedoch zeitgleich *Enterococcus faecalis* im Intestinum nachgewiesen.

Auch **Strauße** (*Struthio camelus*) und **Nandus** (*Rhea americana*) konnten mit Histomonaden in Verbindung gebracht werden. Borst und Lambers (1985) berichteten über eine

Typhlohepatitis bei zwei jungen Straußen sowie den mikroskopischen Nachweis eines *Histomonas*-ähnlichen Erregers. Bei zwei in Hobbyhaltung verendeten Nandus konnten ebenfalls die für eine Infektion mit *H. meleagridis* typischen Veränderungen in den Blinddärmen eruiert werden. Mittels histologischer Untersuchungen wurden auch hier *Histomonas*-ähnliche Parasiten nachgewiesen. Interessant ist, dass diese Nandus zuvor mit Hühnern, Wildputen, Fasanen, Pfauen und Wasservögeln zusammengehalten wurden (McMillan und Zellen 1991).

### 2.4.2 Übertragung

Hinsichtlich der Übertragung von *H. meleagridis* wird aus epidemiologischen Gesichtspunkten zwischen der direkten Übertragung von Tier zu Tier und der Übertragung von Bestand zu Bestand über Vektoren oder Zwischenwirte unterschieden. Untersuchungen aus dem Jahr 1925 von Tyzzer und Collier weisen darauf hin, dass Histomonaden nicht vertikal übertragbar sind.

#### 2.4.2.1 Direkte Übertragung

Um eine Histomonose innerhalb eines Bestands zu verbreiten, scheint die orale Aufnahme von Histomonaden eine der effektivsten Methoden zu sein. Nach den Angaben von Moore (1896) lag bei Puten die Inzidenz einer Histomonose bei 50 % nach Verfütterung von mit Histomonaden infizierten Lebern und Blinddärmen und bei 75 % nach Gabe von kontaminiertem Kot. In einer anderen Studie konnte durch die orale Infektion von Puten die Ausbildung einer Histomonose mit einer erhöhten Mortalität von 67 % (Wegeforth und Wegeforth 1921) ausgelöst werden. Zudem zeigten auch mehrere Veröffentlichungen bei Hühnern, dass eine orale Infektion mit *H. meleagridis* möglich ist (Liebhart et al. 2011; Windisch und Hess 2010; Zahoor et al. 2010). Erkenntnisse über die exakte, für die Entwicklung einer manifesten Histomonose notwendige Anzahl an oral verabreichten Histomonaden existieren jedoch bisher nicht (Lund 1955). Im Gegensatz dazu existieren jedoch Untersuchungen, in denen die Schwarzkopfkrankheit durch die Verfütterung kontaminierten Materials nicht reproduziert werden konnte (Farmer und Stephenson 1949; Graybill und Smith 1920). Der Grund dafür könnte sein, dass die Trophozoiten aufgrund ihrer Struktur die Passage durch den Magen wegen des dort herrschenden niedrigen pH-Wertes nicht überleben (McDougald 1984).

Wichtiger als die Dosis scheinen jedoch die Umstände zu sein, unter denen die Tiere infiziert werden. So berichteten Horton-Smith und Long (1956) über einen Versuch mit Hühnern, bei dem die Infektion der Tiere nur dann gelang, wenn sie zuvor 18 Stunden nicht gefüttert wurden

oder wenn sie oral kurz vor Infektion eine alkalische Lösung erhielten, die zu einem Anstieg des pH-Wertes in Muskelmagen und vorderem Darmtrakt führte. In einer weiteren Untersuchung wurden Puten intrakloakal oder oral mit verschiedenen Histomonaden-enthaltenden Lösungen und unterschiedlichen Dosen infiziert (Lund 1956). Hierbei zeigte sich, dass die Infektion der Tiere mit Histomonaden in proteinreichen Lösungen zu einer scheinbar höheren Infektiösität des Erregers führte. Der Autor vermutete, dass eine erhöhte Verdauungsaktivität der Grund für diesen Effekt war.

Neben den oben genannten Umständen bei einer Infektion könnten jedoch auch die unterschiedlichen morphologischen Stadien von *H. meleagridis* einen Einfluss auf die Effektivität der Übertragung haben. So konnten unter ungünstigen Wachstumsbedingungen die Bildung Zysten-ähnlicher Histomonaden-Stadien, sowohl in der klonalen (Zaragatzki et al. 2010a) als auch in der nicht-klonalen Kultur (Munsch et al. 2009a), (Munsch et al. 2009b) induziert werden. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass diese Zysten-ähnlichen Stadien resistenter gegenüber schädlichen Umweltbedingungen sind. Somit könnte infektiöses Material, welches eine gewisse Menge dieser Zysten enthält, zu einer höheren Infektionsrate führen als Material, in dem die Anzahl dieser Zysten-ähnlichen Stadien geringer ist (Hauck und Hafez 2013).

Eine weitere Möglichkeit, den Erreger von Tier zu Tier zu übertragen, ist das Cloacal Drinking. Dabei wird mit Histomonaden kontaminierter Fremdkot durch retrograde Peristaltik der Kloakenlippen-Muskulatur aufgenommen (Hu und McDougald 2003) und gelangt so direkt in die Bursa fabricius sowie die Blinddärme (Hu et al. 2004). Dieser Infektionsweg führt zu einer raschen Ausbreitung von *H. meleagridis* innerhalb eines Bestandes mit einer hohen Besatzdichte, insbesondere bei Puten (Lollis et al. 2011). Über die für eine erfolgreiche Infektion notwendige Dosis existieren widersprüchliche Ergebnisse. Während in einer Studie von Hess et al. (2008) weniger als 10 Histomonaden aus einer klonalen Kultur ausreichten, bei Puten eine Mortalität von 100 % zu induzieren, waren in einer anderen Untersuchung 3.162 Histomonaden notwendig, um eine 100 %ige Mortalität auszulösen (van der Heijden und Landman 2008b). In der gleichen Studie war die intrakloakale Infektion von Puten mit 100 Histomonaden nicht erfolgreich. In den meisten Versuchen wurden Dosen von 10.000 oder 100.000 Histomonaden verwendet, und die daraus resultierende Mortalität betrug mehr als 70 % (Hauck und Hafez 2013).

Bei Hühnern, die intrakloakal mit *H. meleagridis* infiziert werden, können sich innerhalb von drei bis vier Tagen nach der Infektion Blinddarmläsionen ausbilden (Windisch und Hess 2010; Powell et al. 2009; Chappel 1975), sie können aber auch fehlen. Die Ausbildung von Leberläsionen ist variabel. Sie können sich weniger als sechs Tage nach intrakloakaler

Infektion entwickeln (Beg und Clarkson 1970a), können komplett fehlen (Lund und Chute 1972a) oder nur bei einer geringen Anzahl an Hühnern ausgebildet sein (Zahoor et al. 2011). McDougald und Hu (2001) untersuchten den Einfluss von 100.000 intrakloakal applizierten Histomonaden auf die Ausprägung von Läsionen in Leber und Blinddärmen, wobei bis auf die Kontrollgruppe alle anderen Versuchsgruppen vier Tage vor intrakloakaler Infektion mit *H. meleagridis* zusätzlich mit 1.000 bzw. 10.000 sporulierten Oozysten von *Eimeria tenella* infiziert wurden. In der Versuchsgruppe, in der die Hühner ausschließlich mit 100.000 Histomonaden infiziert wurden, zeigten 68 % der Tiere Blinddarmläsionen und 19 % Leberläsionen.

Eine erfolgreiche Übertragung von *H. meleagridis* durch den Kontakt infizierter Tiere mit nicht infizierten Tieren konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden. So reichte beispielsweise in einem Tierversuch die intrakloakale Infektion von 10 % der in einem Käfig gehaltenen Puten aus, um bei den Kontakttieren eine Mortalität von 97 % auszulösen (Hu und McDougald 2003). In einem anderen Fall, bei dem mit *H. meleagridis* infizierte und nicht infizierte Puten in einer Käfigbatterie auf Papier zusammengehalten wurden, lag die Mortalität der ursprünglich nicht infizierten Kontakttiere bei 13,3 bis 66,7 % (Mc Dougald und Fuller 2005). Neben dem Verhältnis von infizierten Tieren zu nicht infizierten Kontakttieren scheint auch die Zeitspanne, in der die Tiere Kontakt haben, einen Einfluss auf den Erfolg einer Übertragung von Histomonaden zu haben. So konnten Armstrong und McDougald (2011) bei Puten eine erfolgreiche Infektion der Kontakttiere nachweisen, die lediglich eine Stunde mit den infizierten Tieren zusammengehalten wurden. Die Inzidenz lag in dieser Arbeit zwischen 6,25 und 18,75 %. Bei Hühnern scheint die Verbreitung über den Kontakt zwischen infizierten und nicht infizierten Tieren nicht in der Weise erfolgreich zu sein wie bei Puten. So war es Hu et al. (2006) beispielsweise nicht möglich, *H. meleagridis* durch 10 oder 25 % an infizierten Hühnern auf den nicht infizierten Teil der Gruppe zu übertragen. In einem Versuch, in dem zehn infizierte Hühner mit vier Kontakttieren zusammengehalten wurden, konnten lediglich bei zwei der Kontakttiere Histomonaden reisoliert werden. Die anderen beiden Hühner blieben über den gesamten Versuchszeitraum von sechs Wochen Histomonaden-negativ (Hess et al. 2006a).

Experimentell gelang auch die Infektion von Puten durch die intrazäkale Applikation von 4.000 mit *H. meleagridis* infizierten Heterakis-Larven (Swales 1948), während eine Übertragung des Protozoons auf das Huhn durch die intrazäkale Verabreichung von infiziertem Lebergewebe von Puten in einer anderen Arbeit nicht erfolgreich verlief (Tyzzer und Fabyan 1920). Nach subkutanen, subkonjunktivalen und intramuskulären Injektionen von mit *H. meleagridis* kontaminiertem Lebermaterial bei Hühnern und Puten bildeten sich an den Injektionsstellen

Trophozoen-enthaltende Abszesse (Tyzzer et al. 1921). Die intramuskuläre Injektion verursachte Läsionen in Leber und Lunge. Nach intravenöser Injektion konnten Trophozoen-enthaltende Läsionen in Nieren, Herz, Milz, Pankreas, Proventriculus und Lunge detektiert werden (Tyzzer et al. 1921).

### 2.4.2.2 Indirekte Übertragung

Der wohl wichtigste Vektor für die Übertragung der Schwarzkopfkrankheit von Bestand zu Bestand ist der Blinddarmwurm *Heterakis gallinarum*. Bereits 1920 wurde von Graybill und Smith (1920) die Relevanz dieser Nematoden erkannt, als sie Puten mittels Verfütterung von mit *H. gallinarum* infizierten, embryonierten Eiern – damals noch *H. papillosa* – mit Histomonaden infizieren konnten. In den folgenden Jahren fand man heraus, dass *H. meleagridis* in die Epithelzellen des Intestinaltraktes der Wurmlarve aufgenommen werden kann, wenn diese 10 bis 20 Tage alt ist (Lund und Chute 1973). Der mikroskopische Nachweis von Histomonaden in den Nematoden gelang (Kendall 1959). Man vermutet, dass *H. meleagridis* im Intestinaltrakt verbleibt, bis es zur Kopulation des vollständig entwickelten Wurms kommt. Den Histomonaden ist es dann möglich, über das Ovar des weiblichen Wurms durch die noch nicht vollständig ausgebildete Eischale in das Heterakis-Ei eingebettet zu werden (Springer et al. 1969).

Ein weiblicher Wurm ist in der Lage, pro Tag 900 Eier auszuscheiden (Chalvet-Monfray et al. 2004). Gelangen diese Eier durch orale Aufnahme in einen Wirt, schlüpfen die sich darin entwickelnden Larven in den Blinddärmen des Wirtes und setzen dabei die sich im Ei befindlichen Histomonaden frei (Fine 1975). Auch das Absterben der Würmer im Blinddarm führt zu einer Freisetzung von *H. meleagridis* (Lund und Chute 1973). Dazu kommt es beispielsweise dann, wenn virulente Stämme von *H. meleagridis* starke Entzündungsreaktionen der Zäkumschleimhaut verursachen. Die daraus resultierende Veränderung der Umgebung kann zu ungünstigen Lebensbedingungen für *H. gallinarum* und somit zu einem Absterben der Nematoden führen (Lund und Chute 1973).

Hühner stellen neben Perlhühnern, Chukar-Hühnern und Fasanen die wohl vielversprechendsten Wirte für *Heterakis gallinarum* dar (Lund und Chute 1974b; Lund und Chute 1970), wobei auch Puten für die Nematoden empfänglich sind (Swales 1948). Adams et al. (1986) bestätigten den Zusammenhang zwischen *H. meleagridis* und *H. gallinarum*, als sie nachwiesen, dass die Prävalenz für eine Histomonose in Regionen größer ist, in denen auch *Heterakis gallinarum* und verschiedene Spezies von Regenwürmern vorkommen. Aufgrund dessen wird auch heute noch die Meinung vertreten, die Schwarzkopfkrankheit durch Vermeidung der gemeinsamen Haltung von Hühnern und Puten kontrollieren zu können

(Lund und Chute 1970; Tyzzer und Fabyan 1922). Jedoch enthält weniger als ein von 200 Heterakis-Eiern Histomonaden und nicht jeder Wurm entwickelt die gleiche Anzahl an mit *H. meleagridis* infizierten Eiern (Lund und Burtner 1957).

Der Versuch, Histomonaden durch andere Nematoden wie *Heterakis bonasae* zu übertragen, war nicht möglich (Davidson et al. 1978). Allerdings war die Infektion von Puten und Hühnern mit *H. meleagridis* mittels verschiedener Regenwurm-Arten (*Lumbricus terrestris*, *Allolobophora caliginosa*, *Eisenia foetida*) erfolgreich (Lund et al. 1966a). Bei Hühnern wurde durch die Verfütterung von mit *H. meleagridis* kontaminierten Regenwürmern eine Infektionsrate von 7 bis 44 % erzielt. Keins der Tiere starb an der Infektion (Lund und Chute 1972a).

Auch Fliegen und verschiedene Grashüpferarten können als mechanische Vektoren dienen und *H. meleagridis* von einem Bestand zum nächsten transportieren (Frank 1953), genauso wie der Glänzende Getreideschimmelkäfer (*Alphitobius diaperinus*), der in vielen Geflügelbeständen vorkommt (Huber et al. 2007).

### 2.4.3 Klinische Symptome

Während bei Puten eine systemische Histomonose dadurch entsteht, dass *H. meleagridis* die Blinddarmschleimhaut penetriert, in den Blutkreislauf eintritt und die Leber kolonisiert, bleiben die pathologischen Veränderungen bei Hühnern und auch anderen Spezies, die weniger empfänglich für das Protozoon sind, meist auf den Blinddarm beschränkt. Obwohl die Trophozoiten von *H. meleagridis* bei Puten und Hühnern in diversen Organen nachgewiesen werden konnten, stellen Leber und Blinddarm die Zielorgane dar (van der Heijden 2009). Die Inkubationszeit schwankt zwischen sieben und 14 Tagen nach natürlicher und fünf bis 19 Tagen nach experimenteller Infektion (Bruzual und Adams 2019).

Frühe klinische Anzeichen äußern sich bei Puten in Form von schwefelgelbem Kot, gesträubtem Gefieder, Mattigkeit, gesenktem Kopf, hängenden Flügeln, gestelztem Gang, geschlossenen Augen und sowie Anorexie (McDougald et al. 1997; Malewitz 1956), auch die Futteraufnahme kann deutlich herabgesetzt sein und die Wasseraufnahme ansteigen (Aka et al. 2011).

Bei Hühnern zeigt sich oft ein gestörtes Allgemeinbefinden mit Apathie, Kümern, gesträubtem Gefieder, hängenden Flügeln und geschlossenen Augen (Popp et al. 2011; Homer und Butcher 1991), nichtsdestotrotz können die Symptome auch fehlen (Zahoor et al. 2011). In einer Untersuchung von Liebhart et al. (2013) wurde nach der Infektion bei Legehennen ein Legeleistungseinbruch um bis zu 30 % festgestellt. Bei Masthühnern kann

sich eine Histomonose durch verminderte Gewichtszunahmen äußern (Popp et al. 2011). Gerth et al. (1985) beobachteten eine verminderte Eischalenqualität und Legeleistung in der Produktionsphase, nachdem die Hühner am Ende der Aufzucht mit *H. meleagridis* infiziert wurden. Die zyanotischen Kopfanhänge und die daraus resultierende dunkle Verfärbung der Haut im Kopfbereich, die der Histomonose einst auch das Synonym Schwarzkopfkrankheit verlieh, werden heute kaum noch beobachtet (McDougald 2008).

### 2.4.4 Pathologisch-anatomische Veränderungen

Um den achten Tag nach der Infektion mit *H. meleagridis* bilden sich bei Puten im Blinddarm Läsionen, wobei entweder einer oder auch beide Blinddärme betroffen sein können (Smith 1895). Bei Hühnern kommt es als Folge der Besiedlung des Blinddarms zu einer Verdickung der Mukosa, die Blinddärme sind vergrößert, hyperämisch und gefüllt mit einem weiß-gräulichen bis braun-fleckigen Inhalt (Esquenet et al. 2003), wobei sich dieses feste Exsudat nicht ohne Substanzverlust von der Blinddarmschleimhaut lösen lässt (Homer und Butcher 1991). Bei Puten wird der Inhalt als käsig und weisslich-fibrinös beschrieben (Aka et al. 2011; Popp et al. 2011). Durch die Bildung der festen Ausgüsse kann es zu einer Perforation der Blinddärme und in der Folge zu einer Peritonitis kommen (Lotfi 2011; van der Heijden 2009).

Makroskopisch sichtbare Läsionen in der Leber kommen beim Huhn, im Vergleich zur Pute, nur selten vor oder fehlen vollständig (Madsen 1962). Esquenet et al. (2003) konnten mittels mikroskopischer Untersuchungen von makroskopisch läsionsfreien Hühnerlebern jedoch fokale Nekroseherde nachweisen. Bei Puten sind die Lebern häufig geschwollen. Um den 10. Tag p.i. bilden sich kraterähnliche Nekroseherde mit eingezogenem Zentrum und deutlich definiertem Rand oder kleine, multiple Läsionen (McDougald 2005; McDougald et al. 1997).

Auch die Zusammensetzung der Darmflora scheint für den Ausprägungsgrad der Läsionen von hoher Wichtigkeit zu sein, wenngleich die Ergebnisse von Untersuchungen diesbezüglich widersprüchlich sind. So konnten McDougald und Hu (2001) feststellen, dass eine Mischinfektion mit *E. tenella* und *H. meleagridis* bei experimentell infizierten Hühnern den Schweregrad der Leberläsionen erhöht und vermuteten, dass die Vorschädigung der Blinddarm-Mukosa durch die Kokzidien zu einem verstärkten Eindringen des Erregers in das Blinddarmgewebe führt. Bei mit *E. adenoides* infizierten Puten hingegen wurde ein negativ-korrelierender Effekt beobachtet (McDougald und Fuller 2005). Die Tiere, die sowohl mit *H. meleagridis* als auch mit *E. adenoides* infiziert waren, zeigten weniger schwere Läsionen und einen geringeren Anteil an erkrankten Tieren als die, die nur mit Histomonaden infiziert wurden. Auch Chappel (1973) stellte viele Jahre vorher schon fest, dass *H. meleagridis* die Oozysten-Produktion von *E. tenella* negativ beeinflusst und vermutete, dass dies auf einen

geringeren Anteil intakten Gewebes zurückzuführen ist, welches für die Gametogenese notwendig ist.

### 2.4.5 Pathohistologische Veränderungen

Bei Hühnern können Histomonaden eine mit zahlreichen Ulzerationen durchsetzte, schwere diphteroide Typhlitis verursachen, die tief in die Submukosa und herdförmig in die Tunica muscularis reicht (Gerth et al. 1985). Von Homer und Butcher (1991) werden die Veränderungen im Blinddarm als fibrinonekrotische, ulzerative, granulomatöse Typhlitis bezeichnet. Hafez et al. (2001) beschreiben die Entzündung als diphteroid-nekrotisierend. Mittels mikroskopischer Untersuchungen fand man heraus, dass das Zentrum der durch *H. meleagridis* verursachten Blinddarmentzündungen aus einem amorphen, eosinophilen Exsudat mit zahlreichen degenerierten Leukozyten, abgelösten Epithelzellen, Erythrozyten, Thrombozyten und Bakterien besteht (Homer und Butcher 1991). In einigen Entzündungszentren konnte eine Schichtung der eosinophilen Masse sowie das Vorkommen einer geringen Anzahl an polygonalen bis runden Histomonaden-Trophozoiten mit einem Durchmesser von 7 bis 13 µm beobachtet werden. Die Zentren waren zudem teilweise von multinukleären Riesenzellen umgeben, ein Großteil der Mukosa war ulzeriert. In Lamina propria, der Submukosa sowie in einigen Fällen auch in der Tunica muscularis konnten neben eingewanderten Entzündungszellen (Esquenet et al. 2003), zahlreiche Vakuolen mit ein bis fünf Histomonaden-Trophozoiten mit einem Durchmesser von 9 bis 18 µm festgestellt werden (Homer und Butcher 1991).

In Hühnerlebern führt eine Infektion mit *H. meleagridis* zu ausgedehnten, tiefgreifenden Nekrosen mit hochgradiger Infiltration von Histozyten, heterophilen Granulozyten und Lymphozyten (Gerth et al. 1985). Auch eine entzündliche Veränderung der Bursa fabricius konnte bei Hühnern beobachtet werden, wobei die Läsionen nekrotische Bereiche des Parenchyms als auch eine Infiltration mit heterophilen Granulozyten, Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen, Riesenzellen und Histomonaden-Trophozoiten aufwies (Cortes et al. 2004). Auch in einer Untersuchung eines Histomonose-Ausbruchs bei neun bis 11 Wochen alten Puten konnten multifokale Nekroseherde und eine granulomatöse Inflammation in Lebern, Blinddärmen, Peritoneum, Bursa fabricii, Nieren, Lungen, Pankreas sowie Drüsenmagen festgestellt werden (Senties-Cue et al. 2009).

### 2.4.6 Mortalität

Die Angaben zu Mortalitätsraten aufgrund einer Infektion mit *H. meleagridis* variieren in der Literatur stark. Im Allgemeinen ist die Mortalität in infizierten Putenbeständen deutlich höher als bei Hühnern.

Liebhart und Hess (2019) gaben in ihrer Veröffentlichung über Puten eine Spannweite an Mortalitätsraten im Bereich von unter 10 % bis hin zu Verlusten ganzer Herden an. Jung et al. (2009) verzeichneten bei Mastputen eine Mortalität von 56,7 %, Popp et al. (2011) hingegen berichteten über mehrere Ausbrüche bei Bio-Puten, wobei die Mortalität dort nahezu 100 % betrug. In einer Studie von Callait-Cardinal et al. (2007), in der 113 Histomonosis-Fälle bei Puten in Frankreich dargelegt wurden, schwankte die Mortalität je nach Ausbruch bei Mastputen zwischen unter 10 % und 100 %, wobei 60 % der Herden eine Mortalität von unter 10 % aufwiesen. Bei Putenelterntieren lag die Sterblichkeit mit im Durchschnitt 60,2 % sogar noch etwas höher als bei den Mastputen.

Bei Hühnern, die lange Zeit lediglich als asymptomatische Träger für den Erreger eine Rolle zu spielen schienen, variieren die Angaben weniger stark als bei Puten. Gerth et al. (1985) beispielsweise berichteten über die Infektion mit *H. meleagridis* in einem Junghennenbestand mit einer leicht erhöhten Mortalität von 2 % pro Woche. Auch in einer Broilerherde in Kalifornien wurde im Rahmen einer Histomonose lediglich ein leichter Anstieg der Mortalität verzeichnet (Cortes et al. 2004). Homer und Butcher (1991) berichteten über den Ausbruch einer Histomonose bei vier bis sechs Wochen alten Junghennen der Rasse weiße Leghorn, bei der eine Erhöhung der Mortalität auf 2 – 3 % angegeben wurde.

Dolka et al. (2015) berichteten hingegen über einen Ausbruch der Histomonose bei Hühnerelterntieren in einem Aufzuchtbetrieb in Polen, wobei hier eine Mortalität von 6,6 % zwischen der 5. und der 19. Lebenswoche angegeben wurde. In diesem Fall konnten zusätzlich Bakterien der Gattung *Gallibacterium spp.* nachgewiesen werden. Esquenet et al. (2003) dokumentierten einen Fall bei Freiland-Legehennen mit einer Gesamtmortalität von 9,1 %, wobei gleichzeitig *Ascaridia galli* und Brachyspira-ähnliche Bakterien nachgewiesen werden konnten. Ganapathy et al. (2000) berichteten über den Ausbruch einer Histomonose in einem Broilerbestand bei drei Wochen alten Masthühnern. Die Gesamtmortalität bis zum Ende der 6. Lebenswoche betrug hier 19,3 %, wobei darauf hinzuweisen ist, dass die Tiere zeitgleich mit *Salmonella typhimurium var copenhagen* und *Escherichia coli* infiziert waren. Hafez et al. (2001) berichteten sogar über eine Sterberate von 50 % bei einer im Freiland gehaltenen Legehennen-Herde. In diesem Fall wiesen die Tiere zudem eine Infektion mit *Erysipelothrix rhusiopathiae* und *Escherichia coli* auf. In einem Versuch, in dem Hühner

intrakloakal mit Leber- und Blinddarmmaterial einer an Histomonose moribund erkrankten Pute infiziert wurden, konnten Mortalitätsraten bis zu 71 % festgestellt werden (Desowitz 1951).

### 2.4.7 Immunität

Obwohl sich zahlreiche Studien mit der Entwicklung eines Impfstoffes gegen Histomonaden beschäftigen, gibt es sowohl über die Immunantwort von Huhn und Pute als auch über die Mechanismen, die bei einer Immunisierung aufgrund einer Infektion mit *H. meleagridis* ablaufen, immer noch sehr wenig Erkenntnisse (Lollis et al. 2011). Klar ist jedoch, dass eine Pute, die erkrankt und genesen ist, an einer Re-Infektion mit Histomonaden verenden kann (Curtis 1907).

#### 2.4.7.1 Angeborene Immunität

Den ersten Bestandteil der angeborenen Immunität gegenüber einer Infektion mit *H. meleagridis* stellt die natürliche anatomische Barriere des Gastrointestinaltrakts dar. So wurde über orale Infektionsversuche bei Hühnern (Horton-Smith und Long 1956) und bei Puten (Liebhart und Hess 2009; Hu et al. 2004; Lund 1956; Farmer und Stephenson 1949) berichtet, bei denen man das Scheitern eines Infektionsversuchs auf einen niedrigen pH-Wert im Muskelmagen zurückführte. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass das Hungern lassen von Hühnern beziehungsweise die Fütterung einer alkalischen Lösung vor der oralen Infektion mit Histomonaden zu deutlich stärkeren Läsionen in den Blinddärmen führte (Horton-Smith und Long 1956). Dies wurde mit dem Anstieg des pH-Wertes im Gastrointestinaltrakt erklärt.

Des Weiteren fanden Mitra et al. (2017) und Kidane et al. (2018) heraus, dass es bei Hühnern im Vergleich zu Puten schon in einem sehr frühen Stadium der Infektion zu einem deutlichen Anstieg der Monozyten und Makrophagen im Blut und im Blinddarm kommt. Die Autoren vermuten, dass die hohe Anzahl an Makrophagen zu einem initialen Zeitpunkt und die Fähigkeit dieser Zellen zur Phagozytose Gründe dafür sind, warum bei Hühnern die Infektion mit Histomonaden im Allgemeinen mit weniger schwerwiegenden Folgen abläuft als bei Puten, bei denen diese erste proinflammatorische Immunantwort verspätet vonstattengeht (Mitra et al. 2018).

Bei der Untersuchung der mRNA-Expression der Gene für proinflammatorische Zytokine bei Hühnern und Puten fand man heraus, dass bei Hühnern bereits einen Tag nach Infektion eine Immunantwort in den Zäkaltonsillen initiiert wird, während die Hochregulation der

Genexpression bei Puten erst dann geschieht, wenn das Protozoon bereits in der Leber nachzuweisen ist (Powell et al. 2009).

### 2.4.7.2 Adaptive Immunantwort

#### 2.4.7.2.1 Pathogen-spezifische Antikörper

Die erste Studie, die sich mit der passiven Immunisierung von Hühnern und Puten beschäftigte, wurde von Clarkson (1963) durchgeführt. Er übertrug Serum von erkrankten, therapierten Tieren auf naive Tiere und wies nach, dass dies bei empfänglichen Tieren nicht zu einem Schutz gegen eine Infektion mit *H. meleagridis* führte. Diese Beobachtung konnte auch durch Bleyen et al. (2009b) bestätigt werden. Die Autoren zeigten, dass Puten durch zirkulierende Antikörper im Serum nicht vor einer Erkrankung geschützt werden konnten, obwohl die gleichen Antikörper *in-vitro* eine Komplement-assoziierte Lyse von *H. meleagridis* induziert hatten. Auch Windisch und Hess (2010) vermuteten, dass die mukosale Immunantwort in Bezug auf die Prävention der Erkrankung relevanter zu sein scheint als zirkulierende Antikörper.

In einer anderen experimentellen Studie konnte bei Hühnern, die mit 14 Tagen infiziert worden waren, ein Antikörperanstieg im Serum bereits zwei Wochen p.i. festgestellt werden, wobei die Menge der detektierten IgG-Antikörper noch bis sechs Wochen nach Infektion, als der Versuch beendet wurde, über einem vorher festgelegten Cut-off-Wert lag (Windisch und Hess 2009). Zwei Jahre später konnten die oben genannten Autoren in einer weiteren Studie erneut einen Anstieg der IgG-Antikörper im Serum von Hühnern zwei Wochen nach Infektion beobachten, wobei die IgM- und IgA-Antikörpertiter im Serum niedrig blieben (Windisch und Hess 2010). Interessanterweise wurden in dieser Arbeit auch starke Immunreaktionen in verschiedenen intestinalen Gewebeproben festgestellt. So zeigte sich im infizierten Blinddarm ein initialer Anstieg von IgM-Antikörpern, hohe IgG-Level und kontinuierlich erhöhte IgA-Antikörper. Die Menge der IgA-Antikörper in Duodenum und Jejunum waren vergleichbar mit der im Blinddarm, wobei der Anstieg der IgM- und IgG-Antikörper jedoch deutlich schwächer ausfiel.

Powell et al. (2009) verglichen die Immunreaktion bei Hühnern mit denen von Puten. Sie stellten fest, dass Hühner durch eine maternale Immunreaktion im Blinddarm in der Lage sind, die Anzahl der Histomonaden zu reduzieren und dass sich bei Hühnern im Vergleich zu Puten mehr Antikörper bildeten.

Lotfi et al. (2014) verglichen die humorale Immunantwort gegen Actinin 1 und 3 bei einer Legelinie und einer Mastlinie mittels ELISA. Die humorale Immunantwort gegen Actinin 1 setzte bei der Legelinie früher ein und wies einen signifikant höheren Titer auf als bei der

Mastlinie. Die erzielten Ergebnisse zeigten, dass der genetische Hintergrund der Tiere die Reaktion auf eine Infektion mit *H. meleagridis* beeinflusst.

### 2.4.7.2.2 Zell-vermittelte Immunantwort

Im Allgemeinen spielen sowohl die CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen als auch die CD8<sup>+</sup> T-cytotoxischen Zellen eine bedeutende Rolle für die Wirts-Erreger-Interaktion. So koordinieren beispielsweise CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8alpha<sup>-</sup> T-Helferzellen die Produktion von Zytokinen, die Ausschüttung von Effektorzellen, die Bildung von Antikörpern oder die Aktivität verschiedener T-Zellen, während CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8alpha<sup>+</sup> T-Zellen als cytotoxische T-Zellen mittels verschiedener Mechanismen die Lyse eines Pathogens auslösen können (Mitra et al. 2018). In Bezug auf eine Infektion mit *H. meleagridis* konnten durch Studien an diesen Zellen neue interessante Erkenntnisse gewonnen werden. So konnten Powell et al. (2009) mittels immunhistochemischen Färbungen einen Einstrom verschiedener T-Zell-Populationen in die Lebern von Puten und Hühnern nachweisen, wobei dies mit der Infiltration des Gewebes mit *H. meleagridis* korrelierte. Bei Puten war diese Reaktion stärker ausgeprägt als bei Hühnern und gleichzeitig konnte ein Absinken der entsprechenden Immunzellen in der Milz, auch diese Beobachtung war bei der Pute deutlicher zu sehen als beim Huhn, erfasst werden.

Auch in einer Untersuchung von mit *H. meleagridis* und *Heterakis gallinarum* infizierten Hühnern stellte sich heraus, dass das Absinken von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz in Verbindung mit der Zerstörung der Mukosa des Blinddarms und einer Infiltration der zäkalen Lamina propria mit verschiedenen T-Zellen steht (Schwarz et al. 2011). Eine Infiltration von B- und T-Lymphozyten im Blinddarm bei Hühnern konnte zwischen dem 4. und 10. Tag p.i. beobachtet werden (Kidane et al. 2018). Untersuchungen der Zytokine bei Huhn und Pute konnten zudem einen speziesspezifischen Unterschied in der Hoch- und Runterregulation der mRNA-Expression für verschiedene Interleukine zeigen. So findet man beim Huhn schon sehr früh während der Infektion das proinflammatorische Zytokin IFN- $\gamma$  in Blinddarmzellen, während die Hochregulation der Expression der entsprechenden mRNA-Gene bei der Pute erst zu einem späteren Zeitpunkt stattfindet (Powell et al. 2009).

Ein weiterer Unterschied zeigte sich bei der Betrachtung der regulatorischen Zytokine. Die im Vergleich zur Pute beim Huhn sehr frühe Hochregulation der Gen-Expression für das regulatorische Zytokin IL-10 (Kidane et al. 2018) könnte ein Grund für die eher schwächer ausgebildeten klinischen Symptome und die höhere Wahrscheinlichkeit für eine Genesung der Tiere sein (Mitra et al. 2018).

### 2.5 Diagnose

#### 2.5.1 Erregernachweis

Hess et al. (2006a) konnten in einer Studie mit Puten und SPF-Hühnern nachweisen, dass sowohl Puten als auch Hühner *H. meleagridis* nach intrakloakaler Infektion intermittierend ausscheiden, wobei das Phänomen bei Hühnern deutlicher ausgeprägt war.

##### 2.5.1.1 Mikroskopie

Für den mikroskopischen Nachweis lebender Histomonaden mit einer Größe von durchschnittlich 10 µm sollte eine 200- bis 400-fache Vergrößerung und vorzugsweise ein Phasenkontrast-Mikroskop verwendet werden (Mc Dougald 2005). Darüber hinaus sollte die Probe von einem frisch verendeten, noch warmen Tier stammen und die Probe während der Präparation und der Untersuchung warmgehalten werden (Balczulat 2013). Der Nachweis in anderen Organen als dem Blinddarm ist schwierig, da nur dort die Stadien vorkommen, die begeißelt und deren Bewegung im Nativpräparat gut sichtbar sind (McDougald 2008).

##### 2.5.1.2 Histopathologie

Im Allgemeinen basiert die Diagnose der Histomonose auf der Kombination von mikroskopischer Untersuchung von Blinddärmen und Lebern unter Verwendung der Hämatoxylin- und Eosin-Färbung (HE), der PAS-Färbung (periodic acid-Schiff reaction) oder der Grocott-Färbung und makroskopisch sichtbaren pathologischen Organveränderungen. Während die Histomonaden bei der PAS-Färbung als rote, granuliert Körperchen abgebildet werden, sind die granulierten Körperchen bei der Grocott-Färbung eher hellbraun bis schwarz (Kemp und Reid 1966a), bei der HE-Färbung von Leberschnitten können Histomonaden in Clustern vorliegen (McDougald 2005). Auch Brener et al. (2006) berichteten, dass Histomonaden einzeln oder als Ansammlung runder, azidophiler Gebilde auftreten können. Da das Protozoon sich jedoch nicht immer ausreichend anfärben lässt, kann es unter Umständen zu Problemen bei der Abgrenzung zu anderen Mikroorganismen wie *Blastomyces* und *Candida albicans* kommen (Kemp und Reid 1966b).

##### 2.5.1.3 Anzucht

Eine Isolierung und Kultivierung von Parasiten wie *H. meleagridis* kann für die Beantwortung verschiedener Fragestellungen sehr hilfreich sein. Nach den Angaben von Visvesvara und Garcia (2002) gehören zu diesen Problemstellungen insbesondere die Diagnosestellung, die Produktion von Antigenen, die Identifizierung von bei der Infektion involvierten Proteinen, die

Einschätzung von protektiven Antikörpern, die zellvermittelte Immunantwort und Zytokine, Tests an Chemotherapeutika, die Sicherung von Feldisolaten, die Untersuchung resistenter Isolate und unterschiedlicher Stämme, die Produktion attenuierter Vakzine, die Produktion eines Inokulums für Tests *in vivo* sowie die Gewinnung von Erkenntnissen bezüglich Biochemie, Physiologie und Morphologie des Erregers.

Für die erfolgreiche Kultivierung von *H. meleagridis* sind verschiedene Anforderungen notwendig (Lollis et al. 2011). So wurden in den letzten Jahrzehnten einige Kulturmedien auf ihre Eignung für die Anzucht von *H. meleagridis* getestet. Das erste erfolgreiche Kulturmedium basierte auf einer Kombination aus koaguliertem Eiweiß abgedeckt mit einer Blut-Bouillon, in der sich 1 % Pepton befand (Drbohlav 1924). Während dieses Medium noch aus festen und flüssigen Anteilen bestand, wurden bereits wenig später rein flüssige Kulturmedien entwickelt. Devolt (1943) nutzte eine Kombination aus einer salzhaltigen Lösung und Glucose, einem 1 %igen Anteil an Serum, 10 mg Reispuder und Holzkohle. Die Histomonaden wuchsen in diesem Kulturmedium erfolgreich, erreichten aber den Wachstumshöhepunkt erst nach ein bis zwei Wochen. Andere Autoren nutzten eine Kombination aus gepufferter Salzlösung, ergänzt mit Serum oder anderen Zusätzen wie beispielsweise Reisstärke (Bishop 1938; Tyzzer 1934). Dwyer und Honigberg (1970) entwickelten ein Medium, in dem sich die Histomonaden extensiv und schnell vermehren. Dieses besteht zu 85 % bis 90 % aus Medium 199, zu 5 % bis 10 % aus hitzeinaktiviertem Pferdeserum, zu 5 % aus Hühnerembryo-Extrakt, supplementiert mit 10 bis 12 mg Reismehl pro 12,5 ml Medium.

Die Notwendigkeit der Anwesenheit von Bakterien für das Wachstum von *H. meleagridis* ist noch immer umstritten. Allgemein gilt, dass Histomonaden lebende Bakterien im Blinddarm benötigen, um sich zu vermehren (Stepkowski und Klimont 1980) und dass eine Induktion der Erkrankung in gnotobiotischen Tieren nicht möglich ist (Doll und Franker 1963). Jedoch ist anderen Autoren eine erfolgreiche Anzucht auch mit toten Bakterien gelungen (Lund et al. 1967), (Lesser 1960a), (Lesser 1960b). Delappe (1953a) nutzte Penicillin bei der Isolierung von *H. meleagridis* aus Puten und stellte bei einer kleineren Bakterienpopulation ein besseres Wachstum des Protozoons fest. Darüber hinaus konnte in anderen Versuchen der positive Einfluss einer anaeroben Umgebung auf das Wachstum von *H. meleagridis* nachgewiesen werden (Delappe 1953b).

Die Erhaltung einer Histomonaden-Kultur über mehrere Jahre kann in flüssigem Stickstoff durchgeführt werden. DMSO (8 %) mit Hühnerserum (8 %) in Medium 199 fungiert dabei als Kryoprotektor (Dwyer 1970; Chute und Chute 1969; Honigberg und Dwyer 1969).

### 2.5.1.4 Polymerase chain reaction (PCR)

Die Anwesenheit von Histomonaden-DNA nach natürlicher und experimenteller Infektion kann mittels PCR in verschiedensten Organen festgestellt werden (Hauck et al. 2006). So konnten Grabensteiner et al. (2006) nach experimenteller Infektion von Hühnern *H. meleagridis*-DNA im Blinddarm, in der Bursa fabricius, in den Nieren, im Herzen und im Gehirn nachweisen, während im gleichen Versuch der Nachweis von *H. meleagridis* bei Puten darüber hinaus auch in Drüsenmagen, Duodenum, Zäkum, Jejunum, Pankreas, Leber, Milz, Lungen und Thymus gelang. In den zuvor genannten Studien wurden Primer genutzt, deren Sequenz auf einem Teil des ssu rRNA-Gens basieren (Gerbod et al. 2001). Hafez et al. (2005a) entwickelten mithilfe eines Teils des ssu rRNA-Gens eine konventionelle PCR, eine nested-PCR sowie eine Real-time PCR und verglichen Spezifität und Sensitivität der unterschiedlichen PCRs miteinander. Während sich die konventionelle und die nested-PCR im Vergleich zur Real-time PCR als weniger spezifisch erwiesen, war die Nachweisgrenze bei der Real-time PCR im Vergleich zur konventionellen PCR um das Zehnfache, im Vergleich zur nested-PCR um das Einhundertfache höher. Huber et al. (2005) entwickelten eine hoch sensitive PCR, mit der es gelang, ein positives Ergebnis bei nur 10 Parasiten/ml im Blinddarmkot zu detektieren. Aufgrund der Annahme, dass es bei Hühnern und Puten oft zu Mischinfektionen mit mehreren Einzellern kommt, designten Grabensteiner und Hess (2006) auf Basis des ssu rRNA-Gens drei verschiedene Primerpaare, mithilfe derer sie *H. meleagridis*, *T. gallinarum* und *Blastocystis* spp. nachweisen konnten.

Um die negativen Auswirkungen von PCR-inhibierenden Substanzen und damit falsch-negative Ergebnisse auszuschließen, entwickelten Bleyen et al. (2006) eine PCR mit integrierter Amplifikationskontrolle, basierend auf einem 901 bp großen Teil des 18S rRNA Gens. Xu et al. (2014) berichteten einige Jahre später über die Entwicklung einer Variante der isothermalen DNA-Amplifikation, der LAMP (Loop-mediated isothermal amplification assay) zum Nachweis von *H. meleagridis*. Auch hier wurden die Primer auf Basis des 18 S rRNA Gens ausgewählt. Diese Methode stellte sich als um das Zehnfache sensitiver heraus als eine konventionelle PCR, wobei der Unterschied vor allem in Bezug auf makroskopisch veränderte Blinddärme am deutlichsten war. Die Autoren vermuteten, dass die falsch-negativen Ergebnisse durch Inhibitoren der Polymerase zustande kommen, die sich vor allem im Darm befinden.

### 2.5.1.5 In-situ Hybridisierung

In den letzten 15 Jahren wurde mehrfach über erfolgreiche Nachweise verschiedener Protozoa in Gewebeproben mittels In-situ Hybridisierung berichtet. So konnten bereits das Vorkommen

von Cryptosporidien (Chvala et al. 2006), Trichomonaden (Mostegl et al. 2010) oder auch *Entamoeba spp.* und *Monocercomonas spp.* (Richter et al. 2008) erwiesen werden. Liebhart et al. (2006) entwickelten eine In-situ Hybridisierung zum Nachweis histomonaler Nukleinsäure in Blinddärmen und Lebern von Hühnern und Puten. Dazu wurden die Gewebeproben in Paraffin eingebettet. Vorteile dieser Methode sind zum einen die höhere Spezifität für den Nachweis von *H. meleagridis* im Gewebe und zum anderen, dass die Verteilung der Histomonaden in den Organen visualisiert werden kann.

### 2.5.1.6 Immunhistochemie

Neben der In-situ Hybridisierung kann auch die Immunhistochemie für den Nachweis von *H. meleagridis* genutzt werden. In einer experimentellen Studie von Singh et al. (2008) wurden Puten mit Histomonaden infiziert und Gewebeproben dieser Tiere in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Mittels polyklonaler Antikörper, die aus Kaninchen gewonnen wurden, konnte *H. meleagridis* in verschiedenen Geweben detektiert werden. Insbesondere bei einer geringen Anzahl an Parasiten wurde diese Methode als sensitiver als HE- und PAS-Färbungen eingestuft.

### 2.5.2 Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA)

Ein weiteres diagnostisches Verfahren zum Nachweis einer Infektion mit *H. meleagridis* ist der ELISA. Windisch und Hess (2009) entwickelten einen indirekten Sandwich-ELISA zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen Histomonaden in Seren von infizierten Hühnern und Puten. Obwohl IgG-Antikörper in Bezug auf die Protektivität nur eine geringe Rolle zu spielen scheinen, lassen sich mithilfe dieses ELISAs latent infizierte Hühner innerhalb von 14 Tagen p.i. identifizieren. Dies nutzten Grafl et al. (2011) für ein Screening von Legehennen in Aufzuchtbetrieben und während der Produktion. Sie fanden heraus, dass die Prävalenz einer Infektion mit Histomonaden in den Freilandbetrieben deutlich höher war als bei Tieren, die ausschließlich im Stall ohne Freilauf gehalten wurden. Kurze Zeit später wurde ein spezifischer Blocking-ELISA etabliert, der auf monoklonalen Antikörpern gegen ein in Histomonaden vorkommendes Protein basierte (van der Heijden et al. 2010). Dieses Diagnostikum ist in der Lage, zwischen Antikörpern gegen *H. meleagridis* und dem nahe verwandten *Tetratrichomonas gallinarum* zu unterscheiden. In einer Studie von van der Heijden und Landman (2011) konnte mittels dieses kompetitiven ELISAs die weite Verbreitung von *H. meleagridis* bei Legehühnern bestätigt werden. Im Gegensatz zur Studie von Grafl et al. (2011) konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen den verschiedenen Haltungssystemen und der Prävalenz einer Histomonaden-Infektion festgestellt werden.

### 2.5.3 Veränderungen des Blutes

Bereits 1951 führten McGuire und Cavett (1952) erste Untersuchungen der Blutbestandteile bei Puten durch, die mit Histomonaden infiziert worden waren. Sie fanden heraus, dass die Infektion mit *H. meleagridis* einerseits initial zu einem Abfall an Nicht-Protein-Stickstoff, Harnsäure, Glucose sowie Erythrozyten und Hämoglobin führte, andererseits aber zu einem Anstieg der Leukozyten. Spätere Studien an Puten ergaben einen Anstieg der Asparaginsäureaminotransferase (AST), Laktatdehydrogenase (LDH), Malatdehydrogenase (MDH), Glutamatdehydrogenase (GLDH) und des Bilirubins, sowohl nach experimenteller (Hirsch 1979; Al-Khateeb und Hansen 1974), (Beg und Clarkson 1970a), (Beg und Clarkson 1970b), (McDougald und Hansen 1970) als auch nach natürlicher Infektion (Koncicki et al. 1999). Bei Hühnern konnte in Bezug auf diese Enzyme ein Absinken festgestellt werden, wenn nur Blinddarmläsionen vorlagen (McDougald und Hansen 1970).

Hinsichtlich der Bluteiweiße konnten nach einer Infektion mit Histomonaden bei Hühnern und Puten erniedrigte Albumin- und erhöhte Globulinwerte detektiert werden (Beg und Clarkson 1970a), (Beg und Clarkson 1970b). Während bei Puten die akute Phase der Infektion zu einem Anstieg der Alpha-, Beta- und Gammaglobuline führt (Mc Dougald und Hansen 1969), berichteten andere Autoren bei Hühnern nur über einen initialen Anstieg und im Verlauf über einen Abfall des Gamma-Globulin-Gehaltes (Beg und Clarkson 1970a). Bei Hühnern konnte zudem gezeigt werden, dass der Methämoglobin-Wert durch eine Infektion mit Histomonaden ansteigt (Mathis et al. 1984) und dass eine initial detektierbare Leukozytose sich nach der akuten Krankheitsphase wieder zurückbildet (Wilson und Perie 1966).

### 2.5.4 Genotypisierung

Die Annahme, dass es Unterschiede in der Pathogenität von *H. meleagridis* gibt, ist weit verbreitet (Callait-Cardinal et al. 2007; Dwyer und Honigberg 1970; Lund 1956; Tyzzer 1936). Van der Heijden et al. (2006) gibt an, dass die Einteilung von Histomonaden in verschiedene Gruppen unter anderem helfen könnte, epidemiologische Zusammenhänge zu erkennen, die Wirksamkeit von Behandlungen zu messen oder Unterschiede in der Virulenz von verschiedenen Histomonaden-Stämmen einzuschätzen.

Im Jahr 2006 konzentrierten sich van der Heijden et al. (2006) auf einen Teil des ssu rRNA Gens, der Internal transcribed spacer-1 region (ITS1-Region). Bei diesen Bereichen handelt es sich um nicht kodierende Abschnitte, die schnellen Veränderungen unterworfen sind und sich somit besonders für die Untersuchung auf verschiedene Typen eignen. In dieser Studie wurden intramolekulare Sequenzvariationen innerhalb eines Isolates betrachtet, als Fluorogramm dargestellt und die Auswertung aufgrund ihrer Komplexität auf die Base Cytosin

reduziert. Die dabei entstandenen C-Profile ergaben zwei sich ähnelnde Subtypen (Typ I und Typ II) und ein dritter Subtyp, wobei sich letzteres stark von den anderen unterschied. Bei Proben von Hühnern war vor allem Typ II vertreten. Drei Jahre später kamen Mantini et al. (2009) zu dem Ergebnis, dass es sich bei Typ III um *Parahistomonas wenrichi* handelt. Bei Anwendung dieser Methodik auf die ITS2-Region verschiedener Isolate stellte Balczulat (2013) fest, dass sich kein Muster ergab und die Reproduzierbarkeit nicht gegeben war. In einer anderen Untersuchung wurden die ITS1-5.8S rRNA-Sequenzen für die Analyse verschiedener Isolate genutzt und das Vorkommen verschiedener Sequenzvariationen als Konsequenz einer Mischinfektion erklärt (Lollis et al. 2011).

Um die genetische Zugehörigkeit verschiedener Isolate zu bestimmen, wurden Histomonaden-positive Isolate anhand dreier genetischer Loci untersucht (Bilic et al. 2014). Bei diesen handelte es sich um das Gen für die 18S rRNA, für das alpha-Actinin 1 sowie das rpb1-Gen. Bei dieser Methode zeigten sich zwei Cluster, also zwei Genotypen. Genotyp 1 kam vornehmlich bei Proben aus Europa vor, Genotyp 2 konnte nur vereinzelt nachgewiesen werden.

Die Versuche, für *H. meleagridis* positive Isolate mittels Sequenzen zu analysieren, die für Proteine kodieren, schlugen fehl (Gerhold et al. 2011, Hauck und Hafez 2009). Auch andere Abschnitte des rRNA-Gens scheinen für eine Genotypisierung nicht geeignet, sind aber hilfreich bei phylogenetischen Analysen (Kleina et al. 2004; Walker et al. 2003; Felleisen 1997).

## 2.6 Prävention und Kontrolle

### 2.6.1 Herdenmanagement

Der erste Schritt, eine Krankheit zu kontrollieren und den Eintrag in die Betriebe sowie die Ausbreitung von Stall zu Stall zu verhindern, ist die Durchsetzung von Biosicherheitsmaßnahmen. Dies ist in Bezug auf die Histomonose umso wichtiger, da der Eintragungsweg von *H. meleagridis* in Geflügelhaltungen noch immer nicht vollständig geklärt ist (Lotfi et al. 2012).

Über den Eintrag von Histomonaden in Geflügelbestände aufgrund geringer Anforderungen an die Biosicherheit wurde mehrfach berichtet (Popp et al. 2011; Cortes et al. 2004; Ganapathy et al. 2000). Der Einfluss der Biosicherheit auf einen Eintrag ist abhängig von der Haltungform und damit bei Freilandbetrieben stark limitiert (Liebhart et al. 2017). Dies korreliert mit den Beobachtungen von Grafl et al. (2011), die bei Legehennen eine höhere Seroprävalenz bei

Freilandaufzucht- und Freilandlegebetrieben im Vergleich zu Legehennen, die in Bodenhaltung ohne Freilauf gehalten wurden, ermittelten. Callait-Cardinal et al. (2010) konnten einen Zusammenhang zwischen erhöhter Mortalität bei Puten sowie geringem Hygienelevel und Ansäuerung des Tränkewassers ermitteln. Nichtsdestotrotz ist es nicht immer möglich, Tiere durch sehr hohe Biosicherheitsanforderungen, wie sie bei Mast- oder Legeelterntieren oft obligatorisch sind, vor einer Histomonose zu schützen (Dolka et al. 2015; Callait-Cardinal et al. 2007).

Während laut McDougald (2005) mit dem Kot ausgeschiedene Histomonaden-Zellen ohne den Schutz eines Vektors bei Umgebungstemperatur nur eine geringe Tenazität besitzen, konnte Lotfi (2011) bestätigen, dass überlebensfähige Histomonaden auch nach 9 Stunden noch in Fäkalien oder Leitungswasser nachweisbar waren. Diese Zeitspanne scheint für die Übertragung des Erregers ausreichend zu sein, zumal experimentelle Studien eine schnelle Ausbreitung innerhalb eines Bestands nachweisen konnten (Hess et al. 2006a; McDougald und Fuller 2005).

Für die Verbreitung von *H. meleagridis* gilt der Blinddarmwurm *Heterakis gallinarum* bereits viele Jahre als äußerst relevant. Die Tatsache, dass dessen Eier im Vergleich zu den Histomonaden sehr resistent gegen Umwelteinflüsse sind und für mehrere Jahre infektiös bleiben können (Tyzzer 1926; Graybill und Smith 1920), machen sie zu einem exzellenten Intermediär-Wirt für *H. meleagridis*. Dies bestätigen die Beobachtungen von Farr (1961), der herausfand, dass Wurmeier von *Heterakis gallinarum* in der Einstreu bis zu drei Jahre überlebensfähig waren und *H. meleagridis* auch noch nach 150 Wochen in diesen Eiern nachgewiesen werden konnte. Somit gilt die Vermeidung einer Infektion mit den Blinddarmwürmern als höchst effektive Präventionsmaßnahme in Bezug auf die Histomonose (Liebhart und Hess 2019) und ebenso für verschiedene Regenwurm-Arten, die wiederum als Vektoren für *H. gallinarum* dienen (Lund et al. 1966a). Man vermutet, dass durch den Einsatz von Benzimidazol-Derivaten wie Albendazol, Fenbendazol und Flubendazol Heterakiden abgetötet und die Übertragung der Histomonose verhindert werden kann (Squires et al. 2012; Hegngi et al. 1999). Zudem ist der Einsatz von Desinfektionsmitteln, die die Schale von Wurmeiern auflösen können, wie beispielsweise Peressigsäure (van der Gulden und van Erp 1972), zu empfehlen.

Um die Übertragung von *H. meleagridis* einzudämmen, sind auch andere Vektoren wie beispielsweise Fliegen, Grashüpfer oder der Getreideschimmelkäfer zu kontrollieren (Huber et al. 2007; Frank 1953), da sie Histomonaden von Stall zu Stall oder Bestand zu Bestand verbringen können. Über den positiven Nachweis von Histomonaden-DNA in Staub wurde bereits berichtet (Beckmann et al. 2021; Grafl et al. 2015), wenngleich der Staub keine

mikroskopisch nachweisbaren, vermehrungsfähigen Zellen enthielt und in einer zuvor stattgefundenen Studie für Puten nicht infektiös war (Liebhart et al. 2013).

### 2.6.2 Impfung

Bereits 1907 berichtete Curtis (1907) darüber, dass Puten an einer Histomonose erkranken und wieder genesen, jedoch im darauffolgenden Jahr an einer erneuten Infektion versterben konnten. Dies wurde durch Bleyen et al. (2009b) bestätigt, als Puten kurz vor der Infektion ein Antikörper enthaltendes Serum erhielten, an der Infektion starben und die gleichen Läsionsgrade in Blinddärmen und Lebern zeigten. Auch Clarkson (1963) berichtete, dass die Übertragung des Serums von erkrankten und genesenen Puten und Hühnern auf empfängliche Tiere nicht zu einem Schutz vor der Histomonose führte. Im Gegensatz dazu beobachtete jedoch Joyner (1963), dass Puten nach einer Infektion mit *H. meleagridis* und Therapie mit Dimetridazol über das Trinkwasser eine Immunität ausbildeten.

Die Entdeckung des apathogenen Protozoon *Histomonas wenrichi* schien ein interessanter Ansatz für die Entwicklung eines Impfstoffes gegen *H. meleagridis* zu sein, jedoch zeigte Lund (1959), dass Puten nach einer dreimaligen, intrakloakalen Applikation von *H. wenrichi* nicht gegen virulente Histomonaden geschützt waren, die über infizierte, embryonierte Eier von *Heterakis gallinarum* verabreicht wurden.

Schon 1933 führte Tyzzer Versuche zur Immunisierung von Hühnern und Puten mit *in vivo* attenuierten Histomonaden durch (Tyzzer 1936; Tyzzer 1934; Tyzzer 1933). Er konnte nachweisen, dass der Grad der Attenuierung mit der Protektivität negativ korreliert. Nach weiteren Studien zur Attenuierung von *H. meleagridis*, in denen mittels dieser Histomonaden kein Schutz gegen eine Infektion vermittelt werden konnte (Lund et al. 1966b), schlussfolgerten die Autoren, dass eine Attenuierung virulenter Histomonaden nicht möglich sei. Diese These wurde jedoch widerlegt, als 40 Jahre später mittels Mikromanipulation klonale Kulturen hergestellt, diese *in vitro* passagiert (Hess et al. 2006b) und mit diesen Kulturen bei Infektionsversuchen von intrakloakal geimpften Puten ein guter Schutz erzielt werden konnte (Hess et al. 2008).

Eine große Schwierigkeit bei der Herstellung eines Impfstoffes gegen *H. meleagridis* stellt die Notwendigkeit der Anwesenheit lebender Bakterien dar, deren Zusammensetzung oft nicht charakterisiert werden kann (Hess 2019). Ganas et al. (2012) war es jedoch möglich, mittels Einsatzes verschiedener Antibiotika die Wildtyp-Bakterienflora durch eine Bakterienspezies zu ersetzen. Somit steht laut Hess (2019) der Ansatz für einen Lebendimpfstoff zur Verfügung, der nun für die Anwendung im Feld weiterentwickelt werden soll.

### 2.6.3 Rechtslage

Lange Zeit konnte die Histomonose mittels wirksamer Arzneimittel, wie Nitroimidazol-Verbindungen oder bestimmter Nitrofurane, prophylaktischer Präparate und verbessertem Management eingedämmt werden (Aka et al. 2011). Anfang der 90er Jahre wurden jedoch die Arzneimittel der Wirkgruppe der Nitroimidazole, einschließlich der Nitrofurane, in den Anhang IV der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 (EU 1990) aufgenommen, da die Unbedenklichkeit dieser Stoffe im Hinblick auf Karzinogenität und Genotoxizität für den Menschen nicht auszuschließen war (Liebhart et al. 2017). Dies hatte zur Folge, dass seit 1995 für die Histomonose arzneimittelrechtlich ein Therapienotstand für lebensmittelliefernde Tiere innerhalb der EU besteht. Zudem lief am 31. März 2003 gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1756/2002 (EU 2002) die Übergangsfrist zum Einsatz von Nifursol® als Futterzusatzstoff ab, womit das letzte Mittel zur Prävention der Histomonose ebenfalls verboten war. Dieser Therapie- und Prophylaxenotstand in der Europäischen Union führt seither zu einem vermehrten Auftreten der Histomonose (Hafez et al. 2005b).

### 2.6.4 In der Prophylaxe und Therapie eingesetzte Wirkstoffe

#### 2.6.4.1 Antibiotika und andere chemische Wirkstoffe

Seitdem die Arzneimittel der Wirkgruppe der Nitroimidazole, einschließlich des Futterzusatzstoffes Nifursol® nicht mehr eingesetzt werden dürfen, wurde eine Vielzahl an Substanzen *in vivo* und *in vitro* auf ihre prophylaktische und therapeutische Wirksamkeit gegenüber einer Histomonose getestet (Mc Dougald 2005).

Nachgewiesene Interaktionen zwischen *H. meleagridis*, Bakterien und Kokzidien (McDougald und Hu 2001) wurden ein Jahr später als Ansatz für die Testung von Kokzidiostatika und verschiedener Antibiotika genutzt. Hu und McDougald (2002) fanden heraus, dass Kokzidiostatika *in vivo* keinen positiven Einfluss auf eine Infektion mit Histomonaden bei Hühnern hatten, wenngleich der Einsatz von Nicarbazin zu einer signifikanten Reduktion der Leberläsionen bei mit *E. tenella* und *H. meleagridis* infizierten Tieren führte. In dieser Studie wurden zusätzlich auch Versuche mit Penicillin, Chlortetrazyklin, Tylosin und Sarafloxacin durchgeführt. Obwohl teilweise leichte Verbesserungen hinsichtlich der Gewichtszunahme bei einigen Hühnern registriert wurden, hatte keins der genannten Antibiotika einen positiven Effekt auf die Ausbildung der Läsionen.

Auf Grundlage einer Veröffentlichung aus dem Jahr 1962, in der über den erfolgreichen Einsatz eines Antibiotikums aus der Gruppe der Aminoglykoside berichtet wurde (Lindquist 1962), führte man erneut verschiedene *in vivo*- und *in vitro*-Studien mit Paromomycinsulfat

durch. Alle Autoren kamen zu dem Schluss, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Wirksamkeit und der Dosis des Wirkstoffes besteht (van der Heijden et al. 2011; Hafez et al. 2010; Hafez et al. 2009; Bleyen et al. 2009a), da unter anderem positive Effekte auf das Körpergewicht von Puten festgestellt werden konnten. Paromomycinsulfat war jedoch nicht in der Lage, Mortalitätsraten zu senken oder Läsionen abzumildern. Hu und McDougald (2004) konnten in einer *in vivo*-Studie mit jungen Hühnern keinen positiven Effekt einer Paromomycin-Behandlung feststellen. Da der prophylaktische Einsatz dieses Antibiotikums jedoch bei Puten erfolgreich war (Hafez et al. 2010; Bleyen et al. 2009a), wurde vermutet, dass die Verabreichung nur einen Tag vor Infektion eine Ursache für die fehlende Wirksamkeit gewesen sein könnte.

Benzimidazole zeigten weder *in vitro* noch *in vivo* positive Effekte auf eine Infektion mit *H. meleagridis*, obwohl vermutet wird, dass sowohl Fenbendazol, Flubendazol, Mebendazol als auch Nocodazol durch die Bindung an histomonales Beta-Tubulin in der Lage sind, den Stofftransport im Inneren der Histomonaden-Zelle zu hemmen (Hauck und Hafez 2009). Dieser Wirkmechanismus würde die Ergebnisse von Hegngi et al. (1999) erklären, die bei Puten durch kontinuierliche Gabe von Albendazol und Fenbendazol zwei Mal täglich über 14 Tage einen signifikanten Unterschied bezüglich des Körpergewichts und der Stärke der Leber- und Blinddarmläsionen erzielen konnten.

Burch et al. (2007) berichteten darüber, dass Tiamulin, welches zur Behandlung gegen Mykoplasmeninfektionen eingesetzt wird, bei mit Histomonaden infizierten Puten die Mortalität senkt. Diese Beobachtung konnte bei *in vitro*-Versuchen bestätigt werden (Hauck et al. 2010d), die eine Tiamulindosis-abhängige Reduktion der Histomonaden in der Kultur ergaben. Im Gegensatz dazu konnten van der Heijden et al. (2011) *in vitro* nur einen geringen Effekt feststellen.

### 2.6.4.2 Pflanzliche Wirkstoffe

Da bisher jegliche Versuche, gegen die Histomonose wirksame chemische Substanzen mit Chancen auf eine zeitnahe Zulassung zu entwickeln, scheiterten, sind die pflanzlichen Wirkstoffe in den Fokus der Forschung gerückt. In vielen *in vitro*-Studien wurden über antihistomonale und antibakterielle Effekte von diversen Pflanzenbestandteilen, -ölen oder auch -extrakten, unter anderem von Zimt, Zitronen, Möhren, Blaubeeren, Kastanien, Mangos, Oliven, Thymian oder Tomaten berichtet (Arshad et al. 2008; Grabensteiner et al. 2007; Hauck und Hafez 2007; Zenner et al. 2003). Jedoch konnte weder nachgewiesen werden, ob der antihistomonale Effekt lediglich durch die Reduktion der Bakterien zustande kam, noch war es möglich, diese Ergebnisse *in vivo* zu reproduzieren (Grabensteiner et al. 2008).

Duffy et al. (2004) erzielten in einer Studie mit Natustat™, einem pflanzlichen Produkt, welches aus einer Kombination von pflanzlichen Extrakten, Mannan-Oligosacchariden und organischen Mineralstoffen besteht, eine Reduktion der Läsionen in Blinddärmen bei Hühnern. Ein Jahr später konnte in einem anderen Versuch die Reduktion der Blinddarmläsionen bei Puten bestätigt werden, wobei hier auch ein positiver Effekt auf die Leberläsionen festgestellt wurde (Duffy et al. 2005). Da es sich bei dem Material, mit dem die Tiere infiziert wurden, um mit *H. meleagridis* kontaminierte Einstreu aus einem Stall handelte, bleibt jedoch fragwürdig, ob Natustat™ unter aggressiveren Infektionsbedingungen ähnliche Ergebnisse erzielen würde (Hess et al. 2015).

Die Untersuchungen des Produkts Protophyt®, bei dem es sich um eine Mischung aus essenziellen Ölen von Zimt, Knoblauch, Rosmarin und Limone handelt, führte zu kontroversen Ergebnissen. Während Hafez und Hauck (2006) bei Puten mittels Protophyt® eine Reduktion der Mortalität um mehr als die Hälfte erzielten, konnten van der Heijden und Landman (2008b) keine prophylaktische Wirksamkeit feststellen. Das in der gleichen Studie untersuchte Produkt Enteroguard™ zeigte ebenfalls keinen Effekt.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Mastelertier-Herden

Bei den in dieser Dissertation beschriebenen landwirtschaftlichen Betrieben handelte es sich um 20 Masthühnerelertier-Produktionsbetriebe einer Unternehmensgruppe. Einbezogen wurden Hühner zweier Rassen, im Folgenden als Herkunft A und Herkunft B bezeichnet. Die Produktionsbetriebe unterschieden sich sowohl in Stallanzahl, Tierzahl als auch in baulichen Gegebenheiten sowie Standort. Die geographische Lage der Betriebe erstreckte sich über die drei Bundesländer Sachsen-Anhalt, Mecklenburg-Vorpommern und Thüringen (Tab. 1). In allen Produktionsbetrieben wurden die Mastelertiere zwischen der 18. und der 21. Lebenswoche von einem Aufzucht-Standort an den Standort des Produktionsbetriebes transportiert, wobei sich Aufzucht- und zugehöriger Produktionsstandort in sieben Fällen in unterschiedlichen Bundesländern befanden (Tab. 2). Die tierärztliche Betreuung der Tiere erfolgte über den gesamten Lebenszeitraum vom Eintagsküken an bis zur Schlachtung durch Mitarbeiter der Tierarztpraxis MMT in Köthen (Anhalt).

**Tabelle 1:** Standort der Produktionsbetriebe nach Herkunft und Bundesland

Bundesland	Anzahl der Betriebe / Herkunft A	Anzahl der Betriebe / Herkunft B
Mecklenburg-Vorpommern	4	0
Sachsen-Anhalt	6	8
Thüringen	0	2

Vor dem Transport der Mastelertiere vom Aufzuchtbetrieb in den Produktionsbetrieb und dortiger Einstellung erfolgte, während der Serviceperiode, das Ausmisten und die Reinigung des Produktionsbetriebes. Die sich anschließende Desinfektion wurde mittels Advisal® Flächendesinfektionsmittel (1 %ige Lösung) und Envicoc CMK Spezialdesinfektionsmittel (4 %ige Lösung) des Herstellers Envisal, Reppenstedt durchgeführt. Sowohl die Reinigung als auch die Desinfektion umfasste den Tierbereich in den Ställen sowie alle dazu gehörigen Nebenräume, Bruteilager, Außenanlagen sowie sämtliche Stall- und Fütterungseinrichtungen. Nach der Desinfektion wurden die Ställe aufgeheizt und mit Stroh oder Hobelspänen eingestreut.

## Material und Methoden

Die Einhaltung der Biosicherheitsmaßnahmen war in allen Betrieben obligatorisch. Dies beinhaltete die vollständige Umzäunung des Betriebsgeländes, die Eintragung in ein Besucherbuch, die Benutzung einer Hygieneschleuse mit Duschen sowie das Tragen farneigener Kleidung und Schuhwerk als auch die Desinfektion jeglichen Materials, welches bei einem Besuch in den Weißbereich des Produktionsbetriebs verbracht werden musste. Zudem wurde das im Außenbereich des Stalls getragene Schuhwerk im Stallvorraum gegen neues Schuhwerk für den Tierbereich ausgewechselt. Ein- und Ausstellungen erfolgten streng nach dem „All-in-all-out“ - Prinzip, auf den Betrieben wurden somit nur Tiere einer Altersstufe gehalten.

**Tabelle 2:** Standort von Aufzucht- und dazugehörigem Produktionsbetrieb

<b>Produktions- betrieb-ID</b>	<b>Bundesland Aufzuchtbetrieb</b>	<b>Bundesland Produktionsbetrieb</b>	<b>Herkunft</b>
1	Sachsen	Mecklenburg-Vorpommern	A
2	Sachsen-Anhalt	Sachsen-Anhalt	A
3	Sachsen-Anhalt	Sachsen-Anhalt	A
4	Sachsen-Anhalt	Sachsen-Anhalt	A
5	Niedersachsen	Mecklenburg-Vorpommern	A
6	Mecklenburg-Vorpommern	Mecklenburg-Vorpommern	A
7	Mecklenburg-Vorpommern	Mecklenburg-Vorpommern	A
8	Sachsen	Sachsen-Anhalt	A
9	Sachsen-Anhalt	Sachsen-Anhalt	A
10	Niedersachsen	Sachsen-Anhalt	A
11	Sachsen-Anhalt	Sachsen-Anhalt	B
12	Sachsen-Anhalt	Sachsen-Anhalt	B
13	Sachsen-Anhalt	Sachsen-Anhalt	B
14	Sachsen-Anhalt	Sachsen-Anhalt	B
15	Sachsen-Anhalt	Sachsen-Anhalt	B
16	Hessen	Thüringen	B
17	Niedersachsen	Thüringen	B
18	Sachsen-Anhalt	Sachsen-Anhalt	B
19	Sachsen-Anhalt	Sachsen-Anhalt	B
20	Sachsen	Sachsen-Anhalt	B

### 3.1.2 Haltungssystem während Aufzucht und Produktion

Sowohl die Tiere der Herkunft A als auch die Tiere der Herkunft B wurden als Eintagsküken in die Mastelertier-Aufzuchtbetriebe eingestallt. Die Aufzucht erfolgte getrenntgeschlechtlich in Bodenhaltung mit Stroh oder Hobelspänen als Einstreumaterial und A-Reutern als erhöhte Sitzgelegenheit. Die Einstreu wurde über den Verlauf der Aufzuchtphase nicht ausgetauscht. Das Fütterungsmanagement beinhaltete eine restriktive Futterzuteilung über eine Trogfütterung mit Schleppkette. Sowohl in den Aufzucht- als auch in den Produktionsbetrieben wurden die Tiere über Nippeltränken getränkt. Das Tränkwasser wurde entweder aus einem Brunnen (Abb. 1 und 2) oder über einen Stadtwasseranschluss bezogen (Tab. 3).



**Abbildung 1:** Filteranlage mit Brunnenpumpen (Bsp. Betrieb 6)



**Abbildung 2:** Brunnen von außen (Bsp. Betrieb 6)

Nach Umstallung der Tiere vom Aufzuchtbetrieb in den Produktionsbetrieb erfolgte die Anpaarung von Hennen und Hähnen. Die Höhe des prozentualen Anteils der Hähne im Stall war dabei abhängig von der Hennenanzahl sowie rassespezifischen Empfehlungen und kann, ebenso wie der Einstellungszeitpunkt, Tabelle 4 entnommen werden.

Die Ställe der Produktionsbetriebe waren in eine mittig im Stall befindliche Ruhezone zur Eiablage sowie einen Versorgungsbereich unterteilt. Die Eiablage erfolgte in lichtgeschützten Legenestern mit klappbaren Böden, die rechts und links des Brutei-Förderbandes angeordnet waren. Durch die vor den Legenestern befindlichen Holz- oder Kunststoff-Gitterrosten fiel der abgesetzte Kot in eine Kotgrube, wobei dieser Kot über den gesamten Produktionsdurchgang in der Grube verblieb. Oberhalb des Rostens verlief die Tränkelinie, bestehend aus aneinander gereihten Nippeltränken mit Auffangschale. Zwischen Rosten und Außenwand lag der Scharrbereich mit getrennten Fütterungssystemen für Hahn und Henne. Das Fütterungsmanagement beinhaltete eine restriktive Futterzuteilung über eine Trogfütterung mit Schleppkette und Antihahnengrill bei den Hennen sowie über eine Futterschale bei den Hähnen. Wasserversorgung, Lichtprogramm sowie das Hahnenmanagement wurden einheitlich, nach den für die entsprechende Mastelertier-Rasse spezifischen Empfehlungen, durchgeführt.

Die während des Produktionszeitraums verfütterten Alleinfuttermittel wurden von vier verschiedenen Futtermühlen bezogen (Tab. 3). Das Fütterungsmanagement basierte dabei ebenfalls auf rassespezifischen Empfehlungen. Da der Großteil der untersuchten Mastelertier-Herden Futter der gleichen Futtermühle erhielt, wurde dieser Faktor nicht in den statistischen Auswertungen berücksichtigt.

Alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mastelertier-Herden wurden während der Aufzucht nach einem einheitlichen Impfprogramm geimpft. Während des Produktionszeitraumes gab es unter den untersuchten Herden lediglich geringfügige Abweichungen bezüglich des Impfschemas gegen die Infektiöse Bronchitis.

Alle Herden wurden zwischen der 56. und der 61. Lebenswoche geschlachtet.

## Material und Methoden

**Tabelle 3:** Zuordnung Futtermittelhersteller und Tränkwasser zu Betrieb und Herkunft

Betrieb	Herkunft	Futterhersteller	Tränkwasser
1	A	For farmers	Brunnen
2	A	Wimex	Stadtwasser
3	A	Wimex	Brunnen
4	A	Wimex	Brunnen
5	A	Wimex	Stadtwasser
6	A	Wimex	Brunnen
7	A	HaGe	Brunnen
8	A	Wimex	Brunnen
9	A	Wimex	Brunnen
10	A	Wimex	Brunnen
11	B	Wimex	Stadtwasser
12	B	Wimex	Stadtwasser
13	B	Wimex	Brunnen
14	B	Wimex	Stadtwasser
15	B	Wimex	Stadtwasser
16	B	Deuka	Brunnen
17	B	Wimex	Brunnen
18	B	Wimex	Stadtwasser
19	B	Wimex	Stadtwasser
20	B	Wimex	Stadtwasser

**Tabelle 4:** Anzahl der Hennen und Hähne je beprobtem Stall am Einstallungstag

<b>Betrieb</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Zeitpunkt der Einstellung in die Produktionsfarm</b>	<b>Anzahl Hennen / Einstellungstag</b>	<b>Anzahl Hähne / Einstellungstag</b>
1	A	Juni 2016	5.698	504
2	A	Juli 2016	9.660	952
3	A	September 2016	6.230	504
4	A	September 2016	4.550	448
5	A	September 2016	9.136	840
6	A	November 2016	6.636	616
7	A	November 2016	6.720	612
8	A	November 2016	6.648	504
9	A	Januar 2017	6.636	644
10	A	Januar 2017	6.300	560
11	B	Juli 2016	13.650	1.220
12	B	Juli 2016	12.880	1.120
13	B	Juli 2016	13.090	1.064
14	B	Juli 2016	16.660	1.120
15	B	September 2016	5.040	392
16	B	Oktober 2016	7.000	546
17	B	Oktober 2016	7.042	536
18	B	Dezember 2016	6.720	560
19	B	Dezember 2016	16.308	1.398
20	B	Januar 2017	6.300	500

### 3.1.3 Verbrauchsmaterialien und Geräte

#### 3.1.3.1 Probenmaterial

**Tabelle 5:** Probenmaterial zur Sicherung der entnommenen Proben

<b>Material</b>	<b>Herkunft</b>
Abstrichtupfer	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Baretthauben weiß, 49 cm	HELE GmbH, Heilsbronn
Polyethylenbeutel mit Druckverschluss und Beschriftungsfeld in verschiedenen Größen	Henry Schein, Langen
Sterile Metallwatteträger mit kleinem Kopf	Applimed SA, Schweiz
Wischtücher aus Viskose/Polyester	EDEKA Zentrale AG & Co. KG, Hamburg

#### 3.1.3.2 Präparation der DNA

**Tabelle 6:** Material und Geräte für die DNA-Präparation

<b>Material / Geräte</b>	<b>Herkunft</b>
AccuBlock™ Digital Dry Bath	LabNet International Inc., New Jersey
Einmalpipettenspitzen Biosphere® Filter Tips 10 µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Einmalpipettenspitzen Biosphere® Filter Tips 200 µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Einmalpipettenspitzen Biosphere® Filter Tips 1250 µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
PBS-Röhre 13 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
QIAamp® Auffanggefäße	Qiagen GmbH, Hilden
QIAamp® DNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAamp® Spinsäulen	Qiagen GmbH, Hilden
Sicherheitswerkbank NU 437-400E	NuAire, Massachusetts
Standard Safe-Lock-Zentrifugengefäße 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Standard Safe-Lock-Zentrifugengefäße 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg

## Material und Methoden

Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., New York
Zentrifuge Typ 5415D	Eppendorf AG, Hamburg

### 3.1.3.3 Real-time PCR (qPCR)

**Tabelle 7:** Material und Geräte für die Real-time PCR (qPCR)

Material / Geräte	Herkunft
CFX96 Deep-Well™ Real-Time System C1000 Touch™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Deckel für PCR-Strips 0,2 ml Reaktionsgefäße	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Einmalpipettenspitzen Biosphere® Filter Tips 10 µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Einmalpipettenspitzen Biosphere® Filter Tips 100 µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
IsoFreeze® Thermoblöcke für Reaktionsgefäße	Scientific Specialties Inc., Kalifornien
PCR-Strips 0,2 ml Reaktionsgefäße	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Primer	Biomers.net GmbH, Baden-Württemberg
Qik Spin Mikrozentrifuge QS7000	Edwards Group Pty. Ltd, Narellan
QuantiTect Probe PCR Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Reagenzglasschüttler IKA® Vortex 1	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Rotoradapter für Qik Spin Mikrozentrifuge	Edwards Group Pty. Ltd, Narellan
Sicherheitswerkbank Aura PCR	EuroClone®, Siziano PV
Sicherheitswerkbank PCR 6	Labcaire Systems Ltd, North Somerset
Standard Safe-Lock-Zentrifugengefäße 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg

### 3.1.4 Puffer

#### Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS, Phosphate Buffered Saline)

NaCl 8000 mg/l

Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1150 mg/l

KCl 200 mg/l, K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 200 mg/l

pH 7 – 7,6

### 3.1.5 Kits

#### QIAGEN QuantiTect Probe PCR Kit:

2x QuantiTect Probe PCR Master Mix (enthält Hot-Star-Taq DNA Polymerase, QuantiTect Probe RT-PCR Puffer, dNTP mix inklusive dUTP, RNase-freies Wasser)

#### QIAamp DNA Mini Kit (50):

QIAamp Mini Spin Säulen, Auffanggefäße 2,0 ml, Lysispuffer AL, Waschpuffer AW1, Waschpuffer AW2, Elutionspuffer AE, Buffer ATL, Proteinase K

### 3.1.6 Positivkontrollen für die Real-time PCR

Als Positivkontrollen für die durchgeführte Real-time PCR wurden vier, nicht näher bezeichnete *H. meleagridis*-positive Proben aus der Routine-Diagnostik verwendet. Die dort gemessenen CT-Werte lagen im Bereich zwischen 20 und 26.

### 3.1.7 Software

Bio-Rad CFX Industrial Manager Diagnostic Edition 2.2

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Herkunft der Produktionsparameter

Die Produktionsdaten der in dieser Arbeit untersuchten Mastelertier-Herden wurden initial durch Eintragungen der Daten in Stallbücher bzw. auf den Tagesmeldungen erhoben, anschließend in tabellarischer Form zusammengefasst und zur Verfügung gestellt. Somit ergab sich am Ende eines jeden Produktionsdurchgangs die Möglichkeit, anhand verschiedener Parameter eine Bewertung der Herde in Bezug auf Wirtschaftlichkeit und Gesundheitsstatus vorzunehmen.

### 3.2.1.1 Tierverlustdaten

Während eines Produktionsdurchgangs wurde für jeden der untersuchten Ställe die Anzahl der Verluste (Todesfälle) sowie Selektionen (Ausmerzungen) getrennt nach Geschlecht in den Stallbüchern vermerkt. Durch Addition der täglichen Verluste und Selektionen der Hennen wurden die täglichen Abgänge ermittelt. Diese Summe wurde durch die Anzahl der sich am 175. Tag im Stall befindlichen Hennen dividiert und als Prozentwert angegeben. Tag 175 entspricht dem „Point of lay“ (POL) in der 25. Lebenswoche. Es handelte sich dabei um einen von der Integration festgelegten Stichtag, ab dem die Abgänge betrachtet und am Ende eines Produktionsdurchganges mit denen anderer Herden verglichen wurden. Durch das Summieren der Prozentwerte an sieben aufeinanderfolgenden Tagen konnte für jede Lebenswoche ein wöchentlicher prozentualer Anteil an Abgängen ermittelt werden. Bis zum Ende eines Produktionsdurchganges wurden durch Addition der jeweiligen wöchentlichen Abgangswerte Summenprozentwerte gebildet (kumulierte Abgänge). Die in den entsprechenden Lebenswochen angegebenen kumulierten Abgänge werden im Folgenden als *Abgänge kum. in % POL* bezeichnet.

Um den Produktionsparameter *Abgänge kum. in % POL* der Herden miteinander vergleichen zu können, wurde von der Integration für beide Herkünfte je ein Integrationsdurchschnitt zur Verfügung gestellt, der sich als rassespezifischer Durchschnittswert aller in 2016 eingestellten Herden versteht.

### 3.2.1.2 Legeleistung

Während eines Produktionsdurchgangs wurde für jeden der untersuchten Ställe das tägliche Gesamtgelege in den Stallbüchern vermerkt. Dieser absolute Wert des täglichen Gesamtgeleges wurde durch die Anzahl des tagesaktuellen Hennenbestandes (Resthenne) dividiert und so ein Prozentwert (Legeleistung Gelege) berechnet. Durch das Summieren dieser Prozentwerte an sieben aufeinanderfolgenden Tagen konnte für jede Lebenswoche ein wöchentlicher prozentualer Anteil an gelegten Eiern ermittelt werden. Die in den entsprechenden Lebenswochen angegebene Legeleistung wird im Folgenden als *Legeleistung Gelege % Resthenne* bezeichnet.

Um den Produktionsparameter „Legeleistung“ der Herden miteinander vergleichen zu können, wurde von der Integration für beide Herkünfte je ein Integrationsdurchschnitt zur Verfügung gestellt, der sich als rassespezifischer Durchschnittswert aller in 2016 eingestellten Herden versteht.

### 3.2.1.3 Sektionsbefunde

Bei den während der Produktionsphase routinemäßig erhobenen Sektionsbefunden handelte es sich nur um Befunde aus dem Beobachtungszeitraum zwischen Einstellungszeitpunkt in den Produktionsbetrieb bis einschließlich 56. Lebenswoche und auch lediglich um die Tiere, die sich in den mittels qPCR untersuchten Ställen befanden. Die Sektionsbefunde „Typhlitis“ und „Polyserositis“ wurden jeweils stallweise addiert und anschließend als prozentualer Anteil gemessen an der Gesamtsumme aller erhobenen Befunde in dem Beobachtungszeitraum angegeben. Unter „Polyserositis“ wurden sowohl die Polyserositiden bei Hennen und Hähnen sowie wegen makroskopisch schwieriger Abgrenzbarkeit auch die Eileiter-Bauchfell-Entzündungen der Hennen zusammengefasst. Die Anzahl der Sektionsbefunde sowie die prozentualen Anteile der Tiere mit Polyserositis sind Tabelle 15 zu entnehmen.

### 3.2.2 Durchführung der Probenahme

Die untersuchten Feldproben wurden von Mitarbeitern/-innen aus der betreuenden Tierarztpraxis MMT, Köthen (Anhalt) entnommen. Dabei wurde pro Produktionsbetrieb jeweils ein Stall untersucht, wobei es sich immer um denjenigen handelte, der nach dem Transport der Mastelertiere aus dem Aufzuchtbetrieb in den Produktionsbetrieb als erster mit Tieren belegt wurde. Die Anzahl der Tiere in den beprobten Ställen können Tabelle 4 entnommen werden.

Die Probenahme erfolgte in allen 20 Mastelertier-Produktionsbetrieben innerhalb des Zeitraums Juni 2016 bis Oktober 2017 vom Tag der Einstellung (Transport auf den Produktionsbetrieb) an bis einschließlich der 56. Lebenswoche in einem Abstand von vier Wochen.

In **Produktionsbetrieb 8** wurden alle Tiere während der laufenden Brutei-Produktion in der 38. Lebenswoche an einen anderen Standort umgesetzt. Dabei handelte es sich um einen gereinigten und desinfizierten sowie mit neuem Einstreumaterial versehenen Stall, der sich zudem noch in einem anderen Bundesland befand. Da sowohl die frische Einstreu als auch der Stress, dem die Tiere beim Transport während der Produktionsphase ausgesetzt waren, einen Einfluss auf die Vermehrung von *H. meleagridis* haben könnte, wurde diese Herde bei der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt.

Die **erste Probenahme** erfolgte am Tag der Einstellung, welche bei jedem der Produktionsbetriebe im Zeitraum zwischen der 18. und 21. Lebenswoche stattfand. Dabei wurde pro Betrieb bei je zwei Mastelertieren, die aufgrund von Transportverletzungen selektiert wurden oder an stressbedingtem Herzkreislaufversagen verendet waren, eine

Sektion durchgeführt. Zudem wurden bei beiden Tieren die Blinddärme entnommen und ein Sektionsbefund erhoben. Mittels eines Metallwatteträgers wurde bei jedem dieser vier Blinddärme ein Abstrich durchgeführt. Anschließend wurden diese vier Blinddarmtupfer zu einer Probe zusammengefasst. Des Weiteren wurde mit einem angefeuchteten Lappen eine Wischprobe von den ersten fünf Transportkäfigen genommen, die den anderen voran vom Transportfahrzeug abgeladen und in den Stall geschoben wurden. In jedem Transportkäfig befanden sich zwischen 56 und 84 Mastelertiere.

Die **zweite Probenahme** erfolgt in der 24. Lebenswoche. Auch hier wurden bei jeweils zwei selektierten oder verendeten Tieren aus dem für diese Arbeit festgelegten Stall Blinddarmtupfer entnommen sowie ein Sektionsbefund erhoben. Statt der Wischproben von den Transportkäfigen wurden ab diesem Zeitpunkt Sockentupfer genommen, wobei der Stall mit einem Sockentupfer pro Fuß auf beiden Seiten der Legenester über die gesamte Länge mäanderförmig abgelaufen wurde (Abb. 3). Beide Sockentupfer wurden vor dem Überziehen über die Stallschuhe mit Wasser aus dem entsprechenden Stallvorraum angefeuchtet und im Anschluss zu einer Probe zusammengefasst. Dieser Ablauf der Probenahme wurde in der **28., 32., 36., 40., 44., 48., 52. sowie 56. Lebenswoche** wiederholt.

Am Ende eines Produktionsdurchgangs lagen somit je Betrieb eine Wischprobe der Transportkäfige vom Einstallungstag, 40 Blinddarmtupfer, 18 Sockentupfer sowie Sektionsbefunde von 20 Mastelertieren zur Untersuchung und Auswertung vor.

Nach der Probenahme wurden Wischproben bzw. Sockentupfer und Blinddarmtupfer getrennt in Polyethylenbeuteln verpackt, beschriftet und am gleichen Tag zusammen mit den Informationen über die Sektionsbefunde in das Labor der Tierarztpraxis MMT, Köthen (Anhalt) gebracht bzw. auf postalischem Weg gekühlt per Expresssendung verschickt. Die Proben wurden bis zur Weiterbearbeitung bei -20°C eingefroren. Sowohl die Durchführung der DNA-Extraktion als auch die Real-time PCR fanden im Labor der Tierarztpraxis MMT, Köthen (Anhalt) statt.

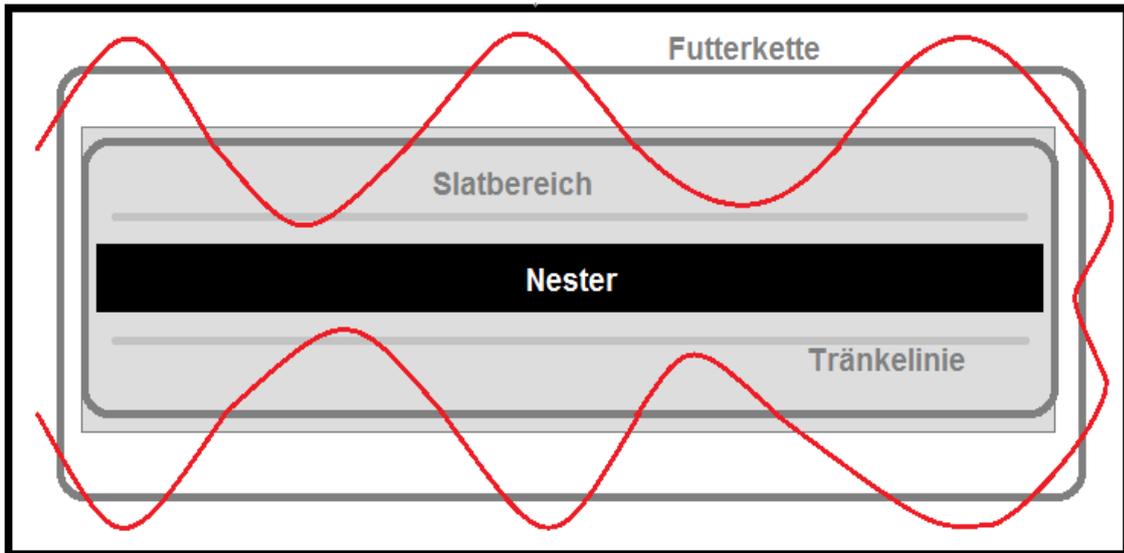


Abbildung 3: mäanderförmiges Ablaufen des Stalls mit Sockentupfern (schematisch)



Abbildung 4 (a-c): Ablauf der Probenahme Sockentupfer



**Abbildung 5:** Probenmaterial zur Sicherung der Feldproben

**a)** Sockentupfer (Baretthauben), **b)** Polyethylenbeutel mit Druckverschluss und Beschriftungsfeld in verschiedenen Größen, **c)** Wischtuch zum Auswischen der Transportkäfige, **d)** Abstrichtupfer zum Auffangen des Blinddarmkots, **e)** sterile Metallwatteträger mit kleinem Kopf



**Abbildung 6 (a+b):** Ablauf der Probenahme Blinddarmtupfer

### 3.2.3 DNA-Extraktion

Die Extraktion der DNA erfolgte in Anlehnung an das von Hafez et al. (2005) publizierte Protokoll, wobei die Anzahl der Umdrehungen beim Zentrifugieren aus technischen Gründen modifiziert wurde. Die Umdrehungszahl zwischen den Waschschrritten wurde von 6000 auf 9000 rpm erhöht, die Zentrifugation nach der zweiten Waschung des Filtrats erfolgte bei 13.000 rpm statt bei 19.000 rpm. Die DNA-Extraktion wurde manuell mittels QIAamp DNA Mini Kit durchgeführt, wobei maximal 20 Extraktionen parallel bei Raumtemperatur erfolgten. Zur Sicherung der Qualität wurde pro 20 Extraktionsansätzen mindestens eine DNA-Extraktionsnegativkontrolle mitgeführt. Mit Ausnahme der Zeiträume des Vortexens, der Zentrifugation sowie der Inkubation im Wärme-Trockenbad fanden alle Arbeitsschritte unter einer Sicherheitswerkbank statt. Das Tragen von arbeitsraumspezifischer Laborkleidung war obligatorisch.

#### 3.2.3.1 Extraktion aus Blinddarmtupfern

Ein Blinddarmtupfer-Pool, bestehend aus je vier Blinddarmtupfern, wurde in 1 ml PBS aufgenommen. Die Aluminiumstäbe des Tupfers wurden dazu mittels einer sterilen Zange auf 3 cm gekürzt. Im Anschluss wurde die Probe 60 s gevortext. Nach diesem Schritt wurden 200 µl der Tupferaufschwemmung aus dieser Lösung in ein Safe-Lock-Zentrifugengefäß übertragen, die übrig gebliebene Lösung wurde als Rückstellprobe einbehalten, beschriftet und bei -20 °C eingefroren. Das entnommene Probenmaterial wurde mit 200 µl Puffer AL sowie 20 µl Proteinase K gemischt und 15 s gevortext. Im Anschluss wurde die Probe zwei Stunden im Wärme-Trockenbad bei 56°C und danach 10 min bei 70°C inkubiert. Innerhalb der zweistündigen Inkubationszeit wurde die Probe in Abständen von 20 min jeweils 15 s gevortext. Nachfolgend wurde die Probe anzentrifugiert und 200 µl EtOH abs. hinzugefügt. Mittels erneutem Vortexen und Anzentrifugieren wurde eine ausreichende Durchmischung der Probe sichergestellt. Im Anschluss wurde der gesamte Ansatz auf eine QIAamp Mini Spin-Säule pipettiert und 1 min bei 9000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und die QIAamp Mini Spin-Säule auf ein neues Sammelgefäß gesetzt. Im Anschluss wurden 500 µl AW1 addiert, Säule und Sammelröhrchen 1 min bei 9000 rpm zentrifugiert, das Filtrat erneut verworfen und die Säule auf ein neues Sammelgefäß gesetzt. Nach diesem Schritt erfolgte eine zweite Waschung mittels 500 µl AW2 und eine dreiminütige Zentrifugation bei 13.000 rpm. Erneut wurde das Filtrat verworfen. Um die DNA zu eluieren, wurde die Säule auf ein 1,5 ml Safe-Lock-Zentrifugengefäß umgesetzt, 100 µl AE-Puffer addiert, die Probe 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 1 min bei 9000 rpm zentrifugiert. Die aus dem Probenmaterial isolierte DNA wurde bis zur weiteren Untersuchung bei -20°C gelagert.

### 3.2.3.2 Extraktion aus Sockentupfern

Ein Sockentupfer-Pool, bestehend aus zwei Sockentupfern, wurde, in Abhängigkeit von der anhaftenden Kot- und Einstreumenge, in 50 bis 100 ml PBS aufgenommen. Durch ausgiebiges Massieren der Probe von außen wurde eine ausreichende Durchmischung von PBS und Einstreumaterial bzw. Kot sichergestellt. Anschließend wurden auch hier 200 µl des Kulturmaterials in ein steriles Safe-Lock-Zentrifugengefäß pipettiert. Die folgenden Arbeitsschritte fanden analog zu Punkt 3.2.3.1 statt.

### 3.2.3.3 Extraktion aus Wischproben

Die Wischproben wurden, in Abhängigkeit von der außen anhaftenden Kotmenge, in 50 bis 100 ml PBS aufgenommen. Durch ausgiebiges Massieren der Probe von außen wurde eine ausreichende Durchmischung von PBS und Kot sichergestellt. Auch hier wurde anschließend 200 µl des Kulturmaterials in ein steriles Safe-Lock-Zentrifugengefäß pipettiert und analog zu Punkt 3.2.3.1 verfahren.

### 3.2.4 Real-time PCR (qPCR)

Bei der in dieser Arbeit eingesetzten PCR handelte es sich um eine Real-time PCR (quantitative PCR, qPCR) mit den von Hauck und Hafez (2012) veröffentlichten Primer-Sequenzen HmqF2 und HmqR, die ein Fragment mit einer Größe von 87 bp amplifizierten (Tab. 8) sowie der dort beschriebenen FAM-markierten Sonde HmQs (Tab. 9).

Für die PCR wurden 12,5 µl QuantiTect Probe PCR Master Mix, jeweils 10 pmol/µl der Primer HmqF2 und HmqR, 5 pmol/µ der Sonde sowie 5µl Eluat aus der DNA-Extraktion addiert und mittels nukleasefreiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 25 µl gebracht. Dazu erfolgte die Zugabe der DNA in einem separaten Raum mit separater Arbeitskleidung, alle Arbeitsschritte wurden unter einer Sicherheitswerkbank auf gefrorenen Thermoblöcken durchgeführt. Zur weiteren Sicherung der Qualität wurden PCR-Negativkontrollen mitgeführt.

Für den Nachweis der DNA von *H. meleagridis* wurde der C1000 Touch® Thermal Cycler (BIO-RAD, Labs Hercules, CA) verwendet. In Bezug auf das Temperaturprotokoll ergaben sich leichte Abweichungen (Tab. 10).

**Tabelle 8:** Überblick über die in der qPCR verwendeten Primer (Hauck und Hafez 2012)

Name des Primers	Orientierung	Sequenz	Amplikon
HmqF2	vorwärts	5'-ccg tga tgt cct tta gat gc-3'	87 bp
HmqR	rückwärts	5'-gat ctt ttc aaa tta gct tta aat tat tc-3'	

**Tabelle 9:** In der qPCR verwendete Sonde (Hauck und Hafez 2012)

Name der Sonde	Sequenz
HmQs	ctg cac gcg cgc tac aat gtt aaa

**Tabelle 10:** Temperaturprofil des Thermocyclers

Histomonaden qPCR	Temperaturprofil Thermocycler Labor MMT (42 Zyklen)		Temperaturprofil nach Hauck und Hafez 2012 (45 Zyklen)	
	Zeit	Temperatur	Zeit	Temperatur
Initiale PCR	15 min	95°C	15 min	95°C
Denaturierung	45 s	94°C	60 s	94°C
Annealing	30 s	52°C	30 s	50°C
Extention	45 s	60°C	30 s	60°C

### 3.2.5 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS 25 (IBM Statistics). In einem ersten Schritt wurden die vorliegenden Daten grafisch und analytisch auf Normalverteilung getestet. Für die analytische Diagnose wurde der Shapiro-Wilk-Test herangezogen und aufgrund seiner höheren Teststärke dem Kolmogorov-Smirnov-Test vorgezogen. In Abhängigkeit von Messniveau, Ergebnis des Tests auf Normalverteilung und der Fragestellung wurden weitere Tests durchgeführt, die unter den entsprechenden Unterpunkten erläutert sind. Eine Übersicht zu allen Fragestellungen ist Tabelle 11 zu entnehmen.

In allen Fällen, in denen die qPCR-Ergebnisse binär skaliert verwendet wurden, gilt, dass Ergebnisse mit einem Ct-Wert  $\leq 39,99$  als positiv und Ergebnisse mit einem Ct-Wert  $\geq 40,00$  als negativ eingestuft wurden. Um diese Einstufung vornehmen zu können, wurden an der

Freien Universität Berlin im Vorfeld acht der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Eluate aus der DNA-Extraktion (Ct-Werte zwischen 20,89 und 41,07) mittels der von Hafez et al. (2005a) publizierten konventionellen und nested-PCR untersucht und die Ergebnisse mit denen der hier verwendeten qPCR verglichen (Daten nicht veröffentlicht). Dabei zeigte sich, dass ein positiver DNA-Nachweis in der konventionellen und nested-PCR nach Hafez et al. (2005a) nur bei Proben gelang, deren Untersuchung mittels der in dieser Arbeit beschriebenen qPCR Ct-Werte  $< 40,18$  erbracht hatte. Gestützt von praxisinternen Erfahrungen, dass bei Mastelterntieren schwach positive DNA-Nachweise mit Ct-Werten  $> 40,00$  tendenziell nur eine geringe klinische Relevanz zu haben scheinen, wurde der Cut-off-Wert bei Ct 40,00 gesetzt.

**Tabelle 11:** Übersicht über die statistischen Methoden mit Fragestellungen

Statistische Methode	Fragestellung	Test	Ergebnisse
-	Untersuchungen zum Infektionszeitpunkt	Deskriptiv	4.1
3.2.5.1.1	Hat die Jahreszeit einen statistisch signifikanten Einfluss auf das Ergebnis der Histomonaden-qPCR?	Chi-Quadrat-Test	4.2.1
3.2.5.1.2	Hat die Herkunft des Tränkewassers einen statistisch signifikanten Einfluss auf das Ergebnis der Histomonaden-qPCR?	Chi-Quadrat-Test	4.2.2
3.2.5.1.3	Hat die Region, in der sich der Betrieb befand, einen statistisch signifikanten Einfluss auf das Ergebnis der Histomonaden-qPCR?	Chi-Quadrat-Test	4.2.3
3.2.5.1.3	Zwischen welchen Regionen bestehen statistisch signifikante Unterschiede in den Ct-Werten?	Kruskal-Wallis-Test (H-Test)	4.2.3
3.2.5.1.4	Hat die Herkunft des Tieres einen statistisch signifikanten Einfluss auf das Ergebnis der Histomonaden-qPCR?	Chi-Quadrat-Test	4.2.4
3.2.5.1.5	Stimmen die qPCR-Ergebnisse von Blinddarm- und Sockentupfern überein?	Kappa-Koeffizient nach Cohen	4.2.5
3.2.5.2.1	Korreliert ein positiver DNA-Nachweis in den Blinddarmtupfern mit dem Sektionsbefund Typhlitis?	Deskriptiv	4.3.1
3.2.5.2.2	Korreliert ein positiver DNA-Nachweis in den Blinddarmtupfern mit dem Sektionsbefund Polyserositis?	Kappa-Koeffizient nach Cohen	4.3.2
3.2.5.2.2	Korreliert ein positiver DNA-Nachweis in den Sockentupfern mit dem Sektionsbefund Polyserositis?	Spearman-Rangkorrelation	4.3.2
3.2.5.3	Hat der Nachweis von <i>H. meleagridis</i> -DNA mittels qPCR einen Einfluss auf den Produktionsparameter Legeleistung Gelege?	Spearman-Rangkorrelation	4.4.1
3.2.5.3	Hat der Nachweis von <i>H. meleagridis</i> -DNA mittels qPCR einen Einfluss auf den Produktionsparameter Abgänge?	Spearman-Rangkorrelation	4.4.2

### 3.2.5.1 Untersuchung der Einflussfaktoren

#### 3.2.5.1.1 Probenahmezeitpunkt

Zur Überprüfung, inwieweit der Probenahmezeitpunkt einen Einfluss auf das Ergebnis der qPCR hatte, wurden alle PCR-Ergebnisse anhand des Cut-off-Wertes in positiv und negativ sowie alle Zeitpunkte in vier Jahreszeiten klassiert:

- Frühjahr (März bis Mai),
- Sommer (Juni bis August),
- Herbst (September bis November)
- Winter (Dezember bis Februar).

Da es sich um unverbundene Stichproben sowie kategoriale, nicht-normalverteilte Daten handelte und für die Ergebnisse der Blinddarm- und Sockentupfer keine der erwarteten Zelhäufigkeiten kleiner waren als 5, wurde zur Klärung dieser Fragestellung der Chi-Quadrat-Test mit einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  gewählt. Dieser wurde sowohl zwischen Probenahmezeitpunkt und qPCR-Ergebnissen der Blinddarmtupfer als auch zwischen Probenahmezeitpunkt und qPCR-Ergebnissen der Sockentupfer durchgeführt. Zur Überprüfung eines Einflusses des Probenahmezeitpunktes auf das qPCR-Ergebnis der Wischproben wurde der Fisher's Exact Test gewählt, da mehr als 25 % der Zellen eine erwartete Häufigkeit kleiner als 5 hatten (83,3 %). Bei beiden Tests lautete die Nullhypothese  $H_0$ , dass es zwischen den Variablen Jahreszeit und qPCR-Ergebnissen keinen systematischen Zusammenhang gibt. Die Alternativhypothese  $H_1$  hingegen würde bedeuten, dass beide Variablen voneinander abhängig sind.

#### 3.2.5.1.2 Tränkewasser

Für die Untersuchung, ob die Art des Tränkewassers (Brunnenwasser vs. Stadtwasser) das qPCR-Ergebnis von Blinddarm- und Sockentupfern beeinflusst, wurde ebenfalls der Chi-Quadrat-Test herangezogen. Es handelte sich, nach Klassierung der qPCR-Ergebnisse analog zu Punkt 3.2.5, um binär skalierte, nicht-normalverteilte Daten und unverbundene Stichproben, die erwarteten Zelhäufigkeiten waren größer 5. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  festgelegt. Die Formulierung der Nullhypothese  $H_0$  und Alternativhypothese  $H_1$  wurde analog zu Punkt 3.2.5.1.1 durchgeführt.

Die qPCR-Ergebnisse der Wischproben wurden nicht mit in die Auswertung einbezogen, da sich diese Fragestellung auf den Einfluss des Tränkewassers in der Produktionsfarm bezog und die Wischproben schon zu einem Zeitpunkt genommen wurden, in dem die Tiere noch nicht in diesem Stall eingestallt waren. Gleiches galt für die ersten Blinddarmtupfer, die am

Einstellungstag unmittelbar nach Transport vom Aufzucht- in den Produktionsbetrieb gezogen wurden. Auch diese qPCR-Ergebnisse wurden nicht mit in die Auswertung einbezogen.

### 3.2.5.1.3 Region

Für die Untersuchung, inwieweit sich die qPCR-Ergebnisse der Blinddarm- und Sockentupfer zwischen den Regionen Mecklenburg-Vorpommern, Sachsen-Anhalt und Thüringen unterscheiden, wurde in einem ersten Schritt ebenfalls der Chi-Quadrat-Test angewandt. Es handelte sich, nach Klassierung der qPCR-Ergebnisse analog zu Punkt 3.2.5, um binär skalierte, nicht-normalverteilte Daten und unverbundene Stichproben, die erwarteten Zellhäufigkeiten waren größer 5. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  festgelegt. Die Formulierung der Nullhypothese  $H_0$  und Alternativhypothese  $H_1$  wurde analog zu Punkt 3.2.5.1.1 durchgeführt.

Da die ersten Blinddarmtupfer am Einstellungstag unmittelbar nach Transport vom Aufzucht- in den Produktionsbetrieb gezogen wurden und zu diesem Zeitpunkt die Region, in der sich die Produktionsfarm befand, noch keinen Einfluss auf die Tiere gehabt haben konnte, wurden diese qPCR-Ergebnisse nicht mit in die Auswertung einbezogen.

In einem zweiten Schritt wurde mithilfe von paarweisen Vergleichen im Kruskal-Wallis-Test überprüft, zwischen welchen der drei Bundesländer ein Unterschied in den qPCR-Ergebnissen besteht. Im Anschluss wurde die Effektstärke berechnet. Dazu wurde der z-Wert (Standardteststatistik) durch die Wurzel der Stichprobengröße geteilt. Der Kruskal-Wallis-Test ist ein Test für nicht-normalverteilte Daten, der die Mittelwerte bei mehr als zwei unabhängigen Stichproben vergleicht und dafür Ränge anstatt tatsächlicher Werte nutzt. Für die Durchführung dieses Tests wurden die tatsächlichen Ct-Werte der qPCR-Ergebnisse verwendet, wobei alle qPCR-Ergebnisse mit einem Ct-Wert  $\geq 40,00$  als negativ bewertet und ausgeschlossen wurden. Die Nullhypothese  $H_0$  des Kruskal-Wallis-Tests geht von gleichen bzw. ähnlichen mittleren Rängen aus, die Alternativhypothese  $H_1$  demzufolge von unterschiedlichen mittleren Rängen. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,05$  galt, dass  $H_0$  abgelehnt wird, wenn  $p < \alpha$ . Zur Verhinderung der Alpha-Fehler Kumulierung durch multiples Testen wurde eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt.

### 3.2.5.1.4 Herkunft der Tiere

Um zu überprüfen, ob sich die qPCR-Ergebnisse von Blinddarm- und Sockentupfern zwischen den beiden Herkünften A und B unterscheiden, wurde ein Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Da

es sich, nach Klassierung der qPCR-Ergebnisse analog zu Punkt 3.2.5, um binär skalierte, nicht-normalverteilte Daten und unverbundene Stichproben handelte und die erwarteten Zellhäufigkeiten größer 5 waren, wurde dieser Test gewählt. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  festgelegt. Zur Überprüfung eines Einflusses der Herkunft der Tiere auf die qPCR-Ergebnisse der Wischproben wurde der Fisher's Exact Test gewählt, da mehr als 25 % der Zellen eine erwartete Häufigkeit kleiner als 5 hatten (50 %). Die Formulierung der Nullhypothese  $H_0$  und Alternativhypothese  $H_1$  wurde analog zu Punkt 3.2.5.1.1 durchgeführt.

### 3.2.5.1.5 Probenmaterial

In der vorliegenden Arbeit wurden je Probenahmezeitpunkt sowohl Blinddarmtupfer von Einzeltieren ( $n=2$  je Betrieb) als auch Sockentupfer als Probenmaterial für die Histomonaden-qPCR genutzt. Um einen Hinweis auf die Eignung der Probenmaterialien für den Nachweis von *H. meleagridis* zu erhalten, wurden für beide Probearten die prozentualen Anteile der positiven Proben an der Gesamtzahl der Proben berechnet.

Des Weiteren wurde überprüft, inwieweit die Ergebnisse der qPCR in Bezug auf Blinddarm- und Sockentupfer übereinstimmen. Dazu wurde der Kappa-Koeffizient nach Cohen berechnet, der die Interraterreliabilität zweier verbundener, kategorialer Stichproben misst. Kappa ( $\kappa$ ) drückt dabei das Verhältnis zwischen der zufällig erwarteten Übereinstimmung und der tatsächlich beobachteten Übereinstimmung aus (zufallskorrigierte Übereinstimmung). Bei  $\kappa = 1$  liegt eine vollkommene Übereinstimmung vor, bei  $\kappa = 0$  entspricht die Übereinstimmung der erwarteten zufälligen Übereinstimmung. Die Nullhypothese  $H_0$  lautet, dass  $\kappa = 0$ , die Alternativhypothese  $H_1$  besagt, dass  $\kappa > 0$ . Für diese Berechnung wurden die qPCR-Ergebnisse binär skaliert. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  festgelegt.

Im nächsten Schritt wurde der McNemar-Test durchgeführt. Dieser vergleicht zwei verbundene Stichproben hinsichtlich eines dichotomen Merkmals, wobei dieser Test nur die diskordanten Merkmalspaare (Nichtübereinstimmungen) betrachtet.  $H_0$  geht somit von Übereinstimmungen zweier Prüfgrößen aus, während  $H_1$  einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen ihnen darstellt. Auch hier wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  festgelegt.

### 3.2.5.2 Untersuchung der Korrelation von qPCR-Ergebnissen und Sektionsbefunden

#### 3.2.5.2.1 Zusammenhang zwischen positiven qPCR-Ergebnissen und Typhlitis

Um zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen einem positiven qPCR-Ergebnis und dem Auftreten einer Typhlitis in Bezug auf die beiden Herkünfte der Tiere (A vs. B) besteht, wurde in einem ersten Schritt der prozentuale Anteil an Blinddarmentzündungen an den Sektionsbefunden berechnet. Dazu standen zwei Datensätze zur Verfügung. Zum einen

handelte es sich um die Sektionsergebnisse der mittels Blinddarmpuffer beprobten Tiere ( $n = 380$ ), zum anderen um die Sektionsergebnisse, die im entsprechenden Stall über den gesamten Beobachtungszeitraum im Rahmen routinemäßiger Bestandsbesuche erhoben worden waren ( $n = 787$ ).

Da der prozentuale Anteil an Sektionen, in denen eine Typhlitis festgestellt werden konnte, sowohl in Bezug auf das Einzeltier als auch in Bezug auf den gesamten Stall sehr gering war, wurde auf die Durchführung statistischer Berechnungen verzichtet.

### **3.2.5.2.2 Zusammenhang zwischen positiven qPCR-Ergebnissen und Polyserositis**

Für die Überprüfung, inwieweit ein Zusammenhang zwischen positiven qPCR-Ergebnissen und dem Auftreten einer Polyserositis in Bezug auf die beiden Herkünfte der Tiere (A vs. B) besteht, wurden zwei Berechnungen durchgeführt.

Zum einen sollte festgestellt werden, ob das qPCR-Ergebnis der Blinddarmpuffer mit dem Sektionsbefund Polyserositis korrelierte. Dazu wurden lediglich die Sektionsbefunde genau jener Tiere in die Berechnung einbezogen, die mittels Blinddarmpuffer beprobt worden waren ( $n = 2$  je Probenahmezeitpunkt). Zur Klärung dieser Fragestellung wurden die Ergebnisse der qPCR sowie der zu diesen Tieren gehörige Sektionsbefund in Bezug auf eine Polyserositis binär skaliert und anschließend der Kappa-Koeffizient nach Cohen als Maß für die Übereinstimmung zweier kategorialer Variablen berechnet. Hintergründe zur Interpretation der Kappa-Statistik sind Punkt 3.2.5.1.5 zu entnehmen.

Zum anderen wurde überprüft, ob eine Korrelation zwischen den qPCR-Ergebnissen der Sockentupfer und dem Sektionsbefund Polyserositis besteht. Dazu wurden für jeden Betrieb die Ct-Werte der qPCR-Ergebnisse der Sockentupfer aufsummiert. Des Weiteren wurde für jeden Betrieb der prozentuale Anteil einer Polyserositis an allen über den gesamten Beobachtungszeitraum erhobenen Sektionsbefunden berechnet, wobei dieser Wert auch Tiere enthält, bei denen eine Eileiter-Bauchfell-Entzündung festgestellt wurde. Im Anschluss wurde zwischen der Summe der Ct-Werte (Sockentupfer) und dem prozentualen Anteil einer Polyserositis für beide Herkünfte eine Spearman-Rangkorrelation durchgeführt.

Die Spearman-Rangkorrelation ist ein Test für mindestens ordinal skalierte Daten (paarweise Beobachtungen), der anhand von Rängen die Stärke eines monotonen Zusammenhangs zwischen zwei Variablen schätzt. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman  $\rho$  ist definiert zwischen -1 und +1, wobei ein Wert von +1 einen perfekten positiven und -1 einen perfekten negativen Zusammenhang zwischen zwei Variablen beschreibt. Bei beiden Berechnungen wurde als Signifikanzniveau  $p < 0,05$  festgelegt.

### 3.2.5.3 Untersuchung der Korrelation von qPCR-Ergebnissen und Produktionsparametern (Legeleistung Gelege und Abgänge)

Für die Überprüfung, ob ein positiver DNA-Nachweis von *H. meleagridis* in der qPCR während eines Produktionsdurchganges einen Einfluss auf die Höhe der Abgänge oder die Legeleistung in Bezug auf das Gesamtgelege hat, wurde ebenfalls eine Spearman-Rangkorrelation durchgeführt. Die entsprechenden Voraussetzungen für diesen Test können dem Punkt 3.2.5.2.2 entnommen werden.

Für die Berechnung wurden zum einen für jeden Betrieb die Ct-Werte der qPCR-Ergebnisse der Sockentupfer und der Blinddarmtupfer getrennt voneinander aufsummiert, wobei alle negativen qPCR-Ergebnisse aufgrund des festgelegten Cut-off-Wertes von 40,00 mit einem Ct-Wert von 40,00 gleichgesetzt wurden. Des Weiteren wurde von den kumulierten Abgängen der jeweiligen Lebenswochen (*Abgänge kum. in % POL*) der entsprechende Wert des Integrationsstandards abgezogen und so eine Differenz gebildet (*Abweichung Abgänge kum. % POL*). Diese Abweichungs-Werte wurden anschließend aufsummiert. Analog dazu geschah dies auch mit den Daten für die *Legeleistung Gelege % Resthenne*. Auch hier wurde von der Legeleistung (beobachteter Wert) jeweils der Integrationsstandard aus der entsprechenden Lebenswoche abgezogen, eine Differenz gebildet (*Abweichung Legeleistung Gelege % Resthenne*) und diese Differenzen anschließend aufsummiert. Sowohl die Summen der Ct-Werte von Socken- und Blinddarmtupfern (Tab. 35) als auch die Summen der Abweichungen von Gelege und Abgängen (Tab. 16 bis 34) sind dem Anhang zu entnehmen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Untersuchungen zum möglichen Infektionszeitpunkt

Um den Infektionsstatus der Herden vor Einstellung in den Produktionsbetrieb zu überprüfen, wurde am Einstellungstag von den ersten fünf Transportkäfigen des ersten LKWs, der den Betrieb erreichte, mittels eines feuchten Lappens eine Sammel-Wischprobe genommen. Wie Tabelle 12 zeigt, konnte bei der Untersuchung dieser Proben mithilfe der qPCR bei drei Betrieben mit Tieren der Herkunft A (Betrieb 6, 9 und 10) sowie bei zwei Betrieben mit Tieren der Herkunft B (Betrieb 15 und 18) Histomonaden-DNA nachgewiesen werden. Die Ct-Werte dieser Wischproben bewegten sich in einem Bereich zwischen 27,32 und 39,36.

Des Weiteren wurden in jedem der Betriebe bei **zwei Tieren**, die aufgrund von Transportverletzungen gemerzt werden mussten, jeweils zwei Blinddarmtupfer genommen (n= 4 je Betrieb). In **Betrieb 6** konnte, zusätzlich zum Histomonaden-DNA Nachweis in der Wischprobe, auch am Blinddarmtupfer DNA von *H. meleagridis* detektiert werden (Ct-Wert 25,20). Auch in Betrieb 19 zeigte sich in der Untersuchung des Blinddarmtupfers ein positiver DNA-Nachweis (Ct-Wert 38,46), jedoch ergab die Untersuchung der zugehörigen Wischprobe in diesem Fall ein negatives Ergebnis (Tab. 12).

**Tabelle 12:** Ergebnisse der qPCR von Wischproben (WP) und Blinddarmtupfern (BDT) bei Einstellung in die Produktionsfarm getrennt nach Herkunft der Tiere

Betriebs-ID	Herkunft	Ct-Werte der qPCR bei Einstellung		Betriebs-ID	Herkunft	Ct-Werte der qPCR bei Einstellung	
		WP	BDT			WP	BDT
1	A	n.n.*	n.n.*	11	B	n.n.*	n.n.*
2	A	n.n.*	n.n.*	12	B	n.n.*	n.n.*
3	A	n.n.*	n.n.*	13	B	n.n.*	n.n.*
4	A	n.n.*	n.n.*	14	B	n.n.*	n.n.*
5	A	n.n.*	n.n.*	15	B	36,96	n.n.*
6	A	31,29	25,20	16	B	n.n.*	n.n.*
7	A	n.n.*	n.n.*	17	B	n.n.*	n.n.*
9	A	37,40	n.n.*	18	B	39,36	n.n.*
10	A	27,32	n.n.*	19	B	n.n.*	38,46
				20	B	n.n.*	n.n.*

\* DNA von *H. meleagridis* nicht nachgewiesen

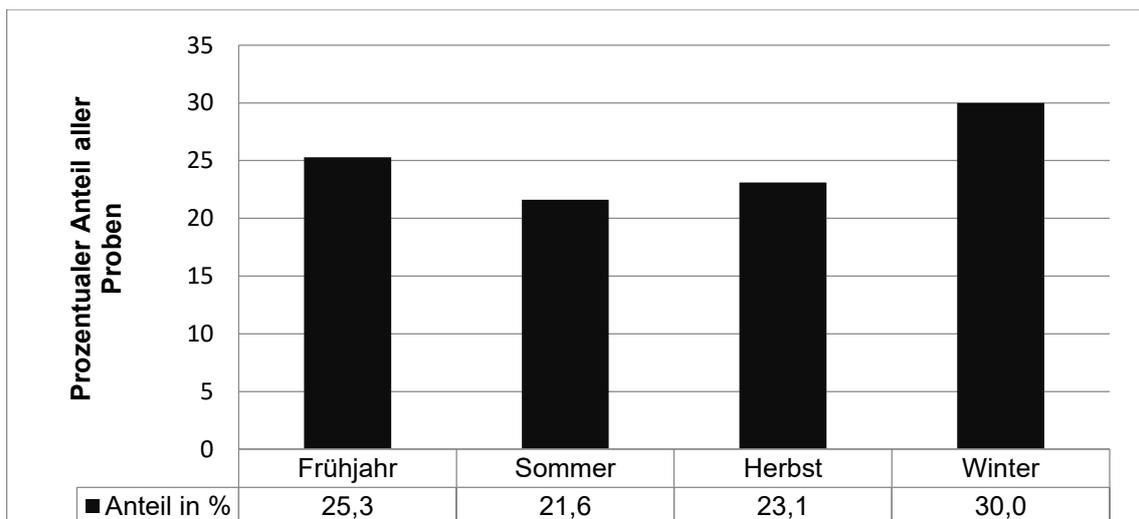
Somit zeigte sich, dass in gut einem Drittel der Betriebe (31,6 %) bereits am Tag der Einstellung in die Produktionsfarm DNA von *H. meleagridis* nachgewiesen werden konnte.

Von den 13 Betrieben, bei denen am Einstellungstag weder in den Blinddarmtupfern noch in den Wischproben Histomonaden-DNA nachgewiesen werden konnte, zeigte sich bei zehn Betrieben in der darauffolgenden Probenahme in der 24. Lebenswoche ein positiver Nachweis in den Blinddarm- oder Sockentupfern. Bei den Proben der verbleibenden drei Betriebe wurde bis spätestens zur 36. Lebenswoche Histomonaden-DNA detektiert. Eine detaillierte Aufstellung aller qPCR-Ergebnisse mit Angaben zu Probenart, Probenahmezeitpunkt und Ct-Werten ist Tabelle 35 im Anhang zu entnehmen.

### 4.2 Ergebnisse des Histomonaden-DNA Nachweises mittels qPCR in Bezug auf verschiedene Einflussfaktoren

#### 4.2.1 Probenahmezeitpunkt

Zur Überprüfung eines Einflusses der Probenahmezeitpunkte auf die qPCR-Ergebnisse wurde für die Wischproben der Fisher's Exact Test und für die Blinddarm- und Sockentupfer der Chi-Quadrat-Test berechnet. Die Probenahmezeitpunkte wurden dazu nach **Jahreszeiten** klassiert. Entsprechend Abbildung 7 ergab sich daraus, dass 25,3 % der Proben im Frühjahr (März bis Mai), 21,6 % im Sommer (Juni bis August), 23,1 % in den Herbstmonaten (September bis November) und 30 % der Proben im Winter (Dezember bis Februar) genommen wurden.

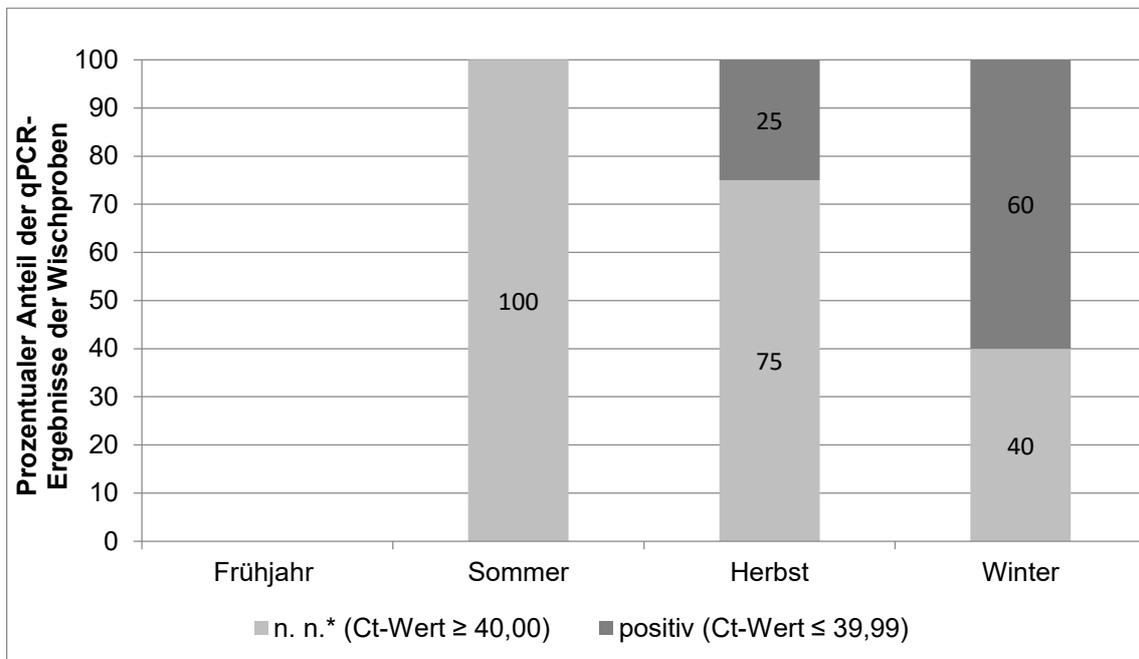


**Abbildung 7:** Prozentualer Anteil aller Proben (n = 380) in Bezug auf die Jahreszeiten Einteilung der Probenahmezeitpunkte: Frühjahr (März bis Mai), Sommer (Juni bis August), Herbst (September bis November), Winter (Dezember bis Februar)

## Ergebnisse

Das Ergebnis der Wischproben ergab  $c^2$  ( $n=19$ ) = 4,522,  $p = 0,082$ . Da  $p$  in diesem Fall  $> 0,05$  war, konnte die Nullhypothese nicht verworfen werden. Auch in Bezug auf die Blinddarmtupfer mit  $c^2$  (3,  $n=190$ ) = 5,556,  $p = 0,135$  und die Sockentupfer mit  $c^2$  (3,  $n=171$ ) = 4,327,  $p = 0,228$  konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden. In beiden Fällen lag die Signifikanz  $p$  bei  $> 0,05$ , weshalb  $H_0$  in beiden Fällen nicht abgelehnt wurde.

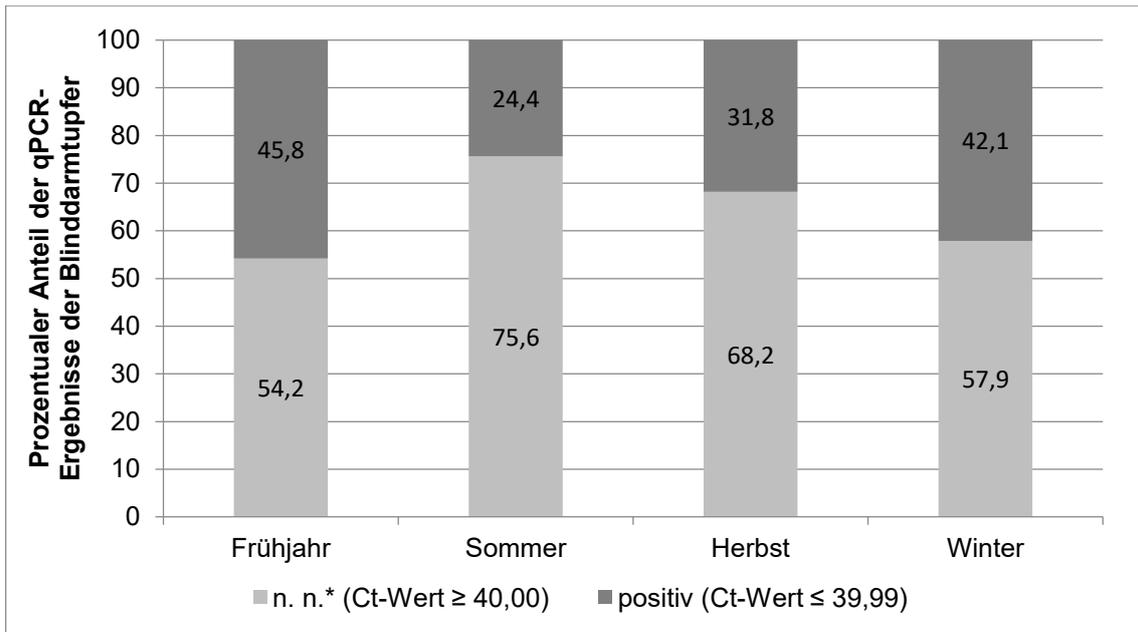
Es war somit festzustellen, dass die Jahreszeit, in der die Proben genommen wurden, keinen statistisch signifikanten Einfluss auf das qPCR-Ergebnis der Wischproben sowie Blinddarm- und Sockentupfer hatte. Nichtsdestotrotz zeigen die Abbildungen 8 bis 10, dass der prozentuale Anteil der positiven Histomonaden DNA-Nachweise bei Wischproben, Blinddarmtupfern und Sockentupfern jeweils im Sommer am niedrigsten war.



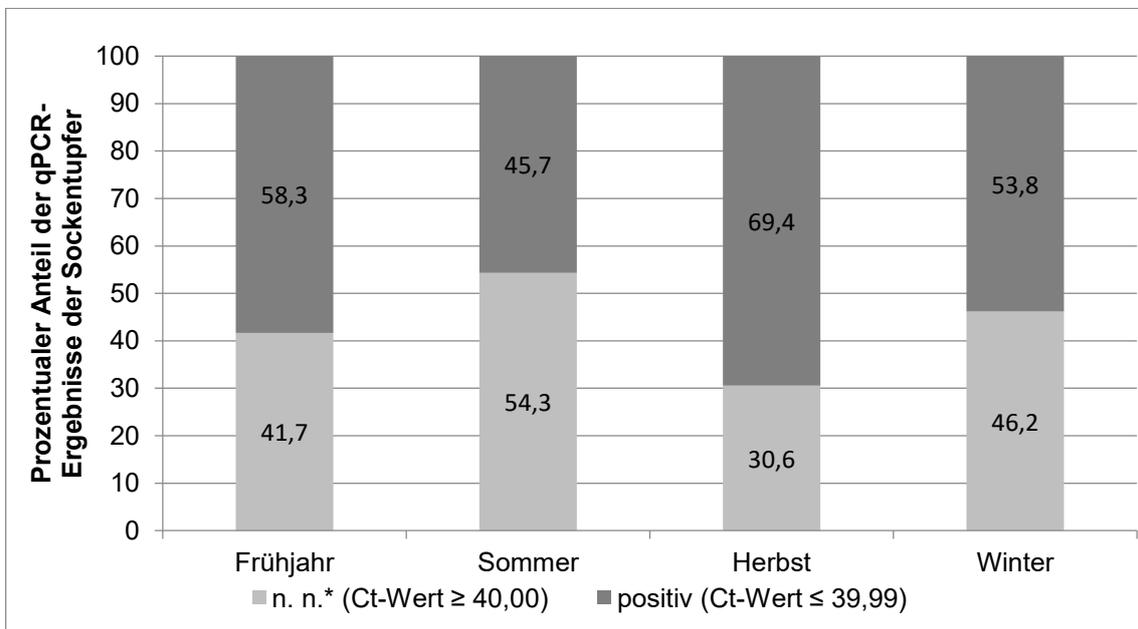
**Abbildung 8:** Prozentualer Anteil positiver und negativer qPCR-Ergebnisse der Wischproben ( $n = 19$ ) in Bezug auf die Jahreszeiten

(\* Histomonaden-DNA nicht nachgewiesen); im Frühjahr fanden keine Einstellungen statt, somit wurden in dieser Jahreszeit keine Wischproben genommen

## Ergebnisse



**Abbildung 9:** Prozentualer Anteil positiver und negativer qPCR-Ergebnisse der Blinddarmtupfer (n = 190) in Bezug auf die Jahreszeiten (\* Histomonaden-DNA nicht nachgewiesen)

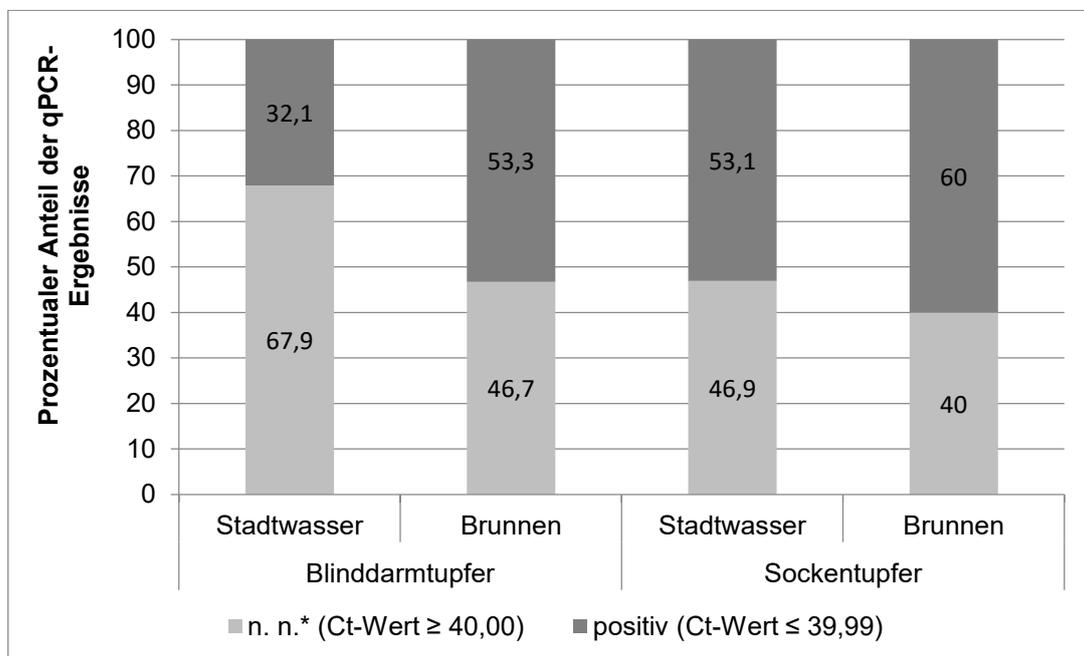


**Abbildung 10:** Prozentualer Anteil positiver und negativer qPCR-Ergebnisse der Sockentupfer (n = 171) in Bezug auf die Jahreszeiten (\* Histomonaden-DNA nicht nachgewiesen)

#### 4.2.2 Tränkwasser

Das in den Betrieben verwendete Tränkwasser entstammte bei zehn Betrieben einem **Brunnen**, bei neun Betrieben wurde es über einen **Stadtwasseranschluss** bezogen. Für die Untersuchung eines Einflusses des Tränkwassers auf das qPCR-Ergebnis von Blinddarm- und Sockentupfern wurde der Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Dieser erfolgte sowohl zwischen Tränkwasserherkunft und qPCR-Ergebnissen der Blinddarmtupfer als auch zwischen Tränkwasserherkunft und qPCR-Ergebnissen der Sockentupfer. Auch hier galt, dass  $H_0$  abgelehnt wird, wenn  $p < 0,05$ .

Als Ergebnis ergab sich für die Blinddarmtupfer  $\chi^2(1, n=171) = 3,777, p = 0,052$  und für die Sockentupfer  $\chi^2(1, n=171) = 0,830, p = 0,362$ . Da der Test in beiden Fällen keine signifikanten Unterschiede zwischen beobachteter und erwarteter Häufigkeit nachweisen konnte ( $p > 0,05$ ), wurde die Nullhypothese nicht abgelehnt. Zwischen der Herkunft des Tränkwassers in den Produktionsbetrieben (Brunnenwasser vs. Stadtwasser) und den qPCR-Ergebnissen der Blinddarm- und Sockentupfer wurde somit kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt. Dennoch zeigt Abbildung 11, dass sowohl in Bezug auf die Blinddarmtupfer als auch in Bezug auf die Sockentupfer der prozentuale Anteil der positiven Histomonaden DNA-Nachweise bei den Betrieben, die die Tiere mittels Brunnenwasser tränkten, höher war als bei den Betrieben, bei denen die Tiere mit Stadtwasser versorgt wurden.

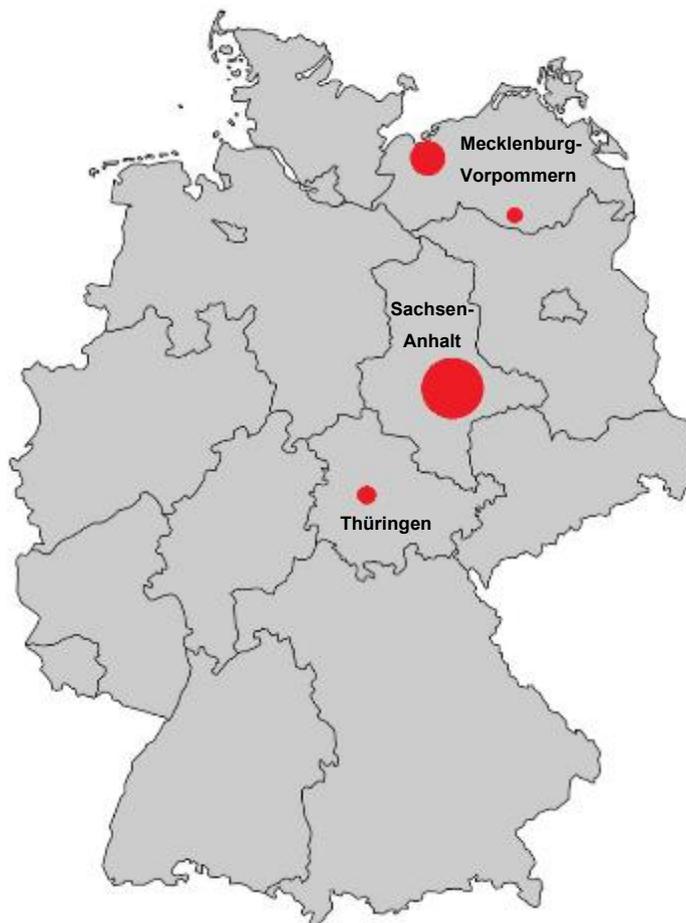


**Abbildung 11:** Prozentualer Anteil positiver und negativer qPCR-Ergebnisse (n = 342) in Bezug auf die Tränkwasserherkunft

(\* Histomonaden-DNA nicht nachgewiesen)

### 4.2.3 Region

Die geographische Verteilung der verschiedenen Betriebe umfasste 4 Betriebe in **Mecklenburg-Vorpommern**, 2 Betriebe in **Thüringen** und 13 Betriebe in **Sachsen-Anhalt**. Deren Lage kann Abbildung 12 entnommen werden, wobei die Betriebe innerhalb der eingezeichneten Kreise lokalisiert waren. Für die Untersuchung eines Zusammenhanges zwischen den Regionen und den qPCR-Ergebnissen von Blinddarm- und Sockentupfern wurde der Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Dieser erfolgte sowohl zwischen den Regionen und den qPCR-Ergebnissen der Blinddarmtupfer als auch zwischen Regionen und den qPCR-Ergebnissen der Sockentupfer. Auch hier galt, dass  $H_0$  abgelehnt wird, wenn  $p < 0,05$ .



**Abbildung 12:** Geographische Lage der Betriebe

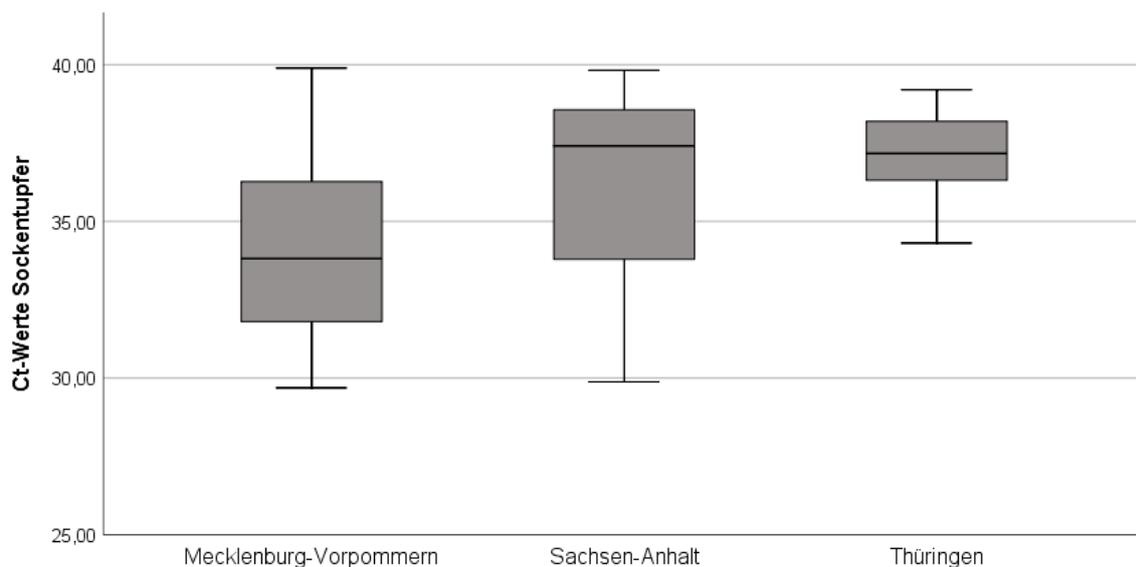
Als Ergebnis ergab sich für die Blinddarmtupfer  $\chi^2(2, n=171) = 0,418, p = 0,811$  und für die Sockentupfer  $\chi^2(2, n=171) = 9,079, p = 0,011$ . Da bei Gegenüberstellung von Region und Sockentupfern signifikante Unterschiede zwischen beobachteter und erwarteter Häufigkeit festgestellt werden konnten ( $p < 0,05$ ), wurde die Nullhypothese in diesem Fall abgelehnt. Das

## Ergebnisse

Ergebnis des Chi-Quadrat-Tests zeigte somit, dass sich die Wahrscheinlichkeit für einen positiven DNA-Nachweis mittels qPCR zwischen den Regionen signifikant voneinander unterschied.

Aufgrund des Ergebnisses des Chi-Quadrat-Tests wurde nun in einem zweiten Schritt untersucht, ob sich die Ct-Werte der qPCR-Ergebnisse der Sockentupfer zwischen den Regionen unterscheiden. Dazu wurde der Kruskal-Wallis-Test (H-Test) durchgeführt. Die Nullhypothese  $H_0$  des Kruskal-Wallis-Tests geht von gleichen bzw. ähnlichen mittleren Rängen aus, die Alternativhypothese  $H_1$  demzufolge von unterschiedlichen mittleren Rängen. Das Signifikanzniveau wurde für  $p < 0,05$  festgelegt. Die Ergebnisse des Tests zeigten, dass sich die Ct-Werte der qPCR-Ergebnisse der Sockentupfer zwischen den einzelnen Regionen statistisch signifikant voneinander unterschieden,  $\chi^2(2, n=171) = 10,389$ ,  $p = 0,006$ . Die Nullhypothese  $H_0$  konnte somit verworfen werden.

Paarweise Vergleiche im Anschluss zeigten, dass sich die Ct-Werte der qPCR der Sockentupfer in der Region Mecklenburg-Vorpommern statistisch signifikant von denen in Sachsen-Anhalt und Thüringen unterschieden. Zwischen Mecklenburg-Vorpommern und Sachsen-Anhalt ergab sich  $z = -2,951$ ,  $p = 0,010$ . Die Effektstärke  $r$  betrug 0,32. Zwischen Mecklenburg-Vorpommern und Thüringen ergab sich  $z = -2,454$ ,  $p = 0,042$  mit  $r = 0,39$ . Laut Cohen (1988) handelt es sich in beiden Fällen um mittlere Effektstärken ( $r = 0,3$  bis  $0,5$ ).



**Abbildung 13:** Vergleich der Ct-Werte der Histomonaden-qPCR (Sockentupfer,  $n = 171$ ) in Bezug auf die Region

## Ergebnisse

Das Ergebnis der paarweisen Vergleiche wird durch Abbildung 13 verdeutlicht. Der Median liegt im Fall von Mecklenburg-Vorpommern mit 33,81 niedriger als die Mediane von Sachsen-Anhalt (37,41) und Thüringen (37,17). Die beiden zuletzt genannten sind dabei ähnlich hoch. In Bezug auf die Interquartilsabstände zeigt sich jedoch eine Ähnlichkeit zwischen den Regionen Mecklenburg-Vorpommern und Sachsen-Anhalt. Bei beiden zeigt sich eine ähnlich große Streubreite der Ct-Werte der Histomonaden-qPCR. Diese beträgt in Mecklenburg-Vorpommern 4,97, in Sachsen-Anhalt 4,8. In Thüringen schwanken die Ct-Werte weniger deutlich, was durch einen geringeren Interquartilsabstand von 2,38 verdeutlicht wird. Auch die Darstellung der Whisker veranschaulicht die deutlich geringere Streuung der Ct-Werte der Histomonaden-qPCR in Thüringen. Des Weiteren zeigt Abbildung 13 eine nahezu symmetrische Verteilung der Ct-Werte in den Regionen Mecklenburg-Vorpommern und Thüringen, wohingegen in Sachsen-Anhalt eine rechtssteile Verteilung der Ct-Werte zu sehen ist.

**Tabelle 13:** Ausgewählte Lage- und Streuparameter der die Ct-Werte darstellenden Boxplots aus Abbildung 13

Lage- und Streuparameter	Mecklenburg-Vorpommern	Sachsen-Anhalt	Thüringen
Median	33,81	37,41	37,17
Minimum	29,69	29,88	34,31
Maximum	39,89	39,82	39,20
1.Quartil	31,39	33,79	36,19
3.Quartil	36,36	38,59	38,57
n*	28	58	11

(\* Anzahl der in die Berechnungen einbezogenen Ct-Werte von  $\leq 39,99$ )

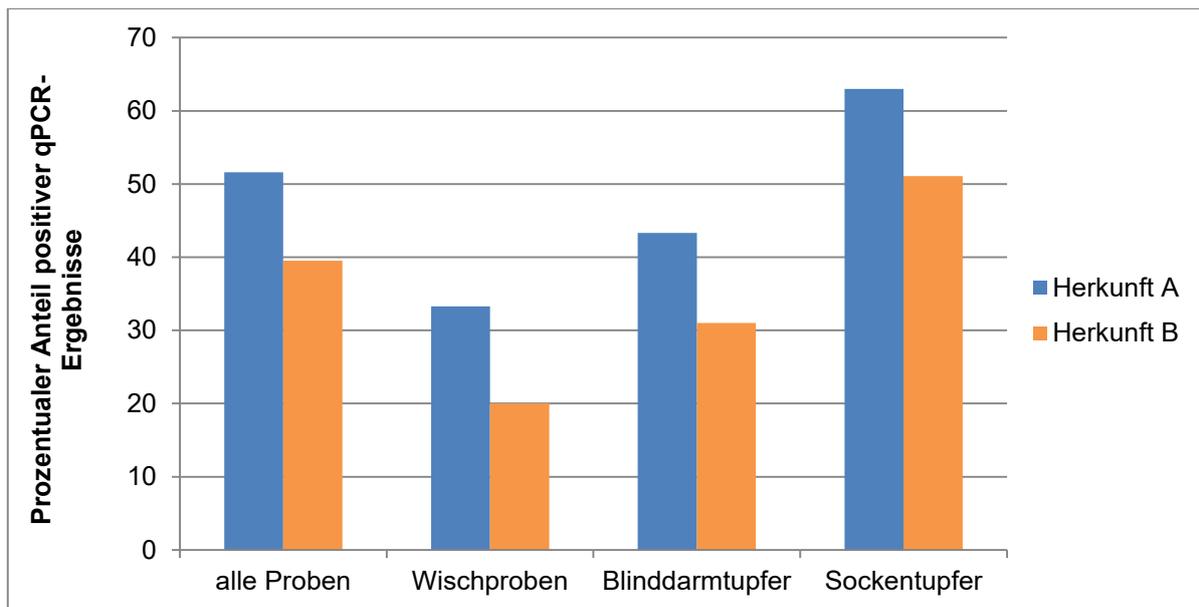
### 4.2.4 Herkunft der Tiere

Von den 19 Betrieben, deren Daten in die statistische Auswertung einbezogen wurden, handelte es sich um neun Betriebe mit Tieren der **Herkunft A**. In 51,7 % aller Proben dieser Herkunft konnte in der qPCR DNA von *H. meleagridis* nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu waren es bei den Tieren der **Herkunft B** 39,5 % der Proben, die ein positives qPCR-Ergebnis erbrachten (Abb. 14).

Für die Untersuchung, inwieweit die Herkunft der Tiere (**A vs. B**) einen Einfluss auf die qPCR-Ergebnisse der Wischproben hatte, wurde der Fisher's Exact Test gewählt. Die Berechnung ergab  $\chi^2 (n=19) = 0,434$ ,  $p = 0,628$ . Da  $p$  in diesem Fall  $> 0,05$  war, konnte die Nullhypothese nicht verworfen werden.

## Ergebnisse

In Bezug auf die Blinddarm- und Sockentupfer wurde der Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Auch hier galt, dass  $H_0$  abgelehnt wird, wenn  $p < 0,05$ . Zwischen beobachteter und erwarteter Häufigkeit konnten jedoch weder in Bezug auf die Blinddarmtupfer,  $\chi^2(1, n=190) = 3,097$ ,  $p = 0,078$  noch in Bezug auf die Sockentupfer  $\chi^2(1, n=171) = 2,439$ ,  $p = 0,118$  signifikante Unterschiede festgestellt werden. Da  $p > 0,05$  wurde die Nullhypothese auch in diesem Fall nicht abgelehnt. Hinsichtlich der beiden Herkünfte A und B bestand somit kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den qPCR-Ergebnissen, weder in Bezug auf die Wischproben noch in Bezug auf die Blinddarm- und Sockentupfer.



**Abbildung 14:** Prozentualer Anteil positiver qPCR-Ergebnisse getrennt nach Herkunft der Tiere (A vs. B) und Probenmaterial (n = 380)

### 4.2.5 Probenmaterial

Insgesamt konnte in 26,3 % der Wischproben, 36,8 % der Blinddarmtupfer und 56,7 % der Sockentupfer DNA von *H. meleagris* mittels qPCR nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich, dass die Streuung der Ct-Werte der Blinddarmtupfer um den Mittelwert größer war als die Streuung der Ct-Werte der Sockentupfer (Tab. 14).

Für die Überprüfung der Übereinstimmung der qPCR-Ergebnisse von Blinddarmtupfern und Sockentupfern wurde der Kappa-Koeffizient nach Cohen ( $\kappa$ ) berechnet. Dieser betrug  $\kappa = 0,101$  mit  $p = 0,163$ . Nach Altman (1991) handelt es sich hierbei um eine mangelhafte Übereinstimmung ( $0,00 > \kappa < 0,20$ ), die zudem nicht statistisch signifikant ist ( $p > 0,05$ ).

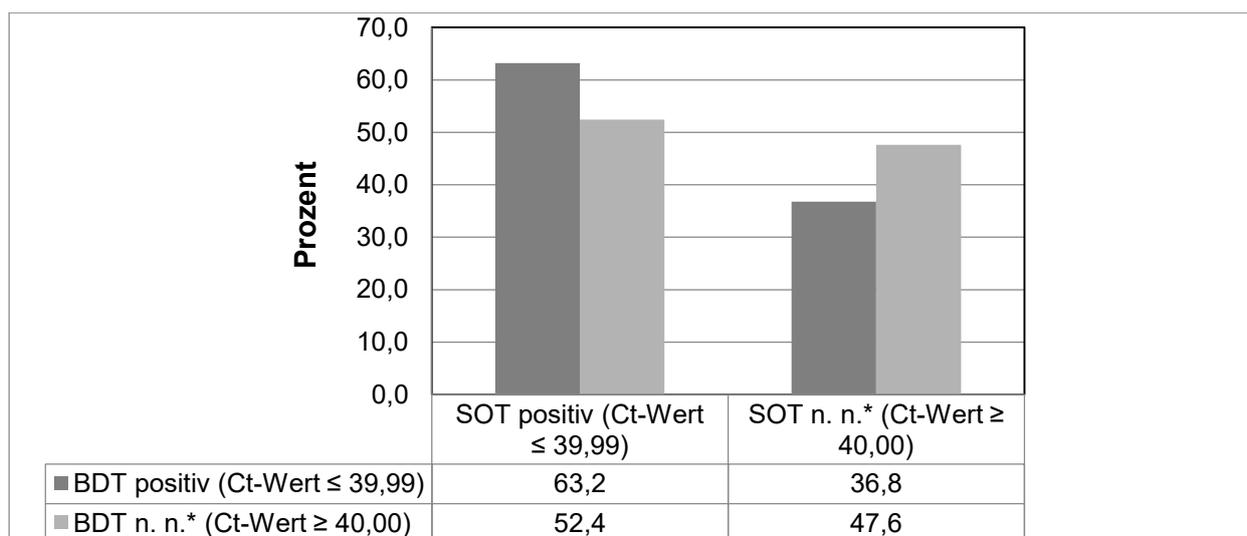
## Ergebnisse

**Tabelle 14:** Vergleich statistischer Maßzahlen in Bezug auf die Ct-Werte von Blinddarm- und Sockentupfern

Maßzahl	Ct-Wert Blinddarmtupfer	Ct-Wert Sockentupfer
Mittelwert	32,80	35,69
Median	34,19	36,09
Std.-Abweichung	5,17	3,06
Varianz	26,75	9,39
Minimum	21,43	26,69
Maximum	39,94	39,89
n *	70	97

(\* Anzahl der in die Berechnungen einbezogenen Ct-Werte mit  $\leq 39,99$ )

Im nächsten Schritt sollte mittels McNemar-Tests überprüft werden, ob sich die Ergebnisse der qPCR hinsichtlich der **Probenmaterialien** statistisch signifikant voneinander unterscheiden. Hier konnte die Nullhypothese  $H_0$ , die von einer Übereinstimmung der qPCR-Ergebnisse beider Probenmaterialien ausgeht, auf Basis einer Signifikanz von  $p = 0,001$  verworfen werden. Die Alternativhypothese  $H_1$ , die besagt, dass es statistisch signifikante Unterschiede in den Ergebnissen der qPCR in Bezug auf zwei verschiedene Probenmaterialien gibt, wurde angenommen. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Wahl des Probenmaterials einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit für einen positiven DNA-Nachweis mittels qPCR hatte und dass Histomonaden-DNA mittels Sockentupfern häufiger nachgewiesen werden konnte als mittels Blinddarmtupfern.



**Abbildung 15:** Gegenüberstellung positiver und negativer qPCR-Ergebnisse beider Probenmaterialien bei identischem Probenahmezeitpunkt in %

(\* Histomonaden-DNA nicht nachgewiesen; BDT = Blinddarmtupfer; SOT = Sockentupfer)

### 4.3 Zusammenhang zwischen qPCR-Ergebnissen und Sektionsbefunden

#### 4.3.1 Zusammenhang zwischen positiven qPCR-Ergebnissen und Typhlitis bezogen auf die Herkunft der Tiere

Bei Betrachtung aller Sektionsergebnisse der Tiere, bei denen Abstriche von den Blinddärmen für die Histomonaden-qPCR entnommen wurden (n = 380), konnte lediglich bei zwei Hennen der Herkunft A (0,5 %) eine makroskopisch sichtbare Typhlitis festgestellt werden (Abb. 16 und 17). In beiden Fällen wurde Histomonaden-DNA nachgewiesen (Ct-Wert ≤ 39,99). Andererseits konnte gezeigt werden, dass auch bei 36,2 % der Blinddarmpuffer, die von makroskopisch unauffälligen Blinddärmen entnommen wurden, DNA von *H. meleagridis* detektiert werden konnte.

Auch bei Betrachtung aller im Rahmen der tierärztlichen Betreuung routinemäßig erhobenen Sektionsbefunde während des Produktionszeitraumes (n = 787), ließ sich in Bezug auf eine Typhlitis nur ein geringer prozentualer Anteil feststellen. In Betrieb 1 betrug der prozentuale Anteil einer Typhlitis an allen Sektionsbefunden 1,6 %, in Betrieb 5 waren es 3,0 % und in Betrieb 10 lag der Anteil bei 2,5 % (Tab. 15). In allen drei Betrieben handelte es sich um weibliche Tiere der Herkunft A. In 16 Betrieben konnten zu keinem Zeitpunkt Blinddarmentzündungen bei den Sektionen festgestellt werden.

**Tabelle 15:** Prozentualer Anteil von Polyserositis und Typhlitis an allen über den Produktionszeitraum erhobenen Sektionsbefunden bis zur 56. Lebenswoche

Betriebs-ID	Herkunft	Polyserositis	Typhlitis	Anzahl Sektionsbefunde
1	A	26,2%	1,6%	61
2	A	31,0%	0,0%	42
3	A	8,7%	0,0%	23
4	A	7,1%	0,0%	28
5	A	24,2%	3,0%	33
6	A	22,2%	0,0%	45
7	A	19,6%	0,0%	46
9	A	9,6%	0,0%	52
10	A	27,5%	2,5%	40
11	B	10,2%	0,0%	59
12	B	34,4%	0,0%	32
13	B	40,9%	0,0%	66
14	B	17,1%	0,0%	41
15	B	7,8%	0,0%	51
16	B	32,3%	0,0%	31
17	B	10,7%	0,0%	28
18	B	16,3%	0,0%	43
19	B	30,0%	0,0%	40
20	B	7,7%	0,0%	26



**Abbildung 16:** Inhalt eines Blinddarms mit fibrinös-diphtheroider Typhlitis

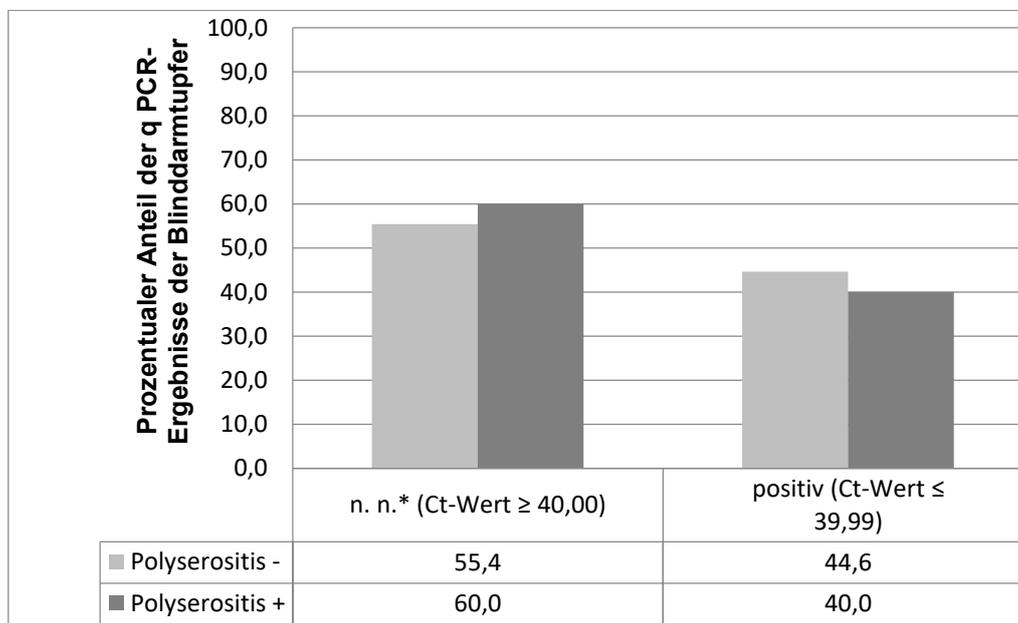


**Abbildung 17:** eröffneter Blinddarm mit fibrinös-diphtheroider Typhlitis

#### 4.3.2 Zusammenhang zwischen positiven qPCR-Ergebnissen und Polyserositis bezogen auf die Herkunft der Tiere

In allen untersuchten Mastelertier-Herden konnten im Rahmen der über den Produktionszeitraum hinweg durchgeführten Sektionen Polyserositiden festgestellt werden. Dabei schwankte der prozentuale Anteil an allen erhobenen Sektionsbefunden zwischen 7,1 % und 40,9 % (Tab. 15). Bei der Überprüfung, inwieweit ein Zusammenhang zwischen positiven qPCR-Ergebnissen und dem Auftreten einer Polyserositis in Bezug auf die Herkunft der Tiere (A vs. B) bestand, konnte festgestellt werden, dass der prozentuale Anteil von Tieren mit Polyserositis und positivem Histomonaden-DNA Nachweis in der qPCR mit 40,0 % bzw. 42,9 % bei beiden Herkünften ähnlich hoch war (Abb. 18 und 19).

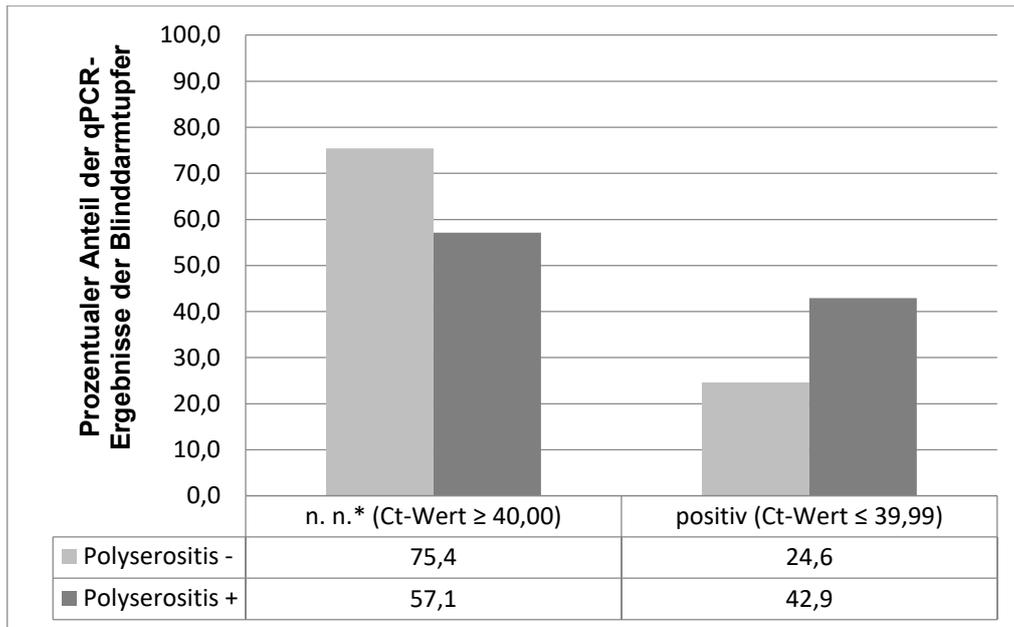
Für die statistische Überprüfung der Übereinstimmung positiver qPCR-Ergebnisse und dem Vorkommen einer Polyserositis wurden zwei Berechnungen durchgeführt. Zum einen sollte festgestellt werden, ob das qPCR-Ergebnis der Blinddarmtupfer mit dem Sektionsbefund Polyserositis korrelierte. Dazu wurde der Kappa-Koeffizient nach Cohen ( $\kappa$ ) für beide Herkünfte berechnet. Dieser betrug bei den Tieren der Herkunft A  $\kappa = -0,039$ ,  $p = 0,692$  und bei Tieren der Herkunft B  $\kappa = 0,187$ ,  $p = 0,060$ . In beiden Fällen handelt es sich nach Altman (1991) um eine mangelhafte Übereinstimmung ( $0,00 > \kappa < 0,20$ ), die zudem nicht statistisch signifikant war ( $p > 0,05$ ).



**Abbildung 18:** Prozentualer Anteil positiver und negativer qPCR-Ergebnisse der Blinddarmtupfer (n = 90) in Bezug auf das zeitgleiche Vorliegen einer Polyserositis bei Tieren der Herkunft A

(\* Histomonaden-DNA nicht nachweisbar)

## Ergebnisse



**Abbildung 19:** Prozentualer Anteil positiver und negativer qPCR-Ergebnisse der Blinddarmtupfer (n = 100) in Bezug auf das zeitgleiche Vorliegen einer Polyserositis bei Tieren der Herkunft B

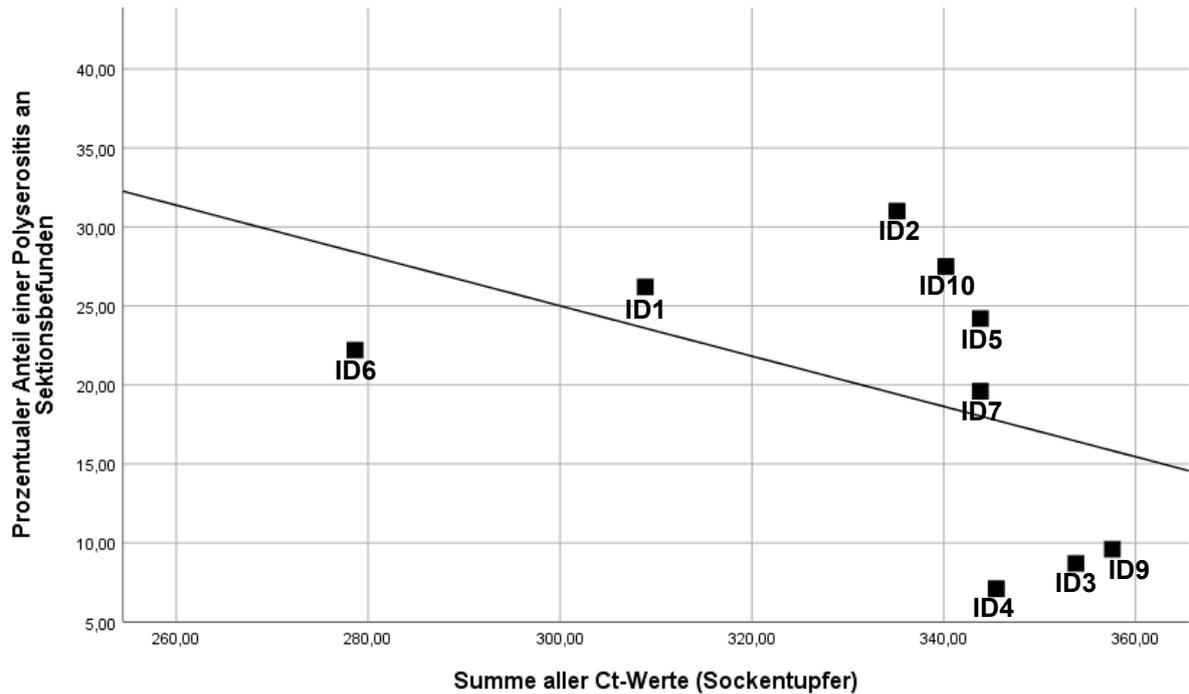
(\* Histomonaden-DNA nicht nachweisbar)

Es konnte somit gezeigt werden, dass das qPCR-Ergebnis der Blinddarmtupfer, weder bei Tieren der Herkunft A noch bei Tieren der Herkunft B einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit für das Vorkommen einer Polyserositis hatte.

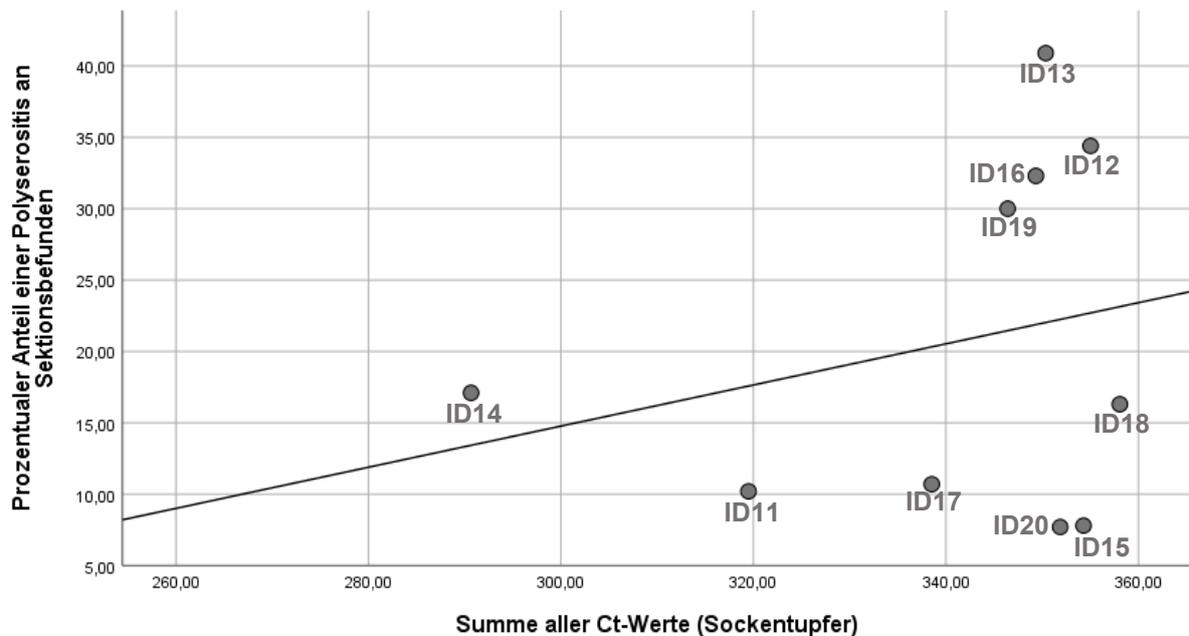
Um festzustellen, ob die qPCR-Ergebnisse der Sockentupfer mit dem Vorkommen einer Polyserositis korrelieren, wurde für beide Herkünfte (A und B) die Spearman-Rangkorrelation berechnet. Diese zeigte für die Summe der Ct-Werte bei den Tieren der Herkunft B eine schwach ausgeprägte positive Korrelation (Abb. 21), welche nicht statistisch signifikant war,  $\rho = 0,042$ ,  $p = 0,907$ .

Bei Tieren der Herkunft A korrelierte die Summe der Ct-Werte der Sockentupfer und der prozentuale Anteil der Tiere mit einer Polyserositis jedoch stark miteinander mit Spearmans  $\rho = -0,703$ ,  $p = 0,035$  (Abb. 20). Die Beziehung zwischen den Variablen ist negativ, was darauf hindeutet, dass bei einer Erhöhung der Summe der Ct-Werte der Anteil der Tiere mit Polyserositis abnimmt. Nach Cohen (1988) handelt es sich bei einem Korrelationskoeffizienten von  $\rho = -0,703$  um einen starken Effekt.

## Ergebnisse



**Abbildung 20:** Zusammenhang zwischen prozentualem Anteil einer Polyserositis und Summe der Ct-Werte der Sockentupfer bei Tieren der Herkunft A mit Trendlinie und Betriebs-ID



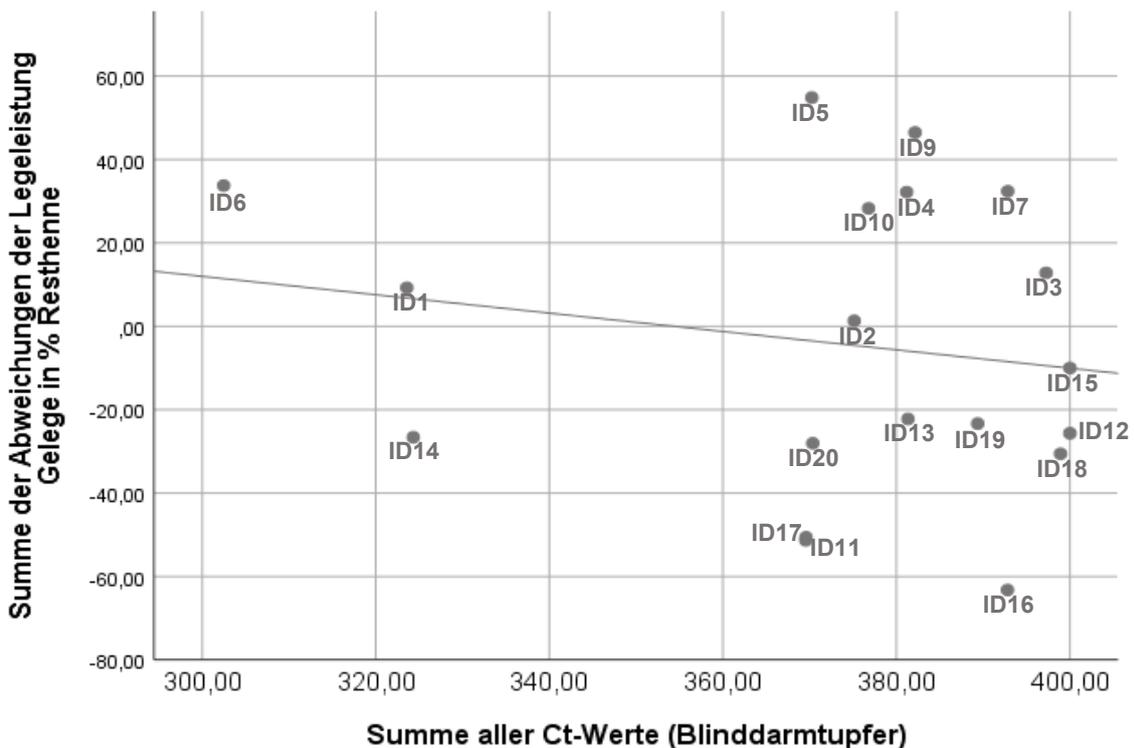
**Abbildung 21:** Zusammenhang zwischen prozentualem Anteil einer Polyserositis und Summe der Ct-Werte der Sockentupfer bei Tieren der Herkunft B mit Trendlinie und Betriebs-ID

#### 4.4 Zusammenhang zwischen positiven qPCR-Ergebnissen und Produktionsparametern

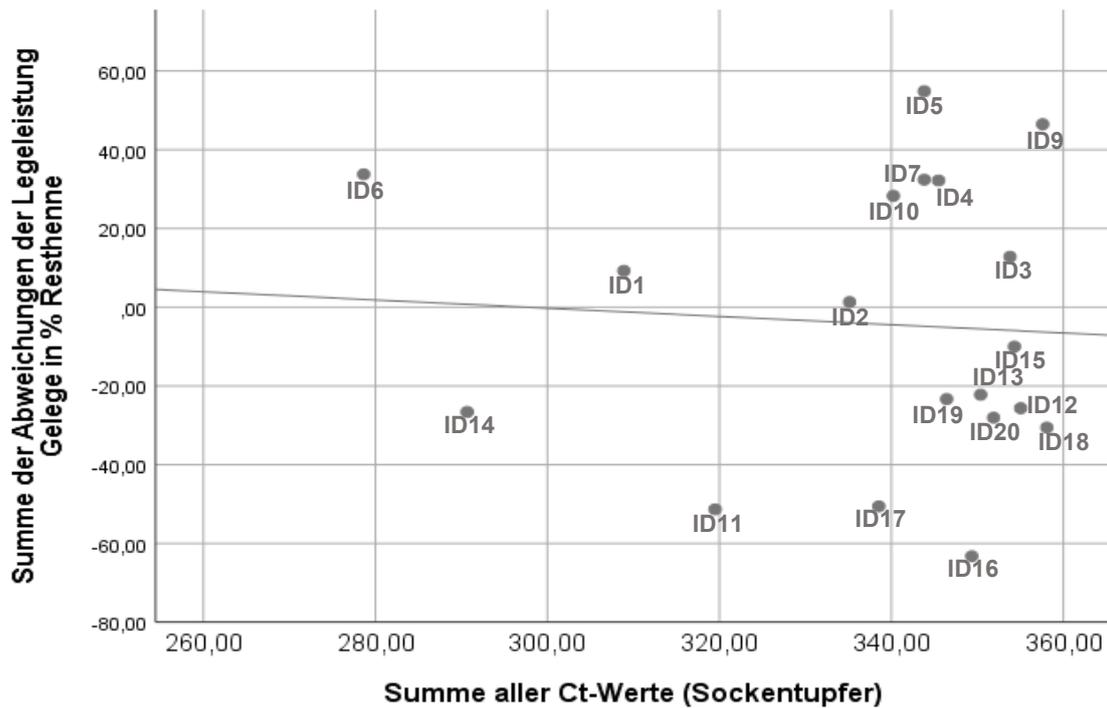
##### 4.4.1 Zusammenhang zwischen positiven qPCR-Ergebnissen und der Legeleistung

Für die Überprüfung, ob der Nachweis von *H. meleagridis* DNA mittels qPCR während eines Produktionsdurchganges einen Einfluss auf die Legeleistung in Bezug auf das Gesamtgelege hatte, wurde eine Spearman-Rangkorrelation berechnet.

Diese zeigte für die Summe der Ct-Werte der Blinddarmtupfer und die Summe der Abweichungen der Legeleistung eine nur sehr schwach ausgeprägte, inverse Korrelation, welche nicht statistisch signifikant war,  $\rho = -0,073$ ,  $p = 0,767$  (Abb. 22). Hinsichtlich der Sockentupfer korrelierte die Summe der Ct-Werte der qPCR mit der Abweichung des Geleges ebenfalls nur sehr schwach negativ,  $\rho = -0,083$ ,  $p = 0,734$  (Abb. 23). Da  $p > 0,05$ , war auch hier das Ergebnis nicht statistisch signifikant.



**Abbildung 22:** Zusammenhang zwischen der Legeleistung Gelege in % Resthenne und der Summe der Ct-Werte der Blinddarmtupfer mit Trendlinie und Betriebs-ID



**Abbildung 23:** Zusammenhang zwischen der Legeleistung Gelege in % Resthenne und der Summe der Ct-Werte der Sockentupfer mit Trendlinie und Betriebs-ID

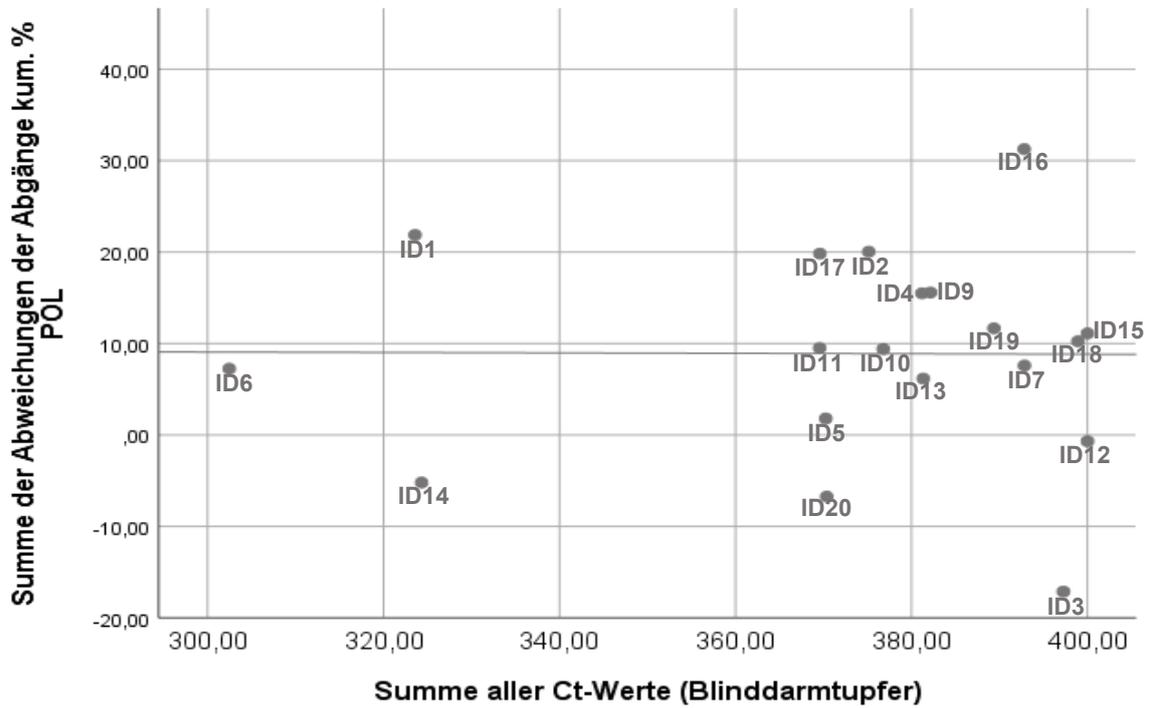
#### 4.4.2 Zusammenhang zwischen positiven qPCR-Ergebnissen und den Abgängen

Für die Überprüfung, ob ein positives qPCR-Ergebnis mit den Abgängen während eines Produktionsdurchganges korreliert, wurde eine Spearman-Rangkorrelation berechnet.

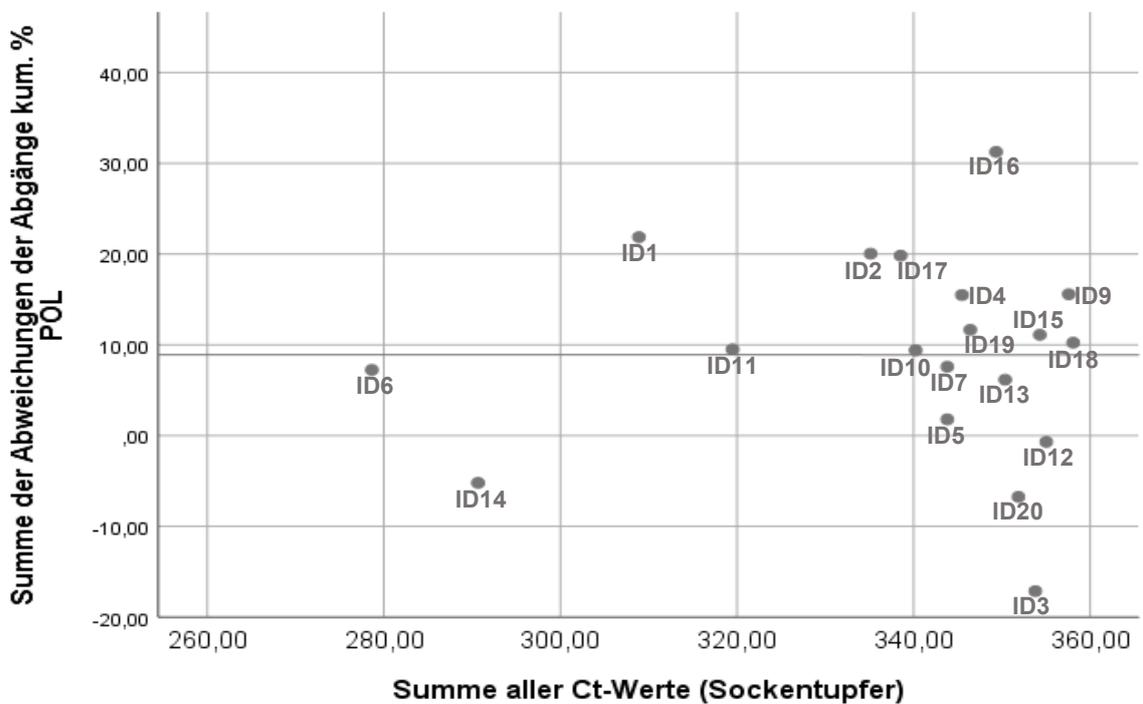
Diese zeigte für die Summe der Ct-Werte der Blinddarmtupfer und die Summe der Abweichungen der Abgänge eine nur sehr schwach ausgeprägte, inverse Korrelation mit  $\rho = -0,047$ ,  $p = 0,847$  (Abb. 24).

Hinsichtlich der Sockentupfer korrelierte die Summe der Ct-Werte und die Abweichung der Abgänge ebenfalls nur sehr schwach negativ,  $\rho = -0,118$ ,  $p = 0,629$  (Abb. 25). Da  $p > 0,05$ , war das Ergebnis in beiden Fällen nicht statistisch signifikant.

## Ergebnisse



**Abbildung 24:** Zusammenhang zwischen den Abgängen in % POL und der Summe der Ct-Werte in Bezug auf die Blinddarmtupfer mit Trendlinie und Betriebs-ID



**Abbildung 25:** Zusammenhang zwischen den Abgängen in % POL und der Summe der Ct-Werte in Bezug auf die Sockentupfer mit Trendlinie und Betriebs-ID

### 5 Diskussion

Die Histomonose, auch als Schwarzkopfkrankheit, Blackhead Disease, Histomoniasis, infektiöse Typhlohepatitis oder infektiöse Enterohepatitis bezeichnet, wird durch das Protozoon *Histomonas meleagridis* verursacht. Diese erstmals von Cushman (1893) beschriebene Erkrankung führt bei Puten zu pathologischen Läsionen in Zäkum und Lebern, die teilweise mit einer hohen Mortalität assoziiert sind (Hess et al. 2015). Über einen Ausbruch der Histomonose bei Hühnern berichteten erstmals Chester und Robin (1900). Seither wurden klinisch manifeste Infektionen bei Hühnern weltweit publiziert, wobei es sich sowohl um Fälle mit geringen klinischen Symptomen und moderaten Verlusten als auch um Fälle mit hoher Mortalität handelte (Esquenet et al. 2003; Ganapathy et al. 2000; Muller 1990; Hungerford 1937). Durch die arzneimittelrechtlichen Einschränkungen in der EU Anfang der 90er Jahre kam es dann zu einem bis heute existierenden Therapie- und Prophylaxenotstand, wodurch es zu einer Zunahme der Histomonose-Ausbrüche sowohl bei Puten (Hauck et al. 2010a; Hafez et al. 2005b) als auch bei Hühnern kam (Dolka et al. 2015). Viele Berichte verdeutlichen bis heute die Relevanz der Histomonose bei Legehennen und Elterntieren (Dolka et al. 2015; Liebhart et al. 2013; Grafl et al. 2011; van der Heijden und Landman 2011) und es wird vermutet, dass die wirtschaftlichen Verluste in Zusammenhang mit einer *H. meleagridis*-Infektion bei Hühnern sogar größer sein könnten als die bei Puten (AAAP 1986). Um einen Zusammenhang zwischen positiven DNA-Nachweisen mittels Histomonaden-qPCR und Produktionsdaten von Mastelternieren zu untersuchen und weitere Informationen über die Prävalenz bei konventionell in Bodenhaltung aufgestellten Zuchthühnern zu erhalten, wurde in 20 Mastelternier-Betrieben während des Produktionszeitraumes eine breit angelegte Verlaufsuntersuchung unter Feldbedingungen durchgeführt. Daten von 19 der 20 Herden wurden anschließend in die statistische Auswertung einbezogen.

Über klinische Ausbrüche bei Mastelternieren existieren bislang nur wenige Berichte, weshalb Informationen über den Infektionszeitpunkt bei dieser Nutzungsrichtung rar sind. Dolka et al. (2015) berichteten über einen Ausbruch bei Elterntieren der Herkunft Ross 308 in der 16. Lebenswoche, wobei die Infektion mit *H. meleagridis* durch einen DNA-Nachweis in der PCR bestätigt werden konnte. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zuerst der Infektionsstatus der Tiere zum Zeitpunkt der Einstellung in den Produktionsbetrieb untersucht. Dazu wurden von den ersten fünf Transportkäfigen, die den Produktionsbetrieb erreichten, Wischproben entnommen und mittels qPCR auf DNA von *H. meleagridis* untersucht. Hierbei konnte in 5 von 19 Betrieben Histomonaden-DNA nachgewiesen werden. Alle Tiere dieser fünf Betriebe befanden sich zum Zeitpunkt der Einstellung in der 19. bzw. 20. Lebenswoche. In 2 Fällen waren auch die Blinddarmpuffer von jeweils zwei Tieren *H. meleagridis*-positiv getestet,

wobei zu diesem Zeitpunkt nur in einem der beiden Fälle auch die am gleichen Tag entnommene Wischprobe ein positives Untersuchungsergebnis erzielte. Die Wischproben, bei denen mittels qPCR DNA von *H. meleagridis* nachgewiesen werden konnte, stammten sowohl von Aufzuchten mit Tieren der Herkunft A als auch von Aufzuchten mit Tieren der Herkunft B. Dolka et al. (2015) konnten bei dem oben erwähnten Ausbruch einer Histomonose bei Elterntieren in der 16. Lebenswoche deutliche Symptome wie gestäubtes Gefieder, Abgeschlagenheit, Apathie oder auch verminderte Futter- und Wasseraufnahme feststellen. Im Gegensatz dazu zeigten die Tiere dieser Aufzuchten während der Zeit im Aufzuchtsbetrieb keine klinischen Anzeichen einer Infektion mit *H. meleagridis*. Dieses Ausbleiben klinischer Symptome entspricht der allgemeinen Annahme, dass die Erkrankung bei Hühnern im Gegensatz zu Puten in der Regel milder verläuft und sogar unbemerkt bleiben kann (McDougald 2005). Zudem werden klinische Ausbrüche einer Histomonose bei Hühnern häufig mit einer Co-Infektion mit anderen Krankheitserregern in Verbindung gebracht. So wird angenommen, dass die Ausprägung der Veränderungen in den Blinddärmen von der Virulenz des Erregers und Faktoren abhängig ist, durch die die Blinddarmmukosa vorgeschädigt wird. Hier seien insbesondere Kokzidien (*Eimeria tenella*), Nematoden, Bakterien (*E. coli*, *Clostridium perfringens*, *Gallibacterium spp.*) und Mykotoxine im Futter genannt (Dolka et al. 2015; McDougald 2005; McDougald und Hu 2001; Ganapathy et al. 2000). Dykstra und Reid (1978) fanden heraus, dass Infektionen mit Kokzidien durch die Senkung von *Bacteroides ssp.* und Förderung des Wachstums von Clostridien zu Dysbakteriosen im Darm führen können. Die daraus resultierende Vorschädigung der Mukosa könnte *H. meleagridis* das Eintreten in das Blinddarmgewebe erleichtern (McDougald und Hu 2001) und in der Folge zu einem Krankheitsverlauf führen, der sich auch klinisch manifestiert. Während des Zeitraumes der Aufzucht der untersuchten Mastelertiere gab es jedoch keine Hinweise, weder für eine klinisch manifeste Histomonose noch für eine Infektion mit anderen Krankheitserregern. Subklinische Infektionen mit Erregern wie beispielsweise Clostridien, *E. coli* oder Kokzidien können jedoch aufgrund nicht durchgeführter Untersuchungen nicht sicher ausgeschlossen werden.

Durch die Untersuchung der Wischproben mittels qPCR konnte festgestellt werden, dass sich die Tiere in gut einem Drittel der Fälle bereits in den Aufzuchtbetrieben mit *H. meleagridis* infiziert hatten. Da jedoch nicht jede Transportkiste, sondern lediglich die ersten fünf je Betrieb mit insgesamt 280 bis 420 Tieren untersucht wurden, ist nicht auszuschließen, dass weitere Betriebe betroffen waren. Grafl et al. (2011) untersuchten die Prävalenz von Histomonaden-spezifischen Antikörpern bei Legehennen und stellten fest, dass 50,0 % der untersuchten Herden am Ende der Aufzucht Antikörper gegen *H. meleagridis* besaßen, wobei lediglich 3,8 % der seropositiven Proben von Tieren stammten, die in Bodenhaltung gehalten wurden. Die Autoren vermuteten, dass die niedrige Seroprävalenz mit einem frühen Stadium der Infektion

zusammenhängt und ein möglicher Indikator für eine eingeschränkte Verbreitung der Infektion mit *H. meleagridis* innerhalb der untersuchten Herde ist. Im Vergleich zu Antikörpertitern, die experimentellen Studien bei SPF-Hühnern zufolge, erst innerhalb von sechs Wochen nach Infektion einen kontinuierlichen Anstieg verzeichnen lassen (Windisch und Hess 2010; Windisch und Hess 2009), ist der Nachweis von Histomonaden-DNA mittels konventioneller PCR bereits vier Tage p. i. möglich (Zahoor et al. 2011). Durch die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden können die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit der Studie von Grafl et al. (2011) jedoch nicht direkt verglichen werden. Andere Studien, die sich auf den Infektionsstatus von Mastelternier-Herden hinsichtlich Histomonaden in der Aufzucht konzentrieren, existieren bislang nicht.

Dolka et al. (2015) berichteten, dass das Durchschnittsalter von zehn untersuchten Mastelternier-Herden, die klinische Symptome einer Histomonose zeigten, bei 33 Lebenswochen lag. Allerdings konnten die Autoren *H. meleagridis* nur bei der Hälfte der klinisch auffälligen Herden mittels PCR nachweisen. Im Verlauf der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnte bei 16 Mastelternier-Herden bis zur 24. Lebenswoche ein positiver DNA-Nachweis festgestellt werden. Der späteste DNA-Nachweis eines Betriebs fand in der 36. Lebenswoche statt. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die meisten Herden entweder bereits in der Aufzucht oder zwischen der Einstellung in den Produktionsbetrieb und der 24. Lebenswoche mit *H. meleagridis* infizierten. Über den genauen Zeitpunkt der Infektion lässt sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch keine Aussage treffen, da der Erreger intermittierend ausgeschieden wird (Hess et al. 2006a; McDougald und Galloway 1973) und die Probenahmen nur im Abstand von vier Wochen erfolgten. Zudem kann der Zeitraum, in dem *H. meleagridis*-DNA mittels PCR in Zäkaltonsillen nachgewiesen werden kann, mehrere Wochen betragen (Powell et al. 2009), was eine Aussage über den Infektionszeitpunkt zusätzlich erschwert.

Die Eintragsquellen für *H. meleagridis* in Geflügelhaltungen sind bisher nicht eindeutig geklärt (Lotfi et al. 2012). Allgemein gilt die Annahme, dass die Wahrscheinlichkeit für einen Eintrag von der Biosicherheit und diese wiederum von der Haltungsform abhängig ist. Somit ist sie bei Freilandbetrieben stark limitiert (Liebhart et al. 2017), was durch Ergebnisse serologischer Untersuchungen bei Legehennen bestätigt werden konnte. So wiesen Tiere in Freilandhaltung eine höhere Seroprävalenz auf als Legehennen, die in Bodenhaltung gehalten wurden (Grafl et al. 2011). Die Mastelterniere, die für die vorliegende Arbeit untersucht wurden, hatten jedoch zu keinem Zeitpunkt Zugang ins Freie, die Hygieneanforderungen in den Betrieben waren hoch. So war das Duschen und Tragen farmeigener Kleidung, ebenso wie das Betreten einer Desinfektionswanne vor Eintritt in den Stallvorraum und ein Schuhwechsel zwischen Stallvorraum und Stall obligatorisch. Gegenstände, die in den Betrieb gebracht wurden, mussten zuvor desinfiziert werden, die Einstreu verblieb über den gesamten

Produktionsdurchgang im Stall. Dennoch konnte im Verlauf der Produktionsdurchgänge bei Proben jedes Betriebes Histomonaden-DNA mittels qPCR nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stimmen mit Beobachtungen überein, dass hohe Biosicherheitsanforderungen, wie sie in der Haltung von Mast- und Legeelertieren obligatorisch sind, eine Infektion der Tiere mit Histomonaden in vielen Fällen nicht verhindern (Dolka et al. 2015; Callait-Cardinal et al. 2007). Grafl et al. (2011) vermuteten, dass der Eintrag von *H. meleagridis* in Farmen ohne Zugang ins Freiland wahrscheinlich durch mechanische Vektoren erfolgt. Eine Möglichkeit für den Eintrag von *H. meleagridis* in Betriebe mit hohen Biosicherheitsanforderungen wäre, dass die Tiere sich über die Aufnahme von Käfern wie dem glänzenden Getreideschimmelkäfer (*Alphitobius diaperinus*) infizieren. Diese Käfer kommen häufig in Geflügelhaltungen vor, da sie sich leicht von verschiedensten Nährstoffquellen wie Futter, Kot und auch verendeten Hühnern ernähren können (Kumar 1986). Zudem zeigen eigene Erfahrungen, dass sie nach Reinigung und Desinfektion im Stall verbleiben und Reinigungsvorgänge überleben können und so von Tieren des folgenden Durchganges aufgepickt werden. Huber et al. (2007) infizierten 20 Larven des glänzenden Getreideschimmelkäfers mit zehn Histomonaden, konnten jedoch nur bei fünf Larven 24 Stunden später *H. meleagridis* mittels PCR nachweisen. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass die Verbreitung von *H. meleagridis* über mechanische Vektoren wie Käfer, Fliegen oder Grashüpfer von Stall zu Stall oder Bestand zu Bestand zwar möglich, unter normalen Umständen aber gering zu sein scheint. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Tiere sich über den Blinddarmwurm *Heterakis gallinarum* mit *H. meleagridis* infizieren (Chute et al. 1976; Lund und Chute 1974b; Lund und Chute 1972a). Farr (1961) fand heraus, dass die Wurmeier in der Einstreu bis zu drei Jahre überlebensfähig waren und Histomonaden auch noch nach 150 Wochen in Heterakis-Eiern nachgewiesen werden können. Somit wäre es möglich, dass sich die Tiere gegen Ende der Aufzucht oder im Produktionsbetrieb mit *H. meleagridis*-tragenden Heterakiden-Eiern infizieren, die durch die durchgeführte Reinigung und Desinfektion der Ställe nicht abgetötet oder später mittels Vektoren in den Stall verbracht wurden. Da die Wurmeier sehr resistent gegenüber Umwelteinflüssen sind und für mehrere Jahre in der Umwelt infektiös bleiben können (Tyzzer 1926; Graybill und Smith 1920), ist ein Verbleiben infektiöser Eier im Stall trotz Reinigung und Desinfektion nicht ausgeschlossen. Wenngleich im Rahmen der routinemäßig durchgeführten Sektionen nur in vereinzelt Fällen Heterakiden nachgewiesen werden konnten, ist eine Beteiligung von *Heterakis gallinarum* am Infektionsgeschehen in den Produktionsbetrieben aufgrund nicht durchgeführter parasitologischer Untersuchungen nicht auszuschließen.

Auch die Infektion der Mastelertiere über mit Histomonaden kontaminiertem Staub aus einem mit *H. meleagridis* infizierten Vordurchgang wäre möglich, da Staub auch nach Reinigung und Desinfektion, wenn auch nur in geringen Mengen, im Stall verbleiben kann. Da jedoch die regelmäßige Untersuchung auf Histomonaden ohne klinische oder pathologisch-

anatomische Hinweise nicht zum Untersuchungsstandard gehörte, fehlen entsprechende Daten zum Infektionsstatus der Vordurchgänge. Gegen eine Infektion über infizierten Staub sprechen zudem Ergebnisse von Grafl et al. (2015), die herausfanden, dass mittels PCR positiv getesteter *H. meleagridis*-kontaminierter Staub keine mikroskopisch nachweisbaren, vermehrungsfähigen Histomonaden enthielt. Zudem war es in einer anderen Studie nicht möglich, durch diesen Staub Puten experimentell zu infizieren (Liebhart et al. 2013). Eine andere Eintragsquelle stellen die zystenartigen Stadien von *H. meleagridis* dar, die der Erreger unter ungünstigen Umweltbedingungen ausbilden kann. Es wird vermutet, dass diese bei der Übertragung von Histomonaden von Bestand zu Bestand eine Rolle spielen könnten (Zaragatzki 2010a, 2010b; Munsch et al. 2009a), da diese Stadien in der Lage sind, die Magenpassage bei Hühnern zu überleben und nach oraler Aufnahme somit zu einer Infektion der Tiere führen könnten (Munsch et al. 2009a; Mielewczik et al. 2008; Hess et al. 2006b). Da durch die Vorgänge bei der Reinigung und Desinfektion der Ställe sowie der Anwendung von Reinigungs- und Desinfektionsmitteln entsprechende ungünstige Umweltbedingungen geschaffen werden, wäre die Bildung dieser zystenartigen Stadien und in der Folge eine orale Infektion der Tiere des folgenden Durchgangs durchaus denkbar. Die orale Infektion von Hühnern mit *H. meleagridis* ist jedoch nach wie vor umstritten, da Daten über die Effizienz einer ausschließlich oralen Infektion von Hühnern limitiert sind. So zeigten zwar diverse Veröffentlichungen, dass eine orale Infektion bei Hühnern möglich ist (Liebhart et al. 2011; Zahoor et al. 2011; Windisch und Hess 2010), jedoch wurden die Hühner in diesen Studien zusätzlich auch intrakloakal mit Histomonaden infiziert. Zudem wurde nachgewiesen, dass die Trophozoiten den sehr niedrigen pH-Wert im Magendarmtrakt der Tiere aufgrund ihrer Struktur nicht überleben (McDougald 1984). Lotfi et al. (2012) wiederum unterstützten mit ihren Beobachtungen die These einer Vektor-unabhängigen Übertragung, da sie nachweisen konnten, dass Histomonaden in unchloriertem Wasser und Kot mehr als neun Stunden überleben konnten. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass auch mit *H. meleagridis* kontaminiertes Tränkwasser eine Eintragsquelle sein könnte. Aufgrund der hohen Biosicherheitsanforderungen und der Haltungsform wäre eine orale Infektion der Mastelertiere, von mechanischen Vektoren abgesehen, somit lediglich über mit *H. meleagridis* kontaminiertes Futter und Wasser sowie das Einstreumaterial möglich. Eine Untersuchung dieser Materialien auf Histomonaden wurde jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt.

Viele der bisher durchgeführten Untersuchungen in Bezug auf eine Saisonalität der Histomonose konnten sowohl eine Zunahme der Nachweise von Histomonaden-DNA als auch einen Anstieg der Anzahl klinischer Ausbrüche in Geflügelbetrieben in den Sommermonaten verzeichnen. So berichteten Hauck et al. (2010b), dass es im Sommer zum einen einen

höheren Anteil an eingesandten Proben zur Untersuchung auf *H. meleagridis* aus deutschen Geflügelbetrieben gab und dass zum anderen auch der Anteil positiver Histomonaden-DNA-Nachweise im Sommer höher war. Auch bei Freiland-Legehennen gab es Berichte über eine höhere Anzahl an Histomonose-Ausbrüchen im Sommer (Schulze 1975), wobei vermutet wurde, dass diese Beobachtungen lediglich auf die vermehrte Nutzung der Ausläufe in der Sommerzeit zurückzuführen waren (Grafl et al. 2011). In Veröffentlichungen über Ausbrüche bei Puten wurde ebenfalls darüber berichtet, dass die Fälle vor allem in den warmen Monaten von April bis September vorkamen (Callait-Cardinal et al. 2007) und dass in Betrieben, die im Sommer und Spätsommer beprobt wurden, mehr positive DNA-Nachweise von *H. meleagridis* detektiert wurden (Sulejmanovic et al. 2019). Beobachtungen aus einer Veröffentlichung über Mastelterniere von Dolka et al. (2015) zeigten jedoch das Gegenteil. Die Autoren berichteten über acht Ausbrüche einer Histomonose in verschiedenen Elterntier-Betrieben in Polen, wobei sich sieben davon auf die Monate Januar, Februar, März, November und Dezember beschränkten. Lediglich ein weiterer Ausbruch fand im August statt. Aufgrund dieser widersprüchlichen Literaturangaben war es unter anderem Ziel dieser Arbeit, zu untersuchen, ob sich die Häufigkeitsverteilung positiver DNA-Nachweise von *H. meleagridis* bei den untersuchten Mastelternier-Herden zwischen den Jahreszeiten unterschied. Bei dieser Auswertung konnte festgestellt werden, dass es sowohl in Bezug auf die Wischproben als auch in Bezug auf die Blinddarm- und Sockentupfer keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Häufigkeit positiver DNA-Nachweise zwischen den Jahreszeiten gab. Tendenziell zeigte sich jedoch, dass der prozentuale Anteil an Proben mit positivem DNA-Nachweis hinsichtlich Blinddarm- und Sockentupfern in den drei Sommermonaten zwischen Juni und August am geringsten war. Auch bei der Untersuchung der Wischproben, die aus den Sommermonaten stammten, konnten keine DNA-Nachweise verzeichnet werden.

Ob diese Beobachtungen bei Mastelternieren mit einer geringeren Luft- bzw. Einstreufeuchtigkeit, wie sie im Allgemeinen in den Sommermonaten zu erwarten ist, in Verbindung gebracht werden können, bleibt unklar. Tatsache ist jedoch, dass die untersuchten Mastelterniere in Bodenhaltung gehalten wurden und die Einstreu über den gesamten Produktionsdurchgang nicht ausgetauscht wurde. Somit kam es im Winter durch die höhere Luftfeuchtigkeit häufig zu feuchterer Einstreu, auch wenn die Temperatur im Stall durch regelmäßige Heiz- und Lüftungsperioden konstant bei etwa 20 °C gehalten werden sollte. Die Vermutung liegt nahe, dass im Vergleich zum Sommer die mäßigeren Stalltemperaturen sowie entsprechende Feuchtigkeit der Einstreu in den Herbst- und Wintermonaten für die Vermehrung und Verbreitung von *H. meleagridis* günstigere Bedingungen darstellen als die im Allgemeinen warme Luft und sehr trockene Einstreu in den Sommermonaten. Ganapathy et al. (2000) zumindest konnten feststellen, dass feuchtes Wetter, wenngleich auch in Verbindung mit Wärme, Symptome einer Histomonose verschlimmern kann. Zusätzlich

könnten auch die in den Herbst- und Wintermonaten vermutlich stärker schwankenden Temperaturen zwischen Tag und Nacht förderlich für eine Histomonose sein, wenngleich Untersuchungen in diesem Bereich bisher fehlen. Saunders et al. (2000) untersuchte jedoch die Reaktion von Heterakiden auf anaerobe Umgebungsbedingungen und Sauerstoff. Sie fanden heraus, dass die Anzahl der embryonierten Eier sowohl mit steigenden Temperaturen als auch unter Bedingungen fluktuierender Temperaturen zu nimmt. Somit wäre vorstellbar, dass Witterungseinflüsse wie starker Wind und niedrige bzw. fluktuierende Temperaturen in Kombination mit bestimmten ungünstigen Lüftungseinstellungen im Herbst und Winter zu größeren Temperaturschwankungen im Stall führen, weshalb in der Folge mehr Histomonaden aus Heterakis-Eiern in den Blinddarm freigesetzt werden. Gegen diese Theorie spricht jedoch die Tatsache, dass weniger als ein von 200 Heterakis-Eiern Histomonaden enthält und auch nicht jeder Wurm die gleiche Anzahl an Eiern entwickelt, die mit *H. meleagridis* infiziert sind (Lund und Burtner 1957). Weiterhin können niedrigere Temperaturen mit einer geringeren oder verzögerten Embryonierung und Entwicklung der Heterakis-Larven im Ei und somit mit einer geringeren Infektionsintensität einhergehen.

In den routinemäßig durchgeführten Sektionen konnten nur in vereinzelten Fällen Heterakiden festgestellt werden, wenngleich Blinddarmwürmer aufgrund ihrer Größe in kaltem Blinddarmkot visuell nur schlecht auszumachen sind und eine parasitologische Untersuchung des Blinddarmkots aus Kostengründen nicht durchgeführt wurde. Im Hinblick auf den Unterschied zur Pute lässt sich vermuten, dass die Häufigkeitsverteilung positiver DNA-Nachweise im Sommer auf Abweichungen in der Pathogenese und Immunreaktion (Powell et al. 2009) nach Infektion mit *H. meleagridis* zurückzuführen ist.

Wasser stellt das wichtigste Element für jeden lebenden Organismus dar (Ball 2017; Wiggins 1990). Es ist essenziell für die Immunfunktion und die Aufrechterhaltung der Homöostase und hat bedeutende Auswirkungen auf Gesundheit und Leistung der Tiere (More-Bayona et al. 2020). Da die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mastelterntiere sowohl mit Brunnenwasser als auch mit Stadtwasser versorgt wurden, sollte überprüft werden, ob die Herkunft des Tränkwassers einen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit für einen positiven Histomonaden-DNA Nachweis in der qPCR hatte. Obwohl sowohl in Bezug auf die Blinddarmpuffer als auch in Bezug auf die Sockentupfer ein höherer Anteil an positiven DNA-Nachweisen bei Proben von Betrieben mit Brunnenwasser festgestellt werden konnte, wurde mittels Chi-Quadrat-Test nachgewiesen, dass dieser Unterschied nicht statistisch signifikant war und die Herkunft des Tränkwassers somit keinen Einfluss auf das Ergebnis der Histomonaden-qPCR hatte.

Weitere Untersuchungen zum Vorkommen von *H. meleagridis* in Tränkwasser unterschiedlicher Quellen fehlen bisher. Nichtsdestotrotz wiesen Lotfi et al. (2012) nach, dass

Histomonaden bis zu neun Stunden in unchloriertem Leitungswasser überlebensfähig waren und schlussfolgerten daraus, dass mit *H. meleagridis* kontaminiertes Wasser eine Rolle in der Übertragung des Parasiten innerhalb oder in der Umgebung eines Geflügelstalles spielen könnte. Dass kontaminiertes Trinkwasser oder auch Futter eine Rolle bei der Übertragung von Parasiten spielt, wurde auch in Bezug auf *Trichomonas gallinae* bereits vermutet. Kocan (1969) untersuchte Motilität und Überlebensfähigkeit von *Trichomonas gallinae* in destilliertem sowie mit NaCl versetztem Wasser und fand heraus, dass der Parasit in Wasser, welches bis zu 0,9 % NaCl enthielt, in Abhängigkeit von der Konzentration des Kochsalzes 120 Minuten bis 24 Stunden überleben konnte und weiterhin infektiös für Tauben war. Dies gelang sowohl bei einer Inkubationstemperatur von 25 °C als auch bei 35 °C. Auch andere Erreger, wie Bakterien, scheinen in stehenden Gewässern längere Zeit überlebensfähig zu sein. So untersuchten Li et al. (2018) die Persistenz von *Salmonella typhimurium* in Brunnenwasser. Sie kamen zu dem Schluss, dass das Bakterium bis zu 75,1 Tage und im Durchschnitt 41,1 Tage in Brunnenwasser überleben konnte. Zudem stellten Sie fest, dass die Menge des Ammoniums im Brunnenwasser sowie die Höhe des pH-Wertes positiv mit der Überlebensfähigkeit von *S. typhimurium* korrelierten. Sie vermuteten, dass sich der pH-Wert indirekt auf einen Erreger im Wasser auswirken kann, indem er die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Wassers, wie die Bioverfügbarkeit von Nährstoffen, die Löslichkeit von kationischen Metallen, die Eigenschaften des enthaltenen organischen Kohlenstoffs und die elektrische Leitfähigkeit ändert. Diese veränderten Eigenschaften könnten dann wiederum einen direkten Einfluss auf die Bakterienpopulation haben. Inwieweit die Eigenschaften des Brunnenwassers, welches in der vorliegenden Arbeit für die Mastelertiere genutzt wurde, die Überlebensfähigkeit der Histomonaden und damit die Wahrscheinlichkeit für einen positiven DNA-Nachweis in der qPCR beeinflussen konnten, blieb unklar. Regelmäßige Daten über die Zusammensetzung des Wassers wurden während des Probenahmezeitraums nicht erhoben und eine Untersuchung des Wassers auf Histomonaden fand nicht statt.

Indirekte Auswirkungen der Verträkung von Brunnenwasser auf den Verlauf einer Infektion mit Bakterien oder Pilzen untersuchten More-Bayona et al. (2020) in Kanada bei drei Wochen alten Masthühnern. Die Autoren identifizierten mehrere im Brunnenwasser vorkommende Kontaminanten und bewerteten ihre Auswirkungen auf immunologische Prozesse in der Bauchhöhle von Hühnern nach 7-tägiger Exposition. Obwohl das untersuchte Brunnenwasser den strengen Trinkwasserrichtlinien Kanadas entsprach, konnten die Autoren gleich mehrere Auswirkungen von Brunnenwasser auf die Immunität der Hühner feststellen. So wurde zum einen das Leukozytenprofil der untersuchten Tiere hin zu einer erhöhten Anzahl an Makrophagen und niedrigeren Anzahl an CD8+-Lymphozyten in der Bauchhöhle der Hühner verändert. Des Weiteren förderte das Brunnenwasser die Expression proinflammatorischer Leukozyten-Gene während einer akuten Entzündungsreaktion. Da auch

die Expression antiinflammatorischer Zytokine hochreguliert wurde, schlussfolgerten die Autoren, dass das Vertränken von Brunnenwasser zu einer Dysregulation der Immunantwort während einer akuten Entzündungsreaktion mit Bakterien oder Pilzen führen könnte.

Wenngleich die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Produktionsbetriebe die jährlich gesetzlich vorgeschriebenen Untersuchungen des Tränkwassers durchführten, berücksichtigten die Ergebnisse dieser Untersuchungen lediglich, ob für die untersuchten Parameter ein bestimmter Höchstwert unter- oder überschritten wurde (Daten nicht veröffentlicht). Unklar bleibt jedoch, inwieweit die Bewertung der derzeit akzeptablen Höchstwerte für einzelne Schadstoffe im Wasser die synergistischen biologischen Wirkungen von Chemikalien und ihren Abbauprodukten berücksichtigen (Alexander et al. 2008). Somit konnte die Frage, ob im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Verlauf einer Infektion mit *H. meleagridis* bei Mastelertieren indirekt durch die Wasserqualität beeinflusst wurde, nicht beantwortet werden. Klar ist jedoch, dass pathogene Mikroorganismen, wie *Escherichia coli*, Pseudomonaden, Klebsiellen oder *Proteus vulgaris*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* und Hefepilze in Tränkeleitungen von Hühnerbeständen persistieren (Soliman et al. 2009) und dass die Anwesenheit dieser Pathogene die Wachstumsbedingungen für *H. meleagridis* positiv beeinflussen kann (Springer et al. 1970; Lesser 1964).

Untersuchungen darüber, ob sich die Prävalenzen für eine Histomonaden-Infektion in den Regionen Deutschlands voneinander unterscheiden, existieren bisher nicht. Daher ist es interessant, dass in der vorliegenden Arbeit in den Jahren 2016/2017 regionspezifische Unterschiede in den qPCR-Ergebnissen der Sockentupfer festgestellt werden konnten. Es zeigte sich, dass nicht nur die Anzahl der positiven DNA-Nachweise der Sockentupfer aus Mecklenburg-Vorpommern statistisch signifikant höher war als die aus Betrieben in Sachsen-Anhalt oder Thüringen, sondern auch, dass die Ct-Werte dieser Sockentupfer statistisch signifikant niedriger waren.

Der Grund für die Unterschiede in den qPCR-Ergebnissen der Sockentupfer blieb unklar. Obwohl in Mecklenburg-Vorpommern nur Tiere der Herkunft A eingestallt waren, konnte die Herkunft der Tiere als Erklärung für die statistisch signifikant höhere Anzahl der positiven DNA-Nachweise bzw. niedrigeren Ct-Werte der Sockentupfer ausgeschlossen werden. Im Vergleich der qPCR-Ergebnisse zwischen den beiden Herkunft A und B wurden weder signifikante Unterschiede in der Häufigkeit positiver Histomonaden-DNA Nachweise (Chi-Quadrat-Test), noch Unterschiede in den Ct-Werten der Blinddarm- oder Sockentupfer festgestellt (Kruskal-Wallis-Test, Daten nicht dargestellt).

Bereits Ende der 80er Jahre konnte nachgewiesen werden, dass die Prävalenz für eine Histomonose in den Regionen größer ist, in denen auch *Heterakis gallinarum* und verschiedene Regenwurmartenvorkommen (Adams et al. 1986). Jedoch hatten die Tiere in

Mecklenburg-Vorpommern, wie auch die Tiere in Sachsen-Anhalt und Thüringen, zu keinem Zeitpunkt Zugang ins Freie und es gab keinen Hinweis darauf, dass Erdreich in die Ställe eingetragen wurde. Weitere vergleichende Untersuchungen zur Prävalenz von *H. meleagridis* zwischen verschiedenen Regionen Deutschlands oder Europas fehlen bis heute, jedoch konnten bei anderen Protozoen Unterschiede in den Prävalenzen innerhalb Europas nachvollzogen werden. Eine Untersuchung von Marx et al. (2017) zeigte, dass in Bezug auf *Trichomonas sp.* die mithilfe einer PCR ermittelte Prävalenz bei Turteltauben in Deutschland und Spanien bei nahezu 100 % lag, während sie im gleichen Untersuchungszeitraum in Italien 80 % und auf Malta nur 21 % betrug.

Mittels einer Einteilung von Histomonaden in verschiedene Genotypen versuchte man in den letzten Jahren, Unterschiede in der Virulenz des Erregers sowie epidemiologische Zusammenhänge darzustellen. So wurden Histomonaden-positive Proben von Puten mittels PCR auf drei genetische Loci untersucht (Bilic et al. 2014). Bei dieser Untersuchung konnten zwei Genotypen dargestellt werden, wobei Genotyp 1 hauptsächlich Proben aus Europa zugeordnet werden konnte, während Genotyp 2 nur vereinzelt nachgewiesen wurde. Offen blieb jedoch, inwieweit sich die Zugehörigkeit eines Histomonaden-positiven Isolates zu einem der beiden Genotypen auf die Inzidenz einer Infektion auswirken könnte. Aka et al. (2010) berichteten über Ausbrüche einer Histomonose bei Putenelterntieren. Die dort isolierten Histomonadenstämme wurden mittels C-Profilung Analyse des Internal transcribed spacers 1 (ITS-1) nach van der Heijden et al. (2006), modifiziert nach Hauck et al. (2010b) genotypisiert. Bei den beschriebenen Ausbrüchen, die mit erhöhter Mortalität und klinischen Symptomen einhergingen, wurde der Genotyp A nachgewiesen. In zwei weiteren Fällen an einem anderen Standort, bei denen *H. meleagridis* nur zufällig bei routinemäßigen Sektionen identifiziert wurde, konnte der Genotyp C detektiert werden. Die Autoren vermuteten, dass die geringere Mortalität bei Genotyp C ein Hinweis auf eine geringere Virulenz sein könnte. Geht man davon aus, dass der Genotyp einen Einfluss auf die Virulenz des Erregers hat (Callait-Cardinal et al. 2007; Dwyer und Honigberg 1970; Lund 1956; Tyzzer 1936), wäre es vorstellbar, dass die Mastelterniere, die in Mecklenburg-Vorpommern gehalten wurden, mit einem anderen Genotyp von *H. meleagridis* infiziert waren, als die Tiere in Sachsen-Anhalt und Thüringen. Dies könnte sowohl eine Erklärung für die Unterschiede in der Häufigkeit der positiven DNA-Nachweise in Mecklenburg-Vorpommern als auch in der Höhe der Ct-Werte sein. Eine Genotypisierung der im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen Histomonaden fand jedoch nicht statt.

Schon 1967 fand Lund heraus, dass sich die Inzidenz einer Infektion mit Histomonaden bei vier verschiedenen Hühnerrassen nach oraler Infektion voneinander unterschied. Sie lag zwischen 25 und 80 %. Auch Chute et al. (1976) infizierten Hühner der Rasse New Hampshire

und weiße Leghorn oral über den Kropf und stellten fest, dass die Inzidenz einer Infektion mit *H. meleagridis* bei den Tieren der Herkunft weiße Leghorn größer war als bei Hühnern der Herkunft New Hampshire. Untersuchungen aus jüngerer Zeit sprechen im Gegensatz dafür, dass der genetische Hintergrund der Hühner keinen Einfluss auf eine Infektion mit *H. meleagridis* hat (Lotfi 2011; Zahoor et al. 2011). Aufgrund der bisher recht widersprüchlichen Ergebnisse in der Literatur galt es daher, in dieser Arbeit zu überprüfen, inwieweit sich bei Mastelternieren die Ergebnisse der Histomonaden-qPCR in Bezug auf zwei verschiedene genetische Herkünfte voneinander unterschieden. Obwohl es bei den Proben der Tiere der Herkunft A eine höhere Anzahl an positiven DNA-Nachweisen gab und diese Beobachtung sowohl für die Proben insgesamt, als auch für Wischproben, Blinddarmpuffer und Sockentupfer im Einzelnen bestätigt werden konnte, waren die Unterschiede in den Häufigkeiten zu den Ergebnissen der Tiere der Herkunft B doch sehr gering. Für die rechnerische Überprüfung wurden die Ergebnisse der Histomonaden-qPCR von Wischproben, Blinddarmpuffern und Sockentuffern daher in positiv und negativ klassiert und mittels Chi-Quadrat-Test beiden Herkünften gegenübergestellt. Die Ergebnisse der Tests ergaben, dass hinsichtlich der Anzahl positiver DNA-Nachweise mittels Histomonaden-qPCR zwischen den Herkünften A und B für keine der genannten Probenmaterialien ein statistisch signifikanter Unterschied existierte. Da zudem keine der untersuchten Herden innerhalb des Zeitraums der Untersuchung klinische Symptome einer Histomonose zeigte, wurde in dieser Arbeit die These von Zahoor et al. (2011) gestützt. Die Autoren untersuchten vier verschiedene, kommerzielle Hühnerlinien auf ihre Empfänglichkeit gegenüber einer Infektion mit *H. meleagridis*, konnten jedoch keine Unterschiede zwischen den Linien feststellen. Sie schlussfolgerten daraus, dass kommerzielle Hühnerlinien lediglich asymptomatische Träger von Histomonaden seien, wengleich teilweise Blinddarm- und Leberläsionen bei den untersuchten Tieren festgestellt werden konnten. Auch bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tieren der Herkunft A konnten im Laufe des Produktionsdurchganges in vereinzelt Fällen makroskopisch sichtbare Blinddarmentzündungen festgestellt werden, bei den Tieren der Herkunft B waren diese zu keinem Zeitpunkt nachweisbar. Dieser Unterschied zwischen beiden Herkünften lässt die Vermutung zu, dass Zuchtprogramme bei Hühnern die Physiologie des Darms (Uni et al. 1996), die Immunfunktion (Simon et al. 2014) und das Mikrobiom des Darms (Kers et al. 2018) durchaus beeinflussen können. In einer Studie mit unterschiedlichen Broiler-Herkünften wurde gezeigt, dass in einem Alter von 20 Lebenstagen die spezifische mikrobielle Zusammensetzung des Ileums bei jeder Herkunft eine andere war (Kim et al. 2015). So wurden bei Tieren der Herkunft Cobb im Ileum *Bacteroidetes*-zugehörige Bakterien gefunden, die Tieren der Herkunft Ross fehlten. Mastelterniere der Herkunft Ross wiederum wiesen Bakterien des Stammes *Actinobacteria* in ihrem Ileum-Inhalt auf, was bei Cobb-Tieren nicht der Fall war. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in anderen Studien beobachtet (Mohd Shaufi

et al. 2015; Pourapedin et al. 2015; Nakphaichit et al. 2011). Vor diesem Hintergrund und der Tatsache, dass bestimmte Kombinationen von Bakterien die Vermehrungsbedingungen für *H. meleagridis* positiv beeinflussen (Springer et al. 1970; Bradley und Reid 1966), wäre es somit denkbar, dass die Zusammensetzung der Bakterienflora im Darm bei den in dieser Arbeit untersuchten Mastelterntieren der Herkunft A für die Vermehrung und somit für die Ausbildung einer makroskopisch sichtbaren Typhlitis bessere Bedingungen bot, wenngleich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Herkünften dargestellt werden konnten.

In der vorliegenden Arbeit wurden, vom Tag der Einstallung in den Produktionsstall abgesehen, je Probenahmezeitpunkt zwei Blinddarmtupfer von je zwei Tieren und ein Paar Sockentupfer aus dem Stall genommen und mittels qPCR untersucht. Da die Untersuchung der Sockentupfer mehr Tiere einbezog, als die Untersuchung der Blinddarmtupfer, verwundert es nicht, dass mehr Socken- als Blinddarmtupfer positiv auf DNA von *H. meleagridis* getestet wurden.

Von der Anzahl der infizierten Tiere im Stall abgesehen, können auch die Durchführung der Probenahme, der intermittierende Ausscheidungscharakter des Erregers sowie PCR-limitierende Faktoren einen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit für einen positiven Histomonaden-DNA Nachweis gehabt haben. So ließen sich die niedrigeren Ct-Werte bei den Blinddarmtupfern damit erklären, dass die Probenahme mittels Blinddarmtupfer genau dort stattfand, wo sich der Erreger ansiedelt und vermehrt, wohingegen die Menge der Histomonaden an den Sockentupfern durch die Stallgrundfläche und die Einstreu verdünnt gewesen sein könnte. Auch die Übertragung von *H. meleagridis* innerhalb eines Stalles über den Kontakt zwischen infizierten und nicht infizierten Tieren, die im Vergleich zu Puten nicht in der gleichen Weise erfolgreich zu sein scheint, könnte einen Einfluss auf das qPCR-Ergebnis gehabt haben. Hu et al. (2006) waren weder in der Lage, eine Histomonaden-Infektion durch 10 %, noch durch 25 % infizierter Tiere auf nicht infizierte zu übertragen. Dies bestätigte auch ein Versuch von Hess et al. (2006a), in welchem zehn infizierte Hühner mit vier Kontakttieren zusammengehalten wurden. Dort konnte *H. meleagridis* lediglich bei zwei Tieren reisoliert werden, die anderen beiden Hühner blieben über den gesamten Versuchszeitraum von sechs Wochen Histomonaden-negativ. Auch Grafl et al. (2011) stellten fest, dass es nicht möglich war, *H. meleagridis* aus Kloakentupfern zu isolieren. Daten zur Ausbreitung einer Infektion mit *H. meleagridis* bei kommerziell in Bodenhaltung gehaltenen Mastelterntieren sind bisher nicht existent. Ein Grund dafür, warum die Nachweise in den Blinddarm- und Sockentupfern in einem einmal infizierten Betrieb nicht durchweg gelang, ist in der intermittierenden Ausscheidung von *H. meleagridis* zu suchen, die, einigen Autoren zufolge, epidemiologische Untersuchungen und Monitorings mittels PCR limitiert (Hess et al. 2006a; McDougald und Galloway 1973).

Da in der vorliegenden Arbeit kein zweites Diagnostikum zum Vergleich eingesetzt wurde, konnte keine Aussage darüber getroffen werden, inwieweit Proben aufgrund einer zu geringen Trophozoiten-Anzahl am Probenmaterial, Inhibitoren oder anderen Faktoren falsch negativ getestet wurden. Um dies zu umgehen, untersuchten Zahoor et al. (2011) die Proben mittels konventioneller PCR und Immunhistochemie. Die Autoren stellten fest, dass bei der Untersuchung von vier Lebern und einem Blinddarm die Histomonaden-PCR ein negatives Ergebnis ergab, während der Befund der Immunhistochemie positiv für *H. meleagridis* war. Xu et al. (2014) vermuteten, dass falsch negative Ergebnisse durch Inhibitoren der Taq-Polymerase, die sich vor allem im Darm befindet, zustande kommen könnten. Huber et al. (2005) fanden mittels einer HIS5-PCR heraus, dass eine hohe Anzahl von *Tetratrichomonas gallinarum* zu weniger positiven Histomonaden-DNA Nachweisen führte. Auch die Nachweisgrenzen der verschiedenen PCRs könnten ein Grund für falsch negative Ergebnisse sein. Bei der Hime-PCR, einer PCR mit einer internen Amplifikationskontrolle, lag die Nachweisgrenze beispielsweise bei 50 Parasiten pro mg Kot oder Leber (Bleyen et al. 2006). Hafez et al. (2005a) verglichen Spezifität und Sensitivität verschiedener PCRs miteinander und fanden heraus, dass die Nachweisgrenze der dort verwendeten Real-time-PCR bei 63 pg/µl lag. Ähnliche Daten zu Untersuchungen der Nachweisgrenzen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten qPCR mit entsprechenden Primern lagen nicht vor.

Verschiedene Studien belegen, dass Hühner lediglich in den Blinddärmen pathologisch-anatomische Veränderungen ausbilden (Stokholm et al. 2010; Esquenet et al. 2003; Homer und Butcher 1991). Als Folge der Besiedlung des Blinddarms durch *H. meleagridis* kommt es zu einer Verdickung der Mukosa und vergrößerten Blinddärmen, die hyperämisch und mit einem weiß-gräulichen bis braun-fleckigen Inhalt gefüllt sind (Esquenet et al. 2003). Im Rahmen dieser Arbeit sollte durch die Untersuchung der Blinddarmtupfer mittels qPCR überprüft werden, inwieweit bei Elterntieren diese makroskopisch sichtbaren Veränderungen an den Blinddärmen mit einem positiven Histomonaden-DNA Nachweis korrelierten. Es zeigte sich, dass von den Fällen, bei denen mittels qPCR ein DNA-Nachweis gelang, nur in 2,9 % eine Typhlitis festgestellt werden konnte und dass der prozentuale Anteil an Blinddarmentzündungen bei allen Betrieben über den gesamten Produktionsdurchgang sehr gering war. In nur drei von neun Betrieben mit Tieren der Herkunft A konnte in wenigen Fällen eine Typhlitis festgestellt werden. Diese Beobachtung widerspricht einer Arbeit von Huber et al. (2005), in der Blinddarmkot von Puten mittels einer konventionellen PCR untersucht und den Ergebnissen eines Scorings der Blinddarmläsionen gegenübergestellt wurde. Die Autoren berichteten, dass das PCR-Ergebnis mit dem Scoring der Läsionen in fast allen Fällen übereinstimmte. Dennoch ist bekannt, dass Hühner im Vergleich zu Puten häufig geringere klinische Symptome ausprägen und die Blinddarmläsionen, bedingt durch eine Histomonose,

auch fehlen können (Zahoor et al. 2011). Außerdem sind die Histomonaden-typischen Blinddarmentzündungen bei einer temporären Erkrankung, wie der Histomonose, bei Hühnern nur für eine kurze Zeit sichtbar (Liebhart et al. 2013; Zahoor et al. 2011).

Nach intrakloakaler Infektion von Hühnern mit *H. meleagridis* können sich bereits nach drei oder vier Tagen Blinddarmläsionen ausbilden. Da die Probenahmen lediglich alle vier Wochen stattfanden, wäre es möglich, dass die Blinddarmentzündungen zum Zeitpunkt der Probenahme bereits wieder abgeheilt waren, auch wenn sich noch Histomonaden mittels qPCR nachweisen ließen. Gründe für das Fehlen makroskopisch sichtbarer Blinddarmentzündungen wurden in der Vergangenheit bereits vielfältig diskutiert. Eine Erklärung ist, dass der Grad der Läsionen in der Darmwand abhängig ist von der Virulenz des Erregers und anderen Faktoren wie dem Vorhandensein von Kokzidien, Nematoden, Bakterien wie *E. coli* und Clostridien und Mykotoxinen (McDougald 2005; Hu und McDougald 2002; Ganapathy et al. 2000). Auch Hauck et al. (2010c) stellten fest, dass bestimmte Bakterien im Darm ein anaerobes Milieu produzieren, welches für *H. meleagridis* scheinbar bessere Wachstumsbedingungen darstellt. Anzunehmen ist daher, dass optimierte Wachstumsbedingungen zu einer stärkeren Ausprägung an Blinddarmentzündungen führen können bzw. im Gegensatz dazu, ungünstige Wachstumsbedingungen zu weniger Blinddarmentzündungen führen. Eine weitere Ursache für ungünstige Bedingungen könnte die Anwesenheit von nicht-pathogenen Organismen in Kot und Zäkum des Huhns sein. Es wurde berichtet, dass diese nicht-pathogenen Organismen das Wachstum von Histomonaden hemmen können (Stepkowski und Klimont 1980; Delappe 1953a). Eine weitere Erklärung könnte im Immunsystem der Hühner im Vergleich zu Puten liegen. Powell et al. (2009) fanden durch die Untersuchung von mRNA Expressionslevels für proinflammatorische Zytokine heraus, dass Hühner die Expression dieser Zytokine deutlich früher hochregulierten als Puten und dass diese frühe Immunantwort der Grund dafür sein könnte, dass sich die Infektion nicht so stark ausbreitet. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass es bei Hühnern im Vergleich zu Puten schon in einem sehr frühen Stadium der Infektion zu einem deutlichen Anstieg der Monozyten und Makrophagen in Blut und Blinddarm kommt (Kidane et al. 2018; Mitra et al. 2017). Somit scheint es möglich, dass diese Zellen durch ihre Fähigkeit zur Phagozytose entsprechende entzündliche Veränderungen im Blinddarm vermindern oder verhindern können. Zudem wäre es möglich, dass die Anzahl infektiöser Trophozoiten, mit der die Hühner infiziert wurden, nicht ausreichte, um Blinddarmläsionen zu verursachen. So zeigten McDougald und Hu (2001) in einem Versuch mit Hühnern, dass 100.000 Histomonaden je Huhn ausreichten, um bei 68 % der Tiere Blinddarmläsionen auszulösen. Des Weiteren wäre es möglich, dass die Infektion noch nicht fortgeschritten genug war, um Blinddarmläsionen auszubilden. Aka et al. (2011) vermuteten, dass bei Puten die Wahrscheinlichkeit für die Ausprägung von klinischen Symptomen, unter anderem

Blinddarmrentzündungen, abhängig vom Genotyp der Histomonaden und einer damit verbundenen schwächeren oder stärkeren Virulenz sein könnte. Überträgt man diese Vermutung auf Mastelterntiere, könnte man mutmaßen, dass das Fehlen der makroskopisch sichtbaren Entzündungen bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Herden auf die Infektion mit einem avirulenten Histomonaden-Stamm zurückzuführen war. Zu betonen ist, dass in keiner der genannten Farmen zu keinem Zeitpunkt klinische Symptome wie Apathie, Kümern, gestäubtes Gefieder, hängende Flügel oder geschlossene Augen beobachtet werden konnten. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von Zahoor et al. (2011) überein, die nach experimenteller Infektion von Hühnern mit Histomonaden weder Mortalität noch klinische Symptome feststellen konnten.

Der Ausbruch einer Histomonose bei Hühnern wird oft mit dem Auftreten einer aviären Colibazillose, auch als Coliseptikämie oder Colisepsis bezeichnet, assoziiert (Vereecken et al. 2015; Stokholm et al. 2010). Eine solche Infektion kann in Legetieren eine systemische Infektion verursachen, die mit einer Perikarditis, Perihepatitis, Salpingitis, Peritonitis, Salpingoperitonitis oder auch einer Polyserositis einhergehen kann (Olsen et al. 2016; Landman und van Eck 2015; Jordan et al. 2005; Zanella et al. 2000). Da Polyserositiden, definiert als gleichzeitige Entzündung mehrerer oder aller serösen Häute (Pschyrembel 1994), auch bei den hier untersuchten Tieren festgestellt werden konnten, sollte überprüft werden, ob der positive Nachweis von Histomonaden-DNA mittels qPCR an Blinddarm- und Sockentupfern die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Polyserositis in den Mastelterntier-Herden beeinflusst. Während die Ergebnisse in Bezug auf die Blinddarmtupfer weder für Tiere der Herkunft A noch für Tiere der Herkunft B mit dem prozentualen Anteil einer Polyserositis korrelierten, zeigte eine zweite Berechnung bei den Sockentupfern, dass für Tiere der Herkunft A ein höherer Ct-Wert in der Histomonaden-qPCR und ein niedrigerer prozentualer Anteil einer Polyserositis an den Sektionsbefunden zueinander in Beziehung standen. Bei den Tieren der Herkunft B konnte dieser Zusammenhang bei den Sockentupfern nicht festgestellt werden. Beide Ergebnisse wurden in der Literatur bereits diskutiert. So untersuchten Stokholm et al. (2010) Gründe für die Mortalität bei Bio-Legehennen in Dänemark. Sie fanden heraus, dass bei 217 von 290 mit *H. meleagridis* infizierten Bio-Legehennen ebenfalls eine Infektion mit *E. coli* vorlag. Zudem erwähnten die Autoren Ergebnisse unveröffentlichter Untersuchungen. Dabei konnten die Autoren bei *E. coli*-Isolaten von Histomonaden-positiven Hennen mit einer Coliseptikämie durch Plasmidanalyse eine hohe Diversität feststellen und vermuteten, dass *H. meleagridis* ein Wegbereiter für eine Coliseptikämie sein könnte. Auch Hess (2017) stellte dar, dass Co-Infektionen mit *E. coli* den Verlauf einer Infektion mit *H. meleagridis* komplizierter machen können. Zudem mutmaßte der Autor, dass die durch Histomonaden induzierten Läsionen im Blinddarm eine Eintrittspforte für

*E. coli* sein könnten. Diese Annahme korreliert mit den Beobachtungen von Paudel et al. (2018), die feststellten, dass eine Colibazillose bei Hühnern oft als Folge einer Infektion mit *H. meleagridis* auftritt und daher vermuteten, dass eine gestörte Darmbarriere eine Verlagerung von *E. coli* aus dem Darm in andere Organe induzieren könnte. In einer anderen Studie konnte bei einem Ausbruch einer Histomonose bei Freilandlegehennen bei allen mit *H. meleagridis* infizierten und in der 63. Lebenswoche euthanasierten Tieren eine fibrinös-hämorrhagische Peritonitis festgestellt werden (Esquenet et al. 2003). Diese Entzündung könnte die Folge einer Perforation der Blinddärme aufgrund der für *H. meleagridis* typischen, festen Blinddarm-Ausgüsse sein (Lotfi 2011; van der Heijden 2009), die sich vermutlich auch vom Bauchfell auf andere Organe hin zu einer Polyserositis ausbreiten kann. Diese Kausalität scheint jedoch als Erklärung für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unwahrscheinlich zu sein. Zum einen konnten über den gesamten Zeitraum, in dem routinegemäße Sektionen durchgeführt wurden, nur bei drei Mastelertier-Herden vereinzelt Typhlitiden festgestellt werden. Zum anderen würde man im Falle eines Zusammenhangs zwischen einer Polyserositis aufgrund einer vorangegangenen *H. meleagridis*-bedingten Typhlitis eine Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil der Polyserositis an allen Sektionsbefunden und den positiven DNA-Nachweisen der Blinddarmtupfer erwarten. Dieser Zusammenhang konnte jedoch nicht dargestellt werden.

Olsen et al. (2011) untersuchten mittels Multi-locus sequence typing und Plasmid-Analyse die genomische Vielfalt von *Aviären pathogenen E. coli* (APEC) und den Einfluss einer Infektion mit *H. meleagridis* bei Freiland-Legehennen in Dänemark. Die Autoren konnten jedoch keine Unterschiede in der Diversität der nachgewiesenen *E. coli*-Sequenztypen zwischen Histomonaden-positiven und Histomonaden-negativen Herden feststellen, so dass sie schlussfolgerten, dass eine Histomonose kein prädisponierender Faktor für eine *E. coli*-Infektion zu sein schien. Bei den Mastelertieren dieser Arbeit handelte es sich jedoch um Tiere, die konventionell in Bodenhaltung gehalten und restriktiv gefüttert wurden. Im Vergleich zu Freiland-Legehennen, die im Laufe des Tages auch im Auslauf Futter aufnehmen können, beinhaltete das restriktive Fütterungsmanagement bei den Mastelertieren jedoch täglich einen gewissen Zeitraum des Futterentzugs. Eine Vermutung wäre somit, dass dieser temporäre Entzug einen positiven Einfluss auf die Vermehrung von *H. meleagridis* haben und somit indirekt auch die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Polyserositis erhöht haben könnte. Der positive Effekt einer Futterrestriktion auf eine Infektion mit *H. meleagridis* wurde bereits von Liebhart und Hess (2009) bestätigt, die durch die Gabe einer alkalischen Lösung einen Futterentzug imitierten, damit den pH-Wert in Kropf, Magen und Duodenum bei Hühnern und Puten erhöhten und so die Anzahl Histomonaden-typischer Läsionen auf 100% steigern konnten. Interessant ist zudem, dass auch andere Studien bestätigen, dass ein temporärer Futterentzug die Darmflora hin zu einer erhöhten Kolonisation mit pathogenen Darmbakterien

beeinflussen kann (Burkholder et al. 2008; Thompson et al. 2008). Somit wäre vorstellbar, dass eine durch die restriktive Fütterung induzierte pathogenreiche Bakterienflora im Darm die Wachstumsbedingungen für Histomonaden positiv beeinflusst und in der Folge die Ausbildung von Polyserositiden begünstigt haben könnte. Zudem ist es sehr interessant, dass bei Hühnern sowohl zwischen Lege- und Mastlinie als auch zwischen verschiedenen Hühnerrassen Unterschiede im Darmmikrobiom festgestellt werden konnten (Kim et al. 2015; Videnska et al. 2014; Jang et al. 2013; Uni et al. 1996). Dies lässt die Vermutung zu, dass sich die Haltung von Mastelertieren typische Futterrestriktion in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund der Tiere unterschiedlich stark auf das Darmmikrobiom auswirkte und daher bei Tieren der Herkunft A zu einer pathogenreicheren Darmflora geführt haben könnte, die wiederum einen positiven Einfluss auf *H. meleagridis* als Wegbereiter für eine *E. coli*-bedingte Polyserositis hatte. Ein Grund dafür, dass sich dieser Zusammenhang nur bei den Sockentupfern, nicht aber in Bezug auf die Blinddarmtupfer darstellen ließ, könnte die geringe Anzahl an Blinddarmtupfern sein, die in diese Berechnung eingeflossen sind. Während es sich bei den Blinddarmtupfern lediglich um Proben von 2 Tieren je Betrieb und Probenahmezeitpunkt ( $n = 380$ ) mit den entsprechenden Sektionsbefunden handelte, konnten mittels Sockentupfern je nach Stallgröße und eingestallter Tierzahl deutlich mehr Tiere beprobt werden, was die Wahrscheinlichkeit für einen positiven DNA-Nachweis in der Histomonaden-qPCR erhöht haben könnte.

Nach experimenteller Infektion von Legehennen mit *H. meleagridis* konnte eine Reduktion der Legeleistung um 30 % induziert werden (Liebhart et al. 2013). Die Autoren vermuteten, dass Blinddarmentzündungen zu einer verringerten Aufnahme von Nahrungsbestandteilen führen, die wiederum eine Atrophie von Eierstock und Eileitern verursacht. Diese Atrophie führte zwei bis vier Wochen p. i. zu einem signifikanten Abfall der Legeleistung, wobei sich diese nach fünf Wochen wieder erholte. Auch andere Autoren berichteten über einen Abfall der Legeleistung in Folge einer Histomonose bei Hühnern (Popp et al. 2011; Esquenet et al. 2003; Ganapathy et al. 2000). Aufgrund der Beobachtungen dieser Autoren und der Tatsache, dass bei zehn Betrieben am Ende des Produktionszeitraumes im Vergleich zum Integrationsstandard eine negative Abweichung der Legeleistung in Bezug auf das Gesamtgelege beobachtet wurde (Betrieb 11 bis 20), sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob niedrigere Ct-Werte in der Histomonaden-qPCR mit einer verminderten Legeleistung korrelierten. Mittels Spearman-Rangkorrelation konnte jedoch dargestellt werden, dass es weder in Bezug auf die Blinddarmtupfer noch in Bezug auf die Sockentupfer einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen niedrigeren Ct-Werten und der Legeleistung gab. Die Hypothese, dass niedrigere Ct-Werte mit einer negativen Abweichung der Legeleistung korrelieren, konnte somit nicht bestätigt werden und wird durch die Tatsache

gestützt, dass in den hier untersuchten Mastelertier-Herden entgegen der Beobachtung von Liebhart et al. (2013) keine makroskopischen Anzeichen einer Atrophie von Eierstock oder Eileitern festgestellt werden konnten. Somit lässt sich vermuten, dass sich die Auswirkungen der Infektion mit *H. meleagridis* auch bei Mastelertieren nur auf die Blinddärme begrenzen können, so wie es bei Hühnern bereits mehrfach beobachtet wurde (Stokholm et al. 2010; Esquenet et al. 2003; Homer und Butcher 1991). Auch die Tatsache, dass Hühner aufgrund einer frühen Immunantwort in den Blinddärmen zumeist dazu in der Lage scheinen, die Infektion auf die Blinddärme zu beschränken (Kidane et al. 2018, Mitra et al. 2017), könnte eine Erklärung dafür sein, warum sich die positiven Histomonaden-DNA Nachweise bei Mastelertieren nicht darstellbar negativ auf die Legeleistung auswirkten. Des Weiteren wurde bereits viel über Unterschiede in der Pathogenität verschiedener Histomonaden-Isolate diskutiert (Callait-Cardinal et al. 2007; Dwyer und Honigberg 1970; Lund 1956; Tyzzer 1936). Obwohl es mithilfe unterschiedlicher Verfahren bereits gelang, *H. meleagridis*-Stämme zu genotypisieren (Bilic et al. 2014; van der Heijden et al. 2006), bedarf es weiterer Untersuchungen in der Zukunft, um den Einfluss der unterschiedlichen Genotypen auf die Wahrscheinlichkeit für die Ausprägung klinischer Symptome, wie eine Verminderung der Legeleistung, zu eruieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die aus der Probe isolierte Histomonaden-DNA nicht typisiert, so dass keine Aussage darüber getroffen werden konnte, ob alle Proben dem gleichen Genotyp angehörten. Gerth et al. (1985) fanden heraus, dass eine Infektion mit *H. meleagridis* am Ende der Aufzucht in der Produktionsphase nicht nur zu einer niedrigeren Legeleistung über mehrere Wochen führen kann, sondern auch zu einer verminderten Eischalenqualität. Aber auch dies konnte im Rahmen dieser Arbeit bei keiner der untersuchten Mastelertier-Herden beobachtet werden. Betriebe, bei denen bereits bei Einnistung in den Produktionsbetrieb DNA von *H. meleagridis* in den Wischproben oder Blinddarmpuffern nachgewiesen werden konnte, fielen weder durch eine besonders schlechte Legeleistung noch durch eine auffallend schlechte Eischalenqualität auf. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Sigmon et al. (2019). Die Autoren zeigten, dass die Infektion von Hühnern während der Aufzucht keine negativen Langzeitauswirkungen auf Legebeginn, Legeleistung, Eigewicht oder Futtermittelverwertung hatten und vermuteten, dass der frühe Infektionszeitpunkt den Tieren Zeit gegeben hatte, zu genesen. In der vorliegenden Arbeit konnte der genaue Infektionszeitraum nicht bestimmt werden, da die Mastelertiere während der Aufzucht nicht untersucht worden waren. Denkbar schien jedoch, dass der Großteil der Tiere sich bereits während der Aufzucht mit *H. meleagridis* infizierte, genesen konnte und daher in der Produktion trotz positiven DNA-Nachweisen keine klinischen Symptome mehr zeigte. Die Ergebnisse dieser Arbeit untermauern somit die Ansicht, dass Hühner trotz positiven Histomonaden-DNA Nachweisen keine klinischen Symptome ausbilden müssen.

Wenngleich die Gegenüberstellung von Ct-Werten und Abweichung der Legeleistung keinen statistisch signifikanten Zusammenhang erbrachte, zeigte sich dennoch eine sehr schwach inverse Korrelation und somit die geringe Tendenz, dass niedrigere Ct-Werte mit einer positiven Abweichung der Legeleistung korrelierten. Ähnliche Ergebnisse erzielte eine Studie von Chadwick et al. (2020), in der die Autoren den Einfluss einer frühen Histomonaden-Infektion bei Elterntier-Hennen in der Aufzucht auf das Wachstum sowie die Legeleistung und Eiqualität in der Produktionsphase untersuchten. Zwischen der 48. und 51. Lebenswoche wurde hier in der Gruppe der mit *H. meleagridis* infizierten Hennen eine höhere Legeleistung im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt. Die Autoren vermuteten, dass die durch Histomonaden induzierten Entzündungen des Blinddarms zu einer verminderten Entwicklung des Körpergewichts in der Aufzucht geführt haben könnten und verwiesen auf eine andere Studie bei Mastelternieren, nach der sich höhere Körpergewichte negativ auf die Legeleistung auswirken können (Abbas et al. 2010).

Über eine erhöhte Mortalität bei Hühnern infolge einer Infektion mit Histomonaden wurde ebenso vielfach berichtet (Popp et al. 2011; Esquenet et al. 2003; Ganapathy et al. 2000), wobei die Angaben stark variieren und sich vor allem auf Legehennen und Masthühner beziehen. In Bezug auf Elterntiere sind Angaben zu Mortalitäten kaum vorhanden. Lediglich bei einem Ausbruch in Polen wurde von einer Mortalität von 6,6 % zwischen der 5. und 19. Lebenswoche berichtet, wobei in diesem Fall auch *Gallibacterium anatis* nachgewiesen wurde. Die höchsten Verluste waren in diesem Fall innerhalb der ersten zwei Wochen nach den ersten Symptomen zu verzeichnen (Dolka et al. 2015). Um zu überprüfen, ob sich die Höhe der Ct-Werte der Histomonaden-qPCR auf die Mortalität der Mastelterniere auswirkte, wurde eine Spearman-Rangkorrelation berechnet. Die Ergebnisse erbrachten eine sehr schwach inverse, nicht statistisch signifikante Korrelation und zeigten somit, dass es weder in Bezug auf die Blinddarmpuffer noch in Bezug auf die Sockentupfer einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Höhe aller Ct-Werte, die über den gesamten Produktionszeitraum mittels qPCR erfasst wurden und den Abgängen gab. Wenngleich in 15 von 19 Betrieben am Ende des Produktionszeitraumes eine im Vergleich zum Integrationsstandard höhere Mortalität zu verzeichnen war, konnte jedoch kein Zusammenhang zu den qPCR-Ergebnissen festgestellt werden. Somit schien die Höhe der Ct-Werte in der Histomonaden-qPCR keine Aussage über die Mortalität der untersuchten Mastelterniere zuzulassen. Auch dieses Ergebnis korrelierte mit der allgemeinen Auffassung, dass Hühner in Bezug auf eine Infektion mit *H. meleagridis* lediglich als Reservoir-Wirte dienen, bei denen die Erkrankung häufig symptomlos abläuft (Liebhart und Hess 2019). Zudem ist bekannt, dass sich Ko-Infektionen mit anderen Erregern negativ auf die Mortalität

bei Hühnern auswirken können (Popp et al. 2011; Stokholm et al. 2010), was jedoch im Rahmen dieser Arbeit aufgrund fehlender Untersuchungen nicht beurteilt werden konnte.

Die Auswertung der erhobenen Daten während der Produktionsphase von 19 Mastelertier-Herden ergab, dass der Nachweis von Histomonaden-DNA mittels qPCR auch in Betrieben mit hohen Biosicherheitsanforderungen gelang und dass positive DNA-Ergebnisse in der qPCR keine statistisch signifikanten Auswirkungen auf die Produktionsparameter Abgänge und Legeleistung hatten. Nichtsdestotrotz ist die Histomonose bei Mastelertieren als durchaus relevante und ernstzunehmende Erkrankung anzusehen und es besteht, insbesondere hinsichtlich des Eintrags in die Herden, der Pathogenität des Erregers sowie des Einflusses aktueller Haltungsbedingungen auf die Darmgesundheit dringend weiterer Forschungsbedarf.

### 6 Zusammenfassung

#### **Untersuchungen zum Vorkommen von *Histomonas meleagridis* bei Mastelterntieren und Einfluss eines positiven Nachweises mittels Real-time PCR auf die Produktionsparameter der Herde**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 19 in Mecklenburg-Vorpommern, Sachsen-Anhalt und Thüringen lokalisierte Masteltern-tier-Herden vom Tag der Einstallung in den Produktionsstall bis zur 56. Lebenswoche alle vier Wochen molekularbiologisch (qPCR) auf das Vorkommen von *Histomonas meleagridis*-DNA untersucht. Dabei handelte es sich um neun Betriebe mit Masteltern-tieren der Herkunft A und zehn Betriebe mit Masteltern-tieren der Herkunft B. Für alle Herden wurden Daten über die Herdengesundheit (Sektionsbefunde) sowie wirtschaftliche Parameter (Abgänge Hennen, Legeleistung) erhoben und den Ergebnissen der Histomonaden-qPCR gegenübergestellt.

Das erste Ziel dieser Arbeit war es, zu prüfen, inwieweit Masteltern-tiere sich trotz umfangreicher Biosicherheitsmaßnahmen mit *H. meleagridis* infizieren. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten, dass der DNA-Nachweis mittels Histomonaden-qPCR in allen Herden im Verlauf des Produktionszeitraumes mehrfach gelang. Zum Zeitpunkt der Einstallung in den Produktionsstall konnte bereits in 31,6 % der Betriebe DNA von *H. meleagridis* detektiert werden. Der späteste Zeitpunkt, an dem ein positiver Nachweis von Histomonaden-DNA mittels qPCR eruiert wurde, war die 36. Lebenswoche. Des Weiteren wurde untersucht, ob bestimmte Faktoren wie die Jahreszeit, die Herkunft des verwendeten Tränke-wassers oder die Region, in der sich der Betrieb befand, die Wahrscheinlichkeit für ein positives DNA-Ergebnis in der Histomonaden-qPCR beeinflusste. Während dies bei den ersten beiden Faktoren Jahreszeit und Tränke-wasserherkunft nicht der Fall war, zeigte sich in Bezug auf die Region, dass die Ct-Werte der Sockentupfer von Betrieben, die sich in Mecklenburg-Vorpommern befanden, statistisch signifikant niedriger waren als die von Betrieben in Sachsen-Anhalt und Thüringen. Der Grund für die Unterschiede in den Ct-Werten blieb unklar.

Ein weiterer Zweck dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob sich die Wahrscheinlichkeit für eine Infektion mit *H. meleagridis* zwischen zwei genetisch unterschiedlichen Tier-Herkünften voneinander unterschied. Die Untersuchung von Blinddarm- und Sockentupfern erbrachte diesbezüglich jedoch kein statistisch signifikantes Ergebnis. Der prozentuale Anteil der

positiven DNA-Nachweise von *H. meleagridis* lag bei Tieren der Herkunft A bei 51,6 %, bei Tieren der Herkunft B bei 39,5 %. Des Weiteren wurde durch Verwendung zweier unterschiedlicher Probenmaterialien, Blinddarm- und Sockentupfer, überprüft, ob das Probenmaterial die Wahrscheinlichkeit für einen positiven DNA-Nachweis beeinflusst. Dabei wurde festgestellt, dass sich bei identischem Probenahmezeitpunkt die Ergebnisse der qPCR bei Blinddarm- und Sockentupfern statistisch signifikant voneinander unterscheiden. Der Nachweis von Histomonaden-DNA mittels qPCR gelang bei mehr als der Hälfte der Sockentupfer, während nur gut ein Drittel der Blinddarmtupfer positiv getestet wurde. Diese Ergebnisse scheinen der Tatsache geschuldet zu sein, dass die Untersuchung mittels Sockentupfern mehr Tiere einbezog als die Untersuchung mittels Blinddarmtupfern.

Trotz einer erheblichen Anzahl an positiven DNA-Nachweisen mittels qPCR konnte augenscheinlich kein Zusammenhang zu einer Typhlitis hergestellt werden. Lediglich bei 3 von 19 Herden wurden im Untersuchungszeitraum in den routinemäßig durchgeführten Sektionen Typhlitiden festgestellt, wobei der höchste prozentuale Anteil bei 3,0 % lag. Interessanterweise konnte jedoch auch bei 36,2 % der makroskopisch unauffälligen Blinddärme DNA von *H. meleagridis* nachgewiesen werden. In Bezug auf den Sektionsbefund Polyserositis zeigte sich bei Tieren der Herkunft A eine Korrelation zwischen der Summe der Ct-Werte (Sockentupfer) und dem prozentualen Anteil der Tiere, bei denen eine Polyserositis festgestellt wurde. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung deuteten darauf hin, dass der Anteil der Tiere mit Polyserositis mit steigendem Ct-Wert abnimmt. Abschließend zeigten weitere Untersuchungen, dass mittels qPCR nachgewiesene Infektionen mit *H. meleagridis* bei Mastelertieren weder zu einer negativen Beeinflussung der Legeleistung (Gesamtgelege) noch zu einem Anstieg der Mortalität (Abgänge) führen müssen.

### 7 Summary

#### **Investigations on the occurrence of *Histomonas meleagridis* in broiler breeders and influence of positive detection by Real-time PCR on the production parameters of the flock**

In the course of this work, 19 broiler breeder flocks located in Mecklenburg-Western Pomerania, Saxony-Anhalt and Thuringia were analysed by qPCR for the presence of *Histomonas meleagridis* DNA every four weeks from the day of housing into the production facility. These were nine farms with broiler breeders of breed A and ten farms with broiler breeders of breed B. Data on flock health (necropsy findings) and economic parameters (mortality and laying performance) were collected for all flocks and compared with the results of the qPCR.

The first aim of this study was to investigate the extent to which broiler breeders become infected with *H. meleagridis* despite extensive biosecurity measures. The results of the tests showed that DNA was detected several times in all flocks during the production period. At the time of housing into the production facility, DNA of *H. meleagridis* was already detected in 31.6 % of the flocks. The latest time at which a positive DNA detection was achieved was the 36<sup>th</sup> week of life. Furthermore, it was investigated whether certain factors such as the season, the origin of drinking water or the region in which the farm was located influenced the probability of a positive DNA result in the qPCR. This was not the case for the first two factors, but with regard to the region, the Ct values of boot swabs from farms located in Mecklenburg-Western Pomerania were statistically significant lower than those from farms in Saxony-Anhalt and Thuringia. The reason for this difference in the Ct values remained unclear.

Another purpose of this study was to find out whether the probability of an infection with histomonads differs between two breeds. However, the examination of cecal and boot swabs did not yield any statistically significant result in this respect. The percentage of positive DNA detections of *H. meleagridis* was 51.6 % in breed A broiler breeders and 39.5 % in breed B broiler breeders. Furthermore, the use of two different sample materials, cecal swabs and boot swabs, was used to investigate whether the sample material influences the probability of a positive DNA detection. It was found that there was a statistically significant difference between the qPCR results at identical sampling times. DNA of *H. meleagridis* was detected in more than half of the boot swabs, while only a third of the cecal swabs tested positive. These results appear to be due to the fact that testing with boot swabs involved more animals than testing with cecal swabs.

## Summary

---

Despite of a considerable number of positive DNA detections by qPCR, no connection to typhlitis could apparently be established. Only 3 out of 19 flocks were found to have typhlitis in the routinely performed necropsies during the study period, with the highest percentage being 3.0 %. Interestingly, DNA of *H. meleagridis* could also be detected in 36.2 % of macroscopically inconspicuous ceca. With regard to the diagnosis of polyserositis, in breed A there was a correlation between the sum of the Ct values (boot swabs) and the percentage of broiler breeders in which polyserositis was diagnosed. The results of the statistical analysis indicated that the percentage of broiler breeders with polyserositis decreases with increasing Ct values. Finally, further studies showed that infections with *H. meleagridis* detected by qPCR do not necessarily lead to a negative effect on laying performance or to an increase in mortality in broiler breeder flocks.

### 8 Literaturverzeichnis

AAAP Committee on Disease Reporting (1986): Summary of commercial poultry disease reports. *Avian Dis* 31: 926–987

Abbas S A, Gasm Elseid A A und Ahmed M K A (2010): Effect of body weight uniformity on the productivity of broiler breeder hens. *Int J Poult Sci* 9(3): 225-230

Adams W W, Hargreaves R C, Hughes E, Murphy C D, Newman J A, Stein G Jr und Springer W T (1986): American Association of Avian Pathologists 1985, Summary of commercial poultry disease reports. *Avian Dis* 30: 856-892

Aka J, Hauck R, Blankenstein P, Balczulat S. und Hafez H M (2011): Wiederauftreten von Histomonose auf einer Putenelternfarm. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 124: 2-7

Alexander J, Hetland R, Vikse R, Dybing E, Eriksen G, Farstad W (2008): Combined toxic effects of multiple chemical exposures. *Nor Sci Comm Food Saf.* 1-105

Alkhalaf A N und Mahmoud O M (2009): An outbreak of concurrent *Histomonas meleagridis* and *Enterococcus faecalis* infection in ducks. *Asian J of Poult Sci* 3: 15-18

Al-Khateeb G H und Hansen M F (1974): Plasma enzymes as a measure of susceptibility of chickens and turkeys to infection with *Histomonas meleagridis*. *Avian Dis* 18: 507- 14

Altman D G (1991): Practical statistics for medical research (Chapman & Hall / CRC texts in statistical science). 1<sup>st</sup> edition, New York: Taylor & Francis Ltd. ISBN: 978-0-429-25858-9

Armstrong P L und McDougald L R (2011): The infection of turkey poults with *Histomonas meleagridis* by contact with infected birds or contaminated cages. *Avian Dis* 55: 48-50

Arshad N, Zitterl-Eglseer K, Hasnain S und Hess M (2008): Effect of *Peganum harmala* or its  $\beta$ -carboline alkaloids on certain antibiotic resistant strains of bacteria and protozoa from poultry. *Phytother Res* 22: 1533-1538

Balczulat S (2013): Untersuchungen zum Vorkommen verschiedener Genotypen und Untersuchungen zum Kohlenhydratstoffwechsel von *Histomonas meleagridis*. Veröff. Diss., Freie Universität Berlin, Journal-Nr. 3687

Ball P (2017): Water is an active matrix of life for cell and molecular biology. *Proc Natl Acad Sci USA.* 114: 13327-35

Banerjee P S und Yadav C L (2002): Infectious enterohepatitis in chickens in Uttar Pradesh. Indian J. Anim. Sci. 71: 30–31

Banerjee P S, Garg R, Singh V S, Shukla S K, Yadav C L (2006): An outbreak of histomonosis in a broiler breeder flock in Uttaranchal. Indian J Anim Sci 76: 922–924

Beckmann J F, Dormitorio T, Oladipupo S O, Terra M T B, Lawrence K, Macklin K S und Hauck R (2021): Heterakis gallinarum and Histomonas meleagridis DNA persists in chicken houses years after depopulation. Vet Parasitol 298: 109536. doi: 10.1016/j.vetpar.2021.109536

Beg M K und Clarkson M J (1970a): Effect of histomoniasis on the serum proteins of the fowl. J Comp Pathol 80: 281-285

Beg M K und Clarkson M J (1970b): Serum enzymes in histomoniasis in the turkey. J Comp Pathol 80: 415-418

Bilic I, Jaskulska B, Souillard R, Liebhart D, Hess M (2014): Multi-locus typing of *Histomonas meleagridis* isolates demonstrates the existence of two different genotypes. PLoS ONE 9(3), e92438

Bishop A (1938): *Histomonas meleagridis* in domestic fowls (*Gallus gallus*) cultivation and experimental infection. Parasitology 30: 181-194

Bleyen N, de Gussem K, de Gussem J und Goddeeris B M (2006): Specific detection of *Histomonas meleagridis* in turkeys by a PCR assay with an internal amplification control. Vet Parasitol 143: 206-213

Bleyen N, de Gussem K, Pham A D G, Ons E, van Gerven N und Goddeeris B M (2009a): Non-curative, but prophylactic effects of paramomycin in *Histomonas meleagridis*-infected turkeys and its effect on performance in non-infected turkeys. Vet Parasitol 165: 248-255

Bleyen N, Ons E, De Gussem J, Goddeeris B M, (2009b): Passive immunization against *Histomonas meleagridis* does not protect turkeys from an experimental infection. Avian Pathol 38: 71–76

Borst G H A und Lambers G M (1985): Typhlohepatitis in ostriches (*Struthio camelus*) caused by *Histomonas* infection. Tijd Diergeneeskd 110: 536-537

Bradley R E und Reid W M (1966): *Histomonas meleagridis* and several bacteria as agents of infectious enterohepatitis in gnotobiotic turkeys. Exp Parasitol 19: 91-101

Brener B, Tortelly R, Menezes R C, Muniz-Pereira L C und Pinto R M (2006): Prevalence and pathology of the nematode *Heterakis gallinarum*, the trematode *Paratanaisia bragai*, and the protozoan *Histomonas meleagridis* in the turkey, *Meleagris gallopavo*. Mem Inst Oswaldo Cruz 101: 677-681

Bruzual J J und Adams C (2019): Histomoniasis (Blackhead). Abgerufen am: 03.08.2022 um 11:24 Uhr, von AAServiceBulletin-Histomoniasis-2019-EN.pdf (aviagen.com)

Burch D, Young S und Watson E (2007): Treatment of histomonosis in turkeys with tiamulin. Vet Rec 161: 864

Burkholder K M, Thompson K L, Einstein M E, Applegate T J und Patterson J A (2008): Influence of stressors on normal intestinal microbiota, intestinal morphology, and susceptibility to *Salmonella enteritidis* colonization in broilers. Poult Sci 87: 1734-1741

Callait M P, Granier C, Chauve C und Zenner L (2002): In vitro activity of therapeutic drugs against *Histomonas meleagridis* (Smith, 1895). Poultry Sci 81: 1122–1127

Callait-Cardinal M P, Chauve C, Reynaud M C, Alogninouwa T und Zenner L (2006): Infectivity of *Histomonas meleagridis* in ducks. Avian Pathol 35: 109-116

Callait-Cardinal M P, Leroux S, Venereau E, Chauve C M, Le Pottier G und Zenner L (2007): Incidence of histomonosis in turkeys in France since the bans of dimetridazole and nifursol. Vet Rec 161: 581-585

Callait-Cardinal M P, Gilot-Fromont E, Chossat L, Gonthier A, Chauve C und Zenner L (2010): Flock management and histomoniasis in free-range turkeys in France: description and search for potential risk factors. Epidemiol Infect 138: 353-363

Cavalier-Smith T A (1998): A revised six-kingdom system of life. Biol Rev Camb Philos Soc 73: 203-266

Cepicka I, Hampl V und Kulda J (2010): Critical taxonomic revision of parabasalids with description of one new genus and three new species. Protist 161: 400-433

Chadwick E, Malheiros R, Oviedo E, Cordova Noboa H A, Quintana Ospina G A, Alfaro Wisaquillo M C, Sigmon C und Beckstead R (2020): Early infection with *Histomonas melagridis* has limited effects on broiler breeder hens' growth and egg production and quality. Poult Sci 99: 4242-4248

- Chalvet-Monfray K, Sabatier P, Chauve C und Zenner L (2004): A mathematical model of the population dynamics of *Heterakis gallinarum* in turkeys (*Meleagris gallopavo*). *Poult Sci* 83: 1629-1635
- Chappel L R (1975): Using Hml1 strain of *Histomonas meleagridis* in evaluating chemotherapeutants in chicks. *Avian Diseases* 19: 679-682
- Chester F D und Robin M D (1900): Entero-hepatitis or blackhead of fowls. Delaware College Agricultural Experimental Station, Report: 60-66
- Chute M B und Chute A M (1969): Freeze preservation of *Histomonas meleagridis*. *Poult Sci* 48: 2189-2191
- Chute M, Lund E E, Wilkins G C (1976): Comparative responses of White Leghorn and New Hampshire Chickens to experimental infections with *Histomonas meleagridis* and *Heterakis gallinarum*. *Poult Sci* 55: 710-713
- Chvala S, Fagner K und Hackl R (2006): *Cryptosporidium* infection in domestic geese (*Anser anser f. domestica*) detected by in-situ hybridization. *J Comp Pathol* 134: 211–218
- Clarkson M J (1963): Immunological response to *Histomonas meleagridis* in the turkey and fowl. *Immunology* 6: 156-168
- Cohen J (1988): *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. 2<sup>nd</sup> Edition, Hillsdale; NJ: Lawrence Erlbaum Associates. ISBN: 978-0-203-77158-7
- Cole L J und Hadley P B (1908): Blackhead, a coccidial disease of turkeys. *Science* 27: 994
- Cortes P L, Chin R P, Bland M C, Crespo R und Shivaprasad H L (2004): Histomoniasis in the bursa of fabricius of chickens. *Avian Dis* 48: 711-715
- Curtis C (1907): Further experiments in connection with the blackhead disease in turkeys. Bulletin 124, Agricultural Experiment Station, Rhode Island College of Agriculture and Mechanic Arts, Kingston, RI: 67-105
- Cushman S (1893): The production of turkeys. Bulletin 25, Agricultural Experiment Station, Rhode Island College of Agriculture and Mechanical Arts, Kingston, RI: 89-123
- Davidson W R, Doster G L und McGhee M B (1978): Failure of *Heterakis bonasae* to transmit *Histomonas meleagridis*. *Avian Dis* 22: 627-632

- Delappe I P (1953a): Studies on *Histomonas meleagridis*. I. Use of antibiotics to facilitate in vitro isolation. Exp Parasitol 2: 79–86
- Delappe I P (1953b): Studies on *Histomonas meleagridis*. III. The influence of anaerobic versus aerobic environments on the growth of the organism in vitro. Exp Parasitol 2: 209-222
- Desowitz R S (1951): Age as a factor influencing fatal infections of histomoniasis in chickens. J Comp Pathol 61: 231–236
- Devolt H M (1943): A new medium for the cultivation of *Histomonas meleagridis*. J Parasitol 29: 353-355
- Dolka B, Zbikowski A, Dolka I und Szeleszczuk P (2015): Histomonosis – an existing problem in chicken flocks in Poland. Veterinary Research Communications 39: 189-195
- Doll J P und Franker C K (1963): Experimental histomoniasis in gnotobiotic turkeys. I. Infection and histopathology of the bacteria-free host. J Parasitol 49: 411-414
- Drbohlav J J (1924): The cultivation of the protozoan of blackhead. Journal of Medical Research 44: 677–678
- Duffy C F, Sims M D und Power R F G (2004): Preliminary evaluation of dietary Natustat versus Histostat (nitarsonsone) for control of *Histomonas meleagridis* in broiler chickens on infected litter. Int J Poult Sci 3: 753-757
- Duffy C F, Sims M D und Power R F (2005): Evaluation of dietary Natustat for control of *Histomonas meleagridis* in male turkeys on infected litter. Avian Dis 49: 423-425
- Dwyer D M (1970): An improved method for cultivating *Histomonas meleagridis*. J Parasitol 56: 191-192
- Dwyer D M (1972a): Analysis of antigenetic relationships among Trichomonas, Histomonas, Dientamoeba and Entamoeba I. Quantitative fluorescent-antibody methods. J Protozool 19: 318-327
- Dwyer D M (1972b): Analysis of antigenetic relationships among Trichomonas, Histomonas, Dientamoeba and Entamoeba II. Gel-diffusion methods. J Protozool 19: 328-334
- Dwyer D M (1974): Analysis of antigenetic relationships among Trichomonas, Histomonas, Dientamoeba and Entamoeba III. Immunelectrophoresis techniques. J Protozool 21: 139-145

Dwyer D M und Honigberg B M (1970): Effect of certain laboratory procedures on the virulence of *Histomonas meleagridis* for turkeys and chickens. J Parasitol 56: 694–700

Dykstra D D und Reid W M (1978): Monensin, *Eimeria tenella* and effects on the bacterial populations in the ceca of gnotobiotic chickens. Poult Sci 57: 398-402

Embley T M, Martin W (2006): Eukaryotic evolution, changes and challenges. Nature 440: 623–630

Esquenet C, de Herdt P, de Bosschere H, Ronsmans S, Ducatelle R und van Erum J (2003): An outbreak of histomoniasis in free-range layer hens. Avian Pathol 32: 305- 308

EU (1990): Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 DES RATES vom 26. Juni 1990 zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs. Amtsblatt Nr. L 224 vom 18/08/1990: 0001–0008.

EU (2002): Verordnung (EG) Nr. 1756/2002 des Rates vom 23. September 2002 zur Änderung der Richtlinie 70/524/EWG des Rates über Zusatzstoffe in der Tierernährung hinsichtlich des Widerrufs der Zulassung eines Zusatzstoffes sowie der Verordnung (EG) Nr. 2430/1999 der Kommission. Amtsblatt Nr. L 256 vom 3.10.2002: 1–2.

Eveleth D F (1943): Histomoniasis in broilers. Veterinary Medicine, 38: 148–149

Farmer R K, Stephenson J (1949): Infectious enterohepatitis (blackhead) in turkeys: a comparative study of methods of infection. J Comp Pathol 59: 119–126

Farr M (1961): Further observations on survival of the protozoan parasite *Histomonas meleagridis* and eggs of poultry nematodes in feces of infected birds. Cornell Vet 51: 3-13

Felleisen R S J (1997): Comparative sequence analysis of 5,8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. Parasitology 115: 111-119

Fine P E M (1975): Quantitative studies on transmission of *Parahistomonas wenrichi* by ova of *Heterakis gallinarum*. Parasitology 70: 407-417

Frank J F (1953): A note on the experimental transmission of enterohepatitis of turkeys by arthropods. Can J Comp Med Vet Sci 17: 230-232

Franker C K und Doll J P (1964): Experimental histomoniasis in gnotobiotic turkeys. II. Effects of some cecal bacteria on pathogenesis. J Parasitol 50: 636-640

- Ganapathy K, Salamat M H, Lee C C, Johara M Y (2000): Concurrent occurrence of salmonellosis, colibacillosis and histomoniasis in a broiler flock fed with antibiotic-free commercial feed. *Avian Pathol* 29: 639-642
- Ganas P, Liebhart D, Glösmann M, Hess C und Hess M (2012): *Escherichia coli* strongly supports the growth of *Histomonas meleagridis*, in a monoxenic culture, without influence on its pathogenicity. *Int J Parasitol* 42: 893-901
- Gerbod D, Edgcomb V P, Noël C, Zenner L, Wintjens R, Delgado-Viscogliosi P, Holder M E, Sogin M L und Viscogliosi E (2001): Phylogenetic position of the trichomonad parasite of turkeys, *Histomonas meleagridis* (Smith) Tyzzer, inferred from small subunit rRNA sequences. *J Eukaryot Microbiol* 48: 498-504
- Gerhold R W, Lollis L A, McDougald L R und Beckstead R B (2011): Partial sequence of the alpha-tubulin gene from *Histomonas meleagridis* isolates from the United States. *J Parasitol* 97: 354-356
- Gerth C, Rudiger-Boesch B, Schmidt U, Mumme J, Friedhoff K T (1985): Histomoniasis in a flock of young hens and its effect on egg laying. *Tierärztl Prax* 13: 519-527
- Grabensteiner E und Hess M (2006): PCR for the identification and differentiation of *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* and *Blastocystis spp.* *Vet Parasitol* 142: 223-230
- Grabensteiner E, Liebhart D, Weissenböck H und Hess M (2006): Broad dissemination of *Histomonas meleagridis* determined by the detection of nucleic acid in different organs after experimental infection of turkeys and specified pathogen-free chickens using a mono-eukaryotic culture of the parasite. *Parasitol Int* 55: 317-322
- Grabensteiner E, Arshad N und Hess M (2007): Differences in the in vitro susceptibility of mono-eukaryotic cultures of *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* and *Blastocystis sp.* to natural organic compounds. *Parasitol Res* 101: 193-199
- Grabensteiner E, Liebhart D, Arshad N und Hess M (2008): Antiprotozoal activities determined in vitro and in vivo of certain plant extracts against *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* and *Blastocystis sp.* *Parasitol Res* 103: 1257-1264
- Grafl B, Liebhart D, Windisch M, Ibesich C und Hess M (2011): Seroprevalence of *Histomonas meleagridis* in pullets and laying hens determined by ELISA. *Vet Rec* 168: 160

Grafl B, Weise H, Le B J, Liebhart D, Bilic I und Hess M (2015): Aberrant clinical appearance and pathomorphology noticed during an outbreak of histomonosis indicates a different pathogenesis of *Histomonas meleagridis* genotype 2. Avian Dis 59: 452–458

Graybill H W und Smith T (1920): Production of fatal blackhead in turkeys by feeding embryonated eggs of *Heterakis papillosa*. J Exp Med 31: 647-655

Gulden, W J van der und Erp A J van (1972): The effect of paracetic acid as a disinfectant on worm eggs. Laboratory Animal Science 22: 225–226

Hafez H M und Hauck R (2006): Efficacy of a herbal product against *Histomonas meleagridis* after experimental infection of turkey poults. Arch Anim Nutr 60: 436-442

Hafez H M, Mazaheril A, Prusas C, Böhland K, Pöppel M und Schulze D (2001): Aktuelle Geflügelkrankheiten bei Legehennen im Zusammenhang mit alternativen Haltungssystemen. Tierärztl Prax 29: 168-174

Hafez H M, Hauck R, Lüscho D und McDougald L (2005a): Comparison of the specificity and sensitivity of PCR, nested PCR, and Real-Time PCR for the diagnosis of histomoniasis. Avian Dis 49: 366-370

Hafez H M, Schulze D, Hauck R und Lüscho D (2005b): *Histomonas meleagridis*: The situation after the ban of the last available drug in the EU. Proceedings of the 55th Western Poultry Disease Conference, Vancouver, B. C. Canada: 36-38

Hafez H M, Lotfi A, Hauck R, De Gussem K (2009): Efficacy of paromomycin in the feed against *Histomonas meleagridis* in turkey poults. In: Hafez, H.M. (Ed.), Fifth International Symposium on Turkey Production: 53–54

Hafez H M, Hauck R, Gad W, De Gussem K und Lotfi A (2010): Pilot study on the efficacy of paromomycin as a histomonostatic feed additive in turkey poults experimentally infected with *Histomonas meleagridis*. Arch Anim Nutr 64: 77-84

Hauck R und Hafez H M (2007): Effect of coated plant extracts on *Histomonas meleagridis* and growth of bacteria in vitro. Avian Dis 51: 880-883

Hauck R und Hafez H M (2009): Partial sequence of the beta-tubulin of *Histomonas meleagridis* and the activity of benzimidazoles against *H. meleagridis* in vitro. Parasitol Res 104: 1183-1189

Hauck R and Hafez H M (2012): Pigeons are not susceptible to intracloacal infection with *Histomonas meleagridis*. Pak Vet J 32(4): 597-600

Hauck R und Hafez H M (2013): Experimental infections with the protozoan parasite *Histomonas meleagridis*: a review. Parasitol Res 112: 19–34.

Hauck R, Lüscho D und Hafez H M (2006): Detection of *Histomonas meleagridis* DNA in different organs after natural and experimental infections of meat turkeys. Avian Dis 50: 35-38

Hauck R, Fuller L, Greif G und McDougald L R (2010a): Evaluation of nifurtimox for potential use in control of histomoniasis in turkeys. Avian Dis 54: 28-32

Hauck R, Balczulat S, Hafez H M (2010b): Detection of DNA of *Histomonas meleagridis* and *Tetratrichomonas gallinarum* in German poultry flocks between 2004 and 2008. Avian Dis. 54(3): 1021-1025

Hauck R, Armstrong P L und McDougald L R (2010c): *Histomonas meleagridis* (Protozoa: Trichomonadidae): Analysis of growth requirements in vitro. J Parasitol 96: 1-77

Hauck R, Lotfi A und Hafez H M (2010d): Factors influencing the activity of tiamulin against *Histomonas meleagridis* in vitro. Avian Dis 54: 936-938

Hegngi F N, Doperr J, Cummings T S, Schwartz R D, Saunders G, Zajac A, Larsen C T und Pierson F P (1999): The effectiveness of benzimidazole derivatives for the treatment and prevention of histomonosis (blackhead) in turkeys. Vet Parasitol 81: 29–37

Hess M (2017): Commensal or pathogen – a challenge to fulfil Koch's postulates. British Poultry Science 58: 1-12

Hess M (2019): Schwarzkopfkrankheit: Vergangenheit – Gegenwart – Zukunft. Abgerufen am 03.08.2022 um 11:34 Uhr, von [https://www.oegt.at/explorerer/Handout\\_MHess\\_OeGT\\_2020.pdf](https://www.oegt.at/explorerer/Handout_MHess_OeGT_2020.pdf)

Hess M, Grabensteiner E und Liebhart D (2006a): Rapid transmission of the protozoan parasite *Histomonas meleagridis* in turkeys and specific pathogen free chickens following cloacal infection with a mono-eukaryotic culture. Avian Pathol 35: 280-285

Hess M, Kolbe T, Grabensteiner E und Prosl H (2006b): Clonal cultures of *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* and a *Blastocystis* sp. established through micromanipulation. Parasitology 133: 547-554

- Hess M, Liebhart D, Grabensteiner E und Singh A (2008): Cloned *Histomonas meleagridis* passaged in vitro resulted in reduced pathogenicity and is capable of protecting turkeys from histomonosis. *Vaccine* 26: 4187-4193
- Hess M, Liebhart D, Bilic I und Ganas P (2015): *Histomonas meleagridis* – new insights into an old pathogen. *Vet Parasitol* 208: 67–76
- Hirsch R P (1979): Dynamics of protozoan population-density, plasma glutamic oxalacetic transaminase and plasma bilirubin concentrations during histomoniasis in turkeys. *Int J Parasitol* 9: 395-399
- Homer B L und Butcher G D (1991): Histomoniasis in leghorn pullets on a florida farm. *Avian Dis* 35: 621-624
- Honigberg B M und B M Dwyer (1969): Maintenance of *Histomonas meleagridis* in liquid nitrogen. *J Protozool* 16 (Suppl.): 18–19
- Honigberg B M und Kuldova J (1969): Structure of a nonpathogenic histomonad from the cecum of galliform birds and revision of the trichomonad family Monocercomonadidae. *Kirby. J Protozool* 16: 526-535
- Honigberg B M und Bennett C J (1971): Lightmicroscopic observations on structure and division of *Histomonas meleagridis* (Smith). *J Eukaryot Microbiol* 18: 687-697
- Horton-Smith C und Long P L (1956): The infection of chickens (*Gallus gallus*) with histomonad suspensions. *Parasitology* 46: 79-90
- Hu J und McDougald L R (2002): Effect of anticoccidials and antibiotics on the control of blackhead disease in broiler breeder pullets. *J Appl Poultry Res* 11: 351-357
- Hu J und McDougald L R (2003): Direct lateral transmission of *Histomonas meleagridis* in turkeys. *Avian Dis* 47: 489–492
- Hu J und McDougald L R (2004): The efficacy of some drugs with known antiprotozoal activity against *Histomonas meleagridis* in chickens. *Vet Parasitol* 121: 233-238
- Hu J, Fuller L und McDougald L R (2004): Infection of turkeys with *Histomonas meleagridis* by the cloacal drop method. *Avian Dis* 48: 746-750
- Hu J, Fuller L und McDougald L R (2005): Blackhead disease in turkeys: direct transmission of *Histomonas meleagridis* from bird to bird in a laboratory model. *Avian Dis* 49: 328-331

- Hu J, Fuller L, Armstrong P L und McDougald L R (2006): *Histomonas meleagridis* in chickens: attempted transmission in the absence of vectors. *Avian Dis* 50: 277-279
- Huber K, Chauve C und Zenner L (2005): Detection of *Histomonas meleagridis* in turkeys cecal droppings by PCR amplification of the small subunit ribosomal DNA sequence. *Vet Parasitol* 131: 311-316
- Huber K, Reynaud M C, Callait M P und Zenner L (2006): *Histomonas meleagridis* in turkeys: Dissemination kinetics in host tissues after cloacal infection. *Poult Sci* 85: 1008-1014
- Huber K, Gouilloud L und Zenner L (2007): A preliminary study of natural and experimental infection of the lesser mealworm *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) with *Histomonas meleagridis* (Protozoa: Sarcocystidophora). *Avian Pathol* 36: 279-282
- Hungerford I G (1937): Blackhead in chickens. *Agricultural Gazette* 48: 647-651
- Ivanics F, Glavits R, Ratz F und Szelenyi Z (1984): Histomonadosis el' fordulása házityúkban (Histomoniasis in fowls). *Magyar Állatorvosok Lapja* 39: 562-566
- Jang S I, Lillehoj H S, Lee S H, Lee K W, Lillehoj E P, Hong Y H, An D J, Hye-Young Jeoung und Chun J E (2013): Relative disease susceptibility and clostridial toxin antibody responses in three commercial broiler lines coinfecting with *Clostridium perfringens* and *Eimeria maxima* using an experimental model of necrotic enteritis. *Avian Dis* 57: 684-687
- Jordan F T, Williams N J, Wattret A und Jones T (2005): Observations on salpingitis, peritonitis and salpingoperitonitis in a layer breeder flock. *Vet Rec* 157: 573-577
- Jowett W (1911): „Blackhead“ (infectious entero-hepatitis or typhlo-hepatitis): a disease of young turkeys. *Agricultural J Union S Africa, Pretoria* 2: 5
- Joyner L P (1963): Immunity to histomoniasis in turkeys following treatment with dimetridazole. *J Comp Path* 73: 201-207
- Jung A, Ryll M, Glünder G und Rautenschlein S (2009): Verlauf einer natürlichen Infektion mit *Histomonas meleagridis* in einem Mastputenbestand. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 116: 392-397
- Kaufmann-Bart M, Hoop R K (2009): Diseases in chicks and laying hens during the first 12 years after battery cages were banned in Switzerland. *Vet Rec* 164: 203-207

Kellogg F E und Reid W M (1970): Bobwhites as possible reservoir hosts for blackhead in wild turkeys. *J Wildlife Manage* 34: 155-159

Kemp R L und Reid W M (1966a): Staining techniques for differential diagnosis of histomoniasis and mycosis in domestic poultry. *Avian Dis* 10: 357-363

Kemp R L und Reid W M (1966b): Studies on the etiology of blackhead disease: The roles of *Histomonas meleagridis* and *Candida albicans* in the United states. *Poult Sci* 45: 1296-1302

Kendall S B (1959): The occurrence of *Histomonas meleagridis* in *Heterakis gallinae*. *Parasitol* 49: 169-172

Kers J G, Velkers F C, Fischer E A, Hermes G D, Stegemann J A und Smidt H (2018): Host and environmental factors affecting the intestinal microbiota in chickens. *Front Microbiol* 9: 235

Kim J E, Lillehoj H S, Hong Y H, Kim G B, Lee S H, Lillehoj E P und Bravo D M (2015): Dietary *Capsicum* and *Curcuma longa* oleoresins increase intestinal microbiome and necrotic enteritis in three commercial broiler breeds. *Res Vet Sci* 102: 150-158

Kidane F A, Mitra T, Wernsdorf P, Hess M, Liebhart D (2018): Allocation of interferon (IFN)-gamma mRNA positive cells in caecum hallmarks a protective trait against histomonosis. *Front Immunol* 9: 1164

Kleina P, Bettim-Bandinelli J, Bonatto S L, Benchimol M und Bogó M R (2004): Molecular phylogeny of Trichomonadidae family inferred from ITS-1, 5.8S rRNA and ITS-2 sequences. *Int J Parasitol* 34: 963–970

Klodnicki M E, McDougald L R und Beckstead R B (2013): A genomic analysis of *Histomonas meleagridis* through sequencing of a cDNA library. *J Parasitol* 99: 264–9

Kocan R M (1969): Various grains and liquid as potential vehicles of transmission for *Trichomonas gallinae*. *Bull. Wildlife Disease Assoc* Vol 5: 148-149

Koncicki A, Krasnodebska-Depta A und Guiro S (1999): Hematological and biochemical studies in an outbreak of histomoniasis in turkeys. *Medycyna Weternaryjna* 55: 674–676

Krijgsman O (1929): Blackhead. In: *Handbuch der Geflügelkrankheiten und der Geflügelzucht*/Hrsg: T. van Heelsbergen, S. 348-360, Stuttgart, Ferdinand Enke

Kumar P (1986): Flesh eating behaviour of *Alphitobius diaperinus* Panz. (Tenebrionidae Coeloptera). *Indian Journal of Entomology* 48: 113-115

- Landman W J und van Eck J H (2015): The incidence and economic impact of the *Escherichia coli* peritonitis syndrome in Dutch poultry farming. *Avian Pathol* 44: 370-378
- Lee D L, Long P L, Millard B J, Bradley J (1969): The fine structure and method of feeding of the tissue parasitizing stages of *Histomonas meleagridis*. *Parasitol* 59: 171-184
- Lesser E (1960a): Cultivation of *Histomonas meleagridis* in a modified tissue culture medium. *J Parasitol* 46: 686
- Lesser E (1960b): Replacement of serum in the cultivation of *Histomonas meleagridis*. *J Parasitol* 46: 271
- Lesser E (1964): Studies on the in vitro growth of *Histomonas meleagridis* with single species of bacteria. *Proc Helm Soc Wash* 31: 265-266
- Li J, Ding M, Han Z, Ma J (2018): Persistence of *Salmonella typhimurium* in well waters from a rural area of Changchun City, China. *Int J Environ Res Public Health* 15: 1090
- Liebhart D und Hess M (2009): Oral infection of turkeys with in vitro-cultured *Histomonas meleagridis* results in high mortality. *Avian Pathol* 38: 223-227
- Liebhart D und Hess M (2019): Spotlight on Histomonosis (blackhead disease): a re-emerging disease in turkeys and chickens. *Avian Pathol* 49: 1-4
- Liebhart D, Weissenböck H und Hess M (2006): In-situ hybridization for the detection and identification of *Histomonas meleagridis* in tissues. *J Comp Pathol* 135: 237-242
- Liebhart D, Zahoor M A, Prokofieva I, Hess M (2011): Safety of avirulent histomonads to be used as a vaccine determined in turkeys and chickens. *Poult Sci* 90: 996–1003
- Liebhart D, Sulejmanovic T, Grafl B, Tivhy A und Hess M (2013): Vaccination against histomonosis prevents a drop in egg production in layers following challenge. *Avian Pathol* 42: 79-84
- Liebhart D, Ganas P, Sulejmanovic T und Hess M (2017): Histomonosis in poultry: previous and current strategies for prevention and therapy. *Avian Pathol* 46: 1–18
- Lindquist W D (1962): Some effects of paromomycin sulfate on blackhead in turkeys. *Am J Vet Res* 23: 1053-1056
- Liu D, Kong L, Tao J und Xu J (2018): An outbreak of Histomoniasis in Backyard Sanhuang chickens. *Korean J Parasitol* Vol 56 (6): 597-602

- Lollis L, Gerhold R, McDougald L und Beckstead R (2011): Molecular characterization of *Histomonas meleagridis* in the United States using the 5.8S, ITS-1, and ITS-2 rRNA regions. *J Parasitol* 97: 610-615
- Lotfi A (2011): Untersuchungen zur Pathogenese und Prophylaxe der Histomonose beim Geflügel. Veröff. Diss., Freie Universität Berlin, Journal-Nr. 3474
- Lotfi A und Hafez H M (2009): Susceptibility of different turkey lines to *Histomonas meleagridis* after experimental infection. *Parasitol Res* 105: 113-116
- Lotfi A, Abdel-Wahab E M und Hafez H M (2012): Persistence of *Histomonas meleagridis* in materials used in poultry houses. *Avian Dis* 56: 224-226
- Lotfi A, Hauck R, Olias P, Hafez H M (2014): Pathogenesis of histomonosis in experimentally infected specific-pathogen-free (SPF) layer-type chickens and SPF meat-type chickens. *Avian Dis* 58: 427-32.
- Lund E E (1955): The progress of histomoniasis (blackhead) in turkeys as related to the size of the infective dose. *Poult Sci* 34: 127-130
- Lund E E (1956): Oral transmission of *Histomonas* in turkeys. *Poult Sci* 35: 900-904
- Lund E E (1959): Immunizing action of a nonpathogenic strain of *Histomonas* against blackhead in turkeys. *J Protozool* 6: 182-185
- Lund E E (1963): *Histomonas wenrichi* n. sp. (Mastigophora: *Mastigamoebidae*), a nonpathogenic parasite of gallinaceous birds. *J Protozool* 10: 401-404
- Lund E E (1967): Response of four breeds of chickens and one breed of turkeys to experimental *Heterakis* and *Histomonas* infections. *Avian Dis* 11: 491-502
- Lund E E und Burtner R H (1957): Infectivity of *Heterakis gallinae* eggs with *Histomonas meleagridis*. *Exp Parasitol* 6: 189-193
- Lund E E und Chute A M (1970): Relative importance of young and mature turkeys and chickens in contaminating soil with *Histomonas*-bearing *Heterakis* eggs. *Avian Dis* 14: 342-348
- Lund E E und Chute A M (1972a): *Heterakis* and *Histomonas* infections in young peafowl compared to such infections in pheasants, chickens and turkeys. *J Wildl Dis* 8: 352-358

Lund E E und Chute A M (1972b): The ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus torquatus*) as a host for *Heterakis gallinarum* and *Histomonas meleagridis*. Am Midl Nat 87: 1-7

Lund E E und Chute A M (1972c): Potential of young and mature guinea fowl in contaminating soil with *Histomonas*-bearing heterakid eggs. Avian Dis 16: 1079-1086

Lund E E und Chute A M (1973): Means of acquisition of *Histomonas meleagridis* by eggs of *Heterakis gallinarum*. Parasitology 66: 335-342

Lund E E und Chute A M (1974a): Reciprocal transfer of *Heterakis gallinarum* larvae between ring-necked pheasants and japanese quail: Effects on *H. gallinarum*, *Histomonas meleagridis*, and *Parahistomonas wenrichi*. Proc Helm Soc Wash 41: 73- 76

Lund E E und Chute A M (1974b): The reproductive potential of *Heterakis gallinarum* in various species of galliform birds: Implications for survival of *H. gallinarum* and *Histomonas meleagridis* to recent times. Int J Parasitol 4: 455-461

Lund E E und Ellis D (1967): Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*, as a host for *Heterakis* and *Histomonas*. Lab Anim Care 17: 110-113

Lund E E, Wehr E E und Ellis D (1966a): Earthworm transmission of *Heterakis* and *Histomonas* to turkeys and chickens. J Parasitol 52: 899-902

Lund E E, Augustine P C und Ellis D (1966b): Immunizing action of in vitro-attenuated *Histomonas meleagridis* in chickens and turkeys. Exp Parasitol 18: 403-407

Lund E E, Augustine P C und Chute A M (1967): *Histomonas meleagridis* after 1000 in vitro passages. J Protozool 14: 349-351

Lund E E, Chute A M und Vernon M E (1974): Experimental infections with *Histomonas meleagridis* and *Heterakis gallinarum* in ducks and geese. J Parasitol 60: 683-686

Madsen H (1962): On the interaction between *Heterakis gallinarum*, *Ascaridia galli*, "blackhead" and the chicken. J Helminthol 36: 107-142

Malewitz T D (1956): Studies on the pathology of experimentally produced blackhead in turkeys. Journal of Parasitology 42: 23-23

Mantini C, Dalia-Cornette J, Noda S, van der Heijden H M, Capron M, Dei-Cas E, Landman W J, Ohkuma M und Viscogliosi E (2009): Molecular identification and phylogenetic relationships

of trichomonad isolates of galliform birds inferred from nuclear small subunit rRNA gene sequences. *Parasitol Res* 106: 163-170

Marx M, Reiner G, Willems H, Rocha G, Hillerich K, Masello J F, Mayr S L, Moussa S, Dunn J C, Thomas R C, Goodman S J, Hamer K C, Metzger B, Cecere J G, Spina F, Koschkar S, Calderón L, Romeike T und Quillfeldt P (2017): High prevalence of *Trichomonas gallinae* in wild columbids across western and southern Europe. *Parasit Vectors* 10 (1): 242

Mathis G F, McDougald L R und Fuller L (1984): Elevated methemoglobin in the pathology of avian Coccidia (Protozoa, Apicomplexa) and Histomonas (Protozoa, Sarcocystidophora). *J Parasitol* 70: 838-839

Mazet M, Diogon M, Alderete J F, Vivarès C P und Delbac F (2008): First molecular characterisation of hydrogenosomes in the protozoan parasite *Histomonas meleagridis*. *Int J Parasitol* 38: 177-190

McDougald L R (1984): Histomoniasis in Hofstad, M.S. *Diseases of Poultry*. Iowa State University Press, Ames/Iowa: 717-723

McDougald L R (2003): Other protozoan diseases of the intestinal tract—histomoniasis (blackhead). In: *Diseases of Poultry*. Y. M. Saif, H. J. Barnes, J. R. Glisson, A. M. Fadly, L. R. McDougald, and D. E. Swayne eds. Iowa State University Press, Ames, IA 1001–1006

McDougald L R (2005): Blackhead disease (Histomoniasis) in poultry: a critical review. *Avian Dis* 49: 462-476

McDougald L R (2008): Histomoniasis (Blackhead) and other protozoan diseases of the intestinal tract. In: *Diseases of Poultry*, 12th ed. Saif, Y. M., Fadly A. M., Glisson J. R., McDougald L. R., Nolan L. K. and Swayne, D. E. Iowa State Press, Ames, Iowa: 1095- 1105

McDougald L R und Galloway R B (1973): Blackhead disease: *in vitro* isolation of *Histomonas meleagridis* as a potentially useful diagnostic aid. *Avian Dis* 17: 847-850

McDougald L R und Hansen M F (1969): Serum protein changes in chicken subsequent to infection with *Histomonas meleagridis*. *Avian Dis* 13: 673-677

McDougald L R und Hansen M F (1970): *Histomonas meleagridis*: Effect on plasma enzymes in chickens and turkeys. *Exp Parasitol* 27: 229-235

- McDougald L R und Hu J (2001): Blackhead Disease (*Histomonas meleagridis*) aggravated in broiler chickens by concurrent infection with cecal coccidiosis (*Eimeria tenella*). Avian Dis 45: 307-312
- McDougald L R und Fuller L (2005): Blackhead disease in turkeys: direct transmission of *Histomonas meleagridis* from bird to bird in a laboratory model. Avian Dis 49: 328-331
- McDougald L R und Reid W M (1978): *Histomonas meleagridis* and relatives. In: Parasitic Protozoa: 139-161
- McDougald L R, Calneck B, Barnes H J, Beard C W und Saif Y M (1997): Other protozoan diseases of the intestinal tract – histomoniasis (blackhead), In: Disease of Poultry, Iowa State University Press, Ames, 1001-1006
- McDougald L R, Abraham M and Beckstead R B (2012): An Outbreak of Blackhead Disease (*Histomonas meleagridis*) in Farm-Reared Bobwhite Quail (*Colinus virginianus*). Avian Dis 56:4, 754-756
- McGuire W C und Cavett J W (1952): Blood studies on histomoniasis in turkeys. Poult. Sci. 31: 610–617
- McMillan E G und Zellen G (1991): Cross-Canada disease report. Can Vet J 32: 244
- Mielewczik M, Mehlhorn H, Al-Quraishy S, Grabensteiner E und Hess M (2008): Transmission electron microscopic studies of stages of *Histomonas meleagridis* from clonal cultures. Parasitol Res 103: 745-750
- Mitra T, Gerner W, Kidane F A, Wernsdorf P, Hess M, Saalmüller A und Liebhart D (2017): Vaccination against histomonosis limits pronounced changes of B cells and T-cell subsets in turkeys and chickens. Vaccine 35(33): 4184–4196
- Mitra T, Kidane F A, Hess M und Liebhart D (2018). Unravelling the immunity of poultry against the extracellular protozoan parasite *Histomonas meleagridis*, is a cornerstone for vaccine development: a review. Front Immunol 9: 2518
- Mohd Shaufi M A, Sieo C C, Chong C W, Gan H M und Ho Y W (2015): Deciphering chicken gut microbial dynamics based on high-throughput 16S rRNA metagenomics analyses. Gut Pathog 7: 4
- Moore V A (1896): The direct transmission of infectious enterohepatitis in turkeys. USDA Circular 5

More-Bayona J A, Torrealba D, Thomson C, Wakaruk J, Barreda D R (2020): Differential effects of drinking water on phagocyte responses of broiler chickens against fungal and bacterial challenges. *Front Immunol* 11: 584

Mostegl M M, Richter B und Nedorost N (2010): Design and validation of an oligonucleotide probe for the detection of protozoa from the order Trichomonadida using chromogenic in situ hybridization. *Vet Parasitol* 171: 1–6

Muller H (1990): Enzootic typhlohepatitis in intensively kept pullets. *Monatsch. Veterinarmed* 45: 464-467

Munsch M, Lotfi A, Hafez H M, Al-Quraishy S und Mehlhorn H (2009a): Light and transmission electron microscopic studies on trophozoites and cyst-like stages of *Histomonas meleagridis* from cultures. *Parasitol Res* 104: 683-689

Munsch M, Mehlhorn H, Al-Quraishy S, Lotfi A R und Hafez H M (2009b): Molecular biological features of strains of *Histomonas meleagridis*. *Parasitol Res* 104: 1137-1140

Nakphaichit M, Thanomwongwattana S, Phraephaisarn C, Sakamoto N, Keawsompong S, Nakayama J und Nitisinprasert S (2011): The effect of including *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 during post-hatch feeding on the growth and ileum microbiota of broiler chickens. *Poult Sci* 90: 2753-2765

Ohara T und Reid W M (1961): Histomoniasis in chickens: age of greatest susceptibility and pathogenicity studies. *Avian Dis* 5: 355–361

Olsen R H, Bisgaard M, Christensen J P, Kabell S und Christensen H (2016): Pathology and molecular characterization of *Escherichia coli* associated with the avian salpingitis-peritonitis disease syndrome. *Avian Dis* 60: 1-7

Olsen R H, Stockholm N M, Permin A, Christensen J P, Christensen H und Bisgaard M (2011): Multi-locus sequence typing and plasmid profile characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* associated with increased mortality in free-range layer flocks. *Avian Pathol* 40(5): 437-444

Patra G, Prasad H, Lalsiamthara J, Kataria J, Malsawmkima D, Lalrinkima H (2013): Prevalence of *Histomonas meleagridis* in broiler chicken in different parts of Mizoram, India. *Int J Poult Sci* 12: 98

- Paudel S, Stessl B, Fürst C, Jandreski-Cvetkovic D, Hess M und Hess C (2018): Identical genetic profiles of *Escherichia coli* isolates from the gut and systemic organs of chickens indicate systemic bacterial dissemination, most likely due to intestinal destruction caused by histomonosis. Avian Dis 62: 300-306
- Pennycott T W (2000): Causes of mortality and culling in adult pheasants. Vet Rec 146: 273-278
- Popp C, Hauck R, Balczulat S und Hafez H M (2011): Recurring histomonosis on an organic farm. Avian Dis 55: 328-330
- Pourapedin M, Guan L und Zhao X (2015): Xylo-oligosaccharides and virginiamycin differentially modulate gut microbial composition in chickens. Microbiome 3: 15
- Powell F L, Rothwell L, Clarkson M J und Kaiser P (2009): The turkey, compared to the chicken, fails to mount an effective early immune response to *Histomonas meleagridis* in the gut. Parasite Immunol 31: 312-327
- Pschyrembel W (1994): Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. 257. Auflage, Berlin; New York: De Gruyter ISBN 3-11-012692-3
- Reis Jr. J L, Beckstead R B, Brown C C und Gerhold R W (2009): *Histomonas meleagridis* and capillarid infection in a captive chukar (*Alectoris chukar*). Avian Dis 53: 637-639
- Richter B, Kübber-Heiss A, Weissenböck H und Schmidt P (2008): Detection of *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba* spp. and *Monocercomonas* spp. in the gastrointestinal tract of snakes by in-situ hybridization. J Comp Pathol 138: 63–71
- Salisch H und Behr K P (2012): Histomonadose, In: Kompendium der Geflügelkrankheiten/Hrsg.: Siegmann O und Neumann U, 7. Auflage, S. 314 – 316, Hannover: Schlütersche Verlagsgesellschaft – ISBN 978-3-89993-083-2
- Saunders L M, Tompkins D M und Hudson P J (2000): The role of oxygen availability in the embryonation of *Heterakis gallinarum* eggs. Int J Parasitol 30: 1481- 1485
- Schulze H W (1975): Über das Auftreten von Schwarzkopfkrankheit bei Legehennenaufzuchten in Norddeutschland. Praktischer Tierarzt 56: 164-168
- Schuster F L (1968): Ultrastructure of *Histomonas meleagridis* (Smith) Tyzzer, a parasitic amoeba-flagellate. J Parasitol 54: 725-737

- Schwarz A, Gauly M, Abel H, Daş G, Humburg J, Weiss A T A, Breves G und Rautenschlein S (2011): Pathobiology of *Heterakis gallinarum* mono-infection and coinfection with *Histomonas meleagridis* in layer chickens. *Avian Pathol* 40: 277-287
- Sentíes-Cué G, Chin R P und Shivaprasad H L (2009): Systemic histomoniasis associated with high mortality and unusual lesions in the bursa of fabricius, kidneys, and lungs in commercial turkeys. *Avian Dis* 53: 231-238
- Shivaprasad H L, Sentíes-Cué G, Chin R P, Crespo R, Charlton B and Cooper G L (2002): Blackhead in turkeys, a re-emerging disease? In: Proceedings of the 4th International Conference on Turkey Diseases. Berlin, Germany. 15-18 May. Ed. Hafez H M, ISBN 3 936815-58-5. P. 143-144
- Sigmon C S, Malheiros R D, Anderson K E, Payne J A und Beckstead R B (2019): Blackhead Disease: recovery of layer flock after disease challenge. *J Appl Poult Res* 28: 755-760
- Simon K, De Vries Reilingh G, Kemp B und Lammers A (2014): Development of ileal cytokine and immunoglobulin expression levels in response to early feeding in broilers and layers. *Poult Sci* 93: 3017-3027
- Singh A, Weissenböck H und Hess M (2008): *Histomonas meleagridis*: Immunohistochemical localization of parasitic cells in formalin-fixed, paraffinembedded tissue sections of experimentally infected turkeys demonstrates the wide spread of the parasite in its host. *Exp Parasitol* 118: 505-513
- Smith T (1895): An infectious disease among turkeys caused by protozoa (infectious enterohepatitis). U.S. Depart of Agricult, Bur of Anim Ind Bull 8: 3-50
- Soliman E S, Sobeih M A A, Ahmad Z H, Hussein M M, Abdel-Latiff H und Moneim A A (2009): Seasonal epidemiological surveillance on bacterial and fungal pathogens in broiler farms in Egypt. *Int J Poult Sci* 8: 720-727
- Springer W T, Johnson J und Reid W M (1969): Transmission of Histomoniasis with male *Heterakis gallinarum* (Nematoda). *Parasitol* 59: 401-405
- Springer W T, Johnson J und Reid W M (1970): Histomoniasis in gnotobiotic chickens and turkeys: Biological aspects of the role of bacteria in the etiology. *Exp Parasitol* 28: 383-392
- Squires S, Fisher M, Gladstone O, Rogerson S, Martin P, Martin S, Lester H, Sygall R und Underwood N (2012): Comparative efficacy of flubendazole and a commercially available

herbal wormer against natural infections of *Ascaridia galli*, *Heterakis gallinarum* and intestinal *Capillaria spp.* in chickens. *Vet Parasitol* 185: 352- 364

Stepkowski S und Klimont S (1980): The influence of some microorganisms on the in vitro multiplication of *Histomonas meleagridis*. *Wiad Parazytol* 26: 635-643

Stokholm N M, Permin A, Bisgaard M, Christensen J P (2010): Causes of mortality in commercial organic layers in Denmark. *Avian Dis* 54, 1241–1250

Sulejmanovic T, Turblin V, Bilic I, Jaskulska B und Hess M (2019): Detection of *Histomonas meleagridis* DNA in dust samples obtained from apparent healthy meat turkey flocks without effect on performance. *Avian Pathol* 48 (4): 1-18

Swales W E (1948): Enterohepatitis (blackhead) in turkeys. II. Observations on transmission by the caecal worm (*Heterakis gallinae*). *Can J Comp Med Vet Sci* 12: 97-100

Thompson K, Burkholder K, Patterson J und Applegate T J (2008): Microbial ecology shifts in the ileum of broilers during feed withdrawal and dietary manipulations. *Poult Sci* 87: 1624-1632

Tyzzer E E (1920): The flagellate character and reclassification of the parasite producing "blackhead" in turkeys – *Histomonas* (gen. noc.) *meleagridis* (Smith). *J Parasitol* 6: 124-131

Tyzzer E E (1926): *Heterakis vesicularis* Frolich 1791: a vector of an infectious disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 23: 708–709

Tyzzer E E (1933): Loss of virulence in the protozoon of "blackhead," a fatal disease of turkeys, and the immunizing properties of attenuated strains. *Science* 78: 522–523

Tyzzer E E (1934): Studies on histomoniasis, or "Blackhead" infection, in the chicken and the turkey. *Proc Am Acad Arts Sci* 69: 189–264

Tyzzer E E (1936): A study of immunity produced by infection with attenuated culture strains of *Histomonas meleagridis*. *J Comp Pathol Therap* 49: 285 - 303

Tyzzer E E und Fabyan M (1920): Further studies on "blackhead" in turkeys, with special reference to transmission by inoculation. *J Infect Dis* 27: 207-239

Tyzzer E E, Fabyan M, Foot N C (1921): Further observations on „blackhead“ in turkeys. *J. Infect Dis* 29: 268-286

Tyzzer E E und Fabyan F (1922): Practical suggestions for raising turkeys. *Dept Bull* 15, Massachusetts Department Agric: 31-32

Tyzzar E E und Collier J (1925): Induced and natural transmission of blackhead in the absence of *Heterakis*. *J Infect Dis* 37: 265-276

Tyzzar E E, Fabyan M und Foot N C (1921): Further observations on "blackhead" in Turkeys. *J Infect Dis* 29: 268-286

Uni Z, Noy Y und Sklan D (1996): Development of the small intestine in heavy and light strain chicks before and after hatching. *Br Poult Sci* 37: 63-71

Van der Heijden H M (2009): Detection, typing and control of *Histomonas meleagridis*. Veröff. Diss., Universität Utrecht, ISBN: 978-90-393-49847

Van der Heijden H M und Landman W J (2008a): In vitro effect of herbal products against *Histomonas meleagridis*. *Vet Parasitol* 154: 1-7

Van der Heijden H M und Landman W J (2008b): In vivo effect of herbal products against *Histomonas meleagridis* in turkeys. *Avian Pathol* 37: 45-50

Van der Heijden H M und Landman W J (2011): High seroprevalence of *Histomonas meleagridis* in Dutch layer chickens. *Avian Dis* 55: 324-327

Van der Heijden H M, Landman W J, Greve S und Peek R (2006): Genotyping of *Histomonas meleagridis* isolates based on internal transcribed spacer-1 sequences. *Avian Pathol* 35: 330-334

Van der Heijden H M, Stegeman A und Landman W J (2010): Development of a blocking-ELISA for the detection of antibodies against *Histomonas meleagridis* in chickens and turkeys. *Vet Parasitol* 171: 216-222

Van der Heijden H M, De Gussem K und Landman W J (2011): Assessment of the antihistomonal effect of paromomycin and tiamulin. *Tijdschr Diergeneeskd* 136: 410-416

Vereecken M, Gelaude P, Gussem M D, Geerinckx M und Depondt W (2015): Field experiences with paromomycin sulphate as treatment for *Histomonas meleagridis* in poultry breeders. In: Proc. 19<sup>th</sup> The World Veterinary Poultry Association Conference, Cape Town, South Africa. p. 147

Videnska P, Rahman M M, Faldynova M, Babak V, Matulova M E, Prukner-Radovic E, Krizek I, Smole-Mozina S, Kovac J, Szmolka A, Nagy B, Sedlar K, Cejkova D und Rychlik I (2014): Characterization off egg laying hen and broiler fecal microbiota in poultry farms in Croatia,

Czech Republic, Hungary and Slovenia. PLoS One 9(10): e110076.doi: 10.1371/journal.pone.0110076

Visvesvara G S, Garcia L S (2002): Culture of protozoan parasites. Clinical Microbiology reviews 15: 327-328

Walker R L, Hayes D C, Sawyer S J, Nordhausen R W, Van Hoosear K A und BonDurant R H (2003): Comparison of the 5.8S rRNA gene and internal transcribed spacer regions of trichomonadid protozoa recovered from the bovine preputial cavity. J Vet Diagn Invest 15: 14–20

Wegeforth H M und Wegeforth P (1921): Observations on the effect of IPECAC in the treatment of infectious entero-hepatitis (blackhead) in turkeys. J Pharmacol Exp Ther 17: 249-259

Welter C J (1960): The effect of various stresses upon histomoniasis in chickens and turkeys. Poult Sci 39: 361–366

Wiggins P M (1990): Role of water in some biological processes. Microbiol Rev 54: 432-449

Wilson S G und Perie N M (1966): A study of the blood changes caused by *Histomonas meleagridis* in chickens. Tijdschr Diergeneeskd 91: 509-522

Windisch M und Hess M (2009): Establishing an indirect sandwich enzymelinked-immunosorbent-assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Histomonas meleagridis* from experimentally infected specific pathogen-free chickens and turkeys. Vet Parasitol 161: 25–30

Windisch M und Hess M (2010): Experimental infection of chickens with *Histomonas meleagridis* confirms the presence of antibodies in different parts of the intestine. Parasite Immunol 32: 29-35

Xu J, Qu C und Tao J (2014): Loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Histomonas meleagridis* infection in chickens targeting the 18S rRNA sequences. Avian Pathol 43: 62–67

Zahoor M A, Liebhart D und Hess M (2011): Progression of Histomonosis in Commercial Chickens Following Experimental Infection with an In Vitro Propagated Clonal Culture of *Histomonas meleagridis*. Avian Dis 55: 29–34

Zanella A, Alborali G L, Bardotti M, Candotti P, Guadagnini P F, Martino P A und Stonfer M (2000): Severe *Escherichia coli* O111 septicaemia and polyserositis in hens at the start of lay. *Avian Pathol* 29: 311-317

Zaragatzki E, Hess M, Grabensteiner E, Abdel-Ghaffar F, Al-Rasheid K A S und Mehlhorn H (2010a): Light and transmission electron microscopic studies on the encystation of *Histomonas meleagridis*. *Parasitol Res* 106: 977-983

Zaragatzki E, Mehlhorn H, Abdel-Ghaffar F, Rasheid K A S, Grabensteiner E und Hess M (2010b): Experiments to produce cysts in cultures of *H. meleagridis* – the agent of histomonosis in poultry. *Parasitol Res* 106: 1005-1007

Zenner L, Callait M P, Granier C, Chauve C (2003): In vitro effect of essential oils from *Cinnamomum aromaticum*, *Citrus limon* and *Allium sativum* on two intestinal flagellates of poultry *Tetratrichomonas gallinarum* and *Histomonas meleagridis*. *Parasite* 10: 153–157

9 Anhang

Tabelle 16: Produktionsparameter Betrieb 1

Alter in Lebenswochen	Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert)	Legeleistung Gelege % Resthenne (Integrationsstandard)	Differenz Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert - Integrationsstandard)	Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert)	Abgänge kum. % POL (Integrationsstandard)	Differenz Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert - Integrationsstandard)
21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	-0,20
24	13,99	22,00	-8,01	0,32	0,70	-0,38
28	85,15	86,00	-0,85	1,61	1,40	0,21
32	84,37	85,00	-0,63	3,27	2,30	0,97
36	83,80	81,00	2,80	4,48	3,00	1,48
40	80,79	77,00	3,79	5,74	3,70	2,04
44	77,56	73,00	4,56	7,92	4,40	3,52
48	72,20	69,00	3,20	9,55	5,20	4,35
52	68,57	64,00	4,57	11,00	6,00	5,00
56	59,83	60,00	-0,17	11,88	7,00	4,88
Summe			9,26			21,87

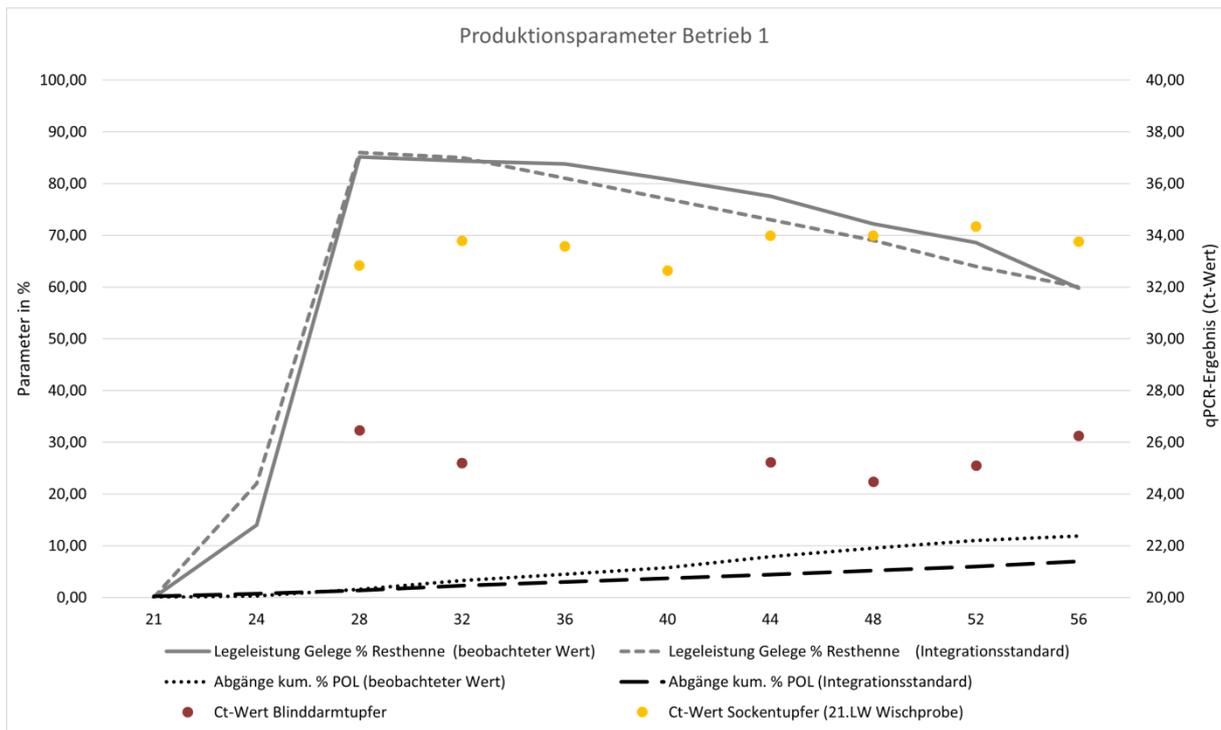


Abbildung 26: Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb

1

Tabelle 17: Produktionsparameter Betrieb 2

Alter in Lebenswochen	Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert)	Legeleistung Gelege % Resthenne (Integrationsstandard)	Differenz Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert - Integrationsstandard)	Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert)	Abgänge kum. % POL (Integrationsstandard)	Differenz Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert - Integrationsstandard)
20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
24	6,13	22,00	-15,87	1,06	0,70	0,36
28	90,45	86,00	4,45	2,94	1,40	1,54
32	89,70	85,00	4,70	4,01	2,30	1,71
36	82,97	81,00	1,97	4,80	3,00	1,80
40	76,05	77,00	-0,95	6,15	3,70	2,45
44	73,22	73,00	0,22	7,22	4,40	2,82
48	69,97	69,00	0,97	8,17	5,20	2,97
52	65,83	64,00	1,83	8,97	6,00	2,97
56	64,00	60,00	4,00	10,42	7,00	3,42
Summe			1,32			20,04

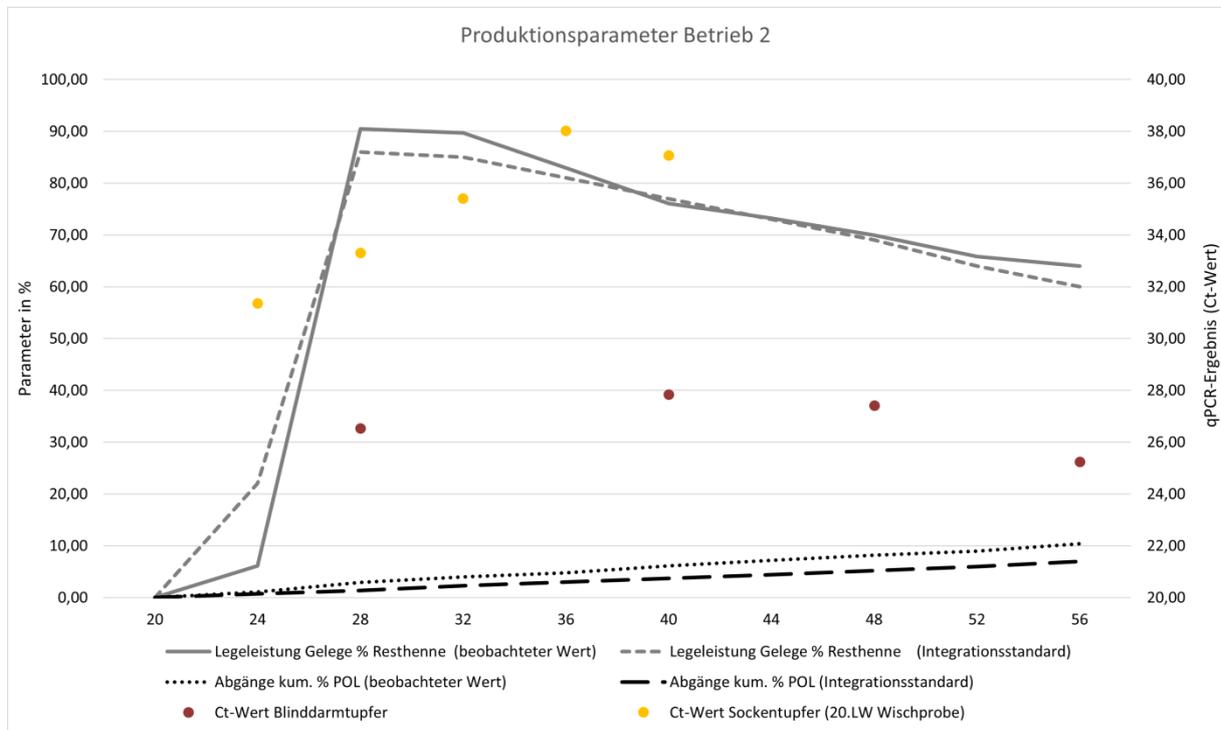


Abbildung 27: Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb

2

Tabelle 18: Produktionsparameter Betrieb 3

Alter in Lebenswochen	Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert)	Legeleistung Gelege % Resthenne (Integrationsstandard)	Differenz Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert - Integrationsstandard)	Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert)	Abgänge kum. % POL (Integrationsstandard)	Differenz Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert - Integrationsstandard)
20	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,05
24	10,89	22,00	-11,11	0,53	0,70	-0,17
28	87,05	86,00	1,05	0,95	1,40	-0,45
32	88,23	85,00	3,23	1,28	2,30	-1,02
36	83,66	81,00	2,66	1,68	3,00	-1,32
40	80,11	77,00	3,11	1,91	3,70	-1,79
44	76,85	73,00	3,85	2,03	4,40	-2,37
48	72,93	69,00	3,93	2,31	5,20	-2,89
52	66,44	64,00	2,44	2,70	6,00	-3,30
56	63,66	60,00	3,66	3,13	7,00	-3,87
Summe			12,82			-17,13

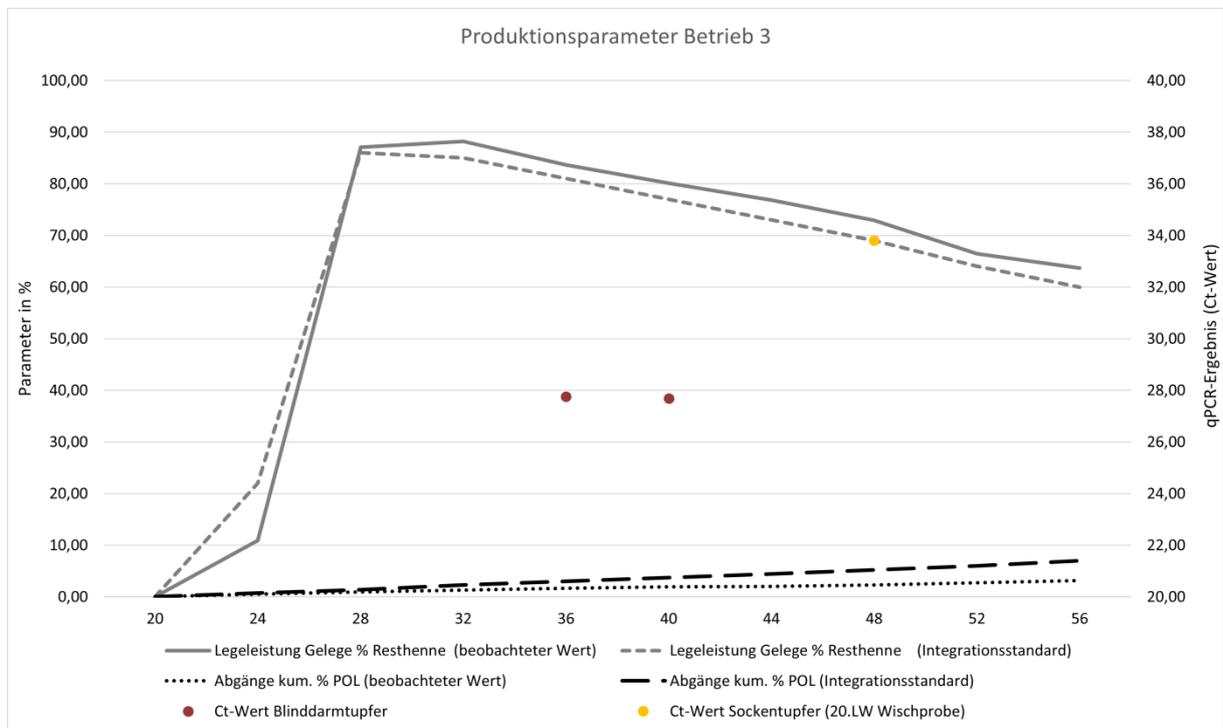


Abbildung 28: Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb

3

Tabelle 19: Produktionsparameter Betrieb 4

Alter in Lebenswochen	Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert)	Legeleistung Gelege % Resthenne (Integrationsstandard)	Differenz Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert - Integrationsstandard)	Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert)	Abgänge kum. % POL (Integrationsstandard)	Differenz Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert - Integrationsstandard)
21	0,00	0,00	0,00	0,18	0,20	-0,02
24	24,77	22,00	2,77	0,71	0,70	0,01
28	87,30	86,00	1,30	2,58	1,40	1,18
32	87,41	85,00	2,41	3,32	2,30	1,02
36	84,83	81,00	3,83	4,14	3,00	1,14
40	80,53	77,00	3,53	5,25	3,70	1,55
44	76,52	73,00	3,52	6,52	4,40	2,12
48	73,31	69,00	4,31	7,57	5,20	2,37
52	68,74	64,00	4,74	8,86	6,00	2,86
56	65,78	60,00	5,78	10,26	7,00	3,26
Summe			32,19			15,49

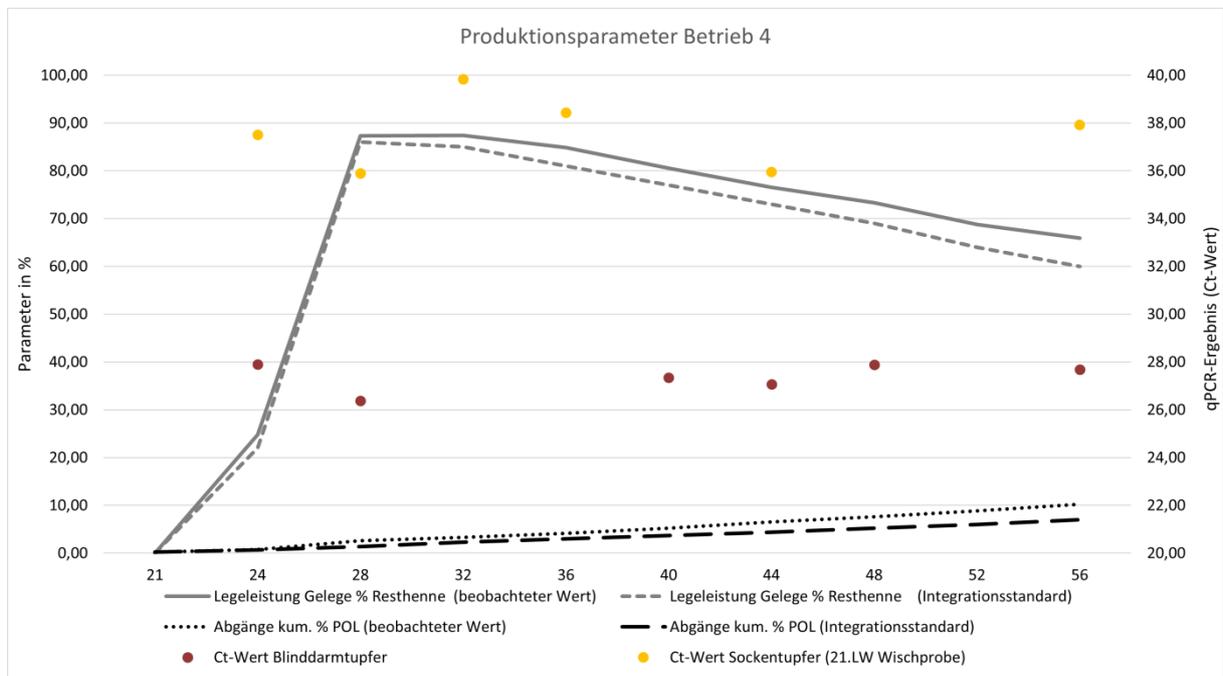


Abbildung 29: Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb

4

Tabelle 20: Produktionsparameter Betrieb 5

Alter in Lebenswochen	Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert)	Legeleistung Gelege % Resthenne (Integrationsstandard)	Differenz Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert - Integrationsstandard)	Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert)	Abgänge kum. % POL (Integrationsstandard)	Differenz Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert - Integrationsstandard)
19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
24	46,74	22,00	24,74	1,98	0,70	1,28
28	87,78	86,00	1,78	2,76	1,40	1,36
32	87,49	85,00	2,49	3,29	2,30	0,99
36	85,01	81,00	4,01	3,63	3,00	0,63
40	82,98	77,00	5,98	4,02	3,70	0,32
44	77,78	73,00	4,78	4,30	4,40	-0,10
48	72,87	69,00	3,87	4,70	5,20	-0,50
52	68,68	64,00	4,68	5,14	6,00	-0,86
56	62,51	60,00	2,51	5,67	7,00	-1,33
Summe			54,84			1,79

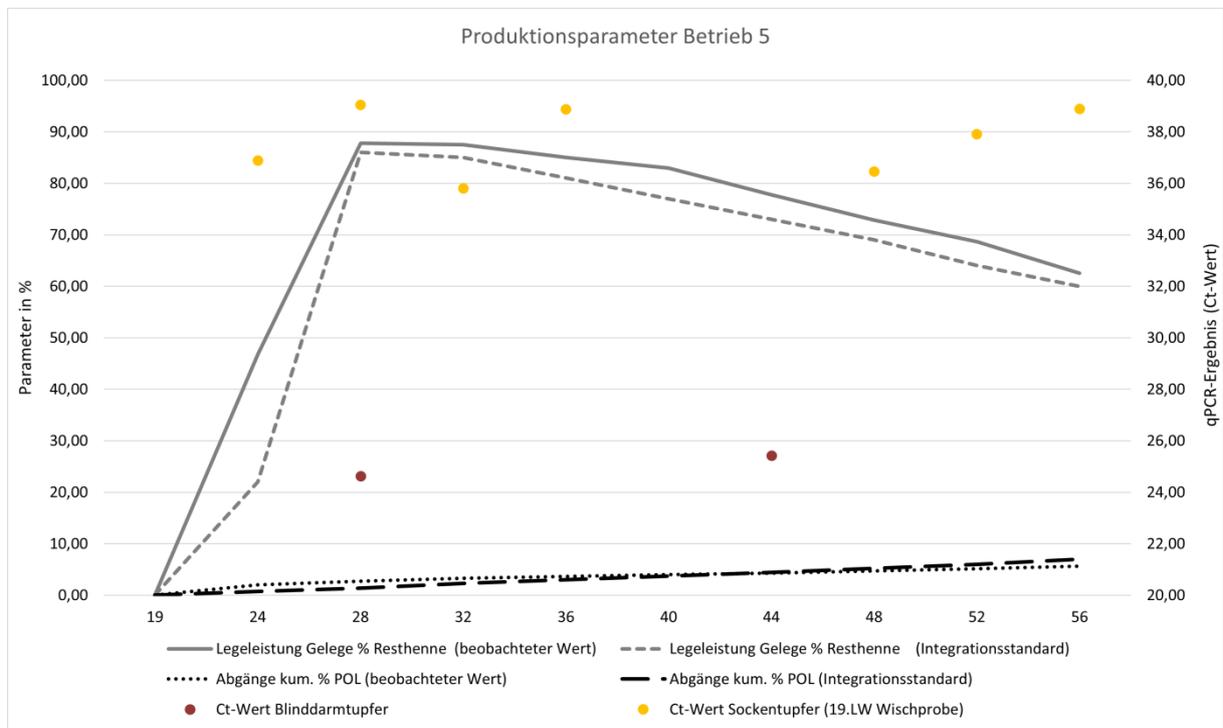


Abbildung 30: Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb 5

Tabelle 21: Produktionsparameter Betrieb 6

Alter in Lebenswochen	Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert)	Legeleistung Gelege % Resthenne (Integrationsstandard)	Differenz Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert - Integrationsstandard)	Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert)	Abgänge kum. % POL (Integrationsstandard)	Differenz Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert - Integrationsstandard)
19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
24	23,60	22,00	1,60	1,54	0,70	0,84
28	87,67	86,00	1,67	2,69	1,40	1,29
32	88,01	85,00	3,01	3,69	2,30	1,39
36	85,32	81,00	4,32	4,18	3,00	1,18
40	81,97	77,00	4,97	4,60	3,70	0,90
44	78,86	73,00	5,86	5,10	4,40	0,70
48	72,64	69,00	3,64	5,73	5,20	0,53
52	69,07	64,00	5,07	6,39	6,00	0,39
56	63,61	60,00	3,61	7,02	7,00	0,02
Summe			33,75			7,24

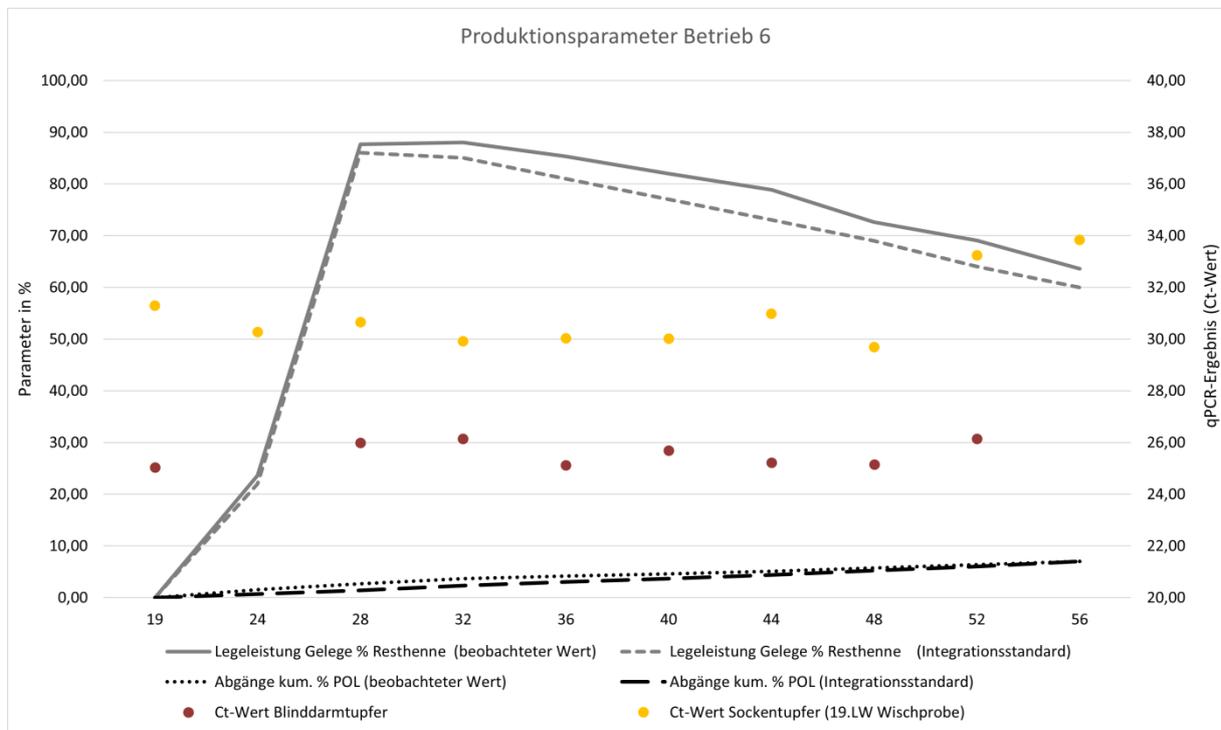


Abbildung 31: Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb

6

Tabelle 22: Produktionsparameter Betrieb 7

Alter in Lebenswochen	Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert)	Legeleistung Gelege % Resthenne (Integrationsstandard)	Differenz Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert - Integrationsstandard)	Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert)	Abgänge kum. % POL (Integrationsstandard)	Differenz Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert - Integrationsstandard)
19	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,05
24	29,15	22,00	7,15	0,80	0,70	0,10
28	87,28	86,00	1,28	2,14	1,40	0,74
32	87,42	85,00	2,42	3,87	2,30	1,57
36	83,62	81,00	2,62	4,65	3,00	1,65
40	82,50	77,00	5,50	5,01	3,70	1,31
44	77,65	73,00	4,65	5,33	4,40	0,93
48	72,12	69,00	3,12	5,85	5,20	0,65
52	67,43	64,00	3,43	6,40	6,00	0,40
56	62,23	60,00	2,23	7,19	7,00	0,19
Summe			32,40			7,59

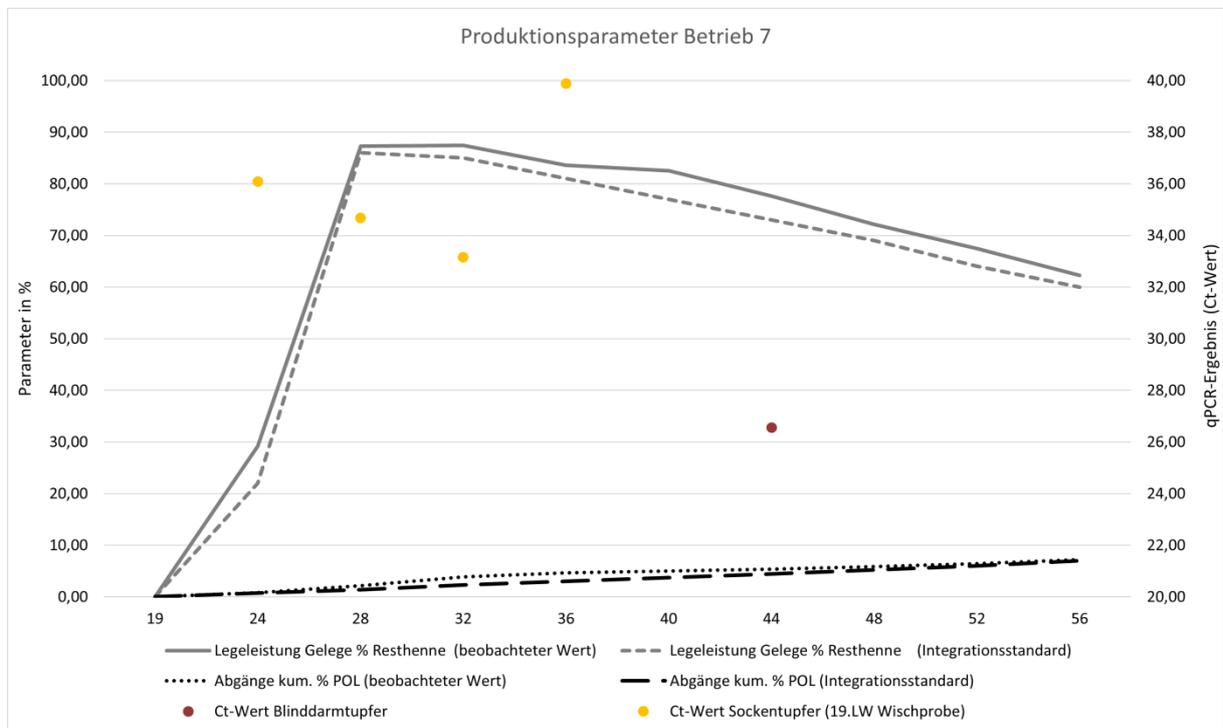


Abbildung 32: Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb

7

Tabelle 23: Produktionsparameter Betrieb 9

Alter in Lebenswochen	Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert)	Legeleistung Gelege % Resthenne (Integrationsstandard)	Differenz Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert - Integrationsstandard)	Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert)	Abgänge kum. % POL (Integrationsstandard)	Differenz Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert - Integrationsstandard)
19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
24	29,15	22,00	7,15	0,35	0,70	-0,35
28	89,51	86,00	3,51	2,20	1,40	0,80
32	88,84	85,00	3,84	4,60	2,30	2,30
36	85,36	81,00	4,36	5,48	3,00	2,48
40	82,02	77,00	5,02	6,18	3,70	2,48
44	77,64	73,00	4,64	6,68	4,40	2,28
48	73,96	69,00	4,96	7,30	5,20	2,10
52	70,90	64,00	6,90	7,94	6,00	1,94
56	66,10	60,00	6,10	8,55	7,00	1,55
Summe			46,48			15,58

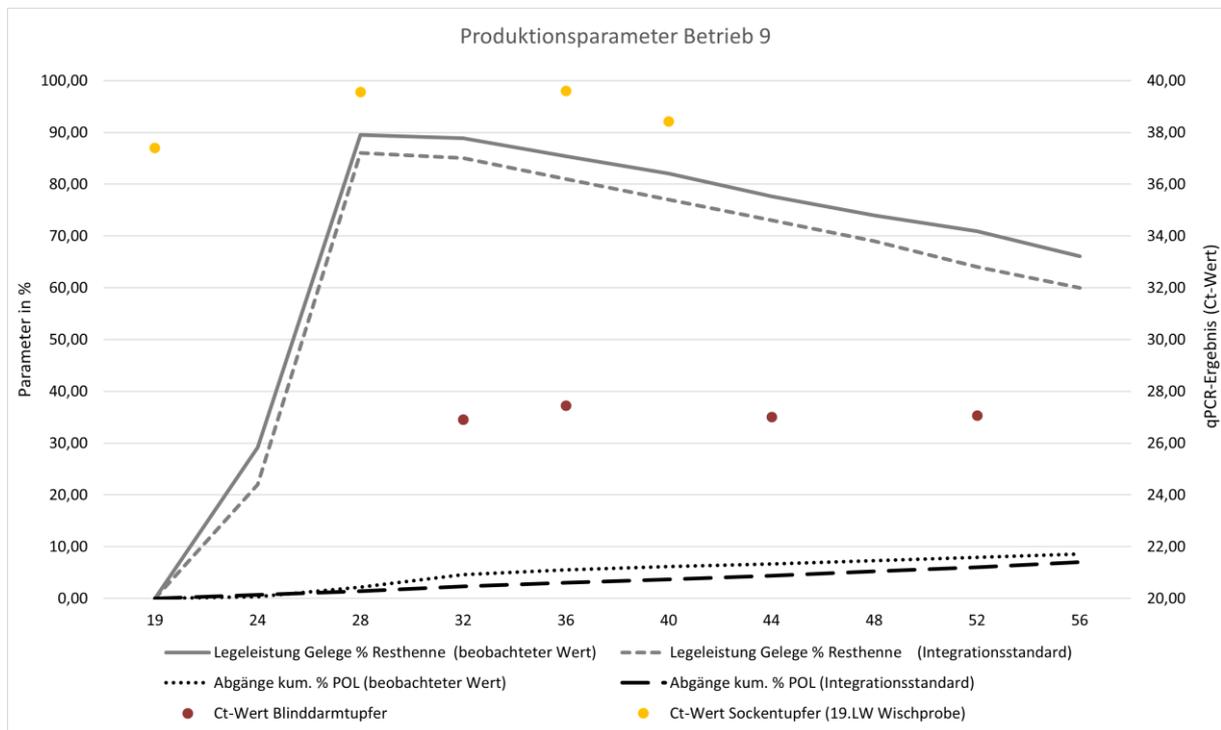


Abbildung 33: Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb 9

9

Tabelle 24: Produktionsparameter Betrieb 10

Alter in Lebenswochen	Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert)	Legeleistung Gelege % Resthenne (Integrationsstandard)	Differenz Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert - Integrationsstandard)	Abgänge % POL (beobachteter Wert)	Abgänge % POL (Integrationsstandard)	Differenz Abgänge % POL (beobachteter Wert - Integrationsstandard)
19	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,08
24	10,26	22,00	-11,74	0,53	0,70	-0,17
28	86,34	86,00	0,34	2,42	1,40	1,02
32	87,91	85,00	2,91	3,28	2,30	0,98
36	86,46	81,00	5,46	4,46	3,00	1,46
40	81,70	77,00	4,70	5,36	3,70	1,66
44	78,32	73,00	5,32	5,97	4,40	1,57
48	75,56	69,00	6,56	6,54	5,20	1,34
52	71,49	64,00	7,49	7,01	6,00	1,01
56	67,23	60,00	7,23	7,45	7,00	0,45
Summe			28,27			9,40

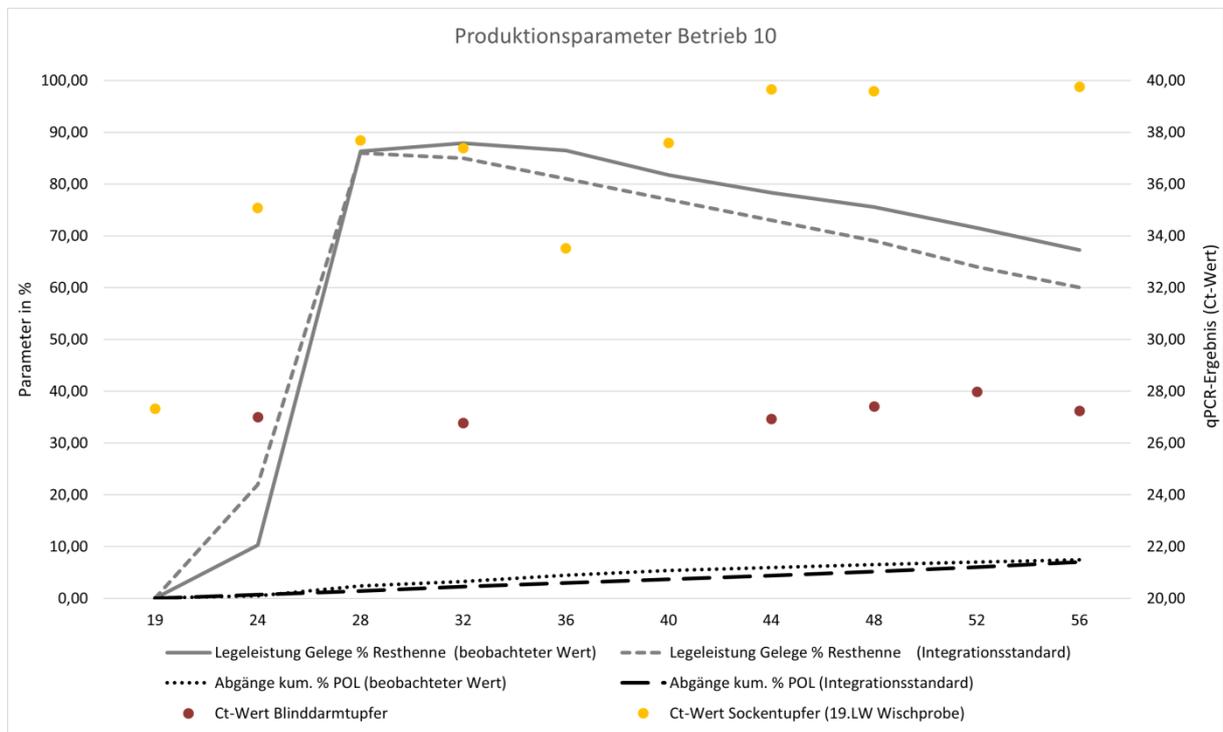


Abbildung 34: Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb 10

Tabelle 25: Produktionsparameter Betrieb 11

Alter in Lebenswochen	Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert)	Legeleistung Gelege % Resthenne (Integrationsstandard)	Differenz Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert - Integrationsstandard)	Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert)	Abgänge kum. % POL (Integrationsstandard)	Differenz Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert - Integrationsstandard)
21	0,00	0,00	0,00	0,43	0,30	0,13
24	3,18	7,10	-3,92	0,67	0,90	-0,23
28	79,93	84,50	-4,57	1,89	2,20	-0,31
32	81,19	86,10	-4,91	2,97	2,90	0,07
36	76,79	80,70	-3,91	4,04	3,40	0,64
40	70,96	75,00	-4,04	5,08	3,80	1,28
44	65,86	71,00	-5,14	5,85	4,30	1,55
48	59,10	67,00	-7,90	6,51	4,60	1,91
52	55,25	63,00	-7,75	7,05	5,00	2,05
56	48,82	58,00	-9,18	7,81	5,40	2,41
Summe			-51,32			9,50

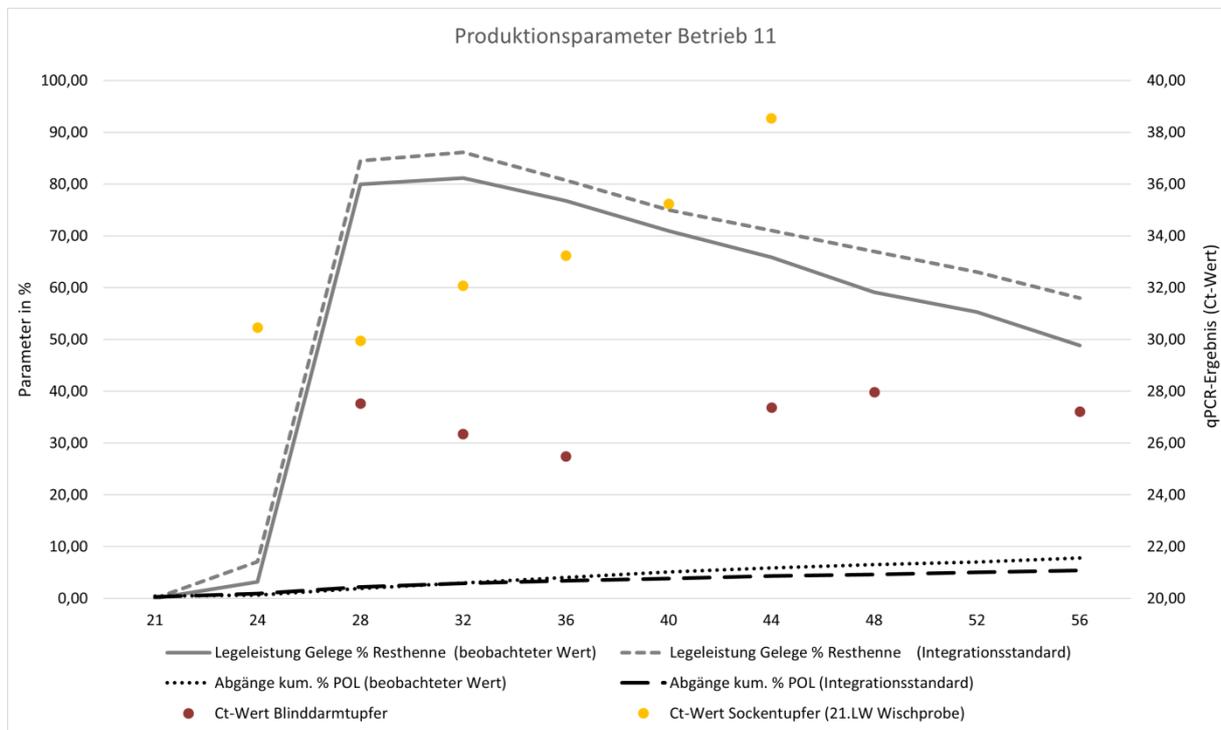


Abbildung 35: Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb

11

Tabelle 26: Produktionsparameter Betrieb 12

Alter in Lebenswochen	Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert)	Legeleistung Gelege % Resthenne (Integrationsstandard)	Differenz Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert - Integrationsstandard)	Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert)	Abgänge kum. % POL (Integrationsstandard)	Differenz Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert - Integrationsstandard)
20	0,00	0,00	0,00	0,06	0,20	-0,14
24	8,58	7,10	1,48	0,50	0,90	-0,40
28	84,20	84,50	-0,30	1,51	2,20	-0,69
32	83,02	86,10	-3,08	2,20	2,90	-0,70
36	77,21	80,70	-3,49	2,93	3,40	-0,47
40	72,56	75,00	-2,44	3,66	3,80	-0,14
44	67,38	71,00	-3,62	4,22	4,30	-0,08
48	62,67	67,00	-4,33	4,95	4,60	0,35
52	57,13	63,00	-5,87	5,52	5,00	0,52
56	53,99	58,00	-4,01	6,46	5,40	1,06
Summe			-25,66			-0,69

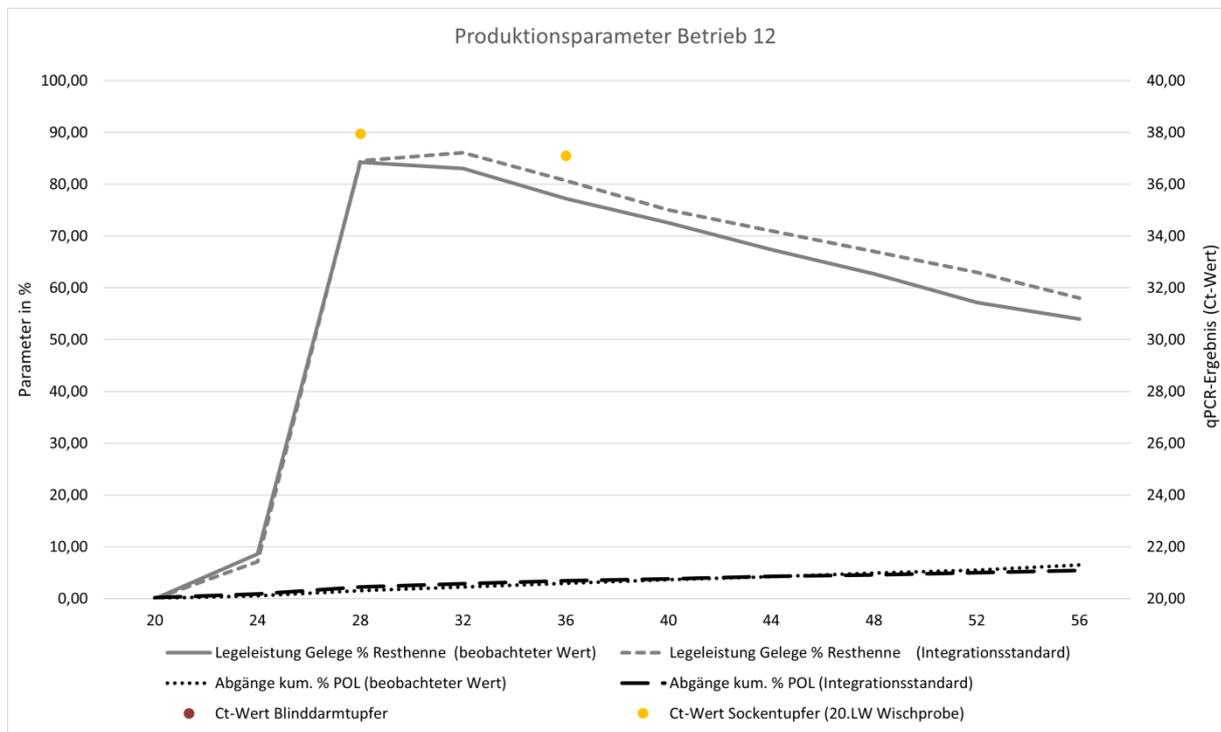


Abbildung 36: Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb 12

Tabelle 27: Produktionsparameter Betrieb 13

Alter in Lebenswochen	Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert)	Legeleistung Gelege % Resthenne (Integrationsstandard)	Differenz Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert - Integrationsstandard)	Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert)	Abgänge kum. % POL (Integrationsstandard)	Differenz Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert - Integrationsstandard)
21	0,00	0,00	0,00	0,09	0,30	-0,21
24	8,37	7,10	1,27	0,48	0,90	-0,42
28	80,98	84,50	-3,52	1,66	2,20	-0,54
32	82,02	86,10	-4,08	3,60	2,90	0,70
36	77,64	80,70	-3,06	4,55	3,40	1,15
40	72,92	75,00	-2,08	4,84	3,80	1,04
44	69,35	71,00	-1,65	5,19	4,30	0,89
48	63,86	67,00	-3,14	5,71	4,60	1,11
52	60,18	63,00	-2,82	6,11	5,00	1,11
56	54,85	58,00	-3,15	6,73	5,40	1,33
Summe			-22,23			6,16

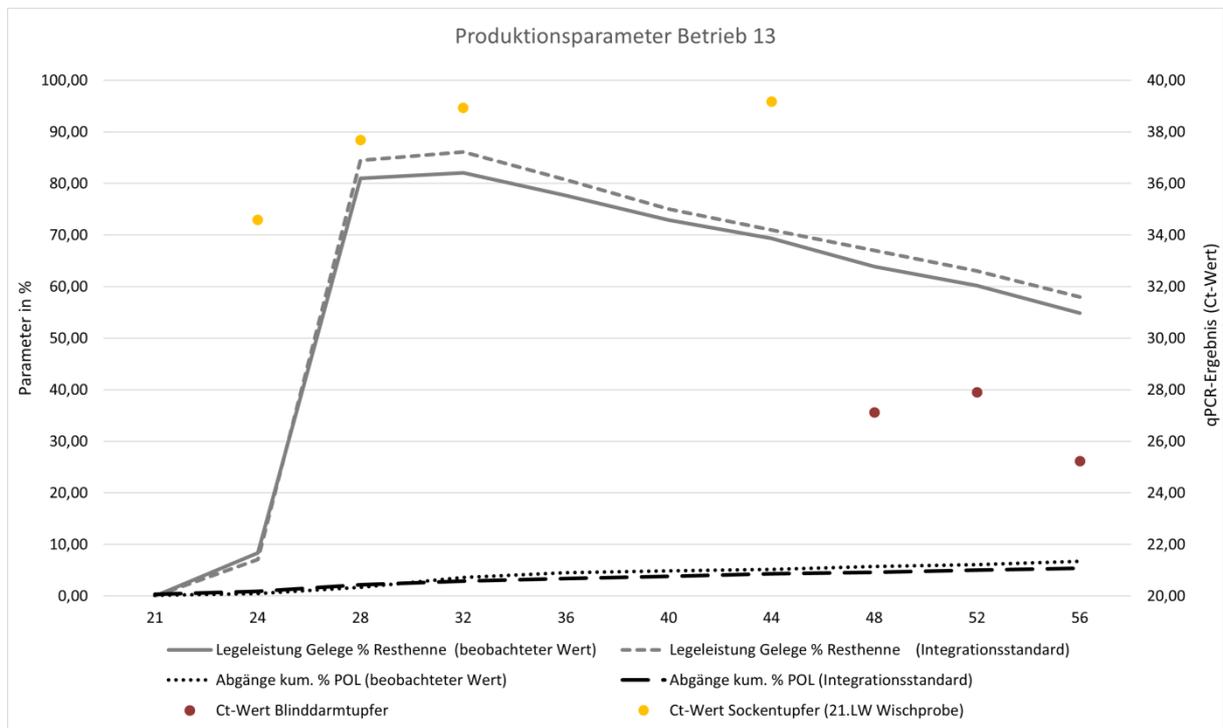


Abbildung 37: Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb 13

Tabelle 28: Produktionsparameter Betrieb 14

Alter in Lebenswochen	Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert)	Legeleistung Gelege % Resthenne (Integrationsstandard)	Differenz Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert - Integrationsstandard)	Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert)	Abgänge kum. % POL (Integrationsstandard)	Differenz Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert - Integrationsstandard)
21	0,00	0,00	0,00	0,30	0,30	0,00
24	0,49	7,10	-6,61	0,54	0,90	-0,36
28	82,01	84,50	-2,49	1,36	2,20	-0,84
32	83,83	86,10	-2,27	1,98	2,90	-0,92
36	79,00	80,70	-1,70	2,49	3,40	-0,91
40	72,55	75,00	-2,45	2,97	3,80	-0,83
44	67,15	71,00	-3,85	3,56	4,30	-0,74
48	65,19	67,00	-1,81	4,20	4,60	-0,40
52	59,44	63,00	-3,56	4,77	5,00	-0,23
56	56,13	58,00	-1,87	5,42	5,40	0,02
Summe			-26,61			-5,21

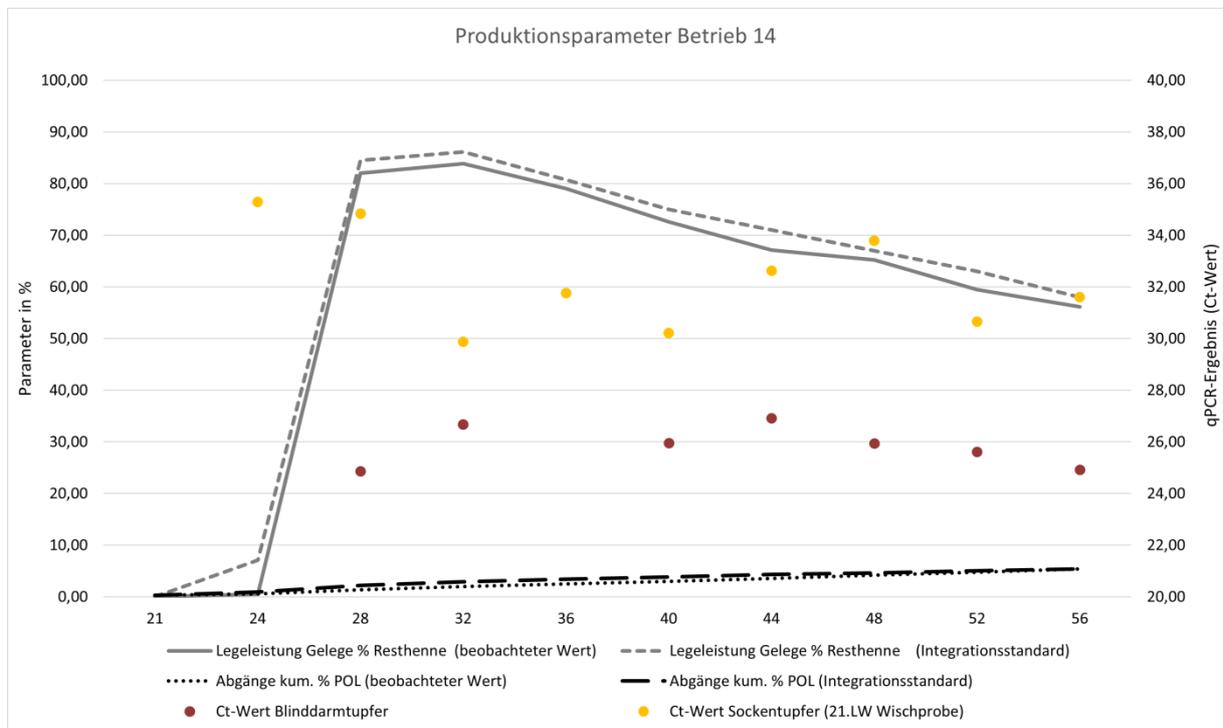


Abbildung 38: Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb 14

Tabelle 29: Produktionsparameter Betrieb 15

Alter in Lebenswochen	Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert)	Legeleistung Gelege % Resthenne (Integrationsstandard)	Differenz Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert - Integrationsstandard)	Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert)	Abgänge kum. % POL (Integrationsstandard)	Differenz Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert - Integrationsstandard)
20	0,00	0,00	0,00	0,43	0,20	0,23
24	0,59	7,10	-6,51	2,17	0,90	1,27
28	76,04	84,50	-8,46	3,58	2,20	1,38
32	85,70	86,10	-0,40	4,09	2,90	1,19
36	81,80	80,70	1,10	4,49	3,40	1,09
40	77,87	75,00	2,87	4,96	3,80	1,16
44	71,70	71,00	0,70	5,39	4,30	1,09
48	67,70	67,00	0,70	5,78	4,60	1,18
52	63,60	63,00	0,60	6,15	5,00	1,15
56	57,41	58,00	-0,59	6,76	5,40	1,36
Summe			-9,99			11,10

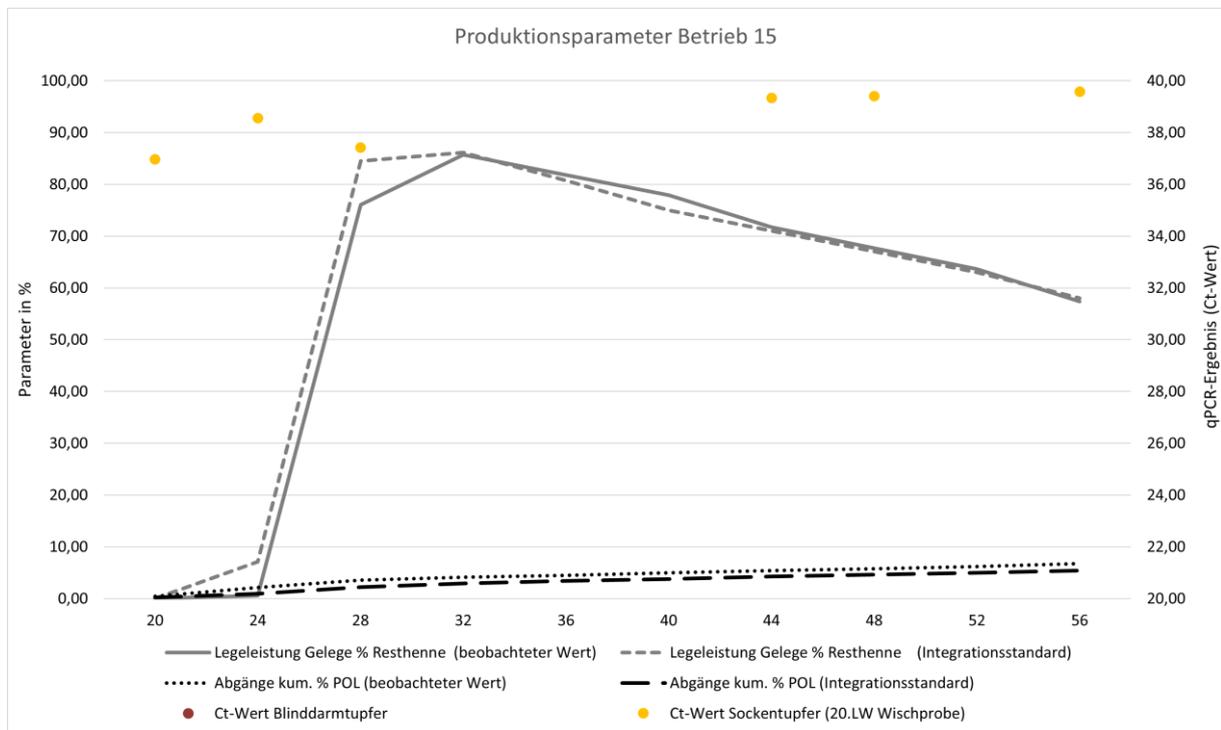


Abbildung 39: Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb 15

15

Tabelle 30: Produktionsparameter Betrieb 16

Alter in Lebenswochen	Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert)	Legeleistung Gelege % Resthenne (Integrationsstandard)	Differenz Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert - Integrationsstandard)	Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert)	Abgänge kum. % POL (Integrationsstandard)	Differenz Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert - Integrationsstandard)
21	0,00	0,00	0,00	0,45	0,30	0,15
24	0,10	7,10	-7,00	0,76	0,90	-0,14
28	79,96	84,50	-4,54	1,92	2,20	-0,28
32	83,99	86,10	-2,11	3,95	2,90	1,05
36	76,72	80,70	-3,98	4,83	3,40	1,43
40	70,90	75,00	-4,10	5,92	3,80	2,12
44	63,41	71,00	-7,59	9,18	4,30	4,88
48	56,79	67,00	-10,21	10,52	4,60	5,92
52	52,33	63,00	-10,67	12,03	5,00	7,03
56	44,97	58,00	-13,03	14,49	5,40	9,09
Summe			-63,23			31,25

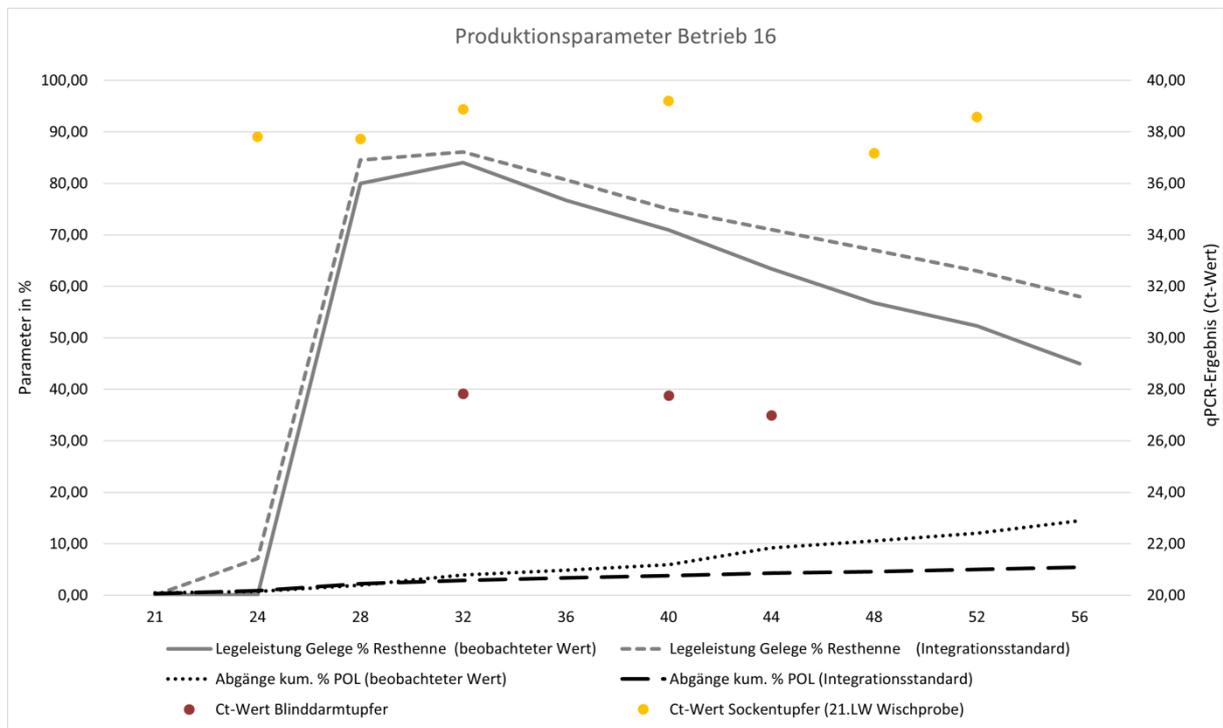


Abbildung 40: Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb 16

Tabelle 31: Produktionsparameter Betrieb 17

Alter in Lebenswochen	Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert)	Legeleistung Gelege % Resthenne (Integrationsstandard)	Differenz Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert - Integrationsstandard)	Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert)	Abgänge kum. % POL (Integrationsstandard)	Differenz Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert - Integrationsstandard)
20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	-0,20
24	0,02	7,10	-7,08	0,54	0,90	-0,36
28	79,37	84,50	-5,13	1,17	2,20	-1,03
32	84,33	86,10	-1,77	2,26	2,90	-0,64
36	76,76	80,70	-3,94	3,34	3,40	-0,06
40	66,34	75,00	-8,66	5,89	3,80	2,09
44	67,49	71,00	-3,51	7,77	4,30	3,47
48	61,74	67,00	-5,26	8,89	4,60	4,29
52	55,96	63,00	-7,04	10,32	5,00	5,32
56	49,81	58,00	-8,19	12,35	5,40	6,95
Summe			-50,58			19,83

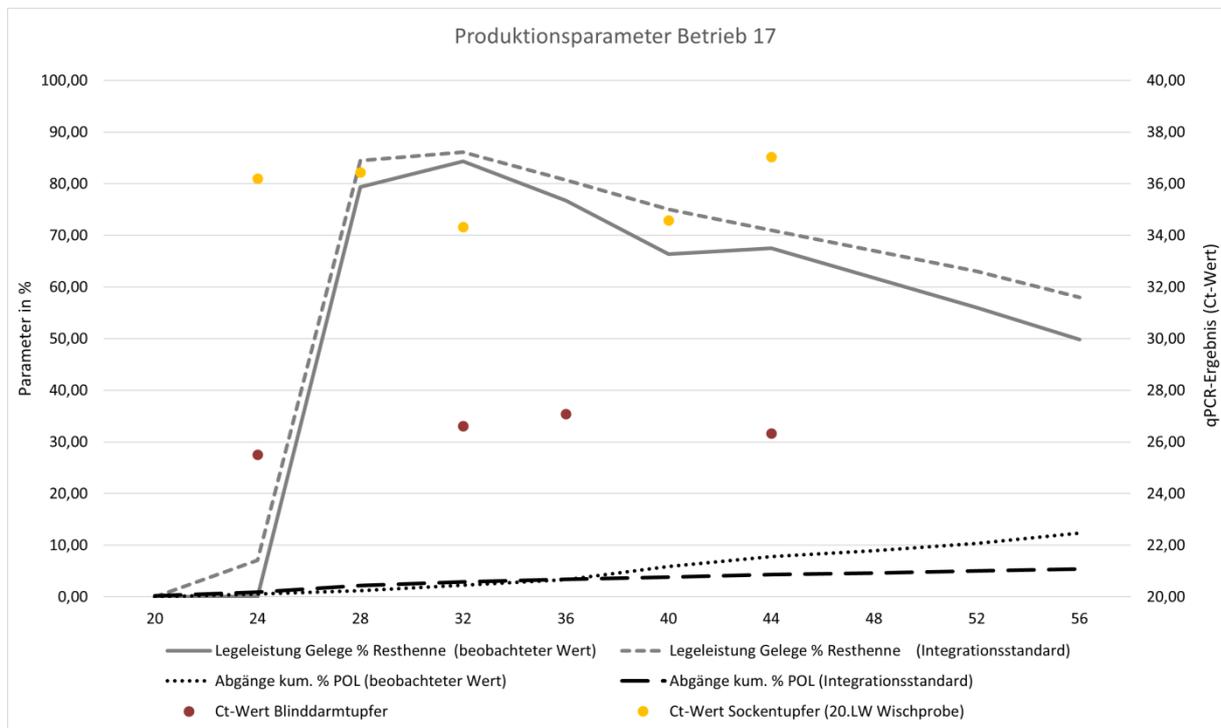


Abbildung 41: Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb 17

17

Tabelle 32: Produktionsparameter Betrieb 18

Alter in Lebenswochen	Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert)	Legeleistung Gelege % Resthenne (Integrationsstandard)	Differenz Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert - Integrationsstandard)	Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert)	Abgänge kum. % POL (Integrationsstandard)	Differenz Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert - Integrationsstandard)
19	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,08
24	0,19	7,10	-6,91	0,60	0,90	-0,30
28	77,55	84,50	-6,95	1,83	2,20	-0,37
32	83,55	86,10	-2,55	2,94	2,90	0,04
36	79,71	80,70	-0,99	3,86	3,40	0,46
40	75,01	75,00	0,01	4,68	3,80	0,88
44	69,88	71,00	-1,12	5,30	4,30	1,00
48	61,40	67,00	-5,60	6,93	4,60	2,33
52	60,07	63,00	-2,93	8,06	5,00	3,06
56	54,47	58,00	-3,53	8,45	5,40	3,05
Summe			-30,57			10,23

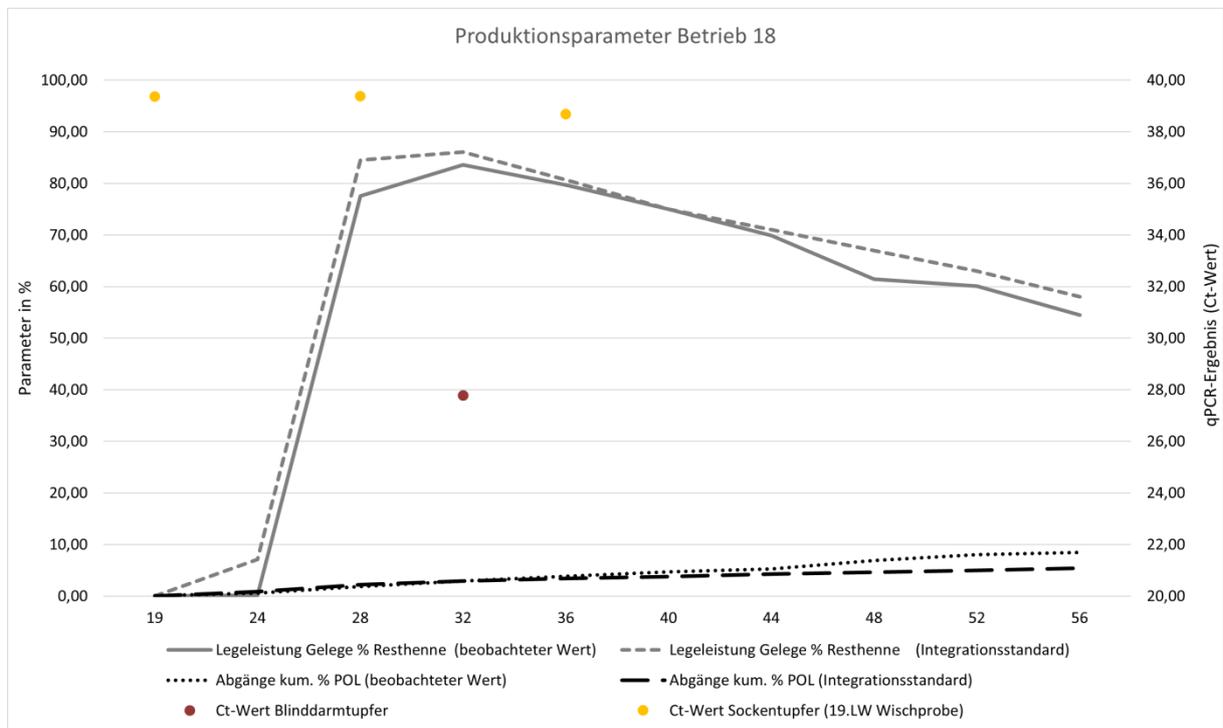


Abbildung 42: Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb 18

Tabelle 33: Produktionsparameter Betrieb 19

Alter in Lebenswochen	Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert)	Legeleistung Gelege % Resthenne (Integrationsstandard)	Differenz Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert - Integrationsstandard)	Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert)	Abgänge kum. % POL (Integrationsstandard)	Differenz Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert - Integrationsstandard)
18	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,04
24	9,80	7,10	2,70	0,92	0,90	0,02
28	83,84	84,50	-0,66	2,13	2,20	-0,07
32	85,27	86,10	-0,83	3,11	2,90	0,21
36	80,31	80,70	-0,39	3,90	3,40	0,50
40	72,15	75,00	-2,85	4,53	3,80	0,73
44	64,53	71,00	-6,47	6,04	4,30	1,74
48	62,21	67,00	-4,79	7,03	4,60	2,43
52	57,11	63,00	-5,89	7,84	5,00	2,84
56	53,85	58,00	-4,15	8,61	5,40	3,21
Summe			-23,33			11,65

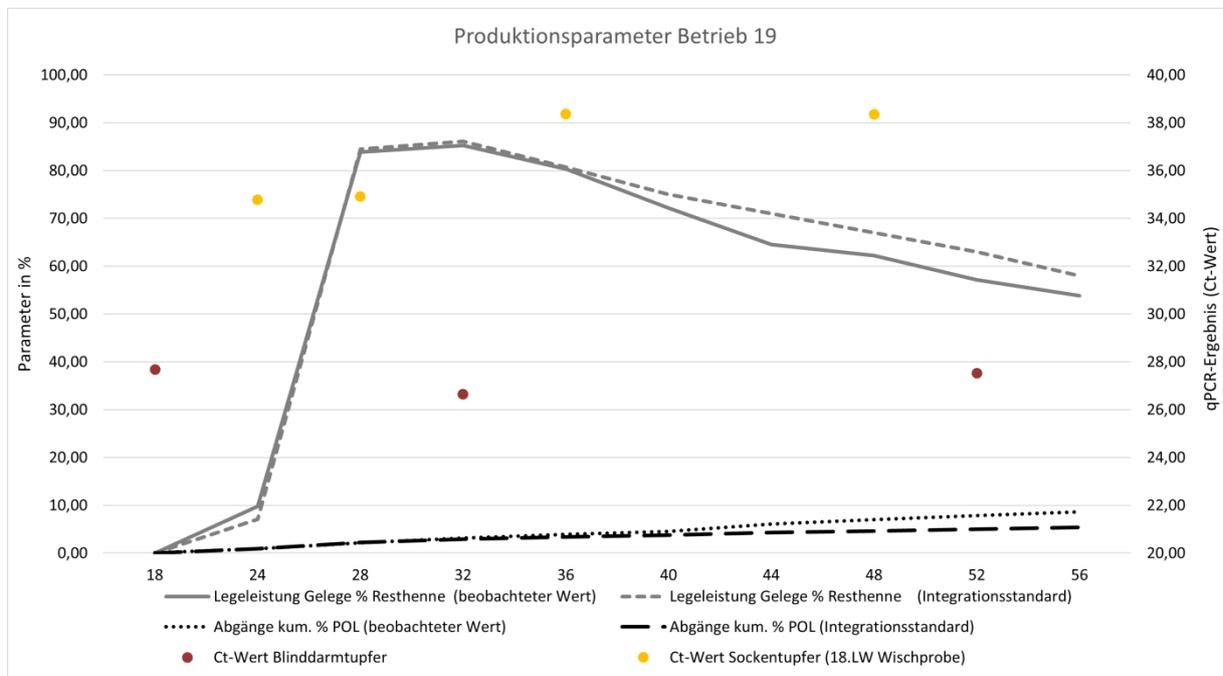
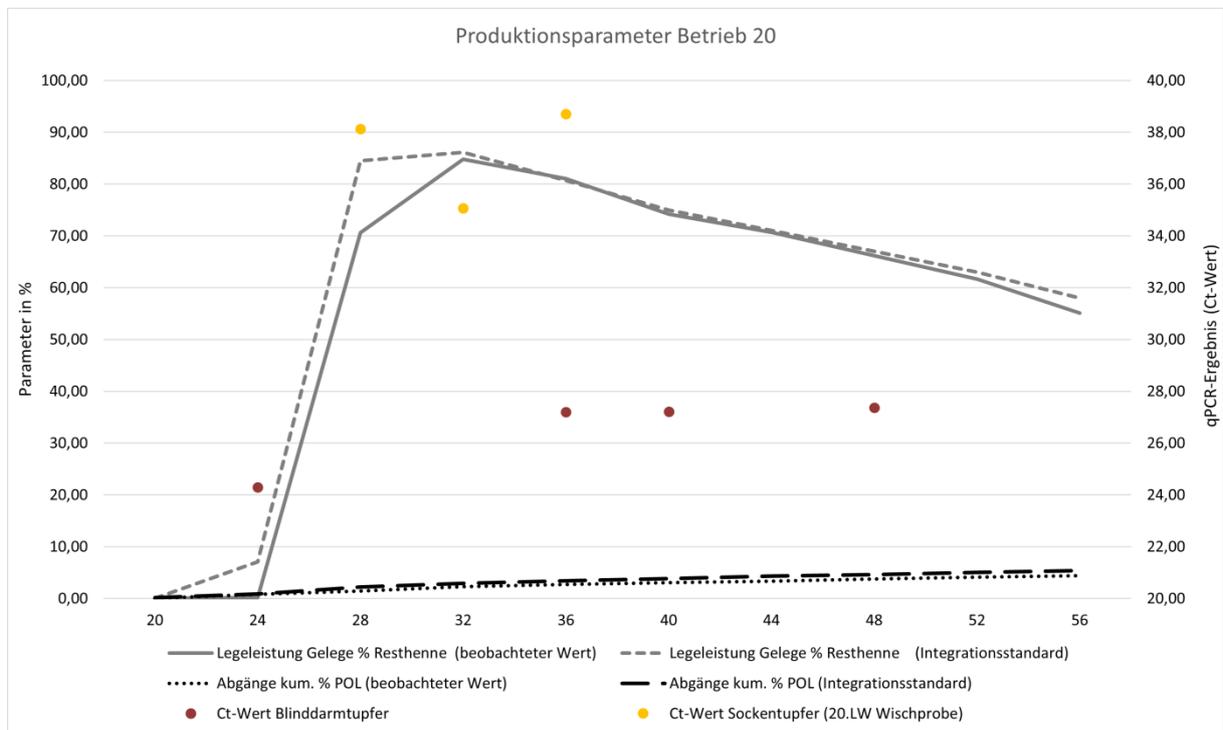


Abbildung 43: Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb 19

**Tabelle 34:** Produktionsparameter Betrieb 20

Alter in Lebenswochen	Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert)	Legeleistung Gelege % Resthenne (Integrationsstandard)	Abweichung Legeleistung Gelege % Resthenne (beobachteter Wert - Integrationsstandard)	Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert)	Abgänge kum. % POL (Integrationsstandard)	Abweichung Abgänge kum. % POL (beobachteter Wert - Integrationsstandard)
20	0,00	0,00	0,00	0,03	0,20	-0,17
24	0,19	7,10	-6,91	0,82	0,90	-0,08
28	70,61	84,50	-13,89	1,46	2,20	-0,74
32	84,76	86,10	-1,34	2,25	2,90	-0,65
36	81,04	80,70	0,34	2,69	3,40	-0,71
40	74,22	75,00	-0,78	3,05	3,80	-0,75
44	70,66	71,00	-0,34	3,37	4,30	-0,93
48	66,13	67,00	-0,87	3,74	4,60	-0,86
52	61,65	63,00	-1,35	4,11	5,00	-0,89
56	55,09	58,00	-2,91	4,43	5,40	-0,97
Summe			-28,05			-6,75



**Abbildung 44:** Produktionsparameter und qPCR-Ergebnisse je Probenahmezeitpunkt Betrieb 20

## Anhang

**Tabelle 35: Ct-Werte Histomonaden-qPCR**

Betriebs- ID	Herkunft	Ct-Wert qPCR		Ct-Wert qPCR		Ct-Wert qPCR		Ct-Wert qPCR		Ct-Wert qPCR		Ct-Wert qPCR		Ct-Wert qPCR		Ct-Wert qPCR		Ct-Wert qPCR		Ct-Wert qPCR		Summe der Ct-Werte*		
		bei Umstallung		24.LW		28.LW		32.LW		36.LW		40.LW		44.LW		48.LW		52.LW		56.LW				
		WP	BDT	SOT	BDT	SOT																		
1	A	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	32,84	32,30	33,78	25,97	33,57	n.n.	32,63	n.n.	33,98	26,12	33,99	22,39	34,34	25,52	33,76	31,28	308,98	323,58	
2	A	n.n.	n.n.	31,35	n.n.	33,30	32,69	35,41	n.n.	38,01	n.n.	37,06	39,19	n.n.	n.n.	n.n.	37,06	n.n.	n.n.	n.n.	26,20	335,13	375,14	
3	A	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	38,82	n.n.	38,44	n.n.	n.n.	33,79	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	353,79	397,26	
4	A	n.n.	n.n.	37,50	39,48	35,88	31,83	39,82	n.n.	38,42	n.n.	n.n.	36,75	35,94	35,33	n.n.	39,38	n.n.	n.n.	37,92	38,41	345,48	381,18	
5	A	n.n.	n.n.	36,88	n.n.	39,05	23,13	35,80	n.n.	38,87	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	27,12	36,45	n.n.	37,91	n.n.	38,89	n.n.	343,85	370,25	
6	A	31,29	25,20	30,27	n.n.	30,65	29,91	29,91	30,70	30,03	25,61	30,02	28,47	30,98	26,08	29,69	25,74	33,24	30,75	33,84	n.n.	278,63	302,46	
7	A	n.n.	n.n.	36,09	n.n.	34,68	n.n.	33,15	n.n.	39,89	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	32,84	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	343,81	392,84	
9	A	37,40	n.n.	n.n.	n.n.	39,56	n.n.	n.n.	34,50	39,60	37,25	38,42	n.n.	n.n.	35,06	n.n.	n.n.	n.n.	35,34	n.n.	n.n.	357,58	382,15	
10	A	27,32	n.n.	35,07	35,04	37,68	n.n.	37,39	33,87	33,51	n.n.	37,58	n.n.	39,65	34,63	39,59	37,08	n.n.	39,94	39,75	36,23	340,22	376,79	
11	B	n.n.	n.n.	30,46	n.n.	29,95	37,62	32,07	31,70	33,24	27,44	35,23	n.n.	38,54	36,85	n.n.	39,86	n.n.	n.n.	n.n.	36,08	319,49	369,55	
12	B	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	37,94	n.n.	n.n.	n.n.	37,09	n.n.	n.n.	n.n.	355,03	400,00									
13	B	n.n.	n.n.	34,59	n.n.	37,68	n.n.	38,93	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	39,17	n.n.	n.n.	35,60	n.n.	39,53	n.n.	26,20	350,37	381,33	
14	B	n.n.	n.n.	35,29	n.n.	34,83	24,34	29,88	33,32	31,76	n.n.	30,22	29,75	32,63	34,61	33,79	29,68	30,66	28,05	31,60	24,57	290,66	324,32	
15	B	36,96	n.n.	38,56	n.n.	37,42	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	39,34	n.n.	39,40	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	39,58	n.n.	354,30	400,00
16	B	n.n.	n.n.	37,81	n.n.	37,72	n.n.	38,88	39,10	n.n.	n.n.	39,20	38,77	n.n.	34,94	37,17	n.n.	38,57	n.n.	n.n.	n.n.	349,35	392,81	
17	B	n.n.	n.n.	36,19	27,55	36,43	n.n.	34,31	33,01	n.n.	35,42	34,57	n.n.	37,03	31,61	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	338,53	369,59	
18	B	39,36	n.n.	n.n.	n.n.	39,38	n.n.	n.n.	38,92	38,69	n.n.	n.n.	n.n.	358,07	398,92									
19	B	n.n.	38,46	34,78	n.n.	34,92	n.n.	n.n.	33,25	38,37	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	38,35	n.n.	n.n.	37,66	n.n.	n.n.	346,42	389,37	
20	B	n.n.	n.n.	n.n.	21,43	38,12	n.n.	35,06	n.n.	38,70	36,01	n.n.	36,09	n.n.	n.n.	n.n.	36,83	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	351,88	370,36	

### Publikationsverzeichnis

Teile der Arbeit wurden bereits auf unten genanntem Kongress vorgestellt.

#### Vortrag

Todte, M. (2022): Aktuelles zur Tiergesundheit in der Elterntierhaltung/Broiler. In: 11. Leipziger Tierärztekongress. Leipzig, Deutschland

### Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dr. Hafez Mohamed Hafez, ehemaliger Leiter des Institutes für Geflügelkrankheiten an der Freien Universität Berlin, für die Vergabe des Dissertationsthemas, das mir von ihm entgegengebrachte Vertrauen sowie die mir stets gewährte, hervorragende fachliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Des Weiteren möchte ich der Wimex Agrarprodukte GmbH sowie der Tierarztpraxis MMT und im Besonderen Dr. Matthias Todte und Dr. Stefan Müller-Molenar für die Bereitstellung der Produktionsdaten der untersuchten Mastelertier-Herden, für die Übernahme der im Rahmen dieser Dissertation entstandenen Kosten für die qPCR-Untersuchungen sowie die fachliche und persönliche Unterstützung meinen Dank aussprechen.

Dr. Matthias Todte danke ich zudem für seine tatkräftige Unterstützung beim Versuchsaufbau, für seine Geduld hinsichtlich der Beantwortung fachspezifischer Fragen und der unermüdlichen, moralischen Unterstützung, ohne die die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt zudem Frau Dr. Dörte Lüschow sowie Herr Dr. Valter Leonardo de Quadros. Eure Fachkenntnisse auf dem Gebiet der Molekularbiologie und im Besonderen im Bereich der Histomonaden-qPCR, eure Geduld sowie die wertvollen Tipps und Hinweise waren Grundlage für das Gelingen dieser Arbeit.

Weiterhin gilt mein Dank der gesamten Mannschaft des Labors der Tierarztpraxis MMT. Ich danke euch für das außerordentlich herzliche und freundschaftliche Arbeitsklima und für eure Unterstützung. Jeder von euch hat auf seine Weise zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen. Sandra Gunter, Daniela Lotter, Vaclav Rulik, Thomas Willer sowie Emanuel Kraft danke ich zudem für die Unterstützung bei den aufwendigen Probenahmen für diese Arbeit.

Maren Wojatschke, Wiebke Völlm, Jacqueline und Roberto Schulz, Petra Glöde, Katharina Prill, Sandra Wallstabe und Alexander Nebel möchte ich dafür danken, dass ihr immer an mich geglaubt und mir seelisch und moralisch zur Seite gestanden habt. Meiner lieben Kollegin Maren danke ich im Besonderen für ihre spirituelle Inspiration und unerschütterliche Zuversicht, Wiebke Völlm für das Aufzeigen neuer Blickwinkel und Überlebensstrategien in schwierigen Phasen. Jacqueline und Roberto Schulz danke ich für die Herzenswärme, die sie mir während meiner Bestandsbesuche stets entgegengebracht haben, für die unzähligen Cappuccinos und den Tequila. Ich bin sehr dankbar, dass sich aus einer Arbeitsbeziehung eine tiefe Freundschaft entwickelt hat. Petra Glöde danke ich für all die unzähligen,

## Danksagung

---

interessanten Fachgespräche und ihr Mitgefühl. Sie war mir stets eine entscheidende Stütze und ich habe viel von ihr gelernt. Katharina Prill danke ich dafür, dass sie mir, insbesondere während der Endphase der Arbeit, die notwendigen Tritte in den Hintern verpasst hat und Sandra Wallstabe für ihre unermüdliche Motivation und die kritische Durchsicht meiner Dissertation. Weiterhin gilt mein Dank Alexander Nebel, der mich durch seinen Zuspruch und seine lieben Worte immer wieder dazu ermutigt hat, mein Ziel konsequent weiterzuverfolgen. Ihr alle seid der Grund dafür, dass ich diese Danksagung heute im Rahmen meiner Dissertation schreiben darf. Ich danke euch von Herzen.

Zu guter Letzt möchte ich auch meinen Eltern, meiner Familie und Eric Wollenberg meinen Dank aussprechen. Eure Geduld und eure Ermutigungen während der Arbeit an dieser Dissertation haben mir sehr viel Kraft gegeben.

### **Finanzierungshilfen**

Für die Durchführung dieser Arbeit wurden keine Finanzierungshilfen in Anspruch genommen. Die im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Aufwendungen für Probenahme, Probematerialien sowie Laboruntersuchungen wurden durch die betreuende Tierarztpraxis MMT, Köthen getragen.

### **Interessenskonflikt**

Im Rahmen dieser Arbeit bestehen keine Interessenskonflikte durch Zuwendungen Dritter.

### **Selbstständigkeitserklärung**

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

Berlin, 17.04.2023

Monique Necke











9 783967 29209 1

**mbv**berlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-209-1