Aus dem Institut für Geflügelkrankheiten

des Fachbereichs Veterinärmedizin

der Freien Universität Berlin

Untersuchungen zum Vorkommen verschiedener Genotypen und Untersuchungen zum Kohlenhydratstoffwechsel von *Histomonas meleagridis*

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Veterinärmedizin

an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Stefanie Balczulat

Tierärztin aus Dortmund

Berlin 2013

Journal-Nr.: 3687

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin

der Freien Universität Berlin

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

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):
Histomonas meleagridis, genotypes, polymerase chain reaction, Galliformes, carbohydrate metabolism

Tag der Promotion: 13.03.2014

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

ISBN: 978-3-86387-454-4
Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2013
Dissertation, Freie Universität Berlin
D 188

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

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

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

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved
© Mensch und Buch Verlag 2014 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I

Abkürzungsverzeichnis VII

Abbildungsverzeichnis IX

Tabellenverzeichnis XIII

1 Einleitung und Ziele der Arbeit 1

2 Literaturübersicht 3

2.1 *Histomonas meleagridis* 3

2.1.1 Allgemeines 3

2.1.2 Morphologie 3

2.1.3 Hydrogenosome 4

2.1.4 Stoffwechsel 5

2.1.4.1 Kulturbedingungen 5

2.1.4.2 Energiestoffwechsel 7

2.1.5 Taxonomie 8

2.1.6 Vorkommen 9

2.1.7 Übertragung 11

2.1.7.1 Übertragung zwischen einzelnen Beständen 11

2.1.7.2 Übertragung innerhalb eines Bestandes 14

2.1.8 Immunität 15

2.1.9 Klinik, Pathologie und Histologie 15

2.1.9.1 Klinische Symptome 15

2.1.9.2 Morbidität und Mortalität 16

2.1.9.3 Pathologische Veränderungen 16

2.1.9.4 Histopathologische Veränderungen 17

2.1.9.5 Andere von der Histomonose betroffene Organe 18

2.1.10 Diagnose ... 19
2.1.10.1 Klinik, Sektion ... 19
2.1.10.2 Mikroskopischer Nachweis ... 19
2.1.10.3 Histopathologie ... 20
2.1.10.4 Anzucht in vitro ... 20
2.1.10.5 Polymerase chain reaction (PCR) ... 21
2.1.10.6 Blutwerte ... 21
2.1.10.7 Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) ... 22
2.1.10.8 In-situ Hybridisation ... 22
2.1.10.9 Immunohistochemischer Nachweis ... 23
2.1.10.10 Untersuchungen zur Genotypisierung ... 23
2.1.10.11 Differentialdiagnosen ... 24
2.1.11 Prophylaxe und Therapie ... 25
2.1.11.1 Herdenmanagement ... 25
2.1.11.2 Therapeutika und prophylaktisch eingesetzte Wirkstoffe ... 26
2.1.11.2.1 Ehemals verwendete Substanzen ... 26
2.1.11.2.2 Rechtliche Grundlagen ... 27
2.1.11.2.3 Weitere Substanzen ... 28
2.2 *Blastocystis* spp. ... 30
2.3 *Tetratrichomonas gallinarum* ... 32
3 Material und Methoden ... 34
3.1 Materialien ... 34
3.1.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte ... 34
3.1.1.1 Präparation der DNA und RNA ... 34
3.1.1.2 PCRs und Gelelektrophorese ... 35
3.1.1.3 Klonierung und Plasmid-Präparation ... 35
3.1.1.4 Kultivierung der Histomonaden ... 36
3.1.3 Verwendete Puffer und Medien ... 37

3.1.3.1 PCR und Gelelektrophorese 37
3.1.3.2 Klonierung und Plasmidpräparation 37
3.1.3.3 Kultivierung von Histomonaden 39
3.1.4 Verwendete Software und Internetprogramme 39
3.1.5 Histomonaden-Probenmaterial 40
3.1.5.1 Probenmaterial zur Untersuchung von Feldproben und zur Genotypisierung 40
3.1.5.2 Histomonadenstämme für Untersuchungen zum Kohlenhydrat-stoffwechsel 40
3.2 Angewandte Methoden 40
3.2.1 Angewandte Methoden zu Untersuchungen von Feldproben und zur Genotypisierung 40
3.2.1.1 Extraktion der DNA 40
3.2.1.1.1 Extraktion aus Organen und Invertebraten 40
3.2.1.1.2 Extraktion aus Tupfern und Kulturmaterial 41
3.2.1.1.3 Bestimmung des DNA-Gehaltes 41
3.2.1.2 PCRs 42
3.2.1.2.1 Zur Diagnostik eingesetzte Real Time-PCR (quantitative PCR, qPCR) 42
3.2.1.2.2 PCR für das C-Profiling 43
3.2.1.2.3 PCRs zur Untersuchung auf *Blastocystis* spp. und *Tetratrichomonas gallinarum* 44
3.2.1.2.4 Gel-Elektrophorese 45
3.2.1.3 Direkte Aufreinigung von PCR-Produkten für Sequenzierungen 45
3.2.1.4 Erstellung der C-Profile 45
3.2.1.5 Anlegen monoklonaler Kulturen 46
3.2.1.5.1 Ausgangsmaterial 46
3.2.1.5.2 Mikromanipulation 46
3.2.1.6 Untersuchung monoklonaler Kulturen 47
3.2.1.6.1 Gelreinigung 47
3.2.1.6.2 Klonierung 48

3.2.1.6.2.1 Ligation 48
3.2.1.6.2.2 Transformation 48
3.2.1.6.2.3 Beurteilung des Klonierungerfolges und Auswahl der Kolonien für die Plasmid-DNA-Präparation 49
3.2.1.6.2.4 Präparation der Plasmid-DNA (Mini-Präparation) 49
3.2.1.6.2.5 Überprüfung des Präparationserfolges und Sequenzierung 50
3.2.2 Angewandte Methoden zu Untersuchungen zum Kohlenhydratstoffwechsel 50
3.2.2.1 Kultivierung von H. meleagridis 50
3.2.2.1.1 Kulturbedingungen 50
3.2.2.1.2 Bestimmung der Histomonadenzahl 50
3.2.2.2 Sequenzierung von Teilen des Alpha-Amylase- und des Glykogenphosphorylase-Gens 51
3.2.2.2.1 Extraktion der Gesamt-RNA 51
3.2.2.2.2 Extraktion eukaryotischer mRNA 51
3.2.2.2.3 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) 52
3.2.2.2.4 Klonierung und Sequenzierung der PCR-Produkte 53
3.2.2.3 Untersuchungen zur Genexpression 53
3.2.2.3.1 Gewinnung der cDNA 53
3.2.2.3.1.1 Extraktion der Gesamt-RNA 53
3.2.2.3.1.2 Reverse Transkription 54
3.2.2.3.2 Real Time-PCR mit EvaGreen 54
4 Ergebnisse 57
4.1 Untersuchungen zum Vorkommen verschiedener Genotypen 57
4.1.1 Probenmaterial für das C-Profiling 57
4.1.2 Entwicklung der Primer und der PCR für das C-Profiling 62
4.1.3 C-Profiling der ITS1-Region 64
4.1.4 C-Profiling der ITS2-Region 66
4.1.5 Anwendungen des C-Profilings 67

4.1.5.1 Putenelterntierbetrieb 67
4.1.5.2 Gemischter Betrieb 67
4.1.5.3 Mastelterntierbetrieb 67
4.1.6 Anlegen monoklonaler Kulturen 68
4.1.6.1 Mikromanipulation 68
4.1.6.2 C-Profiling und Fluorogramme der monoklonalen Kulturen 68
4.1.7 Vorkommen von *Blastocystis* spp. und *T. gallinarum* 70
4.2 Untersuchungen zum Kohlenhydratstoffwechsel 73
4.2.1 Versuche zur Pufferwirkung von MOPS und HEPES 73
4.2.1.1 HEPES 73
4.2.1.2 MOPS 76
4.2.2 Versuche zur Eignung unterschiedlicher Kohlenhydrate in M199 und PBS 78
4.2.2.1 Kultivierung in M199 basiertem Medium 78
4.2.2.2 Kultivierung in PBS basiertem Medium 80
4.2.2 Versuche zur Eignung von Glukose 82
4.2.3 Versuche zur Eignung von verschiedenen Zwischenprodukten des Kohlenhydratstoffwechsels als Kohlenhydratquelle in PBS 89
4.2.3.1 Pyruvat 90
4.2.3.2 Glukose-1-Phosphat 93
4.2.3.3 Glukose-6-Phosphat 96
4.2.3.4 Maltose 99
4.2.4 Versuche zum Einfluss von Sauerstoff und CO_2 auf das Histomonaden-Wachstum 102
4.2.4.1 Einfluß des wiederholten Öffnens der Kulturgefäße 102
4.2.4.2 Einfluss eines anaeroben und eines mikroaerophilen Milieus 104
4.2.5 Einfluss von Pyruvat auf die Transkription verschiedener Enzyme 106
4.2.5.1 Sequenzierung von Abschnitten des Alpha-Amylase- und Glykogenphosphorylase-Gens 107

4.2.5.2 Ermittlung der Effizienzen der qPCR-Primer 107

4.2.5.3 Expression von Alpha-Amylase, Glykogen-Phosphorylase und GAPDH unter verschiedenen Kulturbedingungen 108

5 Diskussion 114

6 Zusammenfassung 132

7 Summary 134

8 Literaturverzeichnis 136

Publikationsverzeichnis 155

Danksagungen 157

Selbstständigkeitserklärung 159

Abkürzungsverzeichnis

Aqua bidest	Aqua bidestillata
Aqua dest	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
CEE	Chicken Embryo Extract
cT	Schwellenzyklus (Threshold cycle)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent-assay
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Glu-1-P	Glukose-1-Phosphat
Glu-6-P	Glukose-6-Phosphat
GOT	Glutamin-Oxalacetat-Transaminase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
ITS-Region	Internal Transcribed Spacer-Region
kbp	Kilobasenpaare
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LSU	Large Subunit
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
p	Signifikanz

p.i.	nach der Infektion (post infectionem)
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction)
qPCR	quantitative PCR
REST	Relative Expression Software Tool
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
rRNA	Ribosomale RNA
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
spp.	species pluralis
SSU	Small Subunit

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Verteilung des am Institut vorliegenden Probenmaterials nach Jahren 57
Abbildung 2 Art des am Institut vorliegenden Probenmaterials..... 58
Abbildung 3 Verteilung der Organproben nach den Organen 59
Abbildung 4 Verteilung des Probenmaterials nach Vogelarten 60
Abbildung 5 Verteilung Probenmaterials aus Puten- und Hühnerbeständen nach Jahren ... 61
Abbildung 6 Beispiele für Fluorogramme der ITS1-Region 63
Abbildung 7 Überprüfung der Spezifität des Primerpaares HmDiffF2, HmDiffR2 64
Abbildung 8 C-Profil Typen der ITS1-Region 65
Abbildung 9 Häufigeit der C-Profil Typen der ITS1-Region 65
Abbildung 10 Verteilung der C-Profil Typen nach Tierarten 66
Abbildung 11 Fluorogramme der ITS1-Region von drei monoklonalen Kulturen 69
Abbildung 12 Allignment der ITS1-Regionen verschiedener Klone 70
Abbildung 13 Anzahl positiver und negativer *Blastocystis* spp.-Proben bei positiv getesteten *H. meleagridis*-Proben der einzelnen Jahre 70
Abbildung 14 Anzahl positiver und negativer *T. gallinarum*-Proben bei positiv getesteten *H. meleagridis*-Proben der einzelnen Jahre 71
Abbildung 15 Anzahl positiver und negativer *Blastocystis* spp.-Proben bei negativ getesteten *H. meleagridis*-Proben der einzelnen Jahre 71
Abbildung 16 Anzahl positiver und negativer *T. gallinarum*-Proben bei negativ getesteten *H. meleagridis*-Proben der einzelnen Jahre 72
Abbildung 17 Wachstum mit verschiedenen HEPES-Konzentrationen in PBS mit 8 g/L NaCl und 2 g/L Reis 74
Abbildung 18 pH-Wert in Abhängigkeit von der HEPES-Konzentration 75
Abbildung 19 Wachstum mit verschiedenen HEPES-Konzentrationen in PBS mit 8 g/L und 5 g/L NaCl und 2 g/L Reis 76
Abbildung 20 Wachstum mit unterschiedlichen MOPS-Konzentrationen ohne HEPES in PBS mit 8 g/L und 5 g/L NaCl und 2 g/L Reis 77

Abbildung 21 Wachstum mit unterschiedlichen MOPS-Konzentrationen und 100 mmol/L HEPES in PBS mit 8 g/L und 5 g/L NaCl und 2 g/L Reis 78

Abbildung 22 Wachstum mit unterschiedlichen Kohlenhydratquellen in M199 79

Abbildung 23 Lichtmikroskopische Aufnahmen von *H. meleagridis* 80

Abbildung 24 Wachstum mit unterschiedlichen Kohlenhydratquellen in PBS mit 5 g/L NaCl 81

Abbildung 25 pH-Wert in Abhängigkeit von der Kohlenhydratquelle in PBS mit 5 g/L NaCl 82

Abbildung 26 Wachstum mit unterschiedlichen Glukose-Konzentrationen in PBS mit 5 g/L NaCl 83

Abbildung 27 pH-Wert in Abhängigkeit von der Glukose-Konzentration in PBS mit 5 g/L NaCl 84

Abbildung 28 Wachstum mit unterschiedlichen Glukose-Konzentrationen mit 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES in PBS mit 5 g/L NaCl 85

Abbildung 29 pH-Wert in Abhängigkeit von der Glukose-Konzentration mit 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES in PBS mit 5 g/L NaCl 86

Abbildung 30 Wachstum mit unterschiedlichen Glukose-Konzentrationen mit 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES ohne Reis 87

Abbildung 31 Wachstum mit unterschiedlichen Glukose-Konzentrationen mit 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES mit 2 g/L Reis 88

Abbildung 32 pH-Wert in Abhängigkeit von der Glukose-Konzentration mit 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES sowie ohne Reis 88

Abbildung 33 pH-Wert in Abhängigkeit von der Glukose-Konzentration mit 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES sowie mit 2 g/L Reis 89

Abbildung 34 Wachstum mit unterschiedlichen Pyruvat-Konzentrationen, ohne Reis 91

Abbildung 35 Wachstum mit unterschiedlichen Pyruvat-Konzentrationen, mit 2 g/L Reis .. 91

Abbildung 36 pH-Wert in Abhängigkeit von der Pyruvat-Konzentration, ohne Reis 92

Abbildung 37 pH-Wert in Abhängigkeit von der Pyruvat-Konzentration, mit 2 g/L Reis 92

Abbildung 38 Wachstum mit unterschiedlichen Glukose-1-Phosphat-Konzentrationen 94

Abbildung 39 Wachstum mit unterschiedlichen Glukose-1-Phosphat-Konzentrationen, mit Reis 94

Abbildung 40 pH-Wert in Abhänhgigkeit von der Glukose-1-Phosphat-Konzentration, ohne Reis 95

Abbildung 41 pH-Wert in Abhänhgigkeit von der Glukose-1-Phosphat-Konzentration, mit Reis 95

Abbildung 42 Wachstum mit unterschiedlichen Glukose-6-Phosphat-Konzentrationen, ohne Reis 97

Abbildung 43 Wachstum mit unterschiedlichen Glukose-6-Phosphat-Konzentrationen, mit Reis 97

Abbildung 44 pH-Wert in Abhänhgigkeit von der Glukose-6-Phosphat-Konzentration, ohne Reis 98

Abbildung 45 pH-Wert in Abhänhgigkeit von der Glukose-6-Phosphat-Konzentration, mit Reis 98

Abbildung 46 Wachstum mit unterschiedlichen Maltose-Konzentrationen, ohne Reis 100

Abbildung 47 Wachstum mit unterschiedlichen Maltose-Konzentrationen, mit Reis 100

Abbildung 48 pH-Wert in Abhänhgigkeit von der Maltose-Konzentration, ohne Reis 101

Abbildung 49 pH-Wert in Abhänhgigkeit von der Maltose-Konzentration, mit Reis 102

Abbildung 50 pH-Wert der einmalig geöffneten Kulturen in Abhängigkeit von..... 104

Abbildung 51 pH-Wert der mehrfach geöffneten Kulturen in Abhängigkeit von unterschiedlichen Kohlenhydratquellen 104

Abbildung 52 Wachstum unter mikroaerophilen Bedingungen 106

Abbildung 53 Wachstum unter anaeroben Bedingungen 106

Abbildung 54 Wachstum mit unterschiedlichen Reis-Konzentrationen, mit der Kombination Pyruvat und Reis in PBS mit 8 g/L NaCl und 25 mmol/L HEPES 109

Abbildung 55 pH-Wert in Abhängigkeit von der Reis- und Pyruvatkonzentration in PBS mit 8 g/L NaCl sowie 25 mmol/L HEPES 110

Abbildung 56 Whisker-box plot der Regulierung der Gene von Alpha-Amylase, Glykogen-Phosphorylase und GAPDH; Kontrollgruppe mit 2 g/L Reis 112

Abbildung 57 Whisker-box plot der Regulierung der Gene von Alpha-Amylase, Glykogen-Phosphorylase und GAPDH; Kontrollgruppe mit 4 g/L Reis 113

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Namen, Orientierungen und Sequenzen der in der Diagnostik-qPCR eingesetzten Primer 42
Tabelle 2 Temperaturprofil der Diagnostik-qPCR 42
Tabelle 3 Namen, Orientierungen, Sequenzen und Positionen (mit Angabe der Nukleotide) der entwickelten Primer 43
Tabelle 4 Temperaturprofil für die C-Profiling PCR 43
Tabelle 5 Namen, Orientierungen und Sequenzen der für den Nachweis von *Blastocystis* spp. und *Tetratrichomonas gallinarum* eingesetzten Primer 44
Tabelle 6 Temperaturprofil für die PCRs zum Nachweis von *Blastocystis* spp. und *Tetratrichomonas gallinarum* 44
Tabelle 7 Namen, Orientierungen, Sequenzen und Positionen (mit Angabe der Nukleotide) im Referenzgen von *T. vaginalis* der Primer, die bei der Entwicklung der qPCR-Primer eingesetzt wurden 52
Tabelle 8 Temperaturprofil der RT-PCR 53
Tabelle 9 Eigenschaften der Primer für die qPCR 56
Tabelle 10 Temperaturprofil für die qPCR mit EvaGreen 55
Tabelle 11 Probenmaterial aus selten eingesendeten Organen 59
Tabelle 12 Eingesendete Invertebraten 61
Tabelle 13 Eingesendete Umgebungsproben 62
Tabelle 14 Chi-Quadrat-Test der *Blastocystis* spp.- und Histomonaden-Proben 72
Tabelle 15 Chi-Quadrat-Test der *T. gallinarum*- und Histomonaden-Proben 73
Tabelle 16 maximale Histomonadenzahl pro Milliliter in Abhängigkeit von der HEPES-Konzentration 74
Tabelle 17 maximale Histomonadenzahl pro Milliliter in Abhängigkeit von der HEPES- und der NaCl-Konzentration im PBS mit 2 g/L Reis 75
Tabelle 18 maximale Histomonadenzahl pro Milliliter in Abhängigkeit von der MOPS-, HEPES- und NaCl-Konzentration im PBS 77

Tabelle 19 maximale Histomonadenzahl pro Milliliter in Abhängigkeit von der Kohlenhydratquelle 79

Tabelle 20 maximale Histomonadenzahl pro Milliliter in Abhängigkeit von der Kohlenhydratquelle 81

Tabelle 21 maximale Histomonadenzahl pro Milliliter in Abhängigkeit von der Glukose- und Reis-Konzentration 83

Tabelle 22 maximale Histomonadenzahl pro Milliliter in Abhängigkeit von der Glukose- und Reis-Konzentration, mit 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES 85

Tabelle 23 maximale Histomonadenzahl pro Milliliter in Abhängigkeit von der Glukose-, MOPS-, HEPES- und Reis-Konzentration 87

Tabelle 24 maximale Histomonadenzahl pro Milliliter in Abhängigkeit von der Pyruvat-, MOPS-, HEPES- und Reis-Konzentration 90

Tabelle 25 maximale Histomonadenzahl pro Milliliter in Abhängigkeit von der Glukose-1-Phosphat-, MOPS-, HEPES- und Reis-Konzentration 93

Tabelle 26 maximale Histomonadenzahl pro Milliliter in Abhängigkeit von der Glukose-6-Phosphat-, MOPS-, HEPES- und Reis-Konzentration 96

Tabelle 27 maximale Histomonadenzahl pro Milliliter in Abhängigkeit von der Maltose-, MOPS-, HEPES- und Reis-Konzentration 99

Tabelle 28 Histomonaden pro Milliliter am vierten Tag p.i. in Kulturen, die zwei, vier, sechs, neun und zwölf Stunden und vier Tage p.i. geöffnet wurden bzw. in Kulturen, die nur einmal vier Tage p.i. geöffnet wurden 103

Tabelle 29 maximale Histomonadenzahl pro Milliliter in Abhängigkeit von der Kulturbedingung 105

Tabelle 30 Effizienzen der jeweiligen Primer 108

Tabelle 31 maximale Histomonadenzahl pro Milliliter in Abhängigkeit von der Menge der Kohlenhydratquelle 109

Tabelle 32 cT-Werte der Kulturen mit 2 g/L Pyruvat sowie 2 g/L Reis; Kontrollgruppe Kulturen mit 2 g/L Reis 111

Tabelle 33 cT-Werte der Kulturen mit 2 g/L Pyruvat sowie 2 g/L Reis; Kontrollgruppe Kulturen mit 4 g/L Reis 111

Tabelle 34 Regulierung der Expression des Alpha-Amylase-, Glykogen-Phosphorylase- und GAPDH-Gens in Kulturen mit je 2 g/L Pyruvat und Reis im Vergleich zu zwei verschiedenen Kontrollgruppen 112

1 Einleitung und Ziele der Arbeit

Die Histomonose, Schwarzkopfkrankheit oder Infektiöse Typhlohepatitis ist eine parasitäre Erkrankung der Hühnervögel, hervorgerufen durch den einzelligen Protozoen *Histomonas meleagridis*. Neben Hühnern und Puten, bei denen es im Falle eines Ausbruchs einer Histomonose zu hohen wirtschaftlichen Verlusten kommt, können auch andere Hühnervögel wie Pfaue, Fasane, Chukarhühner, Perlhühner und Wachteln betroffen sein. Aber auch die nicht zu den Hühnervögeln gehörenden Strauße, Nandus und einige Entenarten sind empfänglich für eine Infektion mit *H. meleagridis*. Dem Namen der Krankheit entsprechend kommt es in den Blinddärmen zu einer fibrinösen Entzündung der Mukosa, was zur Bildung eines käsigen Inhalts führt. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es in den Lebern zur Ausbildung rundlicher Nekroseherde. Selten können andere Organe betroffen sein.

Zwischen den Beständen werden Histomonaden durch den Blinddarmwurm *Heterakis gallinarum* meist im Zusammenspiel mit verschiedenen Stapelwirten wie Regenwürmer, Schwarze Getreideschimmelkäfer, Grashüpfer und Fliegen verbreitet. Innerhalb eines Bestandes werden Histomonaden v. a. durch die kloakale Aufnahme infektiösen Materials verbreitet.

Van der Heijden et al. (2006) entwickelten die Methode des C-Profilings. Durch die Genotypisierung von *H. meleagridis* fanden sich drei unterschiedliche Typen, wobei ein Typ später als *Parahistomonas wenrichi* identifiziert wurde.

Im Darmtrakt von Geflügel kommen neben Histomonaden auch die beiden Einzeller *Blastocystis* spp. und *Tetratrichomonas gallinarum* vor. Meist sind die Erreger apathogen oder avirulent, können aber auch unspezifische Krankheitssymptome hevorrufenen.

Die Ziele des ersten Teils der vorliegenden Arbeit sind somit:

- Das Probenmaterial aus natürlichen Ausbrüchen, welches an das Institut für Geflügelkrankheiten der FU Berlin zur Diagnostik geschickt wurde, zu untersuchen und auszuwerten.
- Eine Verbesserung der Methode des C-Profilings und eine Auswertung sowie Genotypisierung positiver Feldproben mit dieser Methode.
- Eine Untersuchung auf *Blastocystis* spp. und *Tetratrichomonas gallinarum* mit der Fragestellung, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Histomonose und einem Befall mit einem dieser beiden Erreger gibt.

Histomonaden können unter bestimmten Kulturbedingungen leicht in vitro kultiviert werden. Die Basis des Kulturmediums ist klassischerweise das Zellkulturmedium M199, aber auch PBS ist gut geeignet. Diesem wird inaktiviertes Pferdeserum und Chicken Embryo Extract hinzugegeben, wobei die Histomonaden auch ohne letztere Komponente wachsen. Optimale Wachstumsraten werden mit einer Temperatur von 41 bis 42 °C erzielt. Wesentlich bei der Kultivierung ist eine Kohlenhydratquelle und das Vorhandensein von Bakterien.

Als Kohlenhydratquelle wird standardmäßig Reismehl verwendet. Andere Quellen können Hafer-, Roggen- und Buchweizenmehl sowie Maisstärke sein. Die Rolle, die die Bakterien im Kulturmedium spielen, ist noch nicht geklärt. Sehr wahrscheinlich spielen sie direkt oder indirekt eine Rolle bei der Ernährung der Histomonaden.

Wichtig bei der Kultivierung in vitro sind auch die atmosphärischen Bedingungen. So kommt es unter anaeroben Bedingungen zu einem guten Wachstum, während bei aerober Atmosphäre keine Vermehrung der Histomonaden erfolgt.

Im zweiten Teil der Arbeit werden Fragen, die im Zusammenhang mit der Kultivierung der Histomonaden stehen, untersucht:

- Die Eignung unterschiedlicher Stärkequellen und Zwischenprodukte des Kohlenhydratstoffwechsels für die in vitro Kultivierung von Histomonaden.
- Einfluss verschiedener atmosphärischer Bedingungen (mikroaerophil und anaerob) sowie der Einfluss des wiederholten Öffnens der Zellkulturflaschen auf das Histomonadenwachstum.
- Untersuchung der Regulierung der Transkription mehrerer Enzyme, die am Kohlenhydrat-Stoffwechsel beteiligt sind.

2 Literaturübersicht

2.1 *Histomonas meleagridis*

2.1.1 Allgemeines

Der einzellige Protozoe *Histomonas meleagridis* ist der Erreger der Schwarzkopfkrankheit, der Histomonose oder der Infektiösen Typhlohepatitis. Berichte aus allen Kontinenten zeigen eine weltweite Verbreitung. Erstmals beschrieben wurde die Krankheit 1893 auf Rhode Island, USA von Cushman (Cushman, 1893). Zwei Jahre später wurde der Organismus, der für diese Krankheit verantwortlich schien, von Smith als *Amoeba meleagridis* beschrieben (Smith, 1895). Tyzzer bezeichnete den Erreger erstmals als *Histomonas meleagridis* (Tyzzer, 1920b). Dennoch war für Jahrzehnte die genaue Ätiologie des Erregers umstritten. Verschiedene andere Erreger der Krankheit wurden diskutiert (Reid, 1967). So nahmen Cole und Hadley (1908) an, dass es sich bei dem verursachenden Erreger um eine Kokzidien-Art handelt, wohingegen Hadley und Amison (1911) eine Trichomonaden-Art als ursächlich ansahen. Bradley und Reid (1966) zeigten eine duale Ätiologie von *H. meleagridis* und *Escherichia coli*. Für diese beiden Erreger als Ursache der Infektiöden Enterohepatitis trafen die Kochs Postulate zu (Bradley und Reid, 1966). Sowohl die Hefe *Candida albicans* als auch andere Pilze kommen als verursachender Erreger nicht in Frage (Kemp und Reid, 1964; Kemp und Reid, 1966b).

Der Name „Schwarzkopfkrankheit“ leitet sich von dem klinischen Bild der Pute ab, bei der die Krankheit das erste Mal beschrieben wurde: hervorgerufen durch eine Zyanose waren die Kopfanhänge und die Haut im Kopfbereich dunkel verfärbt. Dieses damals gefundene Charakteristikum tritt jedoch nur äußerst selten in Erscheinung (McDougald, 2008).

2.1.2 Morphologie

Die Ultrastruktur der in vitro-Form ähnelt dem Bauplan vieler Trichomonaden-Arten (Schuster, 1968). Auch Mielewczik et al. (2008) untersuchten mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen Histomonaden-Zellen aus in vitro Kulturen sowie Zellen aus dem Blinddarmlumen. Die Größe der einzelnen Zelle beträgt 10 bis 20 µm. Der etwa 1,5 bis zwei µm große Nukleus ist oval bis U-förmig und von einer Doppelmembran umgeben. Der aus mikrotubulären Strukturen geformte Spindelapparat ist mit dem Nukleus verbunden. In der Nähe des Nukleus befindet sich der Golgi-Apparat. Zusätzlich sind eine Reihe von kleineren

Golgi-Apparaten – ebenfalls in Kernnähe – ausgebildet. Das den Kern umgebende Zytoplasma ist mit Nahrungsvakuolen, Hydrogenosomen und Ribosomen angefüllt. Mitochondrien treten nicht auf, wie schon Schuster (1968) beobachtete. Statt dessen fand er in elektronenmikroskopischen Aufnahmen cytoplasmatische Aussackungen von der Größe eines Mitochondriums.

Zur Fortbewegung besitzt diese Form ein einzelnes, gut ausgebildetes Flagellum. Elektronenmikroskopisch kann man die typische 9x2+2 Anordnung der Mikrotubuli erkennen (Mielewczik et al., 2008). Der Parabasal-Apparat besteht aus einem V-förmigen Parabasal-Körperchen und einem langen Parabasal-Filament (Honigberg und Bennett, 1971).

Bei einer anderen Form, die im Gewebe des Wirtes auftritt (Gewebe-Form) fehlt das Flagellum. Statt dessen sind zahlreiche kurze Pseudopodien ausgebildet (Munsch et al., 2009a; Zaragatzki et al., 2010a). Ihre Größe wird mit 8-17 µm angegeben. Im Gewebe sind die Zellen mit 12-21 µm größer. Im degenerierenden Gewebe findet man sie in größerer Anzahl in Vakuolen eingeschlossen. In länger bestehenden Gewebeläsionen treten die Histomonadenzellen eosinophiler als die freie Form in Erscheinung (Clarkson, 1963). Das Innere der Zelle ist mit Nahrungsvakuolen, die Bakterien oder Reispartikel enthalten, angefüllt. Zu den am besten sichtbaren Organellen gehören der einzelne Nukleus, Hydrogenosomen und der Golgi-Apparat. Zudem kommen zahlreiche Glykogen-Granula vor (Zaragatzki et al., 2010b).

Die Ernährungsweise der Gewebeform ist unterschiedlich zu der der freien Form. Erstere ernährt sich durch Phagozytose. Histomonadenzellen in der freien Form scheiden sekretorische Enzyme aus. Die extrazellulär vorverdauten Gewebepartikel des Wirtes werden sodann durch Pinozytose und wahrscheinlich auch durch Diffusion aufgenommen (Lee et al., 1969).

2.1.3 Hydrogenosome

Anaerobisch oder mikroaerophil lebende Eukaryoten werden in zwei Gruppen eingeteilt: Typ I Anaerobier sind einzellige Eukaryoten, die durch das Fehlen von Plastiden und Mitochondrien ihren Energie-Stoffwechsel nicht kompartimentalisieren. Auch den Protisten des Typ II Anaerobiers fehlen Mitochondrien (Hackstein et al., 1999). Statt dessen haben sie Hydrogenosome ausgebildet, durch die der Energie-Stoffwechsels in unterschiedlichen Kompartimenten abläuft. Hierbei handelt es sich um sphärisch geformte, 0,3 bis 0,5 µm große Organellen, die in großer Anzahl im Zytoplasma angesiedelt sind.

Erstmals wurden Hydrogenosome bei *Tritrichomonas foetus* gefunden (Lindmark und Müller, 1973). Fast alle Untersuchungen betrafen allerdings den mit den Histomonaden nahe verwandten Einzeller *Trichomonas vaginalis* (Benchimol et al., 1996). Hier konnte gezeigt werden, dass die Hydrogenosomen im Gegensatz zu Mitochondrien kein eigenes Genom besitzen (Clemens und Johnson, 2000). Alle am Energie-Stoffwechsel beteiligten Proteine müssen demnach im Cytosol an freien Polyribosomen synthetisiert (Lathi et al., 1992) und – falls erforderlich – in die Hydrogenosome transportiert werden. Ein Beweis für die Existenz von Hydrogenosomen bei *H. meleagridis* wurde von Mazet et al. (2008) durch den Nachweis des Hydrogenosom-spezifischen Enzyms Fe-Hydrogenase erbracht. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen der Hydrogenosome von *H. meleagridis* konnte gezeigt werden, dass diese von zwei Membranen umgeben sind (Mielewczik, 2008). Im Gegensatz zu Mitochondrien formt die innere Membran der Hydrogenosome jedoch keine Christae. Zudem konnten keine Cytochrome oder Cardiolipin gefunden werden, was allerdings auf Untersuchungen der Hydrogenosome von *T. vaginalis* zurückgeht (Johnson et al., 1993).

Embley et al. (2002) vermuten einen gemeinsamen Vorfahren von Hydrogenosomen und Mitochondrien. Die Frage nach der Herkunft der hydrogenosomalen Schlüsselenzyme Hydrogenase und Pyruvat-Ferredoxin Oxido-Reduktase konnte von ihnen nicht zufriedenstellend geklärt werden. Allerdings vermuten sie wie auch Hackstein et al. (1999) einen Gentransfer des ursprünglichen Endosymbionten in das nukleäre Genom des Wirtes. Im Laufe der Entwicklung der unterschiedlichen eukaryotischen Linien kam es mehrmals zur Entwicklung von Hydrogenosomen. Die unterschiedliche Morphologie in den einzelnen Gruppen läßt auf eine nicht homologe Entwicklung schließen (Müller, 1993).

Hydrogenosome stellen einen guten Angriffspunkt für Therapeutika dar. Da sie sich in ihrem Stoffwechsel von den Mitochondrien unterscheiden, sind Medikamente, die direkt an den Hydrogenosomen angreifen, sehr wahrscheinlich nicht für die Wirtszellen schädlich (Benchimol, 2008).

2.1.4 Stoffwechsel

2.1.4.1 Kulturbedingungen

Die Isolierung von Histomonaden erfordert frisch tote Tiere. Leber- oder Blinddarmmaterial wird in Kulturflaschen mit 85 % M199, 5 % Chicken Embryo Extract (CEE), 10 % Schaf- oder Pferdeserum und 10 bis 20 mg Reismehl bei einem anfänglichen pH-Wert von 7,8 bis 8 für 24 bis 48 Stunden bei 40 °C bebrütet. Nach dieser Zeit können die

Parasiten mit einem Durchlicht-Mikroskop identifiziert werden (McDougald und Galloway, 1973). Die oben beschriebenen Bedingungen für die in vitro Kultivierung von *H. meleagridis* gehen auf die Beschreibungen von Dwyer (1970) zurück. Er erzielte die besten Resultate mit der Verwendung von M199 als Kulturmedium, dem er 5 % CEE, 10 % inaktiviertes Pferdeserum sowie 10 bis 12 mg steriles Reismehl hinzufügte, womit das sogenannte Dwyers Medium entstand. Neben Reismehl eignen sich aber auch Maisstärke, Hafer-, Roggen- und Buchweizenmehl (Hauck et al., 2010b). Für eine optimale Wachstumsrate empfiehlt Dwyer (1970) eine Temperatur von 41 bis 42 °C.

Für eine erfolgreiche Kultivierung der Histomonaden in vitro sind Bakterien essentiell. Dabei scheint die Kombination mehrerer Bakterien wie z. B. *E. coli*, *Escherichia freundii* und *Proteus mirabilis* besser geeignet zu sein, das Wachstum von *H. meleagridis* zu fördern, als die alleinige Gabe einzelner Bakterien (Lesser, 1964b). Stepkowski und Klimont (1980) führten dagegen auch in monoxenischen Kulturen, besonders mit Vertretern der Familie der Enterobacteriacae, eine Vermehrung von *H. meleagridis* herbei. Auch die Herkunft der Bakterien scheint eine Rolle zu spielen. Während eine Mixtur aus Darmbakterien, die aus Goldhamstern und mongolischen Gerbils gewonnen wurden, das Wachstum der Histomonaden nicht unterstützen, gelang dies mit Darmbakterien aus Hühnern, wenn auch mit nur geringem Erfolg. Offensichtlich fehlt den Bakterien aus diesen Tieren ein Wachstumsfaktor, der in Darmbakterien der Pute vorhanden ist (Lesser, 1960a; Lesser, 1964a). Der Wachstumsfaktor aus den Darmbakterien der Pute kann mit Lebern von über sechs Monate alten weiblichen Hamstern ersetzt werden (Lesser, 1961). Im Laufe einer länger andauernden Kultivierung und Passagierung kann es dazu kommen, dass sich die Bakterienzusammensetzung im Medium ändert, bis sie durch natürliche Selektion stabil bleibt (Dobell und Laidlaw, 1926).

Das in der Kultivierung übliche Serum kann durch frische Sahne, entweder pasteurisiert oder nicht, ersetzt werden (Lesser, 1963). Frische Kuhmilch sowie fettfreies Milchpulver anstelle von Serum führen hingegen zu keinem Histomonadenwachstum (Lesser, 1960b).

Seit der Beschreibung des Dwyer Mediums (Dwyer, 1970) ist CEE ein wesentlicher Bestandteil. Die Notwendigkeit des CEE sowie anderer Komponenten wurde bisher wenig erforscht. Aufgrund der komplexen Zusammensetzung des Mediums kann es bei der Isolierung von Histomonaden aus Kulturmaterial zu Schwierigkeiten kommen. Insbesondere durch die Gewebe- und Zellrückstände erscheint das Medium oft getrübt und Aggregate

bilden sich (van der Heijden und Landman, 2007). Daher versuchten van der Heijden und Landman (2007) auf die beiden als bisher essentiell angesehenen Komponenten CEE und Pferdeserum in der Kultivierung zu verzichten. Dabei fanden sie, dass Kulturen ohne die Beigabe von CEE teilweise besser wuchsen als Kulturen, denen CEE hinzugegeben wurden. Auf der anderen Seite konnte die Erfordernis des Serums bestätigt werden, da Kulturen ohne dessen Beigabe kein Wachstum zeigten. Allerdings kann es sein, dass es durch die Verwendung von Pferdeserum zu einer Agglutination der Histomonadenzellen kommt (Hu et al., 2008).

In Experimenten zur Überlebensfähigkeit von *H. meleagridis* nach Lagerung in flüssigem Stickstoff wurden Histomonaden-Kulturen von Chute und Chute (1969) zunächst auf -80 °C heruntergekühlt. Anschließend wurden sie in -170 bis -196 °C kalten flüssigen Stickstoff verbracht und hier für bis zu 345 Tage belassen. 72 bis 81 % der auf diese Weise eingefrorenen Kulturen überlebten dies und waren darüber hinaus nach rektaler Inokulation in Vögeln auch infektiös.

2.1.4.2 Energiestoffwechsel

Der Energie-Stoffwechsel von *H. meleagridis* ist gekennzeichnet durch das Vorhandensein von Hydrogenosomen, welche unter anaeroben Bedingungen Wasserstoff zur Aufrechthaltung des Redoxpotentials produzieren (Hackstein et al., 1999).

Zusammenfassend besteht die Hauptfunktion der Hydrogenosomen in der oxidativen Decarboxylierung von Pyruvat. Diese ist verbunden mit der ATP-Produktion und der Bildung von molekularem Wasserstoff. Die Schlüsselenzyme des Pyruvat-Metabolismus sind die Pyruvat-Ferredoxin Oxido-Reduktase (PFO) und die Hydrogenase (Kulda, 1999).

Der Energie-Metabolismus in den Hydrogenosomen wurde für *T. vaginalis* von Steinbüchel und Müller (1986) beschrieben. Das in der Glykolyse im Cytosol entstehende Pyruvat wird in den Hydrogenosomen oxidativ zu Acetyl-CoA decarboxyliert. Elektronen werden durch die PFO auf Ferredoxin übertragen. Ferredoxin ermöglicht seinerseits die Übertragung von Elektronen auf Protonen, um molekularen Wasserstoff zu produzieren. Dieser Schritt wird von der Hydrogenase katalysiert. Der Wasserstoff verläßt zur Aufrechterhaltung des Redoxpotentials das Hydrogenosom. Von Acetyl-CoA wird Acetat abgespalten, welches die Hydrogenosomen ebenfalls verläßt. Das verbliebene Coenzym A wird auf Succinat übertragen, wodurch Succinyl-CoA entsteht. Dies dient als Substrat für die

Bildung von ATP, welches wiederum das Hydrogenosom verläßt. Durch eine reduktive Carboxylierung wird aus Pyruvat Malat gebildet und aus dem Hydrogenosom ausgeschleust.

2.1.5 Taxonomie

Die taxonomische Einordnung von *H. meleagridis* hat sich im Laufe der Jahrzehnte seit der Erstbeschreibung immer wieder verändert. Die enge Verwandtschaft aber zu *Trichomonas*, *Dientamoeba* und *Entamoeba* blieb dabei immer bestehen.

Erstmalig wurde das Genus *Histomonas* von Tyzzer (1920b) eingeführt. Aufgrund antigenetischer Analysen konnte eine nahe Verwandtschaft zu *Dientamoeba fragilis* und *Trichomonas gallinae* bestätigt werden. Eine weitaus geringere Verwandtschaft besteht mit *Entamoeba histolytica* und *Entamoeba invadens* (Dwyer, 1972a; Dwyer, 1972b; Dwyer, 1974).

Die Parabasala, denen die Histomonaden angehören, sind eine monophyletische Gruppe von Protisten, gekennzeichnet durch eine Reihe von ultrastrukturellen Merkmalen, die erstmalig in dieser Gruppe auftreten (Synapomorphien), wie das Vorhandensein von Hydrogenosomen, eine typische Anordnung der Mastigonten, einen Axostyl-Pelta-Komplex, einen Parabasal-Apparat und das Auftreten von extranukleären Spindeln während der Zellteilung (Cavalier-Smith, 1998).

In dem taxonomischen System von Cavalier-Smith (1998) ergibt sich folgende systematische Position von *Histomonas meleagridis*:

Stamm	Parabasala
Klasse	Trichomonadea
Ordnung	Trichomonadida
Familie	Monocercomonadidae

Cavalier-Smith (1998) teilt in diesem System dem Stamm der Parabasala nur noch eine weitere Klasse zu, die Hypermastigidea. Die Ordnung Trichomonadida umfaßt insgesamt vier Familien: Trichomonadidae, Monocercomonadidae, Devescovinidae und Calonymphidae.

Eine neue Einteilung ergab sich durch die Einbeziehung molekularbiologischer Ergebnisse von Cepicka et al. (2010):

Stamm	Parabasala
Klasse	Tritrichomonadea
Ordnung	Tritrichomonadida
Familie	Dientamoebidae
Genus	*Histomonas*

Insgesamt gehören in dieser taxonomischen Einteilung sechs Klassen zu den Parabasala. Zur Familie Dientamoebidae wird des weiteren das Genus *Dientamoeba* gezählt.

Gerbod et al. (2001) zeigten durch Untersuchungen des SSU-rRNA-Gens eine enge phylogenetische Verwandtschaft zwischen *Histomonas* und *Dientamoeba*. Zudem zeigen beide Genera einen sekundären Verlust von Strukturen des Cytoskeletts.

Die nahe Verwandtschaft zu *D. fragilis* und *T. foetus* konnte auch durch die Arbeiten von Hauck und Hafez (2009; 2010) und Mantini et al. (2009) bestätigt werden.

2.1.6 Vorkommen

Wirtschaftliche Bedeutung erlangt die Krankheit durch den Befall von Puten- und Hühnerbeständen. Dabei kann die Morbidität und Mortalität bei Puten 100 % betragen. Hühner fallen meist nur durch einen Leistungsabfall mit geringer Mortalität auf (Esquenet et al., 2003; Hafez et al., 2001). Callait-Cardinal et al. (2007) untersuchten das Vorkommen der Histomonose in Putenmast- und Putenelterntierherden in Frankreich. Dabei war die Mortalität bei den Elterntieren um rund ein Drittel höher als in den Mastbeständen. Verschiedene Putenlinien scheinen unterschiedlich empfänglich für die Histomonose zu sein, was sich in einer unterschiedlichen Mortalität bei Wild Canadian Turkey-, British United Turkey-Big6- und Kelly Bronze-Puten zeigt (Lotfi und Hafez, 2009). Reynaud et al. (2005) konnten dagegen keinen Unterschied in der Empfänglichkeit für die Histomonose bei zwei Putenlinien feststellen.

Cortes et al. (2004) beschreiben einen natürlichen Ausbruch der Histomonose bei Hühnern in Kalifornien. Lediglich 1 % der Hühner waren hierbei krank. Auch die Mortalität war mit 0,9 % im Vergleich zu den zu erwartenden 0,1 bis 0,25 % pro Woche nur leicht

erhöht. Einzelne Hühnerrassen können dabei unterschiedlich empfänglich für Histomonaden sein. Die höchste Anfälligkeit zeigt sich bei der Rasse New Hampshire, wohingegen die Rhode Island Red-Hühner relativ resistent sind. White Leghorn-Hühner und Hühner der Kreuzung New Hampshire mit Barred Plymouth Rock weisen eine mittlere Anfälligkeit auf (Lund, 1967). Die von Chute et al. (1976) mit Histomonaden und Heterakiden infizierten Hühner der Rassen White Leghorn und New Hampshire zeigten lediglich Blinddarmveränderungen und keine Mortalität.

Von Lund und Chute (1972a) wurde die Empfänglichkeit von jungen Pfauen (*Pavo cristatus*) für Histomonaden untersucht. Sie gaben den Tieren embryonierte Heterakiden-Eier mit Histomonaden zur oralen Aufnahme. Resultierend aus den Ergebnissen des Versuches kamen sie zu dem Schluss, dass Pfaue ebenso empfänglich sind wie Puten, Hühner und Fasane. Fasane (*Phasianus colchicus*) selber spielen mehr eine Rolle bei der Verbreitung der mit Histomonaden infizierten Heterakiden (Lund und Chute, 1972b). Obwohl Fasane weniger anfällig für die Histomonose sind, ähneln Blinddarm- und Leberläsionen bei den wenigen aufgetretenen Fällen denen der Puten (Pennycott, 2000).

Reis et al. (2009) berichten vom Auftreten der Histomonose bei einem gefangengehaltenen Chukarhuhn (*Alectoris chukar*). Neben dem Auftreten von *H. meleagridis* gelang bei dem Vogel auch der Nachweis von *Heterakis gallinarum*. Auch Lund und Chute (1971b) konnten die Emfpänglichkeit von *A. chukar* für die Histomonose nachweisen, indem sie embryonierte Heterakiden-Eier aus Hühnerbeständen mit nachgewiesener Histomonose oder Regenwürmer aus Fasanenbeständen gaben.

Perlhühner (*Numida meleagris*) sind ebenfalls empfänglich für die Histomonose. Da sie nur wenige klinische Anzeichen aufweisen, scheint eine Infektion für sie allerdings keine große Relevanz zu haben (Chute und Lund, 1972). Vielmehr kommt ihnen eine Rolle als Ansteckungsquelle für andere Hühnervögel zu (Lund und Chute, 1972c).

Eine weitere Infektionsquelle für Histomonaden stellt die Virginiawachtel (*Colinus virginianus*) dar (Zeakes et al., 1981). Da die Wachteln eine geringere Mortalität als Puten aufweisen, sind sie besser als diese geeignet, die Krankheit zu verbreiten (Kellogg und Reid, 1970; Lund und Chute, 1971a). Demgegenüber steht die geringe Empfänglichkeit der Japanischen Wachtel (*Coturnix coturnix japonica*) für Histomonaden und Heterakiden. Weder wird die Gesundheit der einzelnen Wachtel bei einer Infektion mit Histomonaden sonderlich

gefährdet, noch spielen die Wachteln eine nennenswerte Rolle bei der Verbreitung der Krankheit (Lund und Ellis, 1967).

Das Vorkommen von *H. meleagridis* ist nicht nur auf Hühnervögel begrenzt. Borst und Lambers (1985) konnten eine akute Typhlohepatitis in zwei juvenilen Straußen (*Struthio camelus*) nachweisen. Zudem zeigte sich ein *H. meleagridis* ähnlicher Erreger im Nativpräparat. Ein Prolaps der Kloake bei mehreren Straußen konnte ebenfalls mit dem Auftreten von *H. meleagridis* ähnlichen Protozoen in Verbindung gebracht werden (Iordanidis et al., 2003). In einer Hobbyhaltung starben zwei Nandus (*Rhea americana*) an einer vermutlichen Histomonose (Dhillon, 1983). Sie wurden zusammen mit Hühnern, Wildputen, Fasanen, Pfauen und Wasservögeln gehalten. In der Sektion und Histopathologie zeigten sie typische Blinddarm-Veränderungen. In den histopathologischen Schnitten konnten zudem Histomonaden ähnliche Parasiten nachgewiesen werden. Des weiteren treten bei Nandus auch Leberveränderungen, gekennzeichnet durch nekrotische Herde, auf (McMillan und Zellen, 1991).

In einer Studie infizierten Callait-Cardinal et al. (2006) Moschusenten (*Cairina moschata*) und Mularden-Enten. Als Kontrolltiere dienten Puten. Zwar entwickelten auch die Enten klinische Symptome, allerdings waren die makroskopischen Läsionen in den Blinddärmen deutlich geringer als bei den Puten. Damit kamen sie zu der Schlussfolgerung, dass Enten zwar keine empfänglichen Wirtstiere für die Schwarzkopfkrankheit zu sein scheinen, jedoch als Trägertiere für *H. meleagridis* fungieren können. Alkhalaf und Mahmoud (2009) berichten von einem natürlichen Ausbruch einer Histomonose bei Enten. Die Tiere zeigten typische Organveränderungen. Die Schwere der Läsionen wurde durch eine gleichzeitige Infektion mit *Enterococcus fecalis* noch verstärkt.

2.1.7 Übertragung

2.1.7.1 Übertragung zwischen einzelnen Beständen

Histomonaden kommen überall dort vor, wo auch geeignete Wirte existieren. Die Übertragung war lange Zeit nicht geklärt (Tyzzer und Fabyan, 1920). Dennoch wurde schon in den 20er Jahren eine Verbreitung der Histomonose in Putenbeständen mit dem gleichzeitigen Vorhandensein des Nematoden *Heterakis papillosa* – heute *Heterakis gallinarum* – in Verbindung gebracht (Graybill und Smith, 1920; Tyzzer et al., 1921; Tyzzer und Fabyan, 1922). In den 50er Jahren kam es bei Rebhühnern (*Perdix perdix*) und Fasanen zu einem vermehrten Auftreten von *Heterakis isolonche*, was ein Hinweis auf eine

Übertragung der Histomonaden sein könnte (Potts, 2009). Eine Übertragung von *H. meleagridis* durch den Nematoden *Heterakis bonasae* findet dagegen nicht statt (Davidson et al., 1978). Die Prävalenz der Histomonose ist in solchen Gegenden höher, in denen auch der Blinddarmwurm *H. gallinarum* und verschiedene Regenwurm-Spezies vorkommen (Adams et al., 1986).

Für die Übertragung zwischen Beständen sind in erster Linie Hühner in Zusammenspiel mit *H. gallinarum* verantwortlich (Swales, 1950b). Hühner sind der beste und passendste Wirt für Heterakiden (Lund und Chute, 1970; Lund und Chute, 1972d), obwohl auch Puten für Heterakiden empfänglich sind (Swales, 1948). Die Wachstumsrate der Würmer ist in beiden Wirten annähernd gleich (Lund, 1958). Zudem finden sich Heterakiden in den Blinddärmen von Perlhühnern (Chute und Lund, 1974), Fasanen und Wachteln (Lund und Chute, 1974a). Obwohl in Experimenten auch Gänse und Enten mit Heterakideneiern infiziert werden konnten, entwickelten sich die Larven hier nicht bis zum adulten Wurm weiter (Lund et al., 1974).

Adulte Heterakiden finden sich in den Caeca des Wirtsvogels, wobei *H. gallinarum* selber für den Wirtsvogel apathogen ist (Lund und Chute, 1974b; Chalvet-Monfray, 2004). Dennoch kann es bei Hühnern durch *H. gallinarum* in den Caeca gelegentlich zu einer lokalen T-Zell Antwort kommen (Schwarz et al., 2011).

Brener et al. (2006) sprechen von einer 70 %igen Prevalenz von *H. gallinarum* bei brasilianischen Puten. In der einzelnen Pute fanden sie ein bis 113 Würmer, wobei durchschnittlich 26 Heterakiden pro Pute auftraten. *H. meleagridis* befindet sich in Epithelzellen des Intestinaltraktes der Heterakiden, wenn der Wurm selbst noch sehr jung oder frisch geschlüpft ist. Auf welche Weise sie in die Oocysten von *H. gallinarum* gelangen, konnte noch nicht geklärt werden (McDougald, 2008). Wahrscheinlich ist, dass die weiblichen Würmer im Laufe der Kopulation von den männlichen Würmern infiziert werden. Die Histomonaden werden sodann in die Eier inkorporiert, solange die Eischale noch nicht ausgebildet ist (Springer et al., 1969). Dabei enthält aber nur etwa ein Heterakidenei von 200 Eiern bzw. ein Ei von 1000 Histomonaden (Lund und Burtner, 1957; Kendall, 1957). McKay und Morehouse (1948) gelang es, bei 80 bis 100 % der von ihnen mit Heterakiden infizierten Puten eine Histomonose hervorzurufen. Lund (1971) beobachtete eine Histomonadeninfektion pro 473 embryonierten Eiern. Pro Tag und weiblichem Wurm können über 900 Eier ausgeschieden werden (Chalvet-Monfray et al., 2004). In der Einstreu sind die Wurmeier bis zu drei Jahre überlebensfähig und positiv für *H. meleagridis* (Farr, 1961). Nach rund sechs

Wochen befindet sich in den Eiern jeweils ein Wurm, wobei sich die Reifung des Wurmes sowohl in der Umwelt als auch im Vogelwirt vollzieht (Chalvet-Monfray et al., 2004). Die Histomonaden können im Wurm z. B. mikroskopisch nachgewiesen werden (Kendall, 1959). Oftmals kommt es im vorderen Bereich des Wurmes zu einer Schwellung (Connell, 1950). Vögel werden infiziert, wenn sie embryonierte Heterakiden-Eier aufnehmen. In den Blinddärmen des Wirtes schlüpfen die Heterakis-Larven. Aus ihnen werden die Histomonaden während der Häutung der Larven entlassen oder, wenn auch weitaus seltener, durch Absterben der Larve (Fine, 1975).

Da Hühnern in der Verbreitung von *H. meleagridis* im Zusammenspiel mit *H. gallinarum* eine wichtige Rolle zukommt, wird allgemein dazu geraten, Hühner getrennt von anderem Geflügel zu halten, welches empfänglich für die Histomonose ist (Lund und Chute, 1970).

Als Transport- oder Stapelwirte können verschiedene Regenwurm-Arten (z. B. *Lumbricus terrestris*, *Allolobophora caliginosa*, *Eisenia foetida*) fungieren. In ihnen schlüpfen aus den aufgenommenen Heterakiden-Eiern juvenile Würmer. Die Larven dringen in die Körperhöhle des Regenwurms ein und leben hier, bis der Regenwurm wiederum vom Endwirt aufgenommen wird (Lund et al., 1966; Lund, 1969; Lund und Chute, 1974b). Hühner und Puten entwickelten eine klinische Histomonose, nachdem sie Regenwürmer aufnahmen, die von einem Gelände stammten, auf dem zuvor Fasane gehalten wurden. In der Sektion konnten aus den Puten und Hühnern Heterakiden isoliert werden (Kemp und Franson, 1975).

Frank (1953) untersuchte die Möglichkeit, ob verschiedene Grashüpferarten (*Bruneria brunnea*, *Camnula pellucida*, *Melanoplus mexicanus*, *M. packardii*, *M. bivittatus* und *M. femurubrum*) durch Fressen von infizierten Heterakis-Eiern Vektoren für Histomonaden sein können. Er konnte nachweisen, dass Grashüpfer die Eier für bis zu 96 Stunden in ihrem Gastrointestinaltrakt beherbergen. In früheren Studien bestätigte er auch Fliegen (*Musca domestica*, *Lucilia* sp.) als mechanische Vektoren, die mit *H. meleagridis* infizierte Heterakiden-Eier von einem Ort zu einem anderen verbringen (Frank, 1953). Von Tyzzer (1920a) wurde beobachtet, wie Puten Fliegen aufnehmen. Er folgerte, dass diese bei der Verbreitung der Krankheit eine Rolle spielen könnten.

Einen weiteren Stapelwirt stellt der Glänzende Getreideschimmel-Schwarzkäfer (*Alphitobius diaperinus*, Panzer 1797) dar. Dieser findet sich in großer Anzahl in Geflügelbeständen, wo er sich von Geflügelfutter, Faeces und toten Vögeln ernährt (Kumar,

1986). In einer Studie gelang der Nachweis von Histomonaden-DNA mittels PCR aus Käfern aber nur zu einem geringen Teil, was vermuten lässt, dass, obwohl sich der Getreideschimmelkäfer mit *H. meleagridis* infizieren kann, er keine große Rolle bei der Verbreitung zwischen Beständen spielt (Huber et al., 2007).

2.1.7.2 Übertragung innerhalb eines Bestandes

Eine vertikale Übertragung der Histomonaden kommt nicht vor (Tyzzer und Collier, 1925).

Innerhalb eines Bestandes ist es möglich, dass Puten Histomonaden oral aufnehmen, wie es auch in verschiedenen Experimenten gelang (Liebhart und Hess, 2009), und so eine Histomonose entwickeln. Die genaue Anzahl an Histomonaden, die aufgenommen werden muss, um typische pathologische Veränderungen hervorzurufen, ist dabei nicht bekannt (Lund, 1955). Es scheint jedoch unerheblich zu sein, wieviele Histomonaden pro Tier aufgenommen werden, damit sich eine Histomonose manifestieren kann (Liebhart et al., 2008). Hilfreich ist es, wenn im Verdauungstrakt alkalische Verhältnisse herrschen, z. B. durch die Verfütterung einer alkalischen Mixtur (Horton-Smith und Long, 1956). Lund (1956) sieht die Gefahr von oral aufgenommenen Histomonaden bei Puten in der Möglichkeit, dass auf diese Weise Heterakiden, die sich schon in der Pute befinden, in Kontakt mit den Histomonaden gebracht werden. Die Eier der Heterakiden können somit infektiös werden.

McDougald (2008) vertritt die Meinung, dass Histomonaden außerhalb eines Wirtes nicht in der Lage sind, länger als einige Minuten zu überleben. Demgegenüber stehen die Ergebnisse von Lotfi et al. (2010), die überlebensfähige Histomonaden auch noch nach einigen Stunden auf verschiedenen Materialien nachweisen konnten.

Eine weitere Methode der Verbreitung – neben der direkten oralen Aufnahme des Parasiten – innerhalb eines Bestandes ist das Cloacal Drinking. Hierzu kommt es, wenn sich Tiere mit der Kloake direkt auf frischen Kot eines anderen, mit Histomonaden infizierten Tieres setzen. Die Kloake führt bei Stimulation der oberen Kloakenlippe rhythmische Kontraktionen aus. Dadurch zieht sie Material ins Innere. Dieses gelangt in die Bursa fabricius und in die Blinddärme (Hu et al., 2004).

In verschiedenen Tierversuchen konnte eine direkte Übertragung von *H. meleagridis* nachgewiesen werden, indem infizierte Tiere zusammen mit nicht infizierten gehalten wurden. McDougald und Fuller (2005) hielten infizierte und nicht infizierte Puten zusammen, die frei von Heterakiden waren. Die Rate, mit der die nicht infizierten Puten Zeichen einer

Histomonose zeigten, war dabei allerdings mit 16,7 bis 100 % unterschiedlich. Bei Hühnern hingegen scheint es zu keiner Verbreitung von *H. meleagridis* durch den Kontakt infizierter Tiere mit nicht infizierten zu kommen (Hu et al., 2006). Hess et al. (2006a) fanden eine schnelle Verbreitung des Parasiten in infizierten Gruppen von Hühnern oder Puten, denen nicht infizierte Tiere hinzugesetzt wurden. Eine Verbreitung der Histomonose konnte von Armstrong und McDougald (2011) nachgewiesen werden, nachdem sie nicht infizierte Puten in Käfige mit den Faezes infizierter Puten verbrachten.

2.1.8 Immunität

Durch die rektale Inokulation von nichtpathogenen Histomonaden ist es möglich, bei Puten eine Immunität gegen pathogene Stämme hervorzurufen (Lund, 1959). Im Serum von Hühnern und Puten lassen sich sodann Antikörper gegen *H. meleagridis* finden (Clarkson, 1963). Auch eine orale Vakzination von Puten mit in vitro attenuierten Histomonaden ist in der Lage, eine Antikörperbildung hervorzurufen (Liebhart et al., 2010). Nach experimenteller Infektion von Hühnern mit *H. meleagridis* kommt es in den Blinddärmen der betroffenen Tiere zur Ausbildung von IgM-, IgG- und IgA-Antikörpern (Windisch und Hess, 2010). Gibt man eine inaktivierte Vakzine, dessen Basis zerstörte Histomonaden-Zellen sind, bei Puten intramuskulär, bildet sich kein ausreichender Schutz gegen eine anschließende Infektion aus (Hess et al., 2008).

2.1.9 Klinik, Pathologie und Histologie

2.1.9.1 Klinische Symptome

Erste Anzeichen einer klinischen Erkrankung bei Legehennen äußern sich in einem Legeleistungsabfall, wobei ein Produktions-Verlust von 11 % pro Woche auftreten kann (Esquenet et al., 2003). Broiler fallen erstmals durch einen Gewichtsverlust auf (Popp et al., 2011). Homer und Butcher (1991) beobachteten klinische Anzeichen bei Hühnern im Laufe von drei Wochen. In dem von Esquenet et al. (2003) beschriebenen Ausbruch starben 9 % der Hühner, ohne zuvor eine deutliche Klinik zu zeigen.

Bei Hühnern äußert sich die Histomonose in einem Kümmern der Tiere mit gleichzeitiger Apathie. Das Gefieder ist gesträubt, die Flügel werden hängengelassen und die Augen sind geschlossen (Homer und Butcher, 1991; Popp et al., 2011). Klinische Anzeichen und Mortalität können aber, trotz gefundener Schädigungen der Blinddärme, bei Hühnern auch fehlen (Zahoor et al., 2011).

Auch Puten zeigen ein gesträubtes Gefieber, geschlossene Augen und eine zunehmende Mattigkeit (Jung et al., 2009). Die Futteraufnahme ist deutlich herabgesetzt, wohingegen die Wasseraufnahme zunimmt (Aka et al., 2011).

2.1.9.2 Morbidität und Mortalität

Homer und Butcher (1991) geben die Mortalität bei Hühnern mit zwei bis drei Prozent an. Mit 9,1 % war die Mortalität in einem Freiland-Hühnerbestand etwas höher (Esquenet et al., 2003). Auch Cortes et al. (2004) fanden einen nur geringfügig erhöhten Anstieg der Mortalität bei Hühnern. Zudem war die Morbidität mit 1 % äußerst gering. In dem von Hafez et al. (2001) dokumentierten Fall bei Hühnern betrug die Mortalität dagegen 50 %, wobei darauf hinzuweisen ist, dass eine gleichzeitige Infektion mit *Erysipelothrix rhusiopathiae* und *E. coli* vorlag.

In von der Histomonose betroffenen Putenbeständen ist die Mortalität dagegen weitaus höher. Während Jung et al. (2009) eine Mortalität von 56,7 % verzeichneten, berichten Tyzzer (1934) bzw. Popp et al. (2011) von einer 96 %igen bzw. nahezu 100 %igen Mortalität bei Puten.

2.1.9.3 Pathologische Veränderungen

Die Krankheit hat ihren Ursprung in den Blinddärmen. Von hier aus gelangt der Erreger mit dem Blutstrom zu den Lebern (Farmer et al., 1951; McGuire und Morehouse, 1958). Damit sich eine Histomonose bei Puten und Hühnern manifestieren kann bzw. sich pathologische Veränderungen in den Lebern und Blinddärmen zeigen, scheint ein Zusammenspiel zwischen *H. meleagridis* und verschiedenen Bakterien, v. a. *Clostridium perfringens* und *E. coli*, nötig zu sein (Doll und Franker, 1963; Bradley et al., 1964; Franker und Doll, 1964; Springer et al., 1970).

Bei der Sektion zeigt sich, dass die oftmals vergrößerten Blinddärme betroffener Hühner mit einem käsigen kräftig grauem, weißem oder braunfleckigem Inhalt angefüllt sind (Homer und Butcher, 1991; Esquenet et al., 2003). Diese Ausgüsse sind oft mit der inneren Blinddarmwand verbunden, sodass sich beim Entfernen des Inhaltes Teile der Wand ablösen. Die Mukosa stellt sich trüb und granulär dar (Homer und Butcher, 1991). Die Blinddarmwand ist verdickt und hyperämisch (Esquenet et al., 2003). Oftmals tritt eine Peritonitis auf, in deren Verlauf es zu Verklebungen der einzelnen Organe kommt (Homer und Butcher, 1991; Esquenet et al., 2003).

Homer und Butcher (1991) konnten in keinem der untersuchten Hühner Leberläsionen finden. Zwar wiesen die Lebern der Hühner, die von Esquenet et al. (2003) untersucht wurden, nicht die typischen Läsionen auf, wie sie bei Puten gefunden werden. Dennoch stellten sich die Lebern klein und blass dar. Mikroskopisch wurden fokale Nekroseherde nachgewiesen.

Auch Madsen (1962) weist darauf hin, dass die Leberläsionen bei Hühnern nur gering ausgebildet sind oder aber auch fehlen können. Demgegenüber stehen die Beobachtungen von Hafez et al. (2001), die in Hühnern keinerlei Blinddarmläsionen fanden. Dafür beschrieben sie zahlreiche haselnussgroße, weißgelbe Nekroseherde in der Leber.

Puten zeigen – wie auch Hühner – deutliche Blinddarmveränderungen. Die Blinddarmwände sind verdickt und das Lumen ist mit einem käsigen Material angefüllt (Jung et al., 2009; Karaman et al., 2009; Aka et al., 2011, Popp et al., 2011). Zumeist ist dieser Inhalt weisslich-fibrinös (Aka et al., 2011, Popp et al., 2011), teilweise auch mit Blutbeimengungen (Jung et al., 2009).

Die Lebern von erkrankten Puten sind häufig geschwollen. Zu Beginn des Krankheitsgeschehens sind weissliche Nekrosen in der Leber noch sehr fein (Jung et al., 2009; Aka et al. 2011). Im weiteren Verlauf nehmen die Nekroseherde an Größe zu, bis sie runde, bis zu einem Zentimeter große, im Zentrum eingesunkene Läsionen ausgebildet haben (Ley et al., 1989; Popp et al., 2011), die bis ins Parenchym reichen (Hurst, 1980). Die Anzahl der Parasiten, die in die Leber eindringen, ist bei Puten wesentlich höher als bei Hühnern (Powell et al., 2009).

2.1.9.4 Histopathologische Veränderungen

Bei betroffenen Hühnern ergab die von Homer und Butcher (1991) vorgenommene histopathologische Untersuchung der Blinddärme eine fibrinonekrotische ulzerative granulomatöse Typhlitis. Hafez et al. (2001) beschreiben die Blinddarmveränderungen bei Hühnern als diphtheroid nekrotisierende Entzündung. In der Blinddarmwand fanden Homer und Butcher (1991) Histomonaden. Der untersuchte Blinddarminhalt stellte sich als eosinophiles Exsudat mit zahlreichen degenerierten Leukozyten, Erythrozyten, Epithelzellen und Bakterien dar. Einige Ausgüsse waren geschichtet und von multinukleären Riesenzellen umgeben. Ein Großteil der Mukosa war angegriffen und oftmals bereits ulzeriert. Aus dem Inhalt der Blinddärme kam es häufig zu einem Einwandern von Makrophagen, Lymphozyten sowie einigen multinukleären Riesenzellen, heterophilen Granulozyten und Plasmazellen in

Schichten der Blinddarmwand (Homer und Butcher, 1991; Esquenet et al., 2003). In den Wänden fanden sich zahlreiche, mit Histomonaden angefüllte Vakuolen (Homer und Butcher, 1991; Hafez et al., 2001).

Die Leber bei Hühnern mit Histomonose zeigten Nekrosen mit entzündlichen Infiltrationen (Hafez et al., 2001).

Jung et al. (2009) untersuchten die Blinddärme und Lebern von erkrankten Puten. Die Blinddarmwand war entzündlich verändert und von heterophilen Granulozyten besiedelt. Auch die Leber war von Entzündungsherden durchzogen. In den Herden fanden sich Makrophagen und Lymphozyten. Heterophile Granulozyten waren im Gegensatz zum Blinddarm in der Minderheit.

2.1.9.5 Andere von der Histomonose betroffene Organe

Sowohl nach experimenteller als auch nach einer natürlichen Infektion kann der Erreger in verschiedenen Organen nachgewiesen werden (Hauck et al., 2006).

Bereits 1958 berichteten Malewitz et al. (1958) von Veränderungen in der Leber, den Caeca, aber auch den Nieren und der Milz nach experimenteller Infektion bei Puten.

Huber et al. (2006) gelang der Nachweis von Histomonaden-DNA nach experimenteller Infektion von Puten im Duodenum, im Jejunum, im Ileum, im Herzen, im Gehirn, in der Milz und der Lunge. Allerdings konnten sie keine DNA im Blut, im Pankreas, in den Nieren und im Oberschenkelmuskel finden. Mit Hilfe von immunohistochemischen und Färbe-Methoden ergab sich durch die Arbeiten von Singh et al. (2008) ein teilweise anderes Ergebnis: Ein Nachweis bei experimentell infizierten Puten gelang beim Drüsenmagen, dem Caecum, dem Pankreas, der Bursa fabricius, der Leber, der Milz, dem Herzen, der Lunge, dem Knochenmark und dem Gehirn. Dahingegen konnten im Duodenum, dem Jejunum, den Nieren und dem Thymus keine Histomonaden nachgewiesen werden. Nach experimenteller Infektion von Puten wurde Erreger-DNA von Hauck et al. (2006) in allen untersuchten Blinddärmen, Lebern, Lungen und Herzen gefunden. Zum Teil wurde der Erreger auch in den Nieren, in der Bursa fabricius, im Gehirn und in der Milz gefunden (Hauck et al., 2006).

Nach experimenteller Infektion von Hühnern und Puten fanden Grabensteiner et al. (2006) bei den Puten in allen von ihnen untersuchten Organen DNA von *H. meleagridis*. Dies waren der Drüsenmagen, das Duodenum, das Jejunum, die Caeca, das Pankreas, die Bursa

fabricius, die Leber, die Nieren, die Milz, das Herz, die Lungen, das Thymus und das Gehirn. Bei den Hühnern gelang der Nachweis von Histomonaden nur im Blinddarm, in der Bursa fabricius, in den Nieren, im Herzen und im Gehirn.

Auch Clarkson (1962) beschreibt Veränderungen der Nieren bei Puten und Hühnern nach Infektion mit embryonierten Heterakis-Eiern, die Histomonaden enthielten.

Der Nachweis der DNA durch eine PCR nach natürlicher Infektion von Puten gelang bei allen untersuchten Blinddärmen, Lebern, Milzen, Nieren und Gehirnen. Auch einige Bursae fabricii, Duodeni und Jejuni waren Histomonas-positiv (Hauck et al., 2006). Sentíes-Cué et al. (2009) berichten über das Vorliegen von *H. meleagridis* bei Puten in verschiedenen anderen Organen außer der Leber und den Blinddärmen nach natürlicher Infektion. Der Erreger wurde sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch im Pankreas, in der Milz, den Nieren, der Bursa fabricius, der Lunge und im Drüsenmagen nachgewiesen.

Auch Cortes et al. (2004) beschreiben in einem Fallbericht das Auftreten von Histomonaden in der Bursa fabricius. Allerdings waren in diesem Fall Hühner betroffen.

2.1.10 Diagnose

2.1.10.1 Klinik, Sektion

Durch die klinischen Symptome in der Herde sowie pathologischen Veränderungen bei der Sektion, kann bei Puten schnell eine Verdachtsdiagnose gestellt werden (McDougald, 2008).

Läsionen, die in den Blinddärmen von Hühnern gefunden werden, sind sehr unterschiedlich. Einige ähneln denen bei Puten. Oftmals ist jedoch im Inhalt so viel Blut beigemischt, dass eine Abgrenzung zu einer *Eimeria tenella*-Infektion schwerfällt (McDougald, 2005).

2.1.10.2 Mikroskopischer Nachweis

Lebende Organismen können unter dem Mikroskop nachgewiesen werden. Besonders geeignet hierfür ist ein Phasen-Kontrast-Mikroskop. Aufgrund der Größe von *H. meleagridis* (Durchmesser etwa 10 µm) empfielt sich eine 200 bis 400 fache Vergrößerung (McDougald, 2005). Wichtig dabei ist, dass das Material von frisch getöteten, also noch warmen Tieren stammt. Hilfreich ist auch, wenn die zu untersuchenden Proben während der Präparation warm gehalten werden. Wird zusätzlich noch der Mikrokoptisch angewärmt, so bleiben die Bewegungen der Histomonaden auch weiterhin sichtbar, um eine Diagnose stellen zu können.

Allerdings sind die Erreger nur im Blinddarmlumen begeißelt. Eine mikroskopische Diagnose aus anderen Geweben ist wegen der fehlenden Bewegung weitaus schwieriger (McDougald, 2008).

2.1.10.3 Histopathologie

In histopathologischen Schnitten wird der Erreger mittels Hematoxylin und Eosin (HE-Färbung), Periodic-Acid-Schiffs- (PAS) Färbung oder Grocott-Färbung dargestellt. Eine Schwierigkeit besteht in der Unterscheidung zu Pilzen und anderen Pathogenen (Kemp und Reid, 1966a).

Nicht immer gelingt die Färbung des Organismus mit der PAS-Färbung, was eventuell auf unterschiedliche Entwicklungsstufen von *H. meleagridis* zurückzuführen ist (Sentíes-Cué et al., 2009). Cortes et al. (2004) hingegen erzielten gute Ergebnisse mit der PAS-Färbung.

2.1.10.4 Anzucht in vitro

Die Diagnose der Histomonose erfolgt unter anderem mittels Isolierung und Anzucht der Histomonaden aus Leber und Blinddärmen verendeter oder getöteter Tiere (McDougald und Galloway, 1973). Eine Schwierigkeit ergibt sich hier in der Temperaturempfindlichkeit des Erregers. Da die optimale Temperatur für ein Histomonadenwachstum von 41 bis 42 °C (Dwyer, 1970) während eines Transportes der Tiere in ein Diagnostiklabor nicht eingehalten werden kann, versuchten Gerhold et al. (2010), die mindest notwendige Temperatur für eine erfolgreiche Anzucht von *H. meleagridis* aus nicht mehr frisch toten und damit auch nicht mehr optimal warmen Vögeln herauszufinden. Um einen Transport unter Normalbedingungen zu simulieren, wurde zuerst der Kadaver der getöteten Tiere bei Raumtemperatur gelagert. Nach Entnahme der Proben für eine Kultivierung wurden diese verschieden lange (bis zu 120 Stunden) bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Keine der Temperaturen erreichte dabei das von Dwyer (1970) erforderte Optimum. Positive Ergebnisse in der Kultivierung ergaben sich lediglich, wenn der Kadaver nicht länger als zwei Stunden bei Raumtemperatur gelagert wurde gefolgt von einer maximalen Lagerungsdauer von 72 Stunden bei 30 °C. Aufgrund dieser Ergebnisse empfehlen Gerhold et al. (2010) für eine erfolgreiche Kultivierung von *H. meleagridis* als Nachweismethode ein Vorwärmen des Kulturmediums sowie eine umgehende Versendung der toten Vögel. Zudem sollte in dem Behälter, in dem das Material versandt wird, eine möglichst warme Atmosphäre, z. B. durch die Zugabe von Wärmepads, geschaffen werden.

2.1.10.5 Polymerase chain reaction (PCR)

Hafez et al. (2005a) entwickelten eine PCR, eine Nested PCR und eine Real-time PCR und verglichen diese bezüglich ihrer Spezifität und Sensitivität. Amplifiziert wurde jeweils ein Teil des SSU rRNA-Gens. Mit den Primern, die für die PCR entwickelt wurden, wurde sowohl DNA von *H. meleagridis* als auch von *T. foetus* amplifiziert. PCR-Produkte von *T. foetus* und *Tetratrichomonas gallinarum* zeigten in der Nested PCR ein positives Ergebnis, wobei das jeweilige Amplikon etwas kleiner war als das 225 Basenpaare große Amplikon von *H. meleagridis*. In der Real-time PCR wurde mit den entsprechenden Primern dagegen keine DNA von anderen Trichomonaden-Arten nachgewiesen. Eine DNA-Konzentration von 6,3 pg/µl führte in der PCR immer noch zu positiven Ergebnissen, während die Nachweisgrenze für die Real-time PCR bei der zehnfachen Menge lag.

Auch die von Huber et al. (2005) entworfenen Primer zeigten in der PCR ein positives Ergebnis für *H. meleagridis* und *T. gallinarum*. Das Amplikon für *H. meleagridis* umfaßt dabei 209 Basenpaare des SSU rRNA-Gens. Damit ist es nur unwesentlich größer als das Amplikon von *T. gallinarum* mit 181 Basenpaaren.

Grabensteiner und Hess (2006) entwickelten drei verschiedene Primerpaare, mit denen der spezifische Nachweis von *H. meleagridis*, *T. gallinarum* und *Blastocystis* spp. gelang. Amplifiziert wurden dabei jeweils ein Teil des SSU rRNA-Gens. Dabei traten mit Ausnahme des Nachweises von *T. gallinae* mit dem Primerpaar Tgf und Tgr – entwickelt für den Nachweis von *T. gallinarum* – keine Kreuz-Reaktionen in der PCR auf.

Um falsch negative Ergebnisse bei der Diagnose der Histomonose auszuschließen, ließen Bleyen et al. (2007) eine interne Kontrolle mitamplifizieren. Auch hier liegt das Amplikon im SSU rRNA-Gen.

2.1.10.6 Blutwerte

Das Serum-Albumin fällt bei Puten und Hühnern sehr stark ab (Clarkson, 1959; Clarkson, 1966; Beg und Clarkson, 1970b). McDougald und Hansen (1969) zeigten, dass der Gehalt an Alpha-, Beta- und Gamma-Globulin während der akuten Phase bei Puten anstieg. Etwas anders verhält es sich bei Hühnern. Hier kommt es zuerst zu einem Anstieg und danach zu einem Abfall des Gamma-Globulin-Gehaltes (Beg und Clarkson, 1970a).

Bei Puten und Hühnern steigen die Plasma-Werte der Glutamin-Oxalacetat-Transaminase (GOT) (al-Khateeb und Hansen, 1973; al-Khateeb und Hansen, 1974) sowie der Lactat-Dehydrogenase (LDH) in Zusammenhang mit der Entwicklung von Leberläsionen

an, wohingegen die Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) unverändert bleibt (McDougald und Hansen, 1970). Beg und Clarkson (1970b) beobachteten bei Puten degegen einen Anstieg der Plasmakonzentrationen aller drei Enzyme. Die Plasma-Werte der GOT sind bei Puten aber nur selten mit dem Erscheinen von klinischen Anzeichen korreliert (Hirsch, 1979).

Entzündugsgeschehen in Geweben ziehen eine irreversible Oxidation von Hämoglobin zu Methämoglobin nach sich (Cohen und Hochstein, 1961; Paul und Sbarra, 1968). Bei Hühnern steigt der Methämoglobin-Wert durch die Histomonose bedingt an (Mathis et al., 1984).

Die Anzahl der Leukozyten steigt bei Hühnern ebenfalls stark an. Dies betrifft die heterophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten sowie die Monozyten, wohingegen sich die Anzahl der Lymphozyten kaum verändert. Nach der akuten Krankheitsphase kehren sie zu Normalwerten zurück (Wilson und Perie, 1966).

2.1.10.7 Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA)

Um den Infektionsstatus von Hühnern und Puten zu bestimmen, entwickelten Windisch und Hess (2009) einen indirekten Sandwich-ELISA, mit dem sie in den Sera der Tiere die IgG-Antikörper-Antwort nachwiesen.

Etwas später entwarfen van der Heijden et al. (2010) einen kompetetiven ELISA. Dieser Test ist spezifisch, da er ausschließlich Antikörper gegen Histomonaden, nicht aber gegen den antigenetisch verwandten *T. gallinarum* nachweist.

2.1.10.8 In-situ Hybridisation

Um die Nukleinsäure von *H. meleagridis* in verschiedenen Organen nachzuweisen, entwickelten Liebhart et al. (2006) eine in-situ Hybridisation (ISH). Nach experimenteller Infektion von Puten und Hühnern konnte der Erreger mit dieser Methode in den Blinddärmen und in der Leber nachgewiesen werden. In den Blinddärmen wurden Histomonaden im Inhalt, in der Mukosa, in der Muskelschicht und in der Serosa gefunden. In der Leber war der Erreger oftmals in Verbänden angeordnet. Lokalisiert war er interzellulär, in der Regel in Lakunen.

Mit der ISH gelang somit ein sehr spezifischer Nachweis von Histomonaden-Nukleinsäuren. Der histologische Nachweis kann somit beim gleichzeitigen Vorliegen anderer Protozoen oder Pilze erleichtert werden.

2.1.10.9 Immunohistochemischer Nachweis

Singh et al. (2008) verwendeten für einen immunohistochemischen Nachweis ein polyklonales anti-*H. meleagridis* Serum, welches sie aus Kaninchen gewannen. Dafür wurden monoklonale Histomonaden-Kulturen nach der Methode der Mikromanipulation gewonnen. Diese Kulturen wurden durch die Absorption an Acetonpuder von Bakterien und Reismehl gereinigt. Nach Gewinnung des Serums konnten parasitäre Zellen in Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben aus experimentell infizierten Puten nachgewiesen werden. Antigene konnten in verschiedensten Organen lokalisiert werden. Die verwendete Methode stellte sich dabei als sensitiver als herkömmliche HE- und PAS-Färbetechniken heraus.

2.1.10.10 Untersuchungen zur Genotypisierung

Innerhalb der Art *H. meleagridis* gibt es unterschiedlich virulente Genotypen (Tyzzer, 1936; Lund, 1956). Auch Lund und Chute (1974b) erwähnen eine unterschiedliche Virulenz von *H. meleagridis*-Typen, ohne dass sie dabei jedoch auf eine Nachweismethode dieser eingehen. Ebenso stellten Callait-Cardinal et al. (2007) fest, dass es in Putenfarmen in Frankreich zu markant unterschiedlich hohen Mortalitäten kam. Auch sie führten diese Tatsache auf eine möglicherweise unterschiedliche Virulenz verschiedener Histomonaden-Typen zurück.

Um nun das Vorliegen von unterschiedlichen Histomonaden-Typen zu belegen, wurden oftmals die Internal Transcribed Spacer (ITS)-Regionen untersucht. Da es sich hierbei um nicht kodierende Bereiche handelt, die schnellen Veränderungen unterliegen, eignen sie sich besonders für z. B. Untersuchungen zu verschiedenen Typen einer Art (Hillis und Dixon, 1991). Auch Cepicka et al. (2005) nahmen Untersuchungen der ITS-Regionen vor. Allerdings bezogen sich diese auf *T. gallinarum*. Andere Abschnitte des rRNA-Gens sind für eine Genotypisierung nicht geeignet. Sie dienen vielmehr zu Untersuchungen zu phylogenetischen Verwandtschaften (Felleisen, 1997; Gerbod et al., 2001; Mantini et al., 2009; Lollis et al., 2011). Von Munsch et al. (2009b) wurden zwar ein Fragment des 18S rRNA-Gen dazu verwendet, um einen phylogenetischen Stammbaum zusammen mit unter anderem *D. fragilis*, *T. foetus* und *Hexamastix* sp. zu erstellen. Die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen mehreren Klonen von *H. meleagridis* wurden allerdings auf der Grundlage der hoch variablen ITS1-Region erstellt.

Eine Genotypisierung von *H. meleagridis* gelang van der Heijden et al. (2006) durch eine neu entwickelte Methode. Hier wurde die ITS1-Region herangezogen. Durch eine

Reduzierung der durch die PCR in der Sequenzierung erhaltenen Fluorogramme auf die Base Cytosin ergaben sich charakteristische sogenannte C-Profile, die miteinander verglichen werden konnten. Auf diese Weise fanden van der Heijden et al. (2006) drei unterschiedliche C-Profile, die für drei unterschiedliche Typen stehen. Typ I und Typ II ähneln sich dabei, wohingegen Typ III ein völlig anderes C-Profil, nicht vergleichbar mit denen der anderen beiden Typen, aufweist. Mantini et al. (2009) kamen zu der Schlussfolgerung, dass es sich bei dem als Typ III beschriebenen Histomonaden-Typ um *Parahistomonas wenrichi* handelt.

Die Methode des C-Profilings wurde von Bart et al. (2008) für eine Genotypisierung von *D. fragilis* herangezogen. Auch hier wird darauf hingewiesen, dass für epidemiologische Studien das SSU rRNA-Gen aufgrund fehlender Variabilitäten nicht geeignet ist.

Andere Gene, wie z. B. das Alpha- oder das Beta-Tubulin-Gen eignen sich hingegen nicht zur Genotypisierung (Gerhold et al., 2011; Hauck und Hafez, 2009).

2.1.10.11 Differentialdiagnosen

Verschiedene andere Erkrankungen wie Leukose, bakterielle oder Pilz-Infektionen rufen ähnliche Leberveränderungen hervor, wie sie bei einer *H. meleagridis*-Erkrankung zu beobachten sind. Besonders bei Hühnern können die Symptome in den Blinddärmen denen einer Kokzidiose ähneln. Auch hier können bakterielle Infektionen, z. B. durch *E. coli* oder *Salmonella*, ähnliche Krankheitsbilder hervorrufen (McDougald, 2005). *C. albicans* wurde ebenfalls als die Ursache der Histomonose angesehen, da ähnliche Leberveränderungen wie bei einem Befall mit *H. meleagridis* auftreten (Schiefer und Mehnert, 1963). Oftmals lässt sich in Puten neben *H. meleagridis* auch *Trichomonas gallinarum* in den Blinddärmen und in der Leber nachweisen (Amin et al., 2011) nachweisen. Obwohl letzterer ebenfalls zu Leberveränderungen führt, sind diese in ihrem Erscheinungsbild jedoch deutlich anders als die Leberveränderungen, die von *H. meleagridis* verursacht werden (Allen, 1941). Pathogen scheint dieser Erreger für Enten zu sein (Richter et al., 2010). Leber- und Blinddarmläsionen, welche denen einer Histomonose gleichen, werden bei Puten und Hühnern auch von einer *Pentatrichomonas*-Art verursacht (Allen, 1936).

2.1.11 Prophylaxe und Therapie

2.1.11.1 Herdenmanagement

Gute Erfolge bei der Bekämpfung oder Eindämmung der Histomonose wurden durch die Reduzierung oder Elimination der Heterakiden-Eier in den Beständen erzielt (McDougald, 2008). Da Hühner besonders empfänglich für Heterakiden sind und ihnen damit bei der Übertragung auf Puten eine wichtige Rolle zukommt (Lund und Chute, 1970), ist es, um die Infektionskette zu unterbrechen, von essentieller Wichtigkeit, Hühner getrennt von Puten und anderen, für Histomonaden empfänglichen Vögeln, zu halten (McDougald, 2008).

Bei der Verbreitung der Histomonose spielt die Besatzdichte eine wichtige Rolle. So war die Mortalität in Freiland-Putenbeständen höher, wenn zum einen viele Puten auf dem Gelände gehalten wurden und zum anderen auch, wenn die Puten mit anderem Geflügel gehalten wurden. Letzteres erklärt sich aus der Tatsache, dass es zwischen Puten und Hühnern zur Übertragung der Histomonose kommen kann (Callait-Cardinal et al., 2010).

Die Verlagerung der Putenbestände von einer Außenhaltung ins Innere hat die Inzidenz für Histomonose erheblich reduziert. Grund ist wahrscheinlich, dass die Tiere so keinen direkten Kontakt mehr zu den als Stapelwirte fungierenden Regenwürmern oder anderen Vektoren haben. Die gleiche Vorgehensweise bei Hühnern führte nicht zu dem gewünschten Erfolg (McDougald, 2008). Callait-Cardinal et al. (2010) geben dabei allerdings zu bedenken, dass es durch eine schlechte Hygiene in den Ställen, wie z. B. feuchte Einstreu oder zu selten gewechselter Einstreu, zu einer erhöhten Mortalität kommen kann, da die Tiere häufiger mit kontaminiertem Kot in Kontakt kommen.

Ein anderer Ansatz ist die Kontrolle der Wurmpopulation durch den Einsatz von Anthelminthika. Die Benzimidazol-Derivate Albendazol und Fenbendazol sind möglicherweise in der Lage, Heterakiden-Larven abzutöten und somit eine Übertragung der Histomonaden zu verhindern (Hegngi et al., 1999). Das ebenfalls zu den Benzimidazolen gehörende Flubendazol hat eine zuverlässige Wirkung gegen Heterakiden (Squires et al., 2012).

Werden Hühner mit Dimetridazol behandelt, wird die Rate, mit der *H. meleagridis* in Heterakideneier inkorporiert wird, zwar reduziert. Die Verbreitung von Histomonaden durch die Eier wird allerdings nicht gestoppt (Chute et al., 1978).

In Hühnerbeständen ist eine Prävention der Kokzidiose angeraten. McDougald und Hu (2001) untersuchten die Auswirkungen einer kombinierten *E. tenella*- und *H. meleagridis*-Infektion bei experimentell infizierten Hühnern. Demnach wird nicht nur der Schweregrad der Leberläsionen erhöht, sondern auch die Anzahl der Tiere, die Leberläsionen aufweisen. Erklärt wurde der Zusammenhang zwischen den beiden Erregern mit einer Vorschädigung der Blinddarm-Mukosa von *E. tenella*, welches den Histomonaden möglicherweise ein Eindringen in das Blinddarm-Gewebe erleichtert. Später kamen Hu und McDougald (2002) jedoch zu dem Schluss, dass der Schweregrad einer Histomonose bei Hühnern nicht von einer Schädigung der Mukosa durch die Kokzidien abhängig ist. Eine andere Erklärung besteht in einer durch *E. tenella* verursachten Dysbakteriose in den Blinddärmen (McDougald und Hu, 2001). Bekannt ist, dass Kokzidien das Wachstum von *C. perfringens* fördern, aber einen negativen Einfluss auf *Bacteroides* sp. haben (Dykstra und Reid, 1978). Andererseits kann es durch das Vorhandensein von *H. meleagridis* zu einer reduzierten Oocysten-Produktion bei *E. tenella* kommen, da bedingt durch die Histomonose weniger geeignetes Gewebe für die Gametogonie vorhanden ist (Chappel, 1973).

2.1.11.2 Therapeutika und prophylaktisch eingesetzte Wirkstoffe

2.1.11.2.1 Ehemals verwendete Substanzen

Zur Therapie und Prophylaxe wurden verschiedene Pharmaka verwendet. Die beiden arsenhaltigen Mittel Neoarsphenamin und Tryparsamid konnten die Mortalität in Putenbeständen senken. Letzteres zeigte dabei die besseren therapeutischen Effekte (Tyzzer, 1923). Andere arsenhaltige Mittel wie Mapharsen oder Nitarson dienten dabei aufgrund der fehlenden Wirksamkeit bei bereits stattfindenden Ausbrüchen der Prophylaxe (McCulloch und Nicholson, 1941; McGuire und Morehouse, 1952). Duffy et al. (2004) hingegen fanden nach der Gabe des zu den Nitarsonen gehörenden Histostats® eine Reduzierung der Leberläsionen bei Hühnern. Das arsenhaltige Mittel Roxarson ist in vitro sogar in der Lage, Histomonaden abzutöten (Callait, 2002).

Nitrofurane (z. B. Furazolidon) hatten einen geringen therapeutischen Effekt und waren in der Lage, in betroffenen Beständen die Mortalität zu senken (Jerstad, 1957; Vatne et al., 1969a). Das zu den Nitrofuranen gehörende Nifursol hat bei Puten und bei Hühnern einen prophylaktischen Effekt (Sullivan et al., 1972; Vatne et al., 1969b). Nifurtimox, auch ein Nitrofuran, kann ein Wachstum der Histomonaden in vitro verhindern, wenn es in hohen Konzentrationen gegeben wird. In vivo kann es bei Puten als Prophylaktikum eingesetzt werden (Hauck et al., 2010a).

Nitroimidazole (Dimetridazol, Metronidazol, Ipronidazol und Ronidazol) waren lange Zeit Mittel der Wahl sowohl in der Prophylaxe als auch in der Therapie bei Puten und Hühnern. Besonders Dimetridazol kam eine besondere Bedeutung als das am besten wirksame Mittel zu (Flowers et al., 1965; Morehouse et al., 1968). Metronidazol wurde bei Puten zur Prophylaxe eingesetzt (Lindquist, 1962). Von den von Hu und McDougald (2004) in vivo getesteten Stoffen zeigten Dimetridazol, Metronidazol, Ornidazol und Tinidazol eine hohe Effektivität bei der Kontrolle der Histomonose in Hühnern.

Das zu den Thiazolen gehörende Enheptin T (2-Amino-5-Nitrothiazol) wurde verschiedentlich eingesetzt. Bei Puten zeigte es einen guten therapeutischen Erfolg (McGregor, 1949; Swales, 1950a; Swales, 1952a).

Wegeforth und Wegeforth (1921) konnten mit dem Hydroxyquinolin-Derivat IOQUIL gute Erfolge sowohl bei der Prophylaxe als auch der Behandlung der Histomonose bei Puten erzielen. Dahingegen stellte McGregor (1951) lediglich einen geringen prophylaktischen Effekt des IOQUIL fest.

Die in den 60er Jahren getesteten Mittel Nidrafur (5-Nitro-2-Furaldehyd Acetylhydrazon) und Entobex (4,7-Phenanthrolin-5,6 Quinon) stellten ebenfalls kein geeignetes Therapeutikum dar. Nidrafur war jedoch in der Lage, experimentell bei Puten die Mortalität zu senken (Hall et al., 1965).

2.1.11.2.2 Rechtliche Grundlagen

Über einen Zeitraum von mehr als 30 Jahren konnte die Histomonose sehr gut mit dem Mittel Dimetridazol kontrolliert werden. 1995 wurde es als Therapeutikum und 2002 als Futterzusatzstoff vom Markt genommen. Somit stand nur noch Nifursol – ein Futterzusatzstoff aus der Klasse der Nitrofurane – zur Prophylaxe zur Verfügung. Zugelassen war es bis März 2003. In den Jahren 1990 bis 1995 beurteilten das Vereinte FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) und das Committee for Veterinary Medicinal Products (CVMP) den Gebrauch von Veterinärmedizinischen Produkten (VMPs), im Besonderen von Nitrofuranen, bei lebensmittelliefernden Tieren. Wegen des schädlichen Einflusses auf das Erbgut und der kanzerogenen Wirkung konnte kein Maximum Residue Level (MRL) für Substanzen aus der Gruppe der Nitrofurane festgelegt werden. Somit waren sie für lebensmittelliefernde Tiere in der EU nicht mehr als veterinärmedizinisches Produkt zugelassen (Anhang I, Verordnung Nr. 2377/90; Hafez et al., 2005b).

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind keine Stoffe zur Behandlung oder zur Prophylaxe der Histomonose zugelassen.

2.1.11.2.3 Weitere Substanzen

Verschiedene von Swales (1952b) getestete Bezoesäure-Derivate zeigten keinerlei prophylaktische Wirksamkeit gegen die Histomonose bei Puten, weshalb die therapeutische Wirksamkeit nicht weiter getestet wurde.

Schon in den 60er Jahren wurde das Antibiotikum Paromomycin-Sulfat in der Prophylaxe bei Puten eingesetzt, allerdings mit keinem zufriedenstellenden Erfolg (Lindquist, 1962). Auch später war es bei Hühnern nicht in der Lage, die Histomonose zu kontrollieren (Hu und McDougald, 2004). Bleyen et al. (2009) hingegen erzielten gute in vivo Erfolge in der Prophylaxe der Histomonose bei Puten mit Paromomycin-Sulfat. Ein therapeutischer Effekt konnte aber auch von ihnen nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Hafez et al. (2010), die Paromomycin in vivo bei Puten zur Prophylaxe einsetzten. In ihrer Studie kamen sie zu dem Schluss, dass Paromomycin eventuell in der Lage ist, den Verlust ganzer Putenherden bei einem Histomonose-Ausbruch zu verhindern. Nachdem van der Heijden et al. (2011) einen inhibitorischen Effekt auf Histomonaden in vitro nachgewiesen hatten, testeten sie dieses Antibiotikum in vivo bei Puten. Hier zeigte sich ein prophylaktischer Effekt.

Anstatt Benzimidazole als Anthelminthikum einzusetzen, verfolgten Hauck und Hafez (2009) einen anderen Ansatz. Zu Histomonadenkulturen gaben sie jeweils Albendazol, Fenbendazol, Flubendazol, Mebendazol und Nocodazol. Obwohl vermutet wird, dass diese Mittel in der Lage sind, an histomonales Beta-Tubulin zu binden und so den Stofftransport im Inneren der Zelle zu hemmen, konnte in vitro dieser Effekt nicht nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung gaben sie durch die einmalige Gabe der Mittel und den anschließenden Abbau durch die in der Kultur vorhandenen Bakterien. Dies würde erklären, warum es in vivo, wenn Benzimidazole kontinuierlich gegeben werden, eine hohe Effektivität gibt (Hegngi et al., 1999).

Das zu den Pleuromutilinen gehörende Tiamulin kann bei Puten mit einer Histomonose die Mortalität senken (Burch et al., 2007). Ebenso ist es in der Lage, in vitro ein Wachstum der Histomonaden zu hemmen. Die in der Kultur vorhandenen Bakterien werden durch das Tiamulin in ihrem Wachstum dagegen nicht beeinflusst (Hauck et al., 2010c).

Auch die Wirksamkeit verschiedener pflanzlicher Präparate gegen Histomonaden wurde untersucht. Duffy et al. (2005) konnten durch die Gabe von Natustat™, einem pflanzlichen Produkt, dessen Zusammensetzung nicht näher erläutert wird, die Läsionen in der Leber bei Puten verringern. In Hühnern führte Natustat™ zu einer Verringerung der Blinddarmläsionen (Duffy et al., 2004). Die Wirksamkeit von Protophyt®, einem pflanzlichen Mittel bestehend aus Auszügen von Zimt, Knoblauch, Rosmarin und Limone, wurde von Hafez und Hauck (2006) in vivo bei Puten untersucht. Als Futter- oder Tränkezugabe konnte ein prophylaktischer Effekt erzielt werden. Die Schwere der Läsionen in den Blinddärmen und der Leber konnte jedoch nicht reduziert werden. Van der Heijden und Landman (2008b) konnten bei Puten in vivo keinen prophylaktischen Effekt von Protophyt® nachweisen. Allerdings hemmt dieses Produkt in vitro das Wachstum der Histomonaden (van der Heijden und Landman, 2008a). Des weiteren untersuchten Hauck und Hafez (2007) die Wirksamkeit von RepaXol® und zwei weiteren Pflanzenprodukten in vitro. Erstgenanntes besteht aus einer Mischung aus Auszügen von Oregano, Zimt, Thymian, Zitrus-Früchten und Capsicum. Eins der anderen Produkte hat die gleichen Inhaltsstoffe wie RepaXol® mit Ausnahme des Oreganos. Das dritte getestete Produkt besteht aus Auszügen von Grapefruit-Samen. Alle drei Mittel besaßen einen antihistomonalen sowie einen antibakteriellen Effekt. Dabei konnte jedoch nicht geklärt werden, ob der antihistomonale Effekt auf die Reduktion der Bakterien zurückzuführen ist. Die Wirksamkeiten von Carvacrol, Cassia-Öl, Rosmarin-Essenz, einer Essenzenmixtur mit Thymian und Rosmarin sowie Quillaja saponaria-Saponin wurden von Grabensteiner et al. (2007) in vitro getestet. Alle Substanzen zeigten mit einer Ausnahme ähnliche Minimale letale Konzentrationen (MLC). Lediglich die MLC für das Cassia-Öl war signifikant verschieden von den anderen getesteten Substanzen. In experimentell infizierten Puten konnte durch die Gabe von Thymian-, Grapefruitsamen- und Kürbisextrakten lediglich die Mortalität bei einigen Tieren hinausgezögert werden (Grabensteiner et al. 2008). In vitro waren Alkaloide der Steppenraute (*Peganum harmala*) in der Lage, das Histomonadenwachstum zu hemmen (Arshad et al., 2008).

2.2 *Blastocystis* spp.

Der im Darmtrakt vorkommende Protozoe *Blastocystis* ist ein Parasit von Mensch und Tier (Tan, 2008).

Bei der Diagnosestellung aus Kulturmaterial, kann es zu Schwierigkeiten kommen, da eine exakte Zuordnung zum Genus *Blastocystis* aufgrund der verschiedenen Formen, die der Erreger annehmen kann, nicht immer eindeutig gelingt und hier mehrere Formen nebeneinander auftreten können. Im Einzelnen sind dies: eine vakuoläre Form (Duda et al., 1998; Dunn et al., 1989; Lanuza et al., 1997; Vennila et al., 1999), eine multivakuoläre Form (Duda et al., 1998), eine granuläre Form (Chen et al., 1997; Dunn et al., 1989), eine amöboide Form (Dunn et al., 1989; Lanuza et al., 1997) und eine Cystenform (Chen et al., 1997; Chen et al., 1999; Moe et al., 1996; Vennila et al., 1999).

Lange Zeit wurde *Blastocystis* spp. in die Gruppe der Stramenopilen eingeordnet. Diese umfaßt sowohl Protisten mit einem heterotrophen Stoffwechsel als auch solche, die durch Photosynthese Energie gewinnen. Durch Untersuchungen der ITS-Regionen sowie Teilen des SSU und LSU rRNA-Gens konnte innerhalb der Stramenopilen eine enge Verwandtschaft zu *Proteromonas lacertae*, welcher im Darmtrakt von Eidechsen und Amphibien zu finden ist, nachgewiesen werden (Hoevers und Snowden, 2005). Alle Mitglieder der Stramenopilen sind gekennzeichnet durch den Besitz von Flagellen mit Mastigonemen. Letzteres sind haarartige Projektionen, die seitlich des Flagellums entspringen. Die aktuell gültige taxonomische Einordnung wurde aufgrund des Fehlens jeglicher Flagellen von Cavalier-Smith (1998) vorgenommen:

Reich	Chromista
Unterreich	Chromobiota
Infrareich	Heterokonta
Unterstamm	Opalinata
Klasse	Blastocystea

Trotz des Vorkommens bei nichthumanen Wirten war lange nicht bekannt, inwieweit der Errger zoonotisches Potential besitzt (Stenzel und Boreham, 1996). Noël et al. (2005) vermuten auf Grundlagen von Analysen des SSU rRNA-Gens von 12 Isolaten von Menschen, Ratten und Reptilien, das Vorhandensein zahlreicher zoonotischer Isolate mit Mensch-Tier

und Tier-Mensch Übertragung. Des Weiteren vermuten sie, dass Tiere ein Reservoir für menschliche Infektionen darstellen. Auch innerhalb einer Wirtsspezies kann es zu Infektionen mit verschiedenen *Blastocystis*-Spezies kommen. Tanizaki et al. (2005) wiesen die Übertragbarkeit von *B. galli* (Vorkommen bei Hühnern), *B. anatis* (Vorkommen bei Enten) und *B. anseri* (Vorkommen bei Gänsen) untereinander nach.

Abe (2004) untersuchte das Zoonose-Potential ebenfalls anhand des SSU rRNA-Gens. Durch phylogenetische Analysen von 19 Isolaten bei Mensch und Tier stellten sie sieben Gruppen auf. Alle Isolate der jeweiligen Gruppe sind in der Lage, auch die Wirte der anderen Gruppen zu infizieren.

I	Isolate von	Mensch, Primaten, Rinder, Schweine, Vögel
II	"	Mensch, Primaten
III	"	Mensch, Rinder, Schweine
IV	"	Primaten, Vögel, Nagetiere
V	"	Rinder, Schweine
VI	"	Mensch, Vögel
VII	"	Mensch, Vögel

Aufgrund der Vielzahl an Wirten ist der Lebenszyklus entsprechend komplex. Der Mensch kann eine Vielzahl an Blastocysten-Arten beherbergen, die aus unterschiedlichen Tierspezies stammen. Auch Geflügel ist in diese Übertragungskette involviert. Vereinfacht dargestellt werden Cysten aufgenommen, aus welchen im Dickdarm der Parasit frei wird. Hier entwickelt er sich zur vakuolären Form. Die Encystierung beginnt während der Darmpassage und ist mit der Abgabe von Cysten mit dem Kot abgeschlossen (Moe et al., 1997).

Weiterhin unklar ist die Frage, ob Blastocysten pathogen oder apathogen sind. Damit einhergehend ist ebenso unklar, ob intestinale Funktionsstörungen direkt durch den Einzeller hervorgerufen werden. Klinische Symptome bei sämtlichen Tierarten, die in Zusammenhang mit dem Fund von Blastocysten auftreten, sind eher unspezifisch wie Diarrhö, abdominale Krämpfe, Nausea und Fieber (Tan, 2004).

2.3 *Tetratrichomonas gallinarum*

Im Darmtrakt des Geflügels kommt neben Histomonaden auch oft der einzellige Parasit *T. gallinarum* vor (Mehlhorn et al., 2009).

Die Trophozoiten von *T. gallinarum* wie sie sich in der Kultur darstellen sind in der Regel birnenförmig mit einer Größe von 6 bis 15 µm. Am vorderen Pol befinden sich vier freie Flagellen. Die fünfte Flagelle ist rücklaufend und nur am posterioren Pol frei. Dies ist ein Unterscheidungsmerkmal zu *T. gallinae*. Um das endoplasmatische Retikulum befindet sich ein Bereich von Lakunen. Das endoplasmatische Retikulum selbst umgibt den Nukleus in einem regelmäßigen Abstand. Im Cytoplasma befinden sich große Nahrungsvakuolen (Mehlhorn et al., 2009).

Die aktuell gültige Einordnung erfolgte durch Cepicka et al. (2010):

Stamm	Parabasalia
Klasse	Trichomonadea
Ordnung	Trichomonadida
Familie	Trichomonadidae

T. gallinarum ist demnach enger mit *T. vaginalis* (gleiche Familie) verwandt, als mit *H. meleagridis* (Klasse Tritrichomonadea).

Cepicka et al. (2005) zeigten, dass die Frage nach dem Vorhandensein verschiedener Spezies oder unterschiedlicher Stämme innerhalb des *T. gallinarum*-Komplexes noch nicht endgültig geklärt ist. Auch die Frage nach der Pathogenität kann mit nicht ausreichend untersuchten Stämmen nicht zufriedenstellend untersucht werden.

Die Pathogenität ist umstritten (Kulda et al., 1974). Amin et al. (2011) infizierten Hühner und Puten entweder intrakloakal oder oral mit dem Erreger. Weder klinische Symptome noch Todesfälle traten auf. Dennoch konnte *T. gallinarum* durch PCR und in-situ Hybridisation im Oesophagus, im Duodenum, im Jejunum, in den Blinddärmen, in der Leber, in der Lunge, in der Bursa fabricius und im Gehirn nachgewiesen werden. In Enten scheint der Erreger eine Pathogenität zu besitzen. Richter et al. (2010) fanden eine durch *T. gallinarum* verursachte Typhlohepatitis bei drei Enten-Arten. Diese wurden in einem Zoo gehalten. Eine Pute, die ebenfalls in diesem Zoo an Histomonose gestorben war, war zusätzlich mit *T. gallinarum* infiziert. Die gefundenen Stämme von *T. gallinarum* waren

allerdings für die Pute nicht pathogen. Sowohl in Straussen (*S. camelus*) als auch in Nandus (*R. americana*) gelang der Nachweis von *T. gallinarum* (Ponce Gordo et al., 2002).

Norton (1997) infizierte Hühner und Puten mit *T. gallinarum*-Emulsionen, die er aus den Blinddärmen infizierter Puten gewann. Die Blinddärme sowohl der Hühner als auch der Puten waren vergrößert und wiesen eine generalisierte Enteritis mit einer verdickten Mukosa auf. Das Lumen war mit einem gelben, schaumig-flüssigem Inhalt angefüllt. Auf der Mukosa der Blinddärme fanden sich kleine Papulae. Histologisch konnte gezeigt werden, dass die Läsionen in der Lamina propria lokalisiert waren. Diese war mit Lymphozyten und vereinzelten heterophilen Granulozyten durchsetzt.

Als weiteres Ergebnis seiner Arbeit gibt Norton (1997) zu bedenken, dass die dokumentierten pathologischen und histopathologischen Veränderungen möglicherweise auch auf das Vorhandensein von Bakterien oder anderen nicht nachgewiesenen Pathogenen in der Infektionsemulsion zurückzuführen sind. Obwohl *T. gallinarum* offensichtlich bei der Pathogenese der gefundenen Läsionen beteiligt ist, kann eine endgültige Pathogenität des Erregers nicht definitiv angenommen werden (Norton, 1997).

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

3.1.1.1 Präparation der DNA und RNA

Material/Gerät	**Firma**
Automatisches Extraktionsgerät QIAcube®	Qiagen GmbH, Hilden
Biophotometer	Eppendorf, AG, Hamburg
Einmalpipettenspitzen Safeseal-Tips® Premium 10, 20, 100 und 1000 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf
Fixvolumen-Pipetten	Abimed, Langenfeld
Lamina HeraSafe	Heraeus, Hanau
Oligotex mRNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Probengefäße CB für QIAcube®, 2 ml	Qiagen GmbH, Hilden
ProtoScript® M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit	New England Biolabs GmbH
QIAamp® DNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAamp® RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Reagenzgefäße für QIAcube®, 30 ml	Qiagen GmbH, Hilden
Reagenzgefäßehalterung für QIAcube®	Qiagen GmbH, Hilden
RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden
RNeasy® Plus Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Rotoradaptoren für QIAcube®	Qiagen GmbH, Hilden
Rotoradaptorenhalterung für QIAcube®	Qiagen GmbH, Hilden
Schüttelbad Typ 1083	GFL, Burgwedel
Standard Safe-Lock-Zentrifugengefäße, 1,5 und 2 ml	Eppendorf, AG, Hamburg
Standard Safe-Seal-Zentrifugengefäße, 1,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Tissue Lyser	Qiagen GmbH, Hilden
Vortex-GenieTM	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Zentrifuge Typ 5417R	Eppendorf, AG, Hamburg
Zentrifuge Typ 5424R	Eppendorf, AG, Hamburg

3.1.1.2 PCRs und Gelelektrophorese

Material/Gerät	**Firma**
1 kbp-DNA Ladder	LifetechnologiesTM Gibco Brl, Galthersburg, USA
100 bp-DNA Ladder	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
DNA Engine® Peltier Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Einmalpipettenspitzen Safeseal-Tips® Premium 10, 20, 100 und 1000 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf
Elektrophoresekammer Horizon®	LifetechnologiesTM Gibco Brl, Galthersburg, USA
Fixvolumen-Pipetten	Abimed, Langenfeld
Flex Cycler	Analytic Jena
Geldokumentationssystem Bio Hood II	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
iCycler iQTM	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
iQTM SYBR® Green Supermix	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Küvetten	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Lamina HeraSafe	Heraeus, Hanau
Primer	Carl Roth, Karlsruhe
PuReTaqTM Ready-To-Go PCR-Beads	GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont, UK
QIAamp® MinElute® Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Reaktionsgefäße 0,2 ml, dünnwandig	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Reaktionsgefäße 0,5 ml, dünnwandig	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Seakem® LE Agarose	Biozym, Hessissch Oldendorf
SsoFastTM EvaGreen® Supermix	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Stratagene® MRX 2000	
Zentrifuge Typ 5417R	Eppendorf, AG, Hamburg

3.1.1.3 Klonierung und Plasmid-Präparation

Material/Gerät	**Firma**
Agar	LifetechnologiesTM Gibco Brl, Galthersburg, USA
Biopur-Zentrifugengefäße, 0,5 ml	Eppendorf, AG, Hamburg
Bühler-Schüttelinkubator	J. Otto GmbH, Hechingen
Einmalpipettenspitzen Safeseal-Tips® Premium 10, 20, 100 und 1000 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf

Fixvolumen-Pipetten	Abimed, Langenfeld
Hefeextrakt	Difco, Michigan, USA
Lamina HeraSafe	Heraeus, Hanau
Pipettierhilfen (Akkuboys)	Integra Bioscience, Fernwald
Promega pGEM®-T Vektor System II	Promega Corporation, Madison, USA
Standard Safe-Lock-Zentrifugengefäße (1,5; 2ml)	Eppendorf, AG, Hamburg
Thermoblock Thermostat 5320	Eppendorf, AG, Hamburg
Vortex-GenieTM	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Zentrifuge Typ 5417R	Eppendorf, AG, Hamburg

3.1.1.4 Kultivierung der Histomonaden

Material/Gerät	**Firma**
Anaerobentopf	BD, Heidelberg
Anaerocult® A	Merck, Darmstadt
Anaerotest®	Merck, Darmstadt
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Brutschrank	Labotect Inkubator
Cryo Pure Gefäße 1,6 ml, gelb	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
Einmalpipettenspitzen Safeseal-Tips® Premium 10, 20, 100 und 1000 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf
Fuchs-Rosenthal Zählkammer	Hecht-Assistent, Sondheim
Glaspipetten 5, 10 und 25 ml	Hirschmann, Pliezhausen
Isopropylalkohol	Merck, Darmstadt
Lichtmikroskop, Type DM/LS 11/98	Wetzlar GmbH, Bensheim
M199 mit Hanks Salzen	Biochrom AG, Berlin
Mikroskop	Leica DMLS
Nalgene Cryo Freezing Container	Thermo Fisher Scientific., Roskilde, Dänemark
Pferde Serum	Biochrom AG, Berlin
pH-Meter	Schott Geräte GmbH, Mainz
Pipettierhilfen (Akkuboys)	Integra Bioscience, Fernwald
Präzisionswaage	Sartorius Analytik, Berlin
Reismehl	Reformhaus
Zellkultur-Flaschen (25cm^2)	TPP, Deutschland

3.1.3 Verwendete Puffer und Medien

3.1.3.1 PCR und Gelelektrophorese

Größenmarker 1 kbp

1 kbp-DNA-Ladder (1 µg DNA/µl)	30 µl
Probenladepuffer	50 µl
Aqua bidest.	200 µl

Größenmarker 100 bp

100 bp-DNA-Ladder (0,5 µg DNA/µl)	30 µl
Probenladepuffer	30 µl
Aqua bidest.	185 µl

Probenladepuffer

Bromphenolblau	0,25 ml
Xylencyanol	0,25 ml
Glycerin	30 ml
TBE-Puffer (4x)	ad 100 ml

TBE-Puffer (Tris-Borat-Elektrophoresepuffer), pH 7,5

Tris	89 mM
Borsäure	89 mM
EDTA Dinatriumsalz	2 mM

3.1.3.2 Klonierung und Plasmidpräparation

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)

Trypton	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	10 g/L

Flüssiges LB-Ampicillin-Medium

LB-Medium	
Ampicillin	50 µg/ml

LB-Platten

LB-Medium	1000 ml
Agar	15 g
Ampicillin	50 µg/ml
15 ml/Platte	

Lysispuffer

NaOH (1 M)	4 ml
SDS (10 %)	2 ml
Aqua bidest.	ad 20 ml

Neutralisationspuffer

Kaliumazetat	29,4 g
Eisessig	11,5 ml
Aqua bidest.	ad 100 ml

Salz-optimiertes Medium (Salt Optimized Broth, SOB-Medium)

Trypton	6 g
Hefe	1,5 g
NaCl (5 M)	600 µl
KCl (1 M)	750 µl
Aqua bidest.	ad 300 ml
autoklavieren: 15 Minuten, 121 °C	
$MgCl_2/MgSO_4$ (1 M)	1 % (V/V)

Resuspensionspuffer

Tris-HCl (1M)	2,5 ml
EDTA (0,5 M)	2 ml
Glukose (2 M)	2,5 ml
Aqua bidest.	ad 100 ml
Sterilfiltrieren	

Salz-optimiertes Medium mit Glukose (Salt Optimized + Carbon, SOC-Medium)

SOB-Medium	
Glukose (2 M)	1 % (V/V)

3.1.3.3 Kultivierung von Histomonaden

PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Phosphate Buffered Saline), pH 7,2

NaCl	8 g bzw. 5 g
KCl	0,2 g
Na_2HPO_4	1,44 g
KH_2PO_4	0,24 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Modifiziertes M199 (Dwyers Medium)

M199 mit Hanks Salzen	
Inaktiviertes Pferdeserum	10 %
Reismehl	2 g/L

3.1.4 Verwendete Software und Internetprogramme

Software	**Firma, Webseite, Version**
Adobe Photo Shop	Version 7.0.1
Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)-Funktion	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/ (McGinnis und Madden, 2004)
Codon Code Aligner	Demo Mode; Version 2.0.6
MxPro QPCR Software	http://www.genomics.agilent.com
Primer3	http://frodo.wi.mit.edu/primer3/ (Rozen und Skaletsky, 2000)
Quantity One®	Bio-Rad Laboratories GmbH, München; Version 4.6.1
REST2009	http://www.rest.de.com; Version 1 (Pfaffl et al., 2002)
CLUSTAL W	http://www.clustal.org/ (Thompson et al., 1994)

3.1.5 Histomonaden-Probenmaterial

3.1.5.1 Probenmaterial zur Untersuchung von Feldproben und zur Genotypisierung

Alle Proben, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, wurden an das Institut für Geflügelkrankheiten der Freien Universität Berlin zur Überprüfung des Verdachts auf Histomonose gesendet. Die Proben wurden meist von den betreuenden Tierärzten der Geflügelbestände eingesendet. In die Untersuchungen flossen Proben aus den Jahren 2004 bis 2010 ein.

3.1.5.2 Histomonadenstämme für Untersuchungen zum Kohlenhydratstoffwechsel

Die Stämme GB 542/04 und GB 551/04 wurden im Jahr 2004 isoliert und lagen in der Stammsammlung des Institutes für Geflügelkrankheiten der Freien Universität Berlin vor. Für das Anlegen der monoklonalen Kulturen wurde der Stamm GB 1169/09 aus einem akut aufgetretenen Fall von Histomonose bei Puten verwendet.

3.2 Angewandte Methoden

3.2.1 Angewandte Methoden zu Untersuchungen von Feldproben und zur Genotypisierung

3.2.1.1 Extraktion der DNA

Aus den jeweiligen Proben wurde die DNA mit dem DNA Mini Kit extrahiert. Die Präparationen wurden entweder manuell oder mittels des QIAcubes von QIAGEN durchgeführt.

3.2.1.1.1 Extraktion aus Organen und Invertebraten

Eingesetzt wurden 25 mg Organ, welche von den entsprechenden Organproben unter der Sterilbank mit einer Schere steril entnommen wurden. Bei eingesendeten Invertebraten wurden einige Tiere ebenfalls unter der Sterilbank mit einer Schere zerkleinert. Das Material wurde mit 180 µl Puffer ATL in 2 ml Eppendorfgefäße gegeben. Im Falle der Invertebraten wurden diese zusammen mit einem Stahlkügelchen und 180 µl Puffer ATL im Tissue Lyser bei einer Frequenz von 20 s^{-1} für zwei mal 20 s zerkleinert. Sowohl das Organmaterial als auch die zerkleinerten Invertebraten wurden nach Zugabe von 20 µl Proteinase K über Nacht im Schüttelbad bei 56 °C weiter lysiert.

Am nächsten Tag wurden 200 µl Puffer AL hinzugegeben. Nach 15 s vortexen auf Stufe 6 erfolgte eine Inkubation im Wasserbad bei 70 °C für 10 min. Zur DNA wurden 200 µl EtOH abs. hinzugefügt. Nach Mischung durch vortexen und anzentrifugieren wurde das gesamte Material auf eine QIAamp Mini Spin-Säule gegeben. Anschließend wurde 1 min mit 10.000 rpm (Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)) bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Säule wurde auf ein neues Abfallgefäß gegeben.

Zum Waschen der Säule wurden 500 µl Puffer AW1 verwendet. Nach 1 min Zentrifugation mit 10.000 rpm bei Raumtemperatur wurde die Säule auf ein neues Abfallgefäß gegeben. Ein zweiter Waschvorgang mit 500 µl Puffer AW2 schloß sich an. Diesmal wurde 3 min bei 14.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Die Säule wurde auf ein steriles 1,5 ml Eppendorfgefäß gesetzt. Die Elution der an die Säulenmembran gebundenen DNA geschah mit 200 µl Puffer AE. Nach dessen Zugabe wurde 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 1 min bei 8.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Neben der beschriebenen manuellen Extraktion erfolgte die DNA-Extraktion auch automoatisch mittels QIAcube. Dieser führte die einzelnen Schritte in analoger Weise aus.

Alle Schritte, bei denen Puffer oder EtOH verwendet wurden, wurden unter einer Sterilbank bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.2.1.1.2 Extraktion aus Tupfern und Kulturmaterial

Tupfer wurden in 400 µl PBS aufgenommen, wobei für die DNA-Extraktion 200 µl zum Einsatz kamen. Sollte DNA aus Histomonaden-Kulturen extrahiert werden, wurden 200 µl Kulturmaterial eingesetzt. Danach wurden 200 µl Puffer AL sowie 20 µl Proteinase K hinzugegeben und 15 s gevortext. Nach einstündiger Inkubation bei 56 °C im Schüttelbad und 10 min bei 70 °C im Wasserbad wurde verfahren wie unter 3.2.1.1.1 beschrieben.

Eine Abweichung zum oben genannten Protokoll fand bei der Elution der DNA statt, bei der hier nur 100 µl Puffer AE eingesetzt wurden.

3.2.1.1.3 Bestimmung des DNA-Gehaltes

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die optische Dichte der extrahierten DNA gegen Aqua. dest. als Leerwert im Biophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Dabei wurde die DNA 1:50 verdünnt. Der Gehalt wurde in ng/µl angegeben.

Die gewonnene DNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.2.1.2 PCRs

Bei allen beschriebenen PCRs erfolgte die Zugabe der mRNA, DNA bzw. cDNA zur Vermeidung von Kontaminationen in einem separaten Raum.

Alle Schritte wurden unter einer Sterilbank auf Eis durchgeführt.

3.2.1.2.1 Zur Diagnostik eingesetzte Real Time-PCR (quantitative PCR, qPCR)

Am Institut für Geflügelkrankheiten der Freien Universität Berlin wurde zur Abklärung des Verdachts auf Histomonose ein Teil des rRNA-Gens mittels Real-Time-PCR (qPCR) nachgewiesen (Hafez et al., 2005). Dafür wurden die in Tabelle 1 angegebenen Primer verwendet, die ein Amplikon von 122 bp erzeugen:

Tabelle 1: Namen, Orientierungen und Sequenzen der in der Diagnostik-qPCR eingesetzten Primer

Name Primer	**Orientierung**	**Sequenz**
qHf	vorwärts	5´-tgg aat tct atc gat caa ggg-3´
qHr	rückwärts	5´-tct cta agg tcc tac ttc taa aat-3´

Eingesetzt wurden 300 bis 500 ng DNA sowie jeweils 12,5 pmol Primer qHf und qHr, die zu 12,5 µl iQTM SYBR® Green Supermix hinzugegeben werden. Durch Zugabe von nukleasefreiem Wasser wurde ein Volumen von 25 µl erreicht.

Das Temperaturprofil der qPCR ist Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Temperaturprofil der Diagnostik-qPCR

	Temperatur	**Zeit**
Anfängliche Denaturierung	95 °C	15 min
Denaturierung	95 °C	30 s
Annealing	57 °C	30 s
Elongation	72 °C	30 s
40 Zyklen Denaturierung, Annealing, Elongation		

Während der Elongationsphase wurde die Fluoreszens gemessen. Eine Schmelzkurven-Analyse mit einer Starttemperatur von 60 °C, die in 0,5 °C-Schritten auf 95 °C ansteigt, schloss sich an die PCR an.

Für die qPCR werden der Stratagene®-Cycler mit der Software MxPro bzw. der iCycler von Bio-Rad mit dazugehöriger Software verwendet.

3.2.1.2.2 PCR für das C-Profiling

Die Primer HmDiff2F und HmDiff2R (Tabelle 3) wurden basierend auf der LSU-Sequenz (Accession-Nummer HM 185490) mittels Primer3 in für *H. meleagridis* spezifischen Regionen entworfen. Das Amplikon von 438 Basenpaaren umfasste Teile des 18S-Gens, die ITS1-Region, das 5,8S-Gen, die ITS2-Region sowie Teile des LSU-Gens.

Tabelle 3: Namen, Orientierungen, Sequenzen und Positionen (mit Angabe der Nukleotide) der entwickelten Primer

Name	Orientierung	Sequenz	Genbereich
HmDiffF2	vorwärts	5´-ggt gaa atc att gga ttt tt-3´	1497-1516
HmDiffR2	rückwärts	5´-ttc agc ggg ttt tcc tat-3´	1918-1935

Die PCR erfolgte in einem 50 µl-Ansatz. Zu 20 pmol Primermix HmDiffF2 und HmDiffR2 kamen 2 µl DNA. Aufgefüllt wurde mit nukleasefreiem Wasser auf 50 µl. Verwendet wurden Ready-To-GoTM PCR Beads. In einem Bead sind 10 mM Tris HCl (pH-Wert 9), 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, Stabilisatoren (inklusive bovinem Serumalbumin), 200 µM je dNTP sowie 1,5 Einheiten Taq-DNA-Polymerase enthalten.

Das Temperaturprofil der PCR ist in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Temperaturprofil für die C-Profiling PCR

	Temperatur	Zeit
Anfängliche Denaturierung	95 °C	5 min
Denaturierung	94 °C	1 min
Annealing	60 °C	1 min
Elongation	72 °C	30 sek
35 Zyklen Denaturierung, Annealing, Elongation		

Für die PCR wurden die Thermocycler DNA Engine® Peltier Thermal Cycler oder der Flex Cycler verwendet.

3.2.1.2.3 PCRs zur Untersuchung auf *Blastocystis* spp. und *Tetratrichomonas gallinarum*

Die Primer für die PCRs, mit denen Teile des SSU-Gens der beiden Erreger nachgewiesen werden (Tabelle 5), stammen aus der Arbeit von Grabensteiner und Hess (2006). Das Primerpaar Blf und Blr produziert ein 459 Basenpaare großes Amplikon. Das zu dem Primerpaar Tgf und Tgr zugehörige Amplikon ist mit 526 Basenpaaren deutlich größer.

Tabelle 5: Namen, Orientierungen und Sequenzen der für den Nachweis von *Blastocystis* spp. und *Tetratrichomonas gallinarum* eingesetzten Primer

Name Primer	**Orientierung**	**Sequenz**
Blf	vorwärts	5´-taa ccg tag taa ttc tag ggc-3´
Blr	rückwärts	5´-aac gtt aat ata cgc tat tgg-3´
Tgf	vorwärts	5´-gca att gtt tct cca gaa gtg-3´
Tgr	rückwärts	5´-gat ggc tct ctt tga gct tg-3´

Für die PCRs wurden Ready-To-Go-Beads verwendet. Von jedem Primerpaar wurden jeweils 10 pmol eingesetzt. Von der DNA kamen 1 µl zur Anwendung. Mit nukleasefreiem Wasser wurde ein Reaktionsvolumen von 25 µl erreicht.

Die PCRs erfolgten nach dem in Tabelle 6 dargestellten Temperaturprofil.

Tabelle 6: Temperaturprofil für die PCRs zum Nachweis von *Blastocystis* spp. und *Tetratrichomonas gallinarum*

	Temperatur	**Zeit**
Anfängliche Denaturierung	94 °C	5 min
Denaturierung	94 °C	30 s
Annealing	60 °C	30 s
Elongation	72 °C	30 s
39 Zyklen Denaturierung, Annealing, Elongation		

Für die PCRs wurden die Thermocycler wie unter 3.2.1.2.2 beschrieben, verwendet.

3.2.1.2.4 Gel-Elektrophorese

Die PCR-Produkte aus 3.2.1.2.2 und 3.2.1.2.3 wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese ausgewertet. Zur Herstellung des Gels wurden 100 ml des Puffers TBE mit 1,2 % Agarose aufgekocht. Als Fluoreszensfarbstoff wurden 2 µl verdünnte Ethidiumbromidlösung hinzugegeben. Für die Elektrophorese wurde TBE als Laufpuffer verwendet. Nach Erstarrung des Geles in einem Gelträger und der Entfernung des Kammes mit 15 oder 20 Probentaschen wurden 5 µl PCR-Produkt vermischt mit 1 µl Probenladepuffer in die Taschen pipettiert. Als Größenstandard kamen 8 µl eines 100 bp-Größenmarkers zum Einsatz. Eine Spannung von 70-80 Volt wurden angelegt. Nach 1-1,5 Stunden wurde das Gel entnommen und die Amplifikat-Banden unter UV-Licht mittels der Bio Hood II und der Quantity One®-Software dargestellt.

3.2.1.3 Direkte Aufreinigung von PCR-Produkten für Sequenzierungen

Alle Proben, die sich in der Diff-PCR als positiv darstellten, wurden sequenziert. Dazu fand eine direkte Aufreinigung der PCR-Produkte mittels des MicroElute Cycle-Pure Spin Kits statt. Zu den verbliebenen 45 µl PCR-Produkt wurden 230 µl CP-Puffer hinzugegeben und nach Durchmischung auf eine Säule pipettiert. Anschließend wurde bei 10.000 g 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen und die Säule zweimal mit je 700 µl DNA-Wasch-Puffer gewaschen. Nach jedem Wasch-Vorgang erfolgte eine Zentrifugation (10.000 g, 1 min, Raumtemperatur). An diese schlossen sich zwei weitere mit je 14.000 g an, um die Säule optimal zu trocknen. Für die Elution der DNA aus dem Säulenmaterial wurden 15 µl Elutions-Puffer aufgetragen und anschließend – nach einer einminütigen Inkubation bei Raumtemperatur – ebenfalls bei 14.000 g 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Der Erfolg der direkten Aufreinigung wurde überprüft, indem 1 µl des aufgereinigten PCR-Produktes in einer Gelelektrophorese (vergleiche 3.2.1.2.4) eingesetzt wurde.

3.2.1.4 Erstellung der C-Profile

Zu 11-12 µl HmDiff-PCR-Produkt wurden 4 µl des Primers HmDiffF2 (5 pmol) hinzupipettiert. Für die Sequenzierungen wurde dieses Gemisch an das Labor LGC in Berlin geschickt. Die erhaltenen Fluorogramme aus der Sequenzierung wurden mit der Software Codon Code Aligner bearbeitet und die C-Profile erstellt. Dazu war es notwendig, innerhalb des Fluorogramms die ITS1-Region zu bestimmen. Als Vergleichsstandard diente hier das Fluorogramm des Stammes GB 542/04. Eine Abgrenzung war in den meisten Fällen eindeutig. Wo keine 100 %ige Übereinstimmung mit der Vergleichssequenz vorlag, wurde

anhand der Nukleotidposition und der weitestgehenden Übereinstimmungen vieler Basen in diesem Bereich die Grenzen der ITS1-Region bestimmt. Aus dem Fluorogramm wurden die davor bzw. dahinter liegenden Bereiche gelöscht und die Fluorogramme der ITS1-Region durch Entfernen der Basen Adenin, Guanin und Thymin auf die Base Cytosin reduziert.

3.2.1.5 Anlegen monoklonaler Kulturen

3.2.1.5.1 Ausgangsmaterial

Ausgangskultur für die monoklonalen Kulturen war der Stamm GB 1169/09. Dieser stammte aus einem Histomonose-Ausbruch in einer deutschen Putenfarm. Von frisch verendeten Tieren wurden Leber- und Blinddarmproben gewonnen und in vorgewärmtes Kulturmedium verbracht. Nach 24 stündiger Bebrütung bei 40 °C wurden die Kulturen passagiert und nach drei Tagen erneut das Wachstum kontrolliert. Die Bestätigung, ob es sich bei den mikroskopisch festgestellten Erregern um *H. meleagridis* handelte, erfolgte mittels Diagnostik-qPCR.

3.2.1.5.2 Mikromanipulation

Vor Entnahme der Zelle musste das Medium, in welchem diese zum Wachstum verbracht wurde, vorbereitet werden. Dazu wurde mit einer Impföse Material aus der Ausgangskultur auf Blutagar ausgebracht. Nach 24-stündiger Bebrütung bei 40 °C wurden wiederum mit einer Impföse mehrere Bakterienkulturen von der Blutplatte entnommen und in Zellkulturflaschen mit 10 ml M199 sowie 2 g/L Reis 24 Stunden bei 40 °C bebrütet.

Aus dem Bakterienmedium wurden 100 µl entnommen und in ein Eppendorfgefäss mit 1 ml M199 und 2 g/L Reis verbracht.

Um sicherzustellen, mit der Mikropipette nur eine einzelne Zellen zu gewinnen, wurde die Original-Histomonadenkultur so weit mit M199 verdünnt, dass pro Gesichtsfeld lediglich einige wenige Zellen zu sehen waren.

Mit einer Mikropipette wurde unter dem Mikroskop bei 200facher Vergrößerung eine einzelne Zelle aus der Zellkultur entnommen. Die hier verwendete Mikropipette von HUMAGEN^{TM} hatte einen Durchmesser von 20 mm. Die Spitze war um 35° abgewinkelt und angeschliffen.

Der Mikromanipulator wurde so neben das Mikroskop platziert, dass er sich auf Höhe des Mikroskop-Tisches befand. Die Mikropipette wurde mit einem dünnen Schlauch mit einer 1ml Spritze am Ende verbunden.

Als Vorbereitung für die Entnahme der Zelle wurde die Spitze der Mikropipette in die Mitte des Gesichtsfelds gebracht. Auf einem Objektträger mit verdünnter Histomonaden-Kultur wurde eine geeignete Zelle ausgewählt und mithilfe des Mikroskoptisches in die Mitte des Gesichtsfeldes verschoben. Sodann wurde die Mikropipette sehr behutsam nach unten gedrückt, bis die Spitze und die Zelle direkt nebeneinander lagen, was an einer einheitlichen Schärfe beider zu erkennen war. In der Mehrzahl reichten die Kapillarkräfte aus, um die Zelle in die Mikropipette zu saugen. War dies nicht der Fall, wurde die angeschlossene Spritze zur Hilfe genommen. Der Objektträger wurde entfernt und unmittelbar durch einen mit vorbereitetem Medium ersetzt. Unter Sichtkontrolle wurde die Zelle unter Zuhilfenahme der Spritze aus der Mikropipette entlassen. Der Tropfen Medium mit der einzelnen Histomonaden-Zelle wurde mit einer 100 µl-Pipette in das vorbereitete Eppendorfgefäss gebracht.

Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 40 °C bebrütet. Nach drei Tagen fand eine Wachstumskontrolle statt.

Für eine Negativ-Kontrolle wurde aus der verdünnten Histomonaden-Kultur lediglich Kulturmaterial entnommen.

3.2.1.6 Untersuchung monoklonaler Kulturen

10 monoklonale Kulturen wurden, wie unter 3.2.1.4 beschrieben, mittels C-Profiling genotypisiert.

Für Sequenzuntersuchungen wurden PCR-Produkte von monoklonalen Kulturen nach der Gelreinigung (3.2.1.6.1) kloniert (3.2.1.6.2).

3.2.1.6.1 Gelreinigung

Zur Aufreinigung für die anschließende Klonierung (3.2.1.6.2) wurde die entsprechende Bande unter UV-Licht mit einer sterilen Skalpellklinge aus dem Gel ausgeschnitten und sodann gewogen. Sie wurde zusammen mit 3 Volumenanteilen des Puffers QG in ein 2 ml Eppendorfgefäß gegeben. Der Ansatz wurde 10 min bei 50 °C inkubiert, wobei alle 2 bis 3 min gevortext wurde. Danach wurde ein Gelvolumen Isopropanol hinzugegeben und per Hand geschwenkt. Alles wurde auf eine gekühlte MinElute Säule gegeben und bei 14.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen und auf die Säule wurden 500 µl Puffer GQ gegeben. Anschließend wurde für 1 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses wurden 700 µl Puffer PE auf die Säule gegeben. Nach einer Inkubation von 2 bis 3 min bei Raumtemperatur wurde zweimal bei

jeweils 14.000 rpm für 1min zentrifugiert. Die Säule wurde auf ein 1,5 ml Eppendorfgefäß verbracht. In die Mitte der Säulenmembran wurden sodann 11 µl Puffer EB gegeben und eine weitere min bei Raumtemperatur inkubiert. Eine Zentrifugation (14.000 rpm, 1 min) schloß sich an.

Der Erfolg der Gelreinigung wurde überprüft, indem 1 µl des aufgereinigten PCR-Produktes in einer Gelelektrophorese (vergleiche 3.2.1.2.4) eingesetzt wurde.

3.2.1.6.2 Klonierung

Für die Klonierung von PCR-Produkten wurde das Promega pGEM®-T Vektor System II verwendet.

3.2.1.6.2.1 Ligation

Das entsprechende PCR-Produkt wurde nach der Gelreinigung (3.2.1.6.1) in den pGEM-T Vektor ligiert. Dafür wurden 3 µl des gelgereinigten PCR-Produktes in ein steriles 0,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben. Des weiteren wurden 5 µl Rapid Ligation Buffer, 1 µl (entspricht 50 ng) des Vektors sowie 1 µl (entspricht 3 Einheiten) T4 DNA-Ligase hinzugegeben. Alle Komponenten wurden vorsichtig miteinander vermischt.

Die Ligation fand über Nacht bei 4 °C statt.

3.2.1.6.2.2 Transformation

Als Vorbereitung wurden Agar-Platten für die transformierten Bakterien hergestellt. In 1000 ml LB-Medium wurden 15 g Agar gelöst. Dieses Gemisch wurde bei 121 °C für 15 min autoklaviert. Wurde das Medium nicht sofort verwendet, wurde es nach Verfestigung bei 4 °C gelagert. Nach Verflüssigung durch Erwärmen wurden 50 µg/ml Ampicillin hinzugegeben und 15 ml des Mediums in Petrischalen gegossen. Die Platten konnten so bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert werden.

Aus dem Ligations-Ansatz wurden 2 µl in ein steriles Eppendorfgefäß verbracht. Dazu wurden 50 µl der auf Eis aufgetauten JM 109 High Efficiency Kompetenten Zellen gegeben. Nach vorsichtigem Mischen durch Antippen wurde das Gemisch 20 min auf Eis gestellt. Sodann erfolgte ein Hitzeschock für 45-50 s bei 42 °C. Eine sofortige Abkühlung auf Eis für 2 min schloß sich an. 950 µl des auf Raumtemperatur gebrachten SOC-Mediums wurden hinzugegeben. Anschließend wurde das Gemisch für 90 min bei 150 rpm und 37 °C im Bühler-Schüttelinkubator bebrütet.

Zeitgleich wurden die vorbereiteten Platten auf Raumtemperatur gebracht. Mit einem sterilen Drigalskispatel wurden 20 µl X-Gal und 100 µl IPTG auf jeder Platte verteilt. Die Platten wurden 30 min bei 37 °C äquilibriert.

Von den transformierten Bakterien wurden 100 µl auf die Platte gebracht und mit einem sterilen Drigalskispatel gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C bebrütet.

3.2.1.6.2.3 Beurteilung des Klonierungerfolges und Auswahl der Kolonien für die Plasmid-DNA-Präparation

Ein Gen des in die Bakterienzelle eingeschleusten Plasmids kodiert für eine Ampicillin-Resistenz. Somit waren nur solche Bakterien in der Lage auf der Platte mit Ampicillin zu wachsen, bei denen die Transformation erfolgreich war. Die Entscheidung, ob auch die Aufnahme des entsprechenden Inserts in das Plasmid erfolgreich war, geschah anhand der Koloniefarbe. Das auf die Platten gegebene IPTG bindet an den Lac-Repressor, welcher im nativen Zustand das Strukturgen LacZ hemmt. LacZ kodiert für das Enzym β-Galaktosidase, welches Laktose in Galaktose und Glukose spaltet. Durch IPTG wird diese Hemmung aufgehoben und die β-Galaktosidase kann durch das LacZ-Fragment aktiviert werden. Es erfolgt ein Abbau des X-Gal zu einem blauen Produkt. Da die Insertionsstelle in dem LacZ-Bereich liegt, liegt bei einer Ligation mit einer Insertion kein zusammenhängendes LacZ vor. Die β-Galaktosidase kann nicht mehr aktiviert werden und der Abbau des X-Gal unterbleibt, was an der weißen Koloniefarbe zu erkennen ist.

3.2.1.6.2.4 Präparation der Plasmid-DNA (Mini-Präparation)

Von den Platten wurden mehrere weiße Kolonien mit einem Zahnstocher gepickt und einzeln in 2 ml flüssiges LB-Ampicillin-Medium gegeben. Die Kolonien wurden über Nacht im Schüttelinkubator bei 37 °C bei 300 U/min bebrütet.

1,5 ml der Übernacht-Kultur wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben. Anschließend wurde bei 8.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl Resuspensionspuffer aufgenommen. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 µl Lysispuffer hinzugegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurde 4 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 150 µl Neutralisationspuffer hinzugefügt und nach kurzem Vortexen erneut 4 min auf Eis inkubiert. Es schloß sich eine Zentrifugation von 10 min bei 14.000 rpm an. Der Überstand wurde zu 1000 µl EtOH abs. in

einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben und vorsichtig gemischt. Eine Inkubation von mindestens 30 min bei -20 °C schloß sich an.

Erneut wurde bei 14.000 rpm 10 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden 200 µl 70 % EtOH hinzugegeben und 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde nach Verwerfen des Überstandes 7 min im Wärmeblock bei 37 °C getrocknet. Währenddessen wurde RNase A (1 mg/ml) 1:100 mit Aqua dest. steril verdünnt. 50 µl wurden zu dem Pellet hinzugegeben und weitere 40 min im Wärmeblock bei 37 °C inkubiert.

3.2.1.6.2.5 Überprüfung des Präparationserfolges und Sequenzierung

Die Überprüfung der Insertaufnahme geschah mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.2.1.2.4). 1 µl der präparierten Plasmid-DNA wurden mit 1 µl Probenladepuffer in die Taschen eines 0,5 %igen Gels mit 2 µl Ethidiombromid gegeben. Größenmarker war ein 1 kbp-Größenmarker. Als Vergleich diente reine Plasmid-DNA ohne ein Insert.

15 µl Plasmid-DNA vermischt mit 15 µl PCR-Wasser wurden für die Sequenzierung mit den Standardprimern SP6 oder T7-Prom an das Sequenzierungslabor LGC in Berlin geschickt. Die erhaltenen Sequenzen wurden anschließend jeweils mit BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) auf Homologien untersucht.

3.2.2 Angewandte Methoden zu Untersuchungen zum Kohlenhydratstoffwechsel

3.2.2.1 Kultivierung von H. meleagridis

3.2.2.1.1 Kulturbedingungen

Die Kultivierung der Histomonaden erfolgte in Zellkulturflaschen ohne Filterdeckel. Alle verwendeten Stämme wurden in M199 zusammen mit 10 % inaktiviertem Pferdeserum und 2 g/L Reismehl kultiviert und passagiert. Für die Versuche zur Eignung verschiedener Kohlenhydratquellen wurde statt M199 PBS mit 5 bzw. 8 g / L NaCl verwendet. Auch hier wurden 10 % inaktiviertes Pferdeserum zugefügt. Die Kohlenhydratquelle wurde je nach Versuchsaufbau gewählt.

3.2.2.1.2 Bestimmung der Histomonadenzahl

Um das Wachstum einer Kultur zu ermitteln, wurde die Anzahl der in der entsprechenden Kultur vorhandenen Histomonaden durch Auszählen unter dem Mikroskop bei 200 facher Vergrößerung ermittelt. Dies geschah unter Verwendung einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer.

3.2.2.2 Sequenzierung von Teilen des Alpha-Amylase- und des Glykogenphosphorylase-Gens

Alle Präparationsschritte wurden unter der Sterilbank und, wenn nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Zentrifugation fand bei Raumtemperatur statt.

3.2.2.2.1 Extraktion der Gesamt-RNA

Verwendet wurde hierzu das RNeasy Mini Kit von QIAGEN.

In einem doppelten Ansatz wurden je 2 ml Histomonaden-Kultur in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß gegeben. Nach 10 minütiger Sedimentation des Reismehls bei Raumtemperatur wurde der Überstand 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 350 µl Puffer RLT + 1 % β-Mercaptoethanol durch vortexen resuspendiert. Das resuspendierte Pellet wurde auf eine QIAshreddersäule gegeben. Danach wurde für 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde entfernt und der Durchfluß für 3 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einem Volumen (entspricht 350 µl) 70 % EtOH vermischt und auf eine Rneasy-Säule gegeben. Eine Zentrifugation von 15 s bei 10.000 rpm schloss sich an. Der Durchfluß wurde verworfen und nach Zugabe von 700 µl Puffer RW1 auf die Säule 15 s bei 10.000 rpm zentrifugiert. Wiederum wurde der Durchfluß verworfen und nach Zugabe von 500 µl Puffer RPE erneut für 15 s bei 10.000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, wobei anschließend 2 min bei 10.000 rpm zentrifugiert wurde. Zum Schluss wurde der Durchfluss verworfen.

Zur Elution der RNA wurden 50 µl RNase-freies Wasser in die Mitte der Säule gegeben. Nach einminütiger Zentrifugation bei 10.000 rpm wurde dieser Schritt wiederholt und wiederum 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert.

Die beiden Ansätze wurden gepoolt.

3.2.2.2.2 Extraktion eukaryotischer mRNA

Die Präparation geschah mit dem Oligotex mRNA Mini Kit von QIAGEN.

Als Vorbereitung wurde die Oligotex-Suspension im Wasserbad oder Wärmeblock auf 37 °C erwärmt. Nach vortexen wurde sie bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

Der Puffer OEB wurde im Wasserbad auf 70 °C erhitzt und dort bis zur weiteren Verwendung belassen.

Der 200 µl RNA-Pool aus 3.2.2.2.1 wurde mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 250 µl gebracht. Sodann wurden 250 µl des Puffers OBB sowie 15 µl Oligotex Suspension hinzugegeben und der Ansatz durch vorsichtiges Antippen des Eppendorf-Gefäßes oder durch pipettieren gemischt. Nach einer Inkubation von 3 min bei 70 °C im Wasserbad schloß sich eine 10 minütige Inkubation bei Raumtemperatur an. Es wurde für 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 400 µl Puffer OW2 resuspendiert. Das Gemisch wurde auf eine im Kit vorhandene Säule gegeben. Nach Zentrifugation von 1 min bei 14.000 rpm wurde der Durchfluß verworfen. Dieser Schritt wurde wiederholt und nach der Zentrifugation 50 µl des 70 °C heißen Puffers OEB auf die Säule gegeben. Nach mehrmaligem Durchpipettieren wurde 1 min bei 14.000 rpm zentrifugiert.

Die mRNA wurde bei -80 °C gelagert.

3.2.2.2.3 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Die RT-PCR war für die Entwicklung der Primer des Alpha-Amylase- bzw. Glykogenphosphorylase-Gens, welche in der qPCR mit EvaGreen (3.2.2.3.2) eingesetzt wurden, nötig. Die Primer basieren auf Sequenzen von *T. vaginalis*. Aus Histomonaden-Kulturmaterial wurde mRNA gewonnen (3.2.2.2.2), welche in der hier beschriebenen RT-PCR mit den Primern aus Tabelle 7 zu Sequenzen führte, die Grundlage für die Entwicklung der in Tabelle 9 dargestellten Primer war.

Tabelle 7: Namen, Orientierungen, Sequenzen und Positionen (mit Angabe der Nukleotide) im Referenzgen von *T. vaginalis* der Primer, die bei der Entwicklung der qPCR-Primer eingesetzt wurden. Die Primer amf3 und amr1 liegen im Alpha-Amylase Gen, die Primer GP2f und GP2r im Glykogen-Phosphorylase Gen

Primer	**Orientierung**	**Sequenz**	**Genbereich**
amf3	vorwärts	5´-atc gat ggc tgg aga ctc gat ca-3´	523-545
amr1	rückwärts	5´-gat gag gtt tcc gaa gcg-3´	904-921
GP2f	vorwärts	5´-cac aca ctc atg cca gaa gc-3´	1578-1597
GP2r	rückwärts	5´-tga cac cgt ttg tct tgt tg-3´	1889-1908

Verwendet wurde das OneStep RT-PCR Kit. Zu 5 µl 5x Puffer wurden jeweils 1 µl dNTP-Mix sowie RT-PCR-Enzymemix gegeben. Von den entsprechenden Primerpaaren wurden je 20 pmol eingesetzt. 5 µl mRNA wurde hinzugefügt. Mit nukleasefreiem Wasser wurde auf 25µl aufgefüllt. Das entsprechende Temperaturprofil ist Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8: Temperaturprofil der RT-PCR

	Temperatur	Zeit
Reverse Transkription	50 °C	30 min
Anfängliche Denaturierung	95 °C	15 min
Denaturierung	94 °C	1 min
Annealing	50 °C	1 min
Elongation	72 °C	1 min
35 Zyklen Denaturierung, Annealing, Elongation		

Die verwendeten Thermocycler sind unter 3.2.1.2.2 aufgeführt.

3.2.2.2.4 Klonierung und Sequenzierung der PCR-Produkte

Die mittels RT-PCR erhaltenen Amplifikate (3.2.2.2.3) wurden wie unter 3.2.1.6.2 beschrieben kloniert und anschließend sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen waren Grundlage für die Entwicklung der Primer für die Real Time-PCR mit EVAGreen (Tabelle 9).

3.2.2.3 Untersuchungen zur Genexpression

3.2.2.3.1 Gewinnung der cDNA

Alle Schritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Zentrifugiert wurde bei Raumtemperatur.

3.2.2.3.1.1 Extraktion der Gesamt-RNA

Aus Kulturmaterial wurde mithilfe des RNeasy® Plus Mini Kits von QIAGEN die Gesamt-RNA extrahiert.

Eingesetzt wurden 200 µl Histomonaden-Kultur. Diese wurde 5 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen und das entstandene Pellet in 600 µl Puffer RLT Plus + 1 % β-Mercaptoethanol durch vortexen resuspendiert. Falls keine sofortige Weiterverarbeitung stattfand, wurde das Pellet in Puffer bei -80 °C eingefroren.

Das gesamte Material wurde auf eine QIAshredder-Säule gegeben und 2 min bei 14.000 g zentrifugiert. Der homogenisierte Durchfluß wurde sodann auf eine gDNA-Eliminator-Säule gegeben. Zentrifugiert wurde nach diesem Schritt für 30 s bei 10.000 g. Danach wurde die Säule entfernt und zum Durchfluß 600 µl 70 % EtOH hinzugegeben. Nach gründlichem durchpipettieren wurden 700 µl aus diesem Gemisch entnommen und auf eine RNeasy MinElute-Säule gegeben. Der Rest des Gemisches wurde verworfen. Nach 15 s

zentrifugieren bei 10.000 g wurde der Durchfluß verworfen. Auf eine RNeasy MinElute-Säule aus dem RNase-Free DNase Set von QIAGEN zum DNA-Verdau wurden 350 µl Puffer RW1 gegeben. Anschließend wurde für 15 s bei 10.000 g zentrifugiert und der Durchfluß verworfen. Nach Zugabe von 70 µl des Puffers RDD zusammen mit 10 µl DNase I stock solution wurde die Säule 15 min bei Raumtemperatur unter der Sterilbank inkubiert. Weitere 350 µl Puffer RW1 wurden nach dieser Zeit auf die Säule gegeben und erneut wurde 15 s bei 10.000 g zentrifugiert. Der Durchfluß wurde wiederum verworfen.

Zum Waschen der Membran kamen 500 µl Puffer RPE zum Einsatz. Zentrifugiert wurde bei 10.000 g für 15 s. Der Durchfluß wurde verworfen. Nach erneutem Waschen ebenfalls mit 500 µl Puffer RPE wurde diesmal für 2 min bei 10.000 g zentrifugiert. Auch nach diesem Schritt wurde der Durchfluß verworfen. Zur Elution der RNA wurde die Säule auf ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß verbracht. 40 µl RNase-freies Wasser wurden direkt in die Mitte der Membran gegeben. Danach wurde 1 min bei 10.000 g zentrifugiert.

Der vollständige Verdau der DNA wurde mit der in der Diagnostik eingesetzten qPCR (3.2.1.2.1) überprüft. Diese war im Fall eines erfolgreichen Verdaus negativ.

Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

3.2.2.3.1.2 Reverse Transkription

Die RNA wurde mittels ProtoScript® M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit in cDNA umgeschrieben.

Zu 6 µl RNA wurden 2 µl eines Random Primers mit der Sequenz 5´d(N9)3´, wobei N die vier Basen A, C, G und T bezeichnet, hinzugegeben. Anschließend wurde die RNA für 5 min bei 70 °C denaturiert. Nach Ablauf der Zeit wurde der Mix auf Eis gestellt.

Es wurden 10 µl M-MuLV Reaction Mix sowie 2 µl M-MuLV Enzyme Mix hinzugegeben. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei 25 °C wurde der Reaktions-Mix für 1 Stunde bei 42 °C inkubiert. Danach wurde das Enzym bei 80 °C für 5 min inaktiviert.

Die so gewonnene cDNA wurde mit 30 µl Wasser auf 50 µl verdünnt und bei -20 °C gelagert.

3.2.2.3.2 Real Time-PCR mit EvaGreen

Mittels Real Time-PCR mit dem Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen wurde der Einfluss von Pyruvat auf die Transkription verschiedener, am Kohlenhydratstoffwechsel beteiligter

Enzyme untersucht. Für diese qPCR wurden spezifische Primer entwickelt (Tabelle 9, 4.2.5.1).

Eingesetzt wurden 5 µl cDNA, 10 pmol des entsprechenden Primermixes bestehend aus Vorwärts- und Rückwärts-Primer sowie 10 µl SsoFastTm EvaGreen® Supermix. Nukleasefreies Wasser wurde ad 20 µl hinzugegeben.

Das Temperaturprofil der qPCR ist in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Temperaturprofil für die qPCR mit EvaGreen

	Temperatur	**Zeit**
Anfängliche Denaturierung	95 °C	30 s
Denaturierung	95 °C	5 s
Annealing / Elongation	60 °C	10 s
45 Zyklen Denaturierung, Annealing / Elongation		

Nach Beenden der qPCR wurde eine Schmelzkurve erstellt: Ausgehend von einer Starttemperatur von 65 °C wurde in 0,5 °C-Schritten 10 s pro Schritt bis 95 °C gemessen.

Die qPCR wurde in dem Stratagene®-Cycler mit der Software MxPro durchgeführt.

Die Größe der mit den entsprechenden Primerpaaren in der qPCR gewonnenen Amplifikate, der Genbereich, in dem die Primer liegen sowie der Accessionnummer der Sequenz, auf der sie beruhen, sind ebenfalls Tabelle 9 zu entnehmen. Der atub-Primer liegt in einem nicht veröffentlichen Bereich (Hauck, 2010, persönliche Mitteilung).

Die Expression des Alpha-Amylase-Gens, des Glykogen-Phosphorylase-Gens und des GAPDH-Gens wurde mit REST2009 nach folgender Formel berechnet:
Relative Expression = Konzentration des zu untersuchenden Gens /
geometrisches Mittel der Konzentrationen der Referenzgene.
Die Konzentration ist die Effizienz$^{C}_{T}$.

Tabelle 9: Eigenschaften der Primer für die qPCR

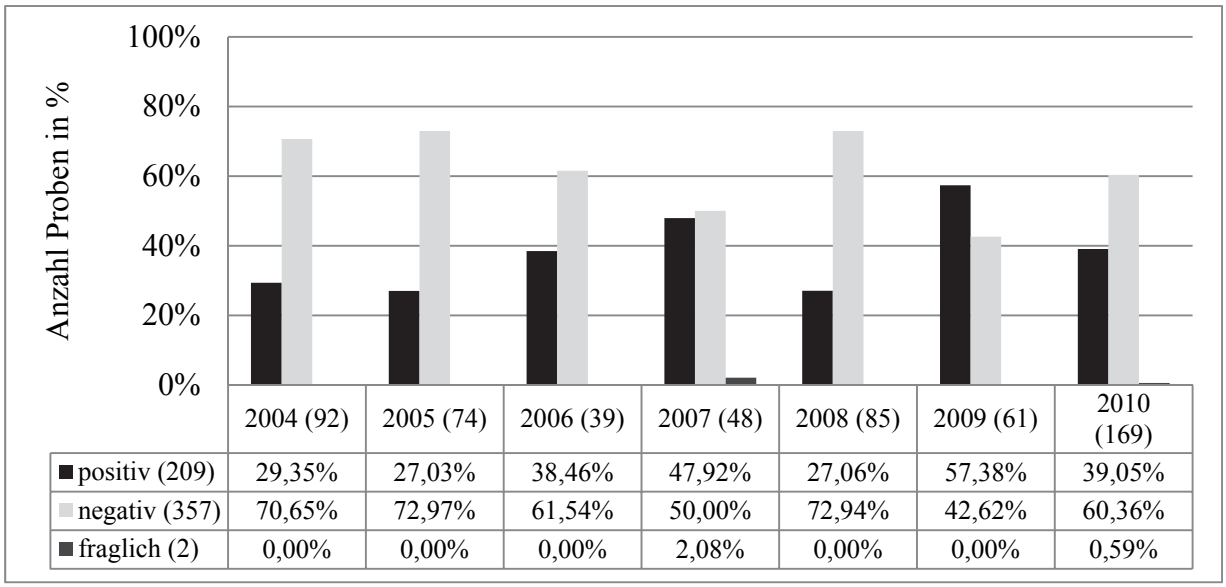
Primer	Gen	Orientierung	Sequenz	Genbereich	Fragment-größe	Accession-nummer
q18S	18S	vorwärts	5´-ctg aag gaa ttg acg gaa gg-3´	190-209	76 Basenpaare	HM229779
		rückwärts	5´-tgg taa gtt tcc ccg tgt tg-3´	246-265		
qatub	Alpha-Tubulin	vorwärts	5´-tcg aaa ggc caa ctt aca cc-3´	nicht veröffentlicht	83 Basenpaare	nicht veröffentlicht
		rückwärts	5´-acc atc gaa acg gag aga tg-3´	nicht veröffentlicht		
qbtub	Beta-Tubulin	vorwärts	5´-caa cac aac cgc att cag ag-3´	1919-1938	112 Basenpaare	FJ624276.1
		rückwärts	5´-atg ttc gat ctc gcc tca tc-3´	2011-2030		
qaam	Alpha-Amylase	vorwärts	5´-ccg cat gtc aac aac gta ag-3´	63-82	134 Basenpaare	JQ178362
		rückwärts	5´-atc aaa ggc aga gcg aag ac-3´	177-196		
qgp2fr	Glykogen-Phosphorylase	vorwärts	5´-agt ggc cag ttc cac ttt tc-3´	9-28	89 Basenpaare	JQ178361
		rückwärts	5´-gcg aac aga atc aag gaa gc-3´	78-97		
qGAPDH	GAPDH	vorwärts	5´-ttc tcg aat cca ccg gta tc-3´	264-283	107 Basenpaare	GQ409853
		rückwärts	5´-aac aac ctt ctt ggc acc ag-3´	351-370		

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zum Vorkommen verschiedener Genotypen

4.1.1 Probenmaterial für das C-Profiling

Die am Institut vorliegenden 568 auf *H. meleagridis* untersuchten Proben stammten aus 252 Ausbrüchen der Jahre 2004 bis 2010. In 116 Fällen wurde der Verdacht der Histomonose bestätigt. Von den 568 Proben waren 209 Proben positiv, 357 Proben negativ und 2 Proben fraglich. Die Verteilung der Proben in den einzelnen Jahren ist in Abbildung 1 dargestellt. In den Jahren 2004, 2005 und 2008 wurden etwa die gleiche Anzahl an Proben eingesendet. Auch das Verhältnis von negativ zu positiv getesteten Proben in diesen Jahren war vergleichbar. Es wurden etwa 2,6 mal so viele Proben negativ getestet als positiv. 2009 war das einzige Jahr, aus dem mehr positive als negative Proben vorlagen. 2006 und 2007 waren die Jahre mit den am wenigsten eingesendeten Proben, wobei die Anzahl in beiden Jahren ähnlich ist. Dahingegen stammte fast ein Drittel des Probenmaterials aus dem Jahre 2010. Auch hier konnte in der Mehrzahl keine Histomonaden-DNA nachgewiesen werden.

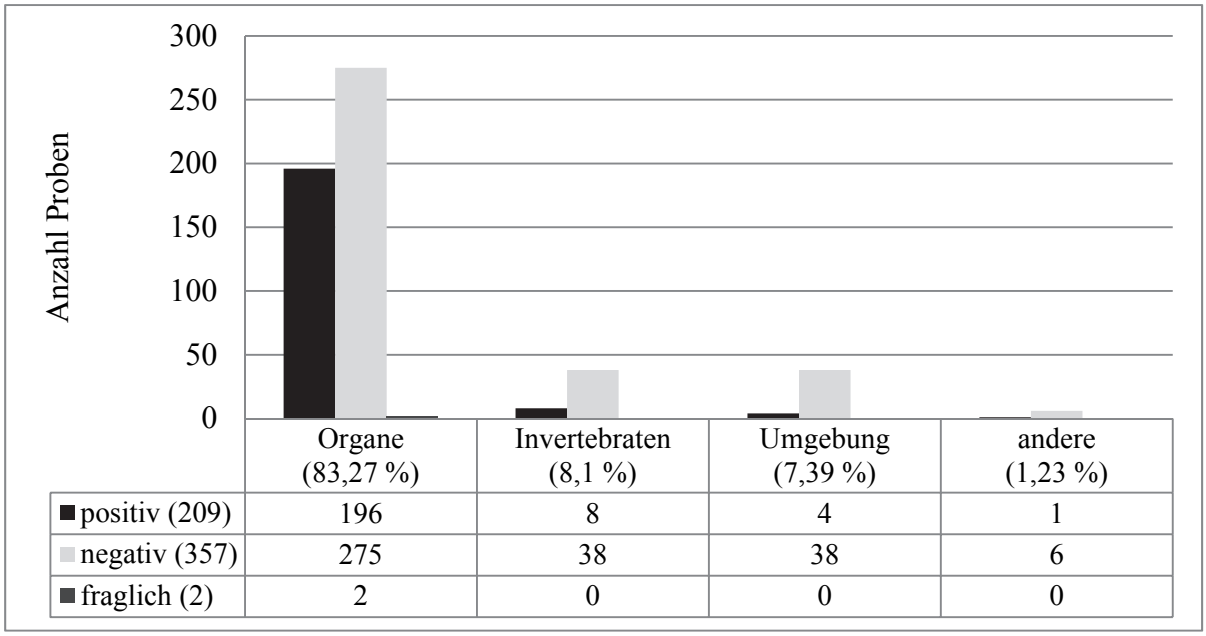


	2004 (92)	2005 (74)	2006 (39)	2007 (48)	2008 (85)	2009 (61)	2010 (169)
positiv (209)	29,35%	27,03%	38,46%	47,92%	27,06%	57,38%	39,05%
negativ (357)	70,65%	72,97%	61,54%	50,00%	72,94%	42,62%	60,36%
fraglich (2)	0,00%	0,00%	0,00%	2,08%	0,00%	0,00%	0,59%

Abbildung 1: Verteilung des ans Institut gesandten Probenmaterials nach Jahren in Prozent und Ergebnis der Untersuchung auf Histomonaden-DNA; Zahlen in Klammern geben absolute Zahlen wieder

Eingesendet wurden Proben unterschiedlicher Art (Abbildung 2). Der überwiegende Teil waren Organproben. Weitaus weniger häufig wurden unterschiedliche Invertebraten, Umgebungsproben, sowie andere Proben, bei denen es sich um Pools aus Invertebraten und

Umgebungsproben handelt, untersucht. In der Mehrzahl der Nicht-Organ Proben konnte jeweils keine Histomonaden-DNA nachgewiesen werden.



	Organe (83,27 %)	Invertebraten (8,1 %)	Umgebung (7,39 %)	andere (1,23 %)
positiv (209)	196	8	4	1
negativ (357)	275	38	38	6
fraglich (2)	2	0	0	0

Abbildung 2: Art des ans Institut gesandten Probenmaterials und Ergebnis der Untersuchung auf Histomonaden-DNA

Unter den Organproben machten sowohl Proben aus der Leber als auch Proben aus Blinddärmen jeweils etwa 40 % des Probenumfangs aus (Abbildung 3). In den Leber-Proben konnte weniger oft Histomonaden-DNA nachgewiesen werden als in den Blinddarm-Proben. Bei jeweils einer Probe blieb das Ergebnis fraglich. Zu einem geringen Teil wurden auch Pool-Proben aus Leber und Blinddärmen eingeschickt. Hier gelang der Nachweis von Histomonaden geringfügig öfter, als dass der Verdacht nicht bestätigt werden konnte. Ebenfalls zu einem geringen Anteil wurden Proben von anderen Organen eingesendet (Abbildung 3, Tabelle 11). Darunter befanden sich auch verschiedene Tupferproben. Bei diesen verschiedenen Organ-Proben zeigte nur etwa ein Viertel ein positives Ergebnis.

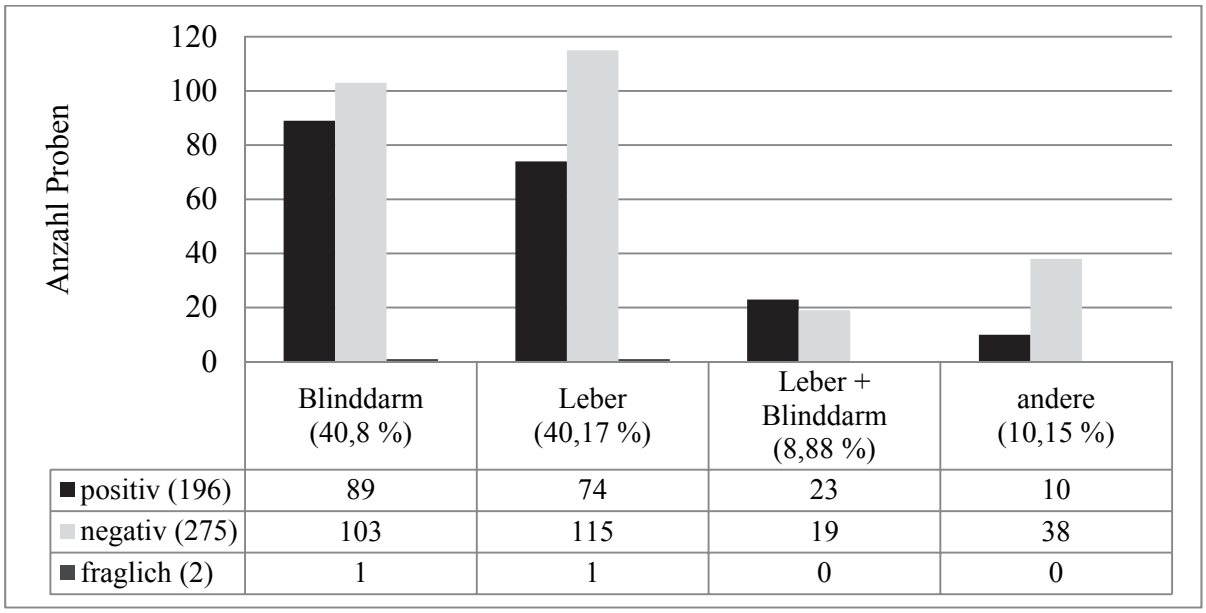
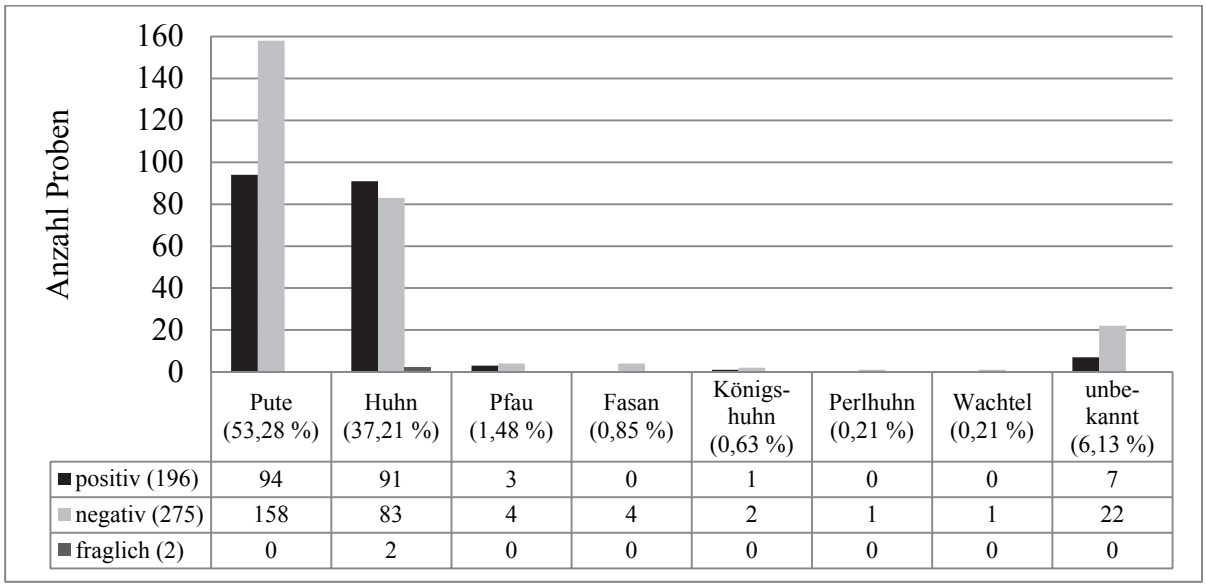


Abbildung 3: Verteilung der 473 ans Institut gesandten Organproben nach den Organen und Ergebnis der Untersuchung auf Histomonaden-DNA. „Andere“ Organproben sind in Tabelle 11 aufgeschlüsselt

Tabelle 11: Probenmaterial aus selten eingesendeten Organen bzw. Tupfern

	positiv	**negativ**	**insgesamt**
Drüsenmagen	-	1	1
Enddarm	-	2	2
Kloake	2	4	6
Leber + Milz	-	1	1
Milz	-	4	4
Milz + Blinddarm + Leber	-	1	1
Niere	-	3	3
Oesophagus	-	3	3
Organe (unbekannt)	-	1	1
Pankreas	-	1	1
Tupfer	4	5	9
Tupfer Blinddarm	2	3	5
Tupfer Kloake	2	3	5
Tupfer Leber	-	4	4
Tupfer Milz	-	2	2
insgesamt	10	38	48

Die eingesendeten Organproben stammten von unterschiedlichen Vogelarten (Abbildung 4), wobei die meisten Proben von Puten und Hühnern stammten. Über die Hälfte des Probenmaterials stammte dabei von Puten. Eine negative Diagnose wurde hier etwa 1,5 mal so oft gestellt wie eine positive. Etwas weniger Proben stammten vom Huhn: am ganzen Probenmaterial machten diese Proben etwa ein Drittel aus. Geringfügig häufiger als bei den Putenproben wurde hier der Verdacht der Histomonose bestätigt. Andere Vogelarten wie Pfau (*P. cristatus*), Fasan (*P. colchicus*), Königshuhn (*Tetraogallus* sp.), Perlhuhn (*N. meleagris*) und Wachtel (*C. coturnix*) waren nur vereinzelt vertreten. In der Mehrzahl wurde jeweils keine Histomonaden-DNA in der qPCR festgestellt.



	Pute (53,28 %)	Huhn (37,21 %)	Pfau (1,48 %)	Fasan (0,85 %)	Königs-huhn (0,63 %)	Perlhuhn (0,21 %)	Wachtel (0,21 %)	unbe-kannt (6,13 %)
positiv (196)	94	91	3	0	1	0	0	7
negativ (275)	158	83	4	4	2	1	1	22
fraglich (2)	0	2	0	0	0	0	0	0

Abbildung 4: Verteilung des ans Institut gesandten Probenmaterials nach Vogelarten und Ergebnis der Untersuchung auf Histomonaden-DNA

Betrachtet man jedoch die Anzahl der Hühner- und Putenproben im Verlauf der Jahre (Abbildung 5), so fällt auf, dass es hier zu einer unterschiedlichen Entwicklung kam. Die Anzahl der Einsendungen aus Putenbeständen war in den einzelnen Jahren großen Schwankungen unterworfen, wobei 2004, 2008 und 2010 im Gegensatz zu den anderen Jahren am meisten Proben eingesendet wurden. Im Vergleich dazu war die Anzahl der Hühnerproben in den Jahren 2004 bis 2009 relativ konstant. Lediglich 2010 wurden weitaus mehr Proben aus Hühnerbeständen eingesandt als in den Jahren davor.

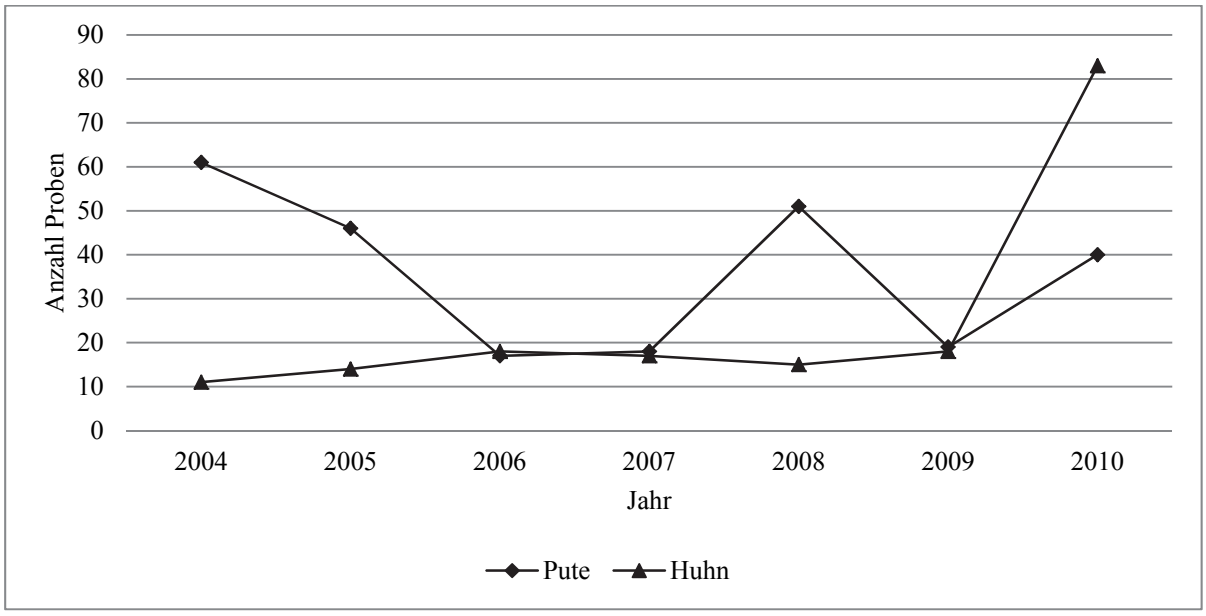


Abbildung 5: Verteilung des ans Institut gesandten Probenmaterials aus Puten- und Hühnerbeständen nach Jahren

Verschiedene Invertebraten wurden auf das Vorhandensein von Histomonaden-DNA untersucht (Tabelle 12). Bei über der Hälfte der eingesendeten Invertebraten handelte es sich um Käfer. Dabei waren etwa ein Viertel der Käfer Histomonaden-positiv. Die anderen positiven Proben wurden bei den eingesendeten Fliegen nachgewiesen, deren Anteil an der Invertebraten-Zahl jedoch gering war. Andere Invertebraten wurden nur vereinzelt und jedesmal mit einem negativen Ergebnis untersucht.

Tabelle 12: Eingesendete Invertebraten und Ergebnis der Untersuchung auf Histomonaden-DNA

	positiv	**negativ**	**insgesamt**
Fliegen	2	3	5
Käfer	6	21	27
Käfer, Larven	-	1	1
Larven	-	4	4
Mehlwürmer	-	1	1
Nematodenlarve	-	1	1
Regenwurm	-	5	5
Schnecken	-	2	2
insgesamt	8	38	46

Auch die Mehrzahl der Umgebungsproben wurde negativ auf Histomonaden-DNA getestet (Tabelle 13). Die meisten Proben stammten aus dem Futter, aus Staub sowie aus dem Bereich außerhalb des Stalles. Zu letzteren zählten z. B. Proben aus Wasser, welches sich vor dem Stall befand. Bei den Staub- und Umgebungsproben gelang vereinzelt der Nachweis von Histomonaden-DNA. Bei einer anderen positiven Probe handelte es sich um eine Probe aus der Einstreu.

Tabelle 13: Eingesendete Umgebungsproben und Ergebnis der Untersuchung auf Histomonaden-DNA

	positiv	**negativ**	**insgesamt**
Einstreu	1	2	3
Futter	-	7	7
Kot	-	5	5
Schafkot	-	1	1
Stall	-	5	5
Staub	1	9	10
Stroh	-	3	3
Bereich außerhalb des Stalls	2	6	8
insgesamt	4	38	42

4.1.2 Entwicklung der Primer und der PCR für das C-Profiling

Van der Heijden et al. (2006) entwickelten ein Verfahren, bei der die Internal Transcribed Spacer-Region 1 (ITS1-Region) des rRNA-Gens zur Genotypisierung herangezogen wird. Dabei wurde diese Region in einer PCR amplifiziert und das PCR-Produkt anschließend sequenziert. Da das erhaltene Fluorogramm aufgrund von Überlagerungen (Abbildung 6) mehrerer Basen an verschiedenen Stellen nicht auswertbar war, wurde es auf die Base Cytosin reduziert. Die somit erhaltenen C-Profile wurden miteinander verglichen und eine Typisierung wurde vorgenommen.

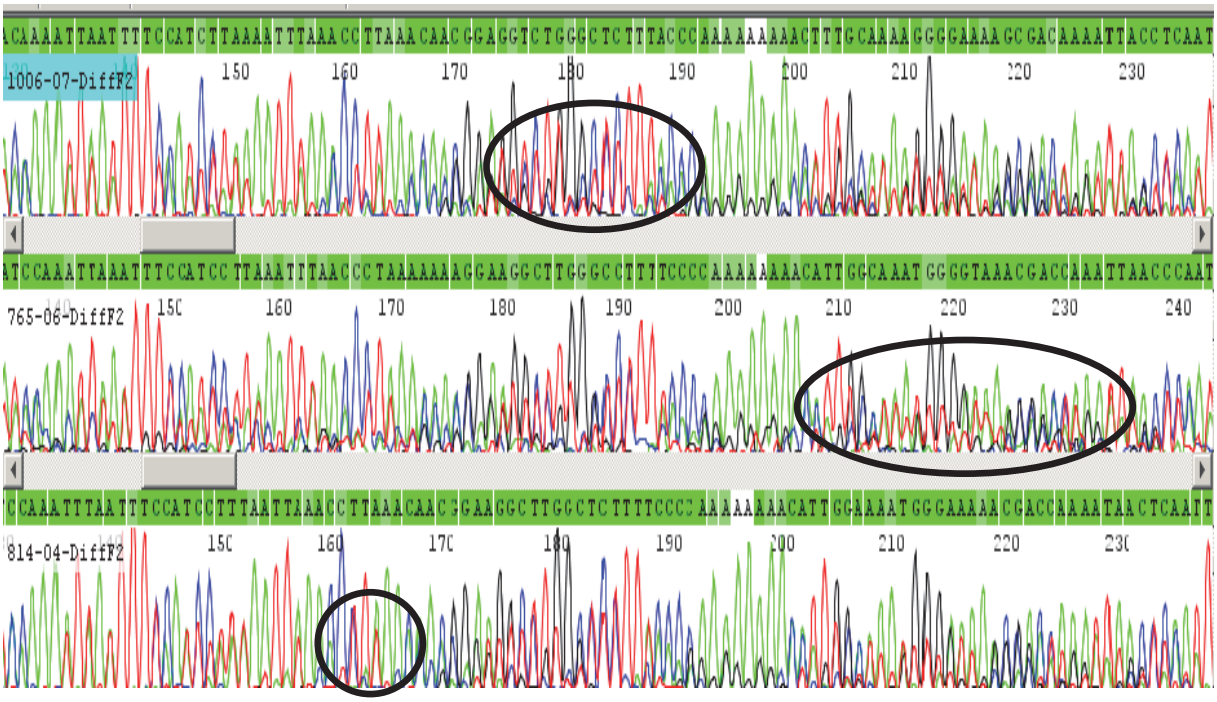


Abbildung 6: Beispiele für Fluorogramme der ITS1-Region von drei verschiedenen Proben. Bereiche mit Überlagerungen sind schwarz umrandet.

Um eine höhere Spezifität zu erlangen und zusätzlich auch die ITS2-Region zu amplifizieren, wurden andere als bei van der Heijden et al. (2006) beschriebene Primer in der PCR für das C-Profiling entworfen. Neu entwickelt wurde das Primerpaar HmDiff2F und HmDiff2R (Kapitel 3.2.1.2.2 und Tabelle 3). HmDiff2F liegt im SSU rRNA-Gen, HmDiff2R im LSU rRNA-Gen. Für eine hohe Spezifität wurden für die Entwicklung der Primer Bereiche in diesen Genen ausgewählt, die wenig Homologien mit anderen Trichomonaden-Arten aufweisen. Die Sequenz des SSU rRNA-Gens wurde der Gendatenbank entnommen (AF293056.1).

Zu Beginn wurden 55 °C und 60 °C als Annealing-Temperaturen der C-Profiling PCR getestet. Ferner wurden Elongationszeiten von 30 und 60 Sekunden in Verbindung mit den Annealing-Temperaturen getestet. Reproduzierbare Ergebnisse wurden nur mit einer Annealing-Temperatur von 60 °C für eine Minute, sowie einer Elongatios-Zeit von 30 Sekunden erhalten. Die Spezifität der Primer wurde mit DNA von einer Histomonaden-Feldprobe sowie mit DNA von *Blastocystis* spp. und *T. gallinarum* überprüft. Nur die Zugabe von Histomonaden-DNA führte zu einem positiven Ergebnis (Abbildung 7).

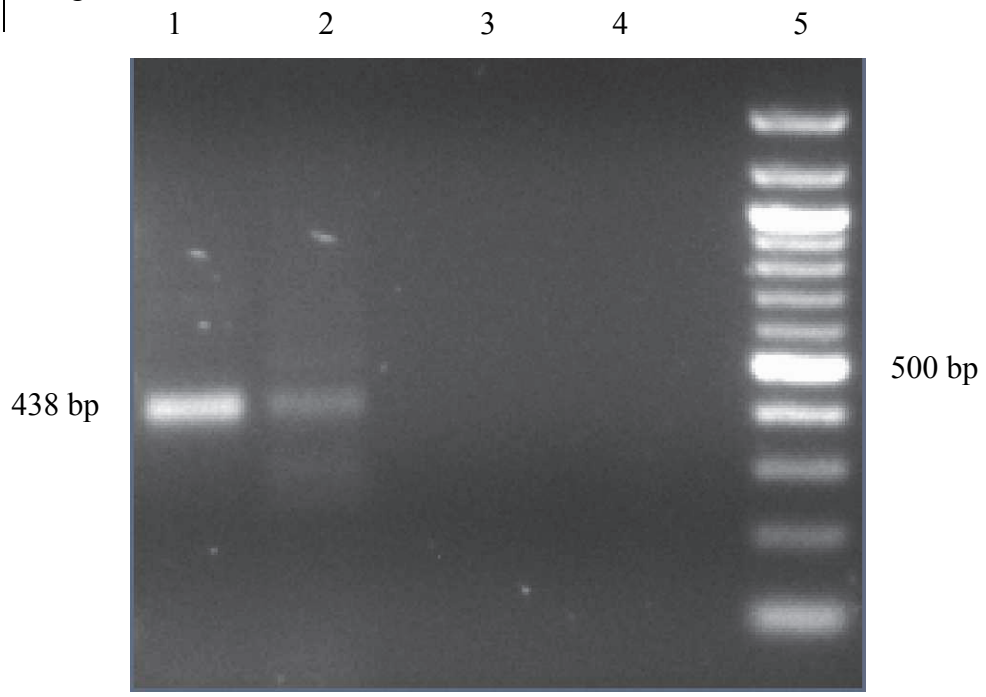


Abbildung 7: Überprüfung der Spezifität des Primerpaares HmDiffF2, HmDiffR2 mit weiteren protozoischen Parasiten; Spur 1: Positiv-Kontrolle *H. meleagridis*, Spur 2: Histomonaden-Feldprobe, Spur 3: *Blastocystis* spp., Spur 4: *T. gallinarum*, Spur 5: Negativ-Kontrolle, M: 100 bp-Marker

4.1.3 C-Profiling der ITS1-Region

Von den 209 Proben, die in der diagnostischen qPCR positiv auf Histomonaden getestet worden waren, wurden 192 Proben in der Diff-PCR eingesetzt. 42 Proben zeigten ein negatives Ergebnis. Dabei handelte es sich um Proben, die auch schon in der Diagnostik ein nur schwach positives Ergebnis aufwiesen. Von den 150 zur Sequenzierung eingesandten Proben konnte in 125 Fällen ein C-Profil erstellt werden. Bei 25 Proben gelang keine Auswertung, da vermutlich ein unspezifisch amplifiziertes PCR-Produkt sequenziert wurde.

Für den Vergleich der einzelnen C-Profile der ITS1-Region untereinander und die Zuordnung zu verschiedenen Typen wurden bei jedem C-Profil charakteristische Gruppen definiert, die sich je nach Typ voneinander unterscheiden (Abbildung 8). Bei Typ A war in den einzelnen Gruppen der Anstieg der Peaks einer Zweiergruppe immer von links nach rechts. Bei Typ C hingegen fielen sie in dieser Orientierung. Eine Mischung von Typ A und Typ C stellte Typ D dar. Die ersten beiden Gruppen von Peaks waren bei Typ A, C und D jeweils von einem sehr hohen Peak unterbrochen. Dieser Peak fehlte bei Typ B. Auch bei den anderen Gruppen von Peaks, bei denen bei den vorher beschriebenen Typen jeweils zwei zu sehen waren, fehlte jeweils einer.

Eine Ausnahme stellte Typ E dar, welcher nicht mit den anderen vier Typen zu vergleichen war. Trotzdem war die Abgrenzung der ITS1-Region zu den benachbarten rRNA-Regionen gut möglich, weshalb er als eigener Typ geführt wurde.

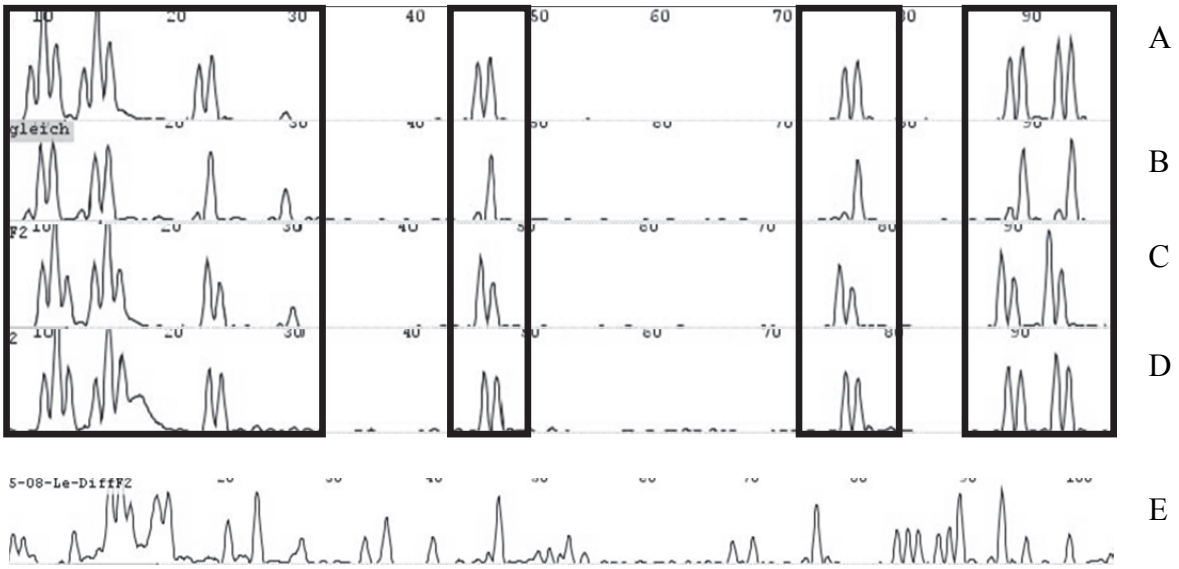


Abbildung 8: C-Profil Typen der ITS1-Region. Die Bereiche, die jeweils für die Zuordnung der Typen herangezogen wurden, sind umrandet

Vergleicht man das Vorkommen der einzelnen C-Profil-Typen der ITS1-Region (Abbildung 9), so ist auffallend, dass Typ A mit über der Hälfte der häufigste Typ war. Typ B und C kamen mit jeweils etwa einem Fünftel fast gleich häufig vor. Vereinzelt fand sich Typ D. Typ E wurde nur einmal gefunden.

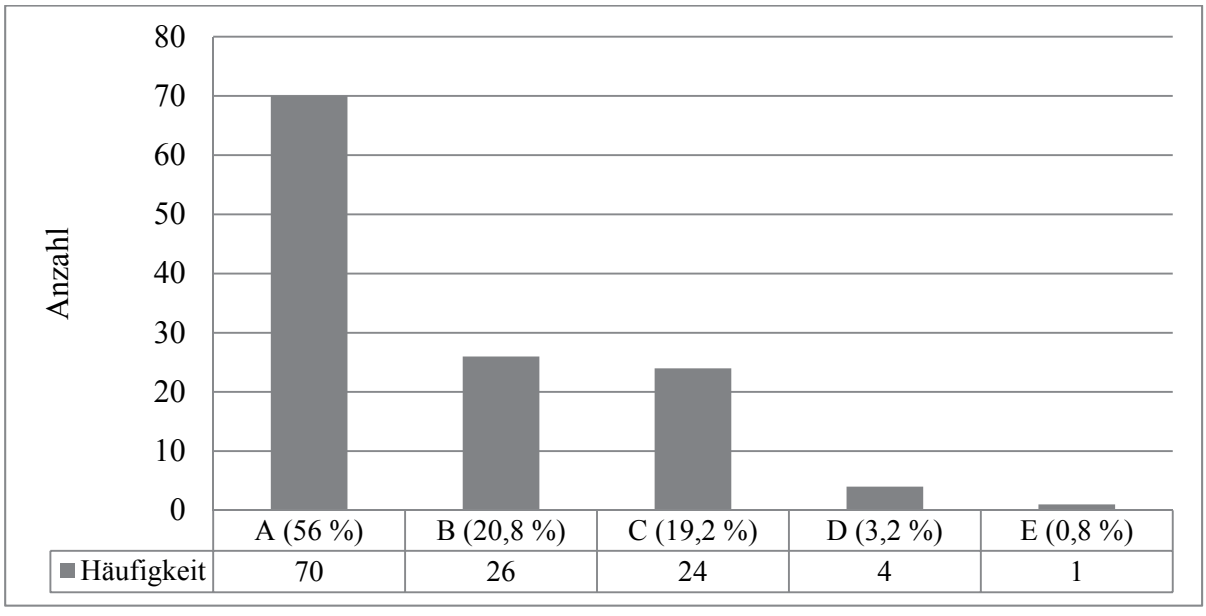
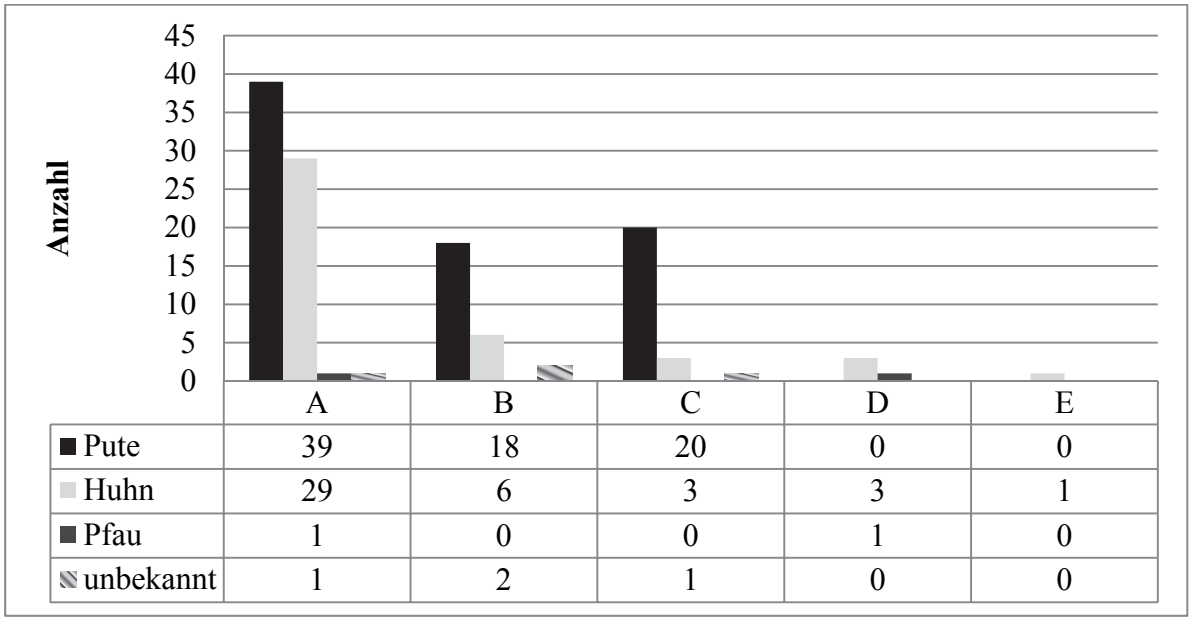


Abbildung 9: Häufigkeit der C-Profil Typen der ITS1-Region

Der dominierende Typ bei den Puten und den Hühnern war Typ A (Abbildung 10). Nur in einem Fall wurde er beim Pfau gefunden. Zu etwa gleichen Teilen kamen Typ B und C bei den Puten vor. Nur vereinzelt fand man sie beim Huhn. Typ D hingegen wurde nicht bei der Pute angetroffen, sondern beim Huhn und ebenfalls einmal beim Pfau. Typ E, der mit einer Probe vorkam, fand man beim Huhn.



	A	B	C	D	E
Pute	39	18	20	0	0
Huhn	29	6	3	3	1
Pfau	1	0	0	1	0
unbekannt	1	2	1	0	0

Abbildung 10: Verteilung der C-Profil Typen nach Tierarten

4.1.4 C-Profiling der ITS2-Region

Eine Typisierung anhand der ITS2-Region stellte sich als nicht praktikabel heraus. Nach Reduzierung der Fluorogramme auf die Base Cytosin ergaben sich mindestens 14 verschiedene, nicht miteinander vergleichbare C-Profile. Da kein bestimmtes Muster zu erkennen war, konnte keine Einteilung in Typen vorgenommen werden. Auch war die Reproduzierbarkeit nicht gegeben: Mehrere C-Profile von gleichen Proben waren untereinander nicht identisch.

4.1.5 Anwendungen des C-Profilings

Einige Betriebe mit mehreren Histomonose-Ausbrüchen wurden mittels C-Profiling untersucht.

4.1.5.1 Putenelterntierbetrieb

Erstmals trat hier die Histomonose im Juni 2005 auf. Ein C-Profiling der eingesendeten Proben aus diesem Jahr ordnete den Erreger Typ A zu.

Ein zweiter Ausbruch ereignete sich vier Jahre später im September 2009. Es handelte sich um die gleiche Farm wie beim ersten Ausbruch. Auch hier ergab das C-Profiling Typ A.

4.1.5.2 Gemischter Betrieb

Neben Puten wurden auf diesem Betrieb auch Broiler gehalten. Insgesamt wurde Probenmaterial aus vier Ausbrüchen eingesendet.

Ein erster Ausbruch erfolgte im August 2005 bei den Puten. Im C-Profiling ergab sich die Zuordnung zu Typ B.

Im Mai 2008 wurde der zweite Ausbruch bestätigt. Wiederum waren Puten betroffen. Diesmal handelte es sich – im Gegensatz zum ersten Ausbruch drei Jahre zuvor – um Typ A.

Im selben Jahr fünf Monate später wurden erneut Proben mit dem Verdacht auf Histomonose eingeschickt. Allerdings waren nun die Broiler des Betriebes betroffen. Der Verdacht wurde bestätigt. Wie beim ersten Ausbruch bei den Puten konnte Typ B nachgewiesen werden. Zusätzlich fand sich in diesem Ausbruch die eine Probe, welche als Typ E charakterisiert wurde.

Einen Monat später, im November 2008, trat die Histomonose wiederum bei den Puten auf. Wie auch schon im Frühjahr desselben Jahres konnte mit dem C-Profiling der Typ A nachgewiesen werden.

4.1.5.3 Mastelterntierbetrieb

Im Jahr 2010 wurden 59 Proben aus diesem Betrieb eingesendet. Es handelte sich ausschließlich um Organproben. Den größten Teil machten dabei Leber- und Blinddarmproben aus. Vereinzelt wurden Kloaken-, Enddarm-, Oesophagus und nicht näher beschriebene Tupferproben sowie eine Probe aus einem Leber- und Blinddarmpool eingedendet. 30 mal konnte Histomonaden-DNA nachgewiesen werden, 29 mal gelang dies nicht. Die positiven Proben waren zum überwiegenden Teil Leber- und Blinddarmproben.

Jeweils zwei positive Proben stammten von Kloaken sowie von Blinddarmtupfern. Die eingesendeten Proben stammten aus neun verschiedenen Herden. Nur von 10 der positiven Proben konnte ein C-Profil erstellt werden. Neun Fluorogramme konnten nicht ausgewertet werden und bei ebenfalls neun Proben war keine Sequenzierung möglich, da sie in der Diff-PCR ein negatives Ergebnis zeigten. Von zwei der positiven Proben war kein Material mehr vorhanden, sodass diese Proben nicht bearbeitet werden konnten. In sieben Fällen konnte durch das C-Profiling eine Zuordnung zu Typ A vorgenommen werden, zweimal fand sich Typ B und einmal Typ C. Alle 10 C-Profile konnten mit einer Ausnahme von Proben derselben Herde erstellt werden. Einmal wurde Typ A in einer anderen Herde gefunden.

4.1.6 Anlegen monoklonaler Kulturen

4.1.6.1 Mikromanipulation

Um herauszufinden, ob die Überlagerungen im Fluorogramm der ITS1-Region auf intergenomische oder intragenomische Unterschiede zurückzuführen waren, wurden mithilfe der Methode der Mikromanipulation wie sie von Hess et al. (2006b) beschrieben wurde, monoklonale Kulturen gewonnen. In einigen Teilen wurde die Methode verändert, um bestmögliche Ergebnisse zu erzielen, wie es in 3.2.1.5.2 beschrieben ist.

4.1.6.2 C-Profiling und Fluorogramme der monoklonalen Kulturen

Anhand des C-Profilings der ITS1-Region der Ausgangskultur ergab sich die Zuordnung zu Typ A. Aus der sechsten Passage dieser Kultur wurden zehn monoklonale Kulturen gewonnen. Alle Kulturen wurden in einer PCR auf das Vorhandensein von DNA von *T. gallinarum* und *Blastocystis* spp. untersucht, da in der Ausgangskultur *Blastocystis* spp. gefunden wurde. Nach Vorliegen der negativen Ergebnisse wurde von allen zehn Kulturen ein C-Profil erstellt. Neun Kulturen konnten dabei – wie die Ausgangskultur auch – dem Typ A zugeordnet werden. Bei einer Kultur ergab sich durch das C-Profiling die Zuordnung zu Typ C.

In Material aus einer Kultur, in die mittels Mikromanipulation nur Medium, aber keine Histomonadenzelle überführt worden war, konnte in der PCR keine Histomonaden-DNA nachgewiesen werden.

In allen zugehörigen Fluorogrammen konnten die Überlagerungen immer noch gefunden werden (Abbildung 11).

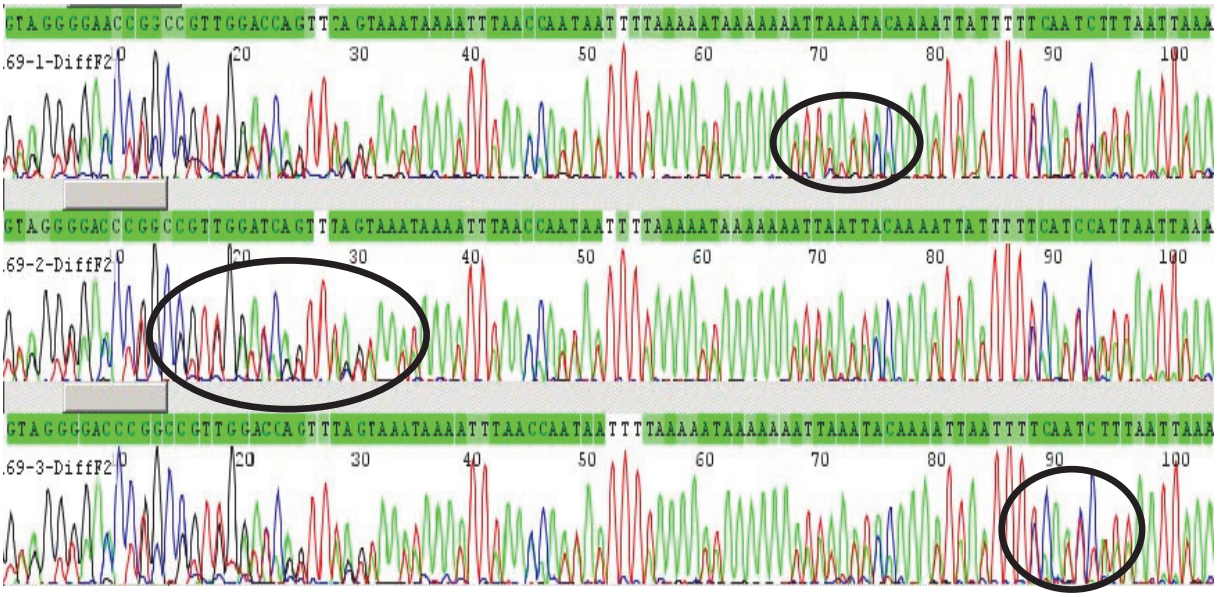


Abbildung 11: Fluorogramme der ITS1-Region von drei monoklonalen Kulturen. Bereiche mit Überlagerungen sind schwarz umrandet

Das PCR-Produkt von einem Typ A sowie das PCR-Produkt des Typs C wurden kloniert. Fünf Typ A-Klone sowie vier Typ C-Klone wurden sequenziert. Die Sequenzen wurden mittels A1lignment verglichen (Abbildung 12). Klon 3, Klon 4 und Klon 5 des Typs A zeigten an drei Stellen der ITS1-Region eine andere Nukleotidabfolge als die anderen Klone, wobei hier jeweils nur eine Sequenz betroffen war. Im Nukleotid-Bereich 70 und 72 sowie 94 und 96 der ITS1-Region traten entweder die Base Thymin oder Adenin auf. Bei den Typ A Klonen 1 und 2 sowie bei den Typ B Klonen 1, 2 und 4 kam es bei den Basen 98 und 99 zu Deletionen.

```
Typ A, Klon 1      GTAGGTGAACCTGCCGTTGGATCAGTTTAGTAAATAAAATTTAAACAATA 50
Typ A, Klon 2      GTAGGTGAACCTGCCGTTGGATCAGTTTAGTAAATAAAATTTAAACAATA 50
Typ A, Klon 3      GTAGGTGAACCTGCCGTTGGGTCAGTTTAGTAAATAAAATTTAAACAATA 50
Typ A, Klon 4      GTAGGTGAACCTGCCGTTGGATCAGTTTAGTAAATAAAATTTTAACAATA 50
Typ A, Klon 5      GTAGGTGAACCTGCCGTTGGATCAGTTTAGTAAATAAAATTTAAACAATA 50
Typ C, Klon 1      GTAGGTGAACCTGCCGTTGGATCAGTTTAGTAAATAAAATTTAAACAATA 50
Typ C, Klon 2      GTAGGTGAACCTGCCGTTGGATCAGTTTAGTAAATAAAATTTAAACAATA 50
Typ C, Klon 3      GTAGGTGAACCTGCCGTTGGATCAGTTTAGTAAATAAAATTTAAACAATA 50
Typ C, Klon 4      GTAGGTGAACCTGCCGTTGGATCAGTTTAGTAAATAAAATTTAAACAATA 50
                   ********************.**********************:*******

Typ A, Klon 1      ATTTTAAAAATAAAAAAATTATATACAAAATTAATTTTCAATCATTAA-- 98
Typ A, Klon 2      ATTTTAAAAATAAAAAAATTAAATACAAAATTAATTTTCAATCATTAA-- 98
Typ A, Klon 3      ATTTCAAAAATAAAAAAATAATATACAAAATTAATTTTCAATCTTAAAAT 100
Typ A, Klon 4      ATTTTAAAAATAAAAAAATAATATACAAAATTAATTTTCAATCTTAAAAT 100
Typ A, Klon 5      ATTTTGAAAATAAAAAAATAATATACAAAATTAATTTTCAATCTTAAAAT 100
Typ C, Klon 1      ATTTTAAAAATAAAAAAATTAAATACAAAATTAATTTTCAATCATTAA-- 98
Typ C, Klon 2      ATTTTAAAAATAAAAAAATTAAATACAAAATTAATTTTCAATCATTAA-- 98
Typ C, Klon 3      ATTTTAAAAATAAAAAAATAATATACAAAATTAATTTTCAATCTTAAAAT 100
Typ C, Klon 4      ATTTTAAAAATAAAAAAATTAAATACAAAATTAATTCTCAATCATTAA-- 98
                   **** .*************:*:************** ******:*:**
```

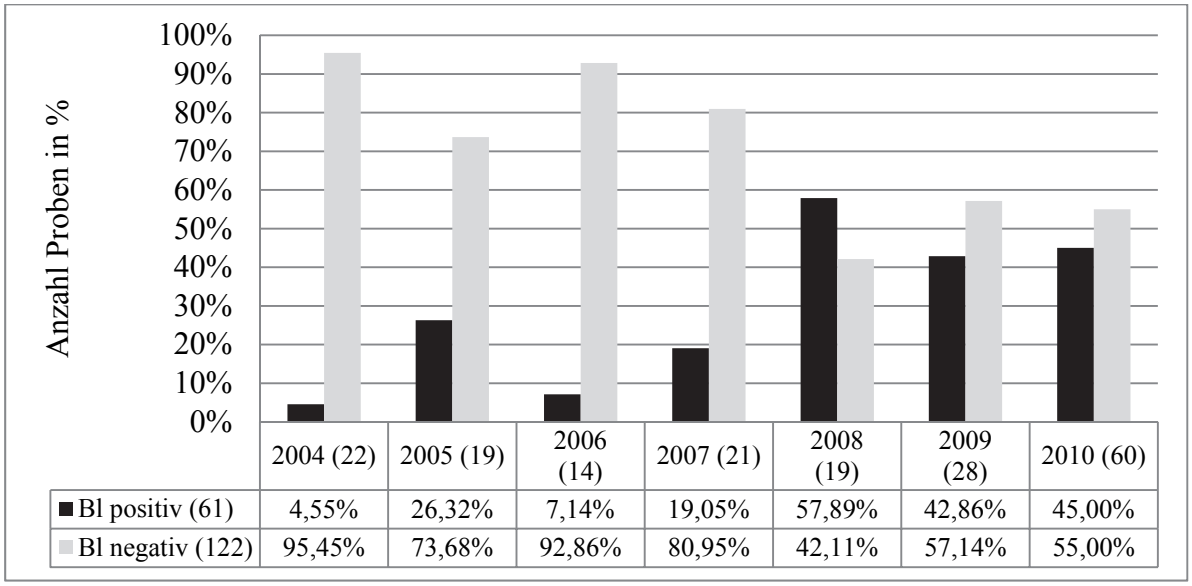
```
Typ A, Klon 1      TTAAA 103
Typ A, Klon 2      TTAAA 103
Typ A, Klon 3      TTAAA 105
Typ A, Klon 4      TTAAA 105
Typ A, Klon 5      TTAAA 105
Typ C, Klon 1      TTAAA 103
Typ C, Klon 2      TTAAA 103
Typ C, Klon 3      TTAAA 105
Typ C, Klon 4      TTAAA 103
                   *****
```

Abbildung 12: Allignment der ITS1-Regionen von fünf Typ A-Klonen und vier Typ C-Klonen

4.1.7 Vorkommen von *Blastocystis* spp. und *T. gallinarum*

Insgesamt wurden 273 Proben auf das Vorhandensein von *Blastocystis* spp. und *T. gallinarum* untersucht. Darunter waren 183 positive Histomonadenproben. Von 357 Proben, die negativ auf Histomonaden getestet worden waren, wurden insgesamt 90 Proben aus den Jahren 2004 bis 2010 ausgewählt.

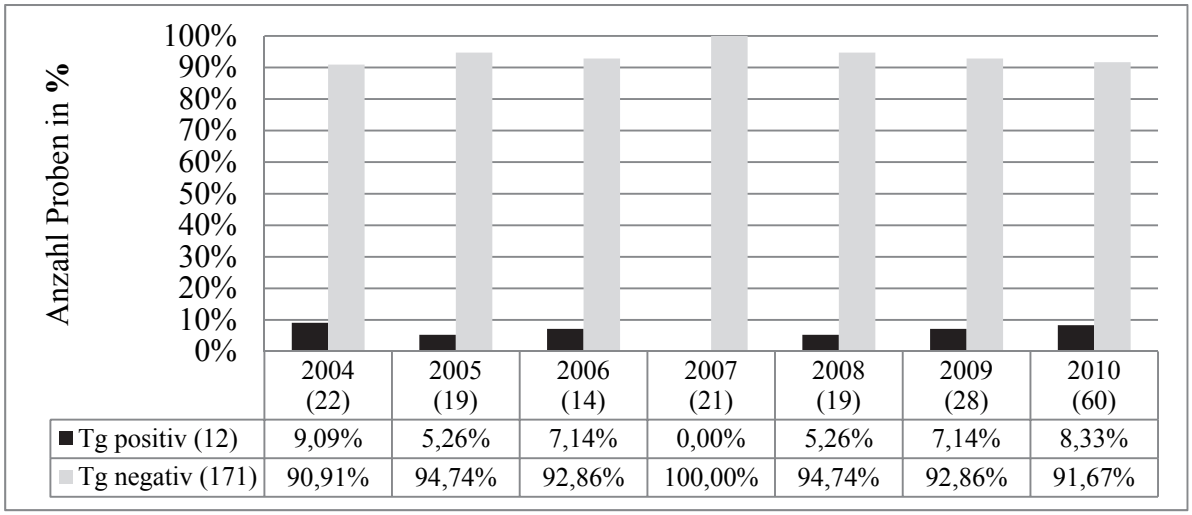
Bei einem Drittel der positiv auf *H.meleagridis* getesteten Proben konnte DNA von *Blastocystis* spp. nachgewiesen werden (Abbildung 13). Zwei Drittel der Proben waren *Blastocystis*-negativ. Bei den Proben aus den Jahren 2004 und 2005 gelang der Nachweis jeweils nur bei einer einzigen Probe. Die Proben der einzelnen Jahre zeigten jeweils häufiger ein negatives als ein positives Ergebnis. Ausnahme sind hier die Proben aus dem Jahr 2008, bei denen in 11 aus den untersuchten 19 Proben DNA von *Blastocystis* nachgewiesen wurde.



	2004 (22)	2005 (19)	2006 (14)	2007 (21)	2008 (19)	2009 (28)	2010 (60)
Bl positiv (61)	4,55%	26,32%	7,14%	19,05%	57,89%	42,86%	45,00%
Bl negativ (122)	95,45%	73,68%	92,86%	80,95%	42,11%	57,14%	55,00%

Abbildung 13: Anzahl positiver und negativer *Blastocystis* spp.-Proben (Bl) bei positiv getesteten *H. meleagridis*-Proben der einzelnen Jahre in Prozent; Zahlen in Klammern geben absolute Zahlen wieder

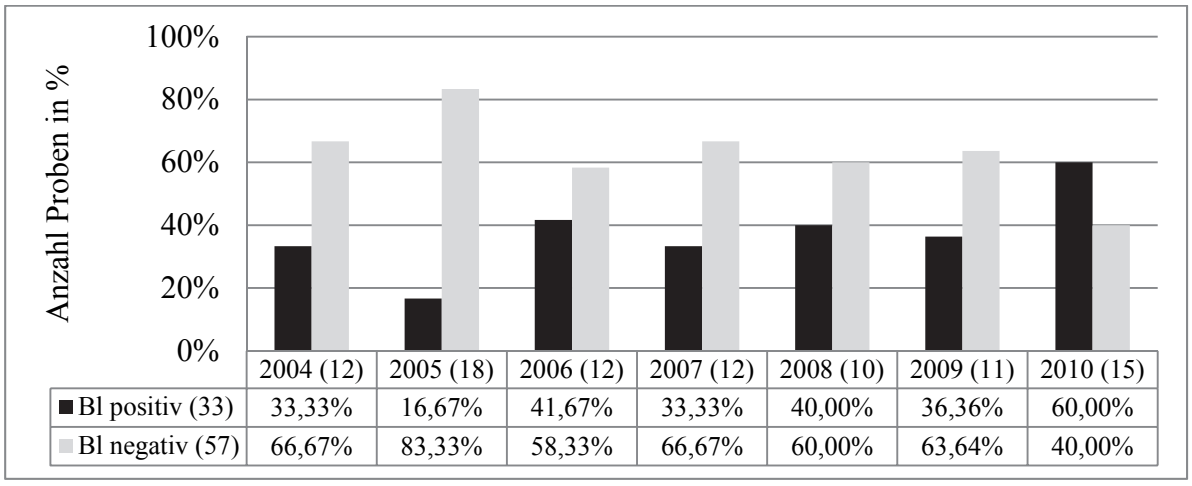
Im Gegensatz zu *Blastocystis* spp. trat *T. gallinarum* in den einzelnen Jahren nur vereinzelt auf (Abbildung 14), wobei es im Jahr 2007 keine *T. gallinarum*-positive Probe gab. 2010 konnte der Erreger bei fünf Proben nachgewiesen werden.



	2004 (22)	2005 (19)	2006 (14)	2007 (21)	2008 (19)	2009 (28)	2010 (60)
Tg positiv (12)	9,09%	5,26%	7,14%	0,00%	5,26%	7,14%	8,33%
Tg negativ (171)	90,91%	94,74%	92,86%	100,00%	94,74%	92,86%	91,67%

Abbildung 14: Anzahl positiver und negativer *T. gallinarum*-Proben (Tg) bei positiv getesteten *H. meleagridis*-Proben der einzelnen Jahre in Prozent; Zahlen in Klammern geben absolute Zahlen wieder

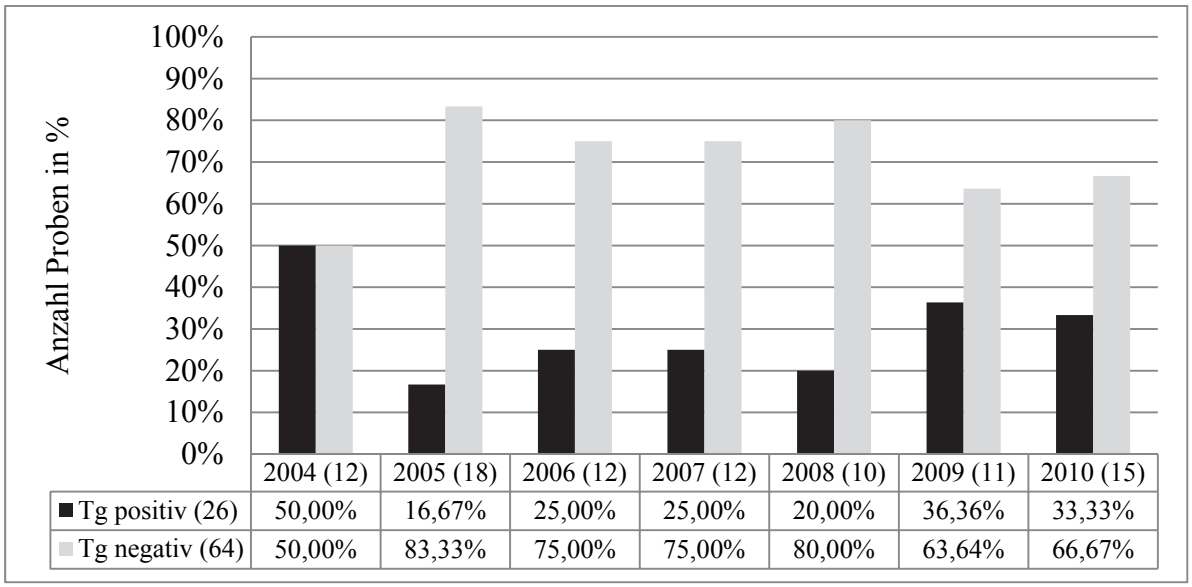
Wie auch bei den *H. meleagridis*-positiven Proben wurde bei einem Drittel der negativen Proben *Blastocystis* spp. gefunden (Abbildung 15). Bei zwei Dritteln der Proben konnte keine DNA von *Blastocystis* spp. festgestellt werden. In jedem Jahr gab es mehr negative als positive *Blastocystis* spp.-Proben. Ausnahme waren die Proben aus dem Jahr 2010: hier waren 60 % der getesteten Proben positiv.



	2004 (12)	2005 (18)	2006 (12)	2007 (12)	2008 (10)	2009 (11)	2010 (15)
Bl positiv (33)	33,33%	16,67%	41,67%	33,33%	40,00%	36,36%	60,00%
Bl negativ (57)	66,67%	83,33%	58,33%	66,67%	60,00%	63,64%	40,00%

Abbildung 15: Anzahl positiver und negativer *Blastocystis* spp.-Proben (Bl) bei 90 von 357 negativ getesteten *H. meleagridis*-Proben der einzelnen Jahre in Prozent; Zahlen in Klammern geben absolute Zahlen wieder

Anders als bei den *H. meleagridis*-positiven Proben, bei denen *T. gallinarum* nur vereinzelt nachgewiesen wurde, wurde *T. gallinarum*-DNA bei den *H. meleagridis*-negativen Proben in etwa einem Drittel der Proben nachgewiesen (Abbildung 16). Zwei Drittel der Proben waren *T. gallinarum* negativ. Bis auf das Jahr 2004, aus dem ebensoviele positive wie negative *T. gallinarum*-Proben vorlagen, wurden in allen Jahren mehr negative als positive *T. gallinarum* -Proben festgestellt.



	2004 (12)	2005 (18)	2006 (12)	2007 (12)	2008 (10)	2009 (11)	2010 (15)
Tg positiv (26)	50,00%	16,67%	25,00%	25,00%	20,00%	36,36%	33,33%
Tg negativ (64)	50,00%	83,33%	75,00%	75,00%	80,00%	63,64%	66,67%

Abbildung 16: Anzahl positiver und negativer *T. gallinarum*-Proben (Tg) bei 90 von 357 negativ getesteten *H. meleagridis*-Proben der einzelnen Jahre in Prozent; Zahlen in Klammern geben absolute Zahlen wieder

Mittels Chi-Quadrat-Test wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Nachweis von *Blastocystis* spp. bzw. *T. gallinarum* und dem Nachweis von *H. meleagridis* geprüft (Tabelle 14 und Tabelle 15). Ein signifikanter Zusammenhang ergab sich bei den *T. gallinarum*-getesteten Proben, nicht jedoch bei den auf *Blastocystis* spp. untersuchten Proben.

Tabelle 14: Chi-Quadrat-Test (= X^2-Test oder Vierfelder-Test) der *Blastocystis* spp.- und Histomonaden-Proben; $X^2 = 0,30$

	Bl pos	**Bl neg**	**Summe**
Hm pos	61	122	183
Hm neg	33	57	90
Summe	94	179	273

Tabelle 15: Chi-Quadrat-Test (=X^2-Test oder Vierfelder-Test) der *T. gallinarum*- und Histomonaden-Proben; X^2 = 25,11

	Tg pos	**Tg neg**	**Summe**
Hm pos	12	171	183
Hm neg	26	64	90
Summe	38	235	273

4.2 Untersuchungen zum Kohlenhydratstoffwechsel

Für alle Kultivierungsversuche wurden für die Auswertung drei Kategorien gebildet: vermehrt, überlebt und abgestorben. Als Bezug diente dabei die Inokulationsdosis, also die Anzahl an Histomonaden, die nach Zugabe aus der Ausgangskultur in einem Milliliter der jeweils zu untersuchenden Kultur vorhanden war. Fiel im Laufe des Versuchs die Histomonadenzahl einer Kultur deutlich unter die Inokulationsdosis, wurde diese Kultur als „abgestorben“ eingestuft. Blieb die Anzahl die einzelnen Tage in etwa bei der Inokulationsdosis, dann handelte es sich um eine Kultur, die „überlebt“ hatte. „Vermehrt“ hatten sich Kulturen, bei der die Anzahl der Histomonaden deutlich über die Inokulationsdosis angestiegen waren.

4.2.1 Versuche zur Pufferwirkung von MOPS und HEPES

Durch den Einsatz verschiedener Puffer sollte versucht werden, einen möglichst gleichbleibenden pH-Wert für alle Versuche zu schaffen. Dazu wurden alle Kulturen in PBS kultiviert. Natriumchlorid, welches ein Bestandteil von PBS ist, wurde in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (8 g/L oder 5 g/L) hinzugegeben. Um die optimalen Pufferkonzentrationen und die Verträglichkeit auf die Histomonaden herauszufinden, wurden den Kulturen in unterschiedlichen Konzentrationen die Puffer HEPES und/oder MOPS zugegeben oder es wurde kein Puffer hinzugesetzt. Die Kultivierung erfolgte unter Zugabe von Reismehl in einer Konzentration von 2 g/L. Alle Versuchsansätze wurden im Duplikat angesetzt und für die Auswertung wurde der Mittelwert verwendet.

4.2.1.1 HEPES

In einem ersten Versuch wurde die Pufferkapazität sowie die Verträglichkeit von HEPES untersucht. Die Ansätze erfolgten in PBS mit 8 g/L NaCl, 2 g/L Reis, sowie 0, 5, 25, 100 oder 250 mmol/L HEPES. Das Wachstum wurde einmal täglich über drei Tage durch Auszählen der Kulturen ermittelt, wobei von den jeweils zwei angesetzten Replikaten für die

Auswertung der Mittelwert gebildet wurde. Des weiteren wurde an allen drei Tagen der pH-Wert jeder Kultur gemessen.

Dabei ergab sich ein gutes Wachstum in den Ansätzen mit 0, 5 und 25 mmol/L HEPES. Der Ansatz mit 100 mmol/L HEPES zeigte ebenfalls ein gutes, wenn auch geringeres Wachstum. Unter Anwendung von 250 mmol/L HEPES hatte keine Vermehrung stattgefunden. Die Anzahl nahm bis zum dritten Tag stark ab (1.250 Hm/ml). In Tabelle 16 und Abbildung 17 ist das Wachstum dargestellt.

Tabelle 16: Histomonadenzahlen pro Milliliter in Abhängigkeit von der HEPES-Konzentration; Inokulationsdosis: 32.500 Histomonaden pro Milliliter; s = Standardabweichung

Konzentration HEPES	**Tage nach Inokulation**		
	1	2	3
	Hm/ml		
0 mmol/L	60.000 (s = 5.000)	112.500 (s = 2.500)	150.000 (s = 25.000)
5 mmol/L	95.000 (s = 5.000)	132.500 (s = 7.500)	160.000 (s = 20.000)
25 mmol/L	90.000 (s = 0)	137.500 (s = 12.500)	145.000 (s = 5.000)
100 mmol/L	77.500 (s = 12.500)	100.000 (s = 5.000)	97.500 (s = 7.500)
250 mmol/L	23.750 (s = 3.750)	3.750 (s = 1.250)	1.250 (s = 1.250)

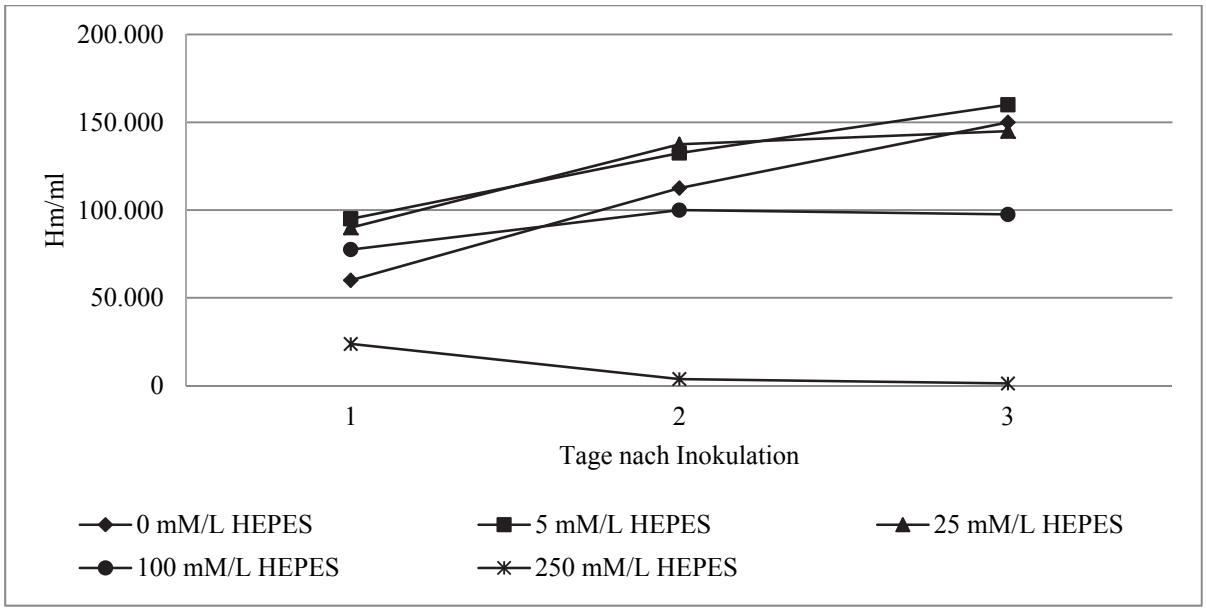


Abbildung 17: Wachstum mit verschiedenen HEPES-Konzentrationen in PBS mit 8 g/L NaCl und 2 g/L Reis

Der pH-Wert lag bei allen Kulturen an allen drei Tagen in einem Bereich von 6,7-6,9 (Abbildung 18).

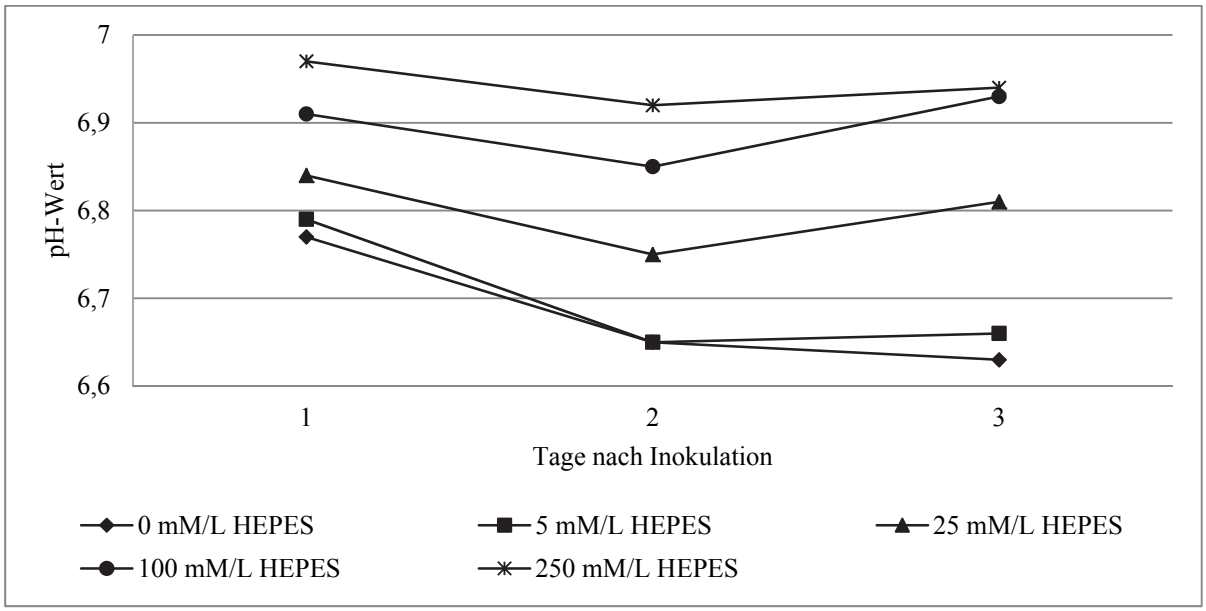


Abbildung 18: pH-Wert in Abhängigkeit von der HEPES-Konzentration

Der 100 und 250 mmol/L HEPES-Ansatz wurde – teilweise mit anderen NaCl-Konzentrationen im PBS – wiederholt. Wie im ersten Versuch wurden die Kulturen im Duplikat angesetzt und drei Tage lang täglich gezählt. Für die Auswertung wurde der Mittelwert gebildet.

Beide Ansätze mit 100 mmol/L HEPES, entweder mit 5 oder 8 g/L NaCl wuchsen gleich gut. Mit 250 mmol/L HEPES und 5 g/L NaCl überlebten die Histomonaden diesmal (Tabelle 17 und Abbildung 19).

Tabelle 17: Histomonadenzahlen pro Milliliter in Abhängigkeit von der HEPES- und der NaCl-Konzentration im PBS mit 2 g/L Reis; Inokulationsdosis: 32.500 Histomonaden pro Milliliter; s = Standardabweichung

Konzentration HEPES	**Konzentration NaCl**	**Tage nach Inokulation**		
		1	2	3
		Hm/ml		
100 mmol/L	8 g/L	25.000 (s = 2.500)	92.500 (s = 2.500)	107.500 (s = 7.500)
100 mmol/L	5 g/L	41.875 (s = 625)	97.500 (s = 12.500)	105.000 (s = 25.000)
250 mmol/L	5 g/L	26.250 (s = 0)	21.250 (s = 0)	41.875 (s = 8.125)

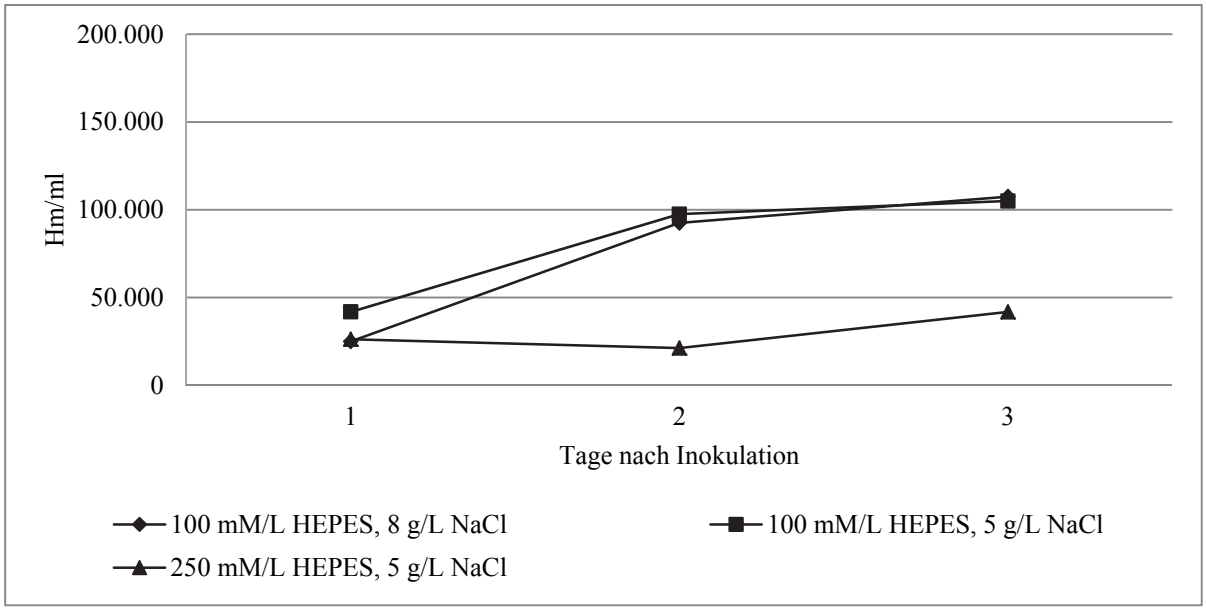


Abbildung 19: Wachstum mit verschiedenen HEPES-Konzentrationen in PBS mit 8 g/L und 5 g/L NaCl und 2 g/L Reis

4.2.1.2 MOPS

Als nächstes fanden Versuche zur Pufferwirkung und Verträglichkeit mit dem Puffer MOPS statt. Getestet wurden verschiedene Konzentrationen von MOPS (0, 50 100 und 250 mmol/L), mit und ohne Zugabe von 100 mmol/L HEPES. Das PBS enthielt 5 oder 8 g/L NaCl. Reis wurde in einer Konzentration von 2 g/L hinzugegeben. Das Wachstum wurde vier Tage lang gezählt.

Im Medium mit MOPS in einer Konzentration von 250 mmol/L konnte keine Vermehrung festgestellt werden. Auch die Zugabe von HEPES führte zu keiner Verbesserung. Ausnahme war der Ansatz in PBS mit 5 g/L NaCl und ohne HEPES: hier überlebten die Histomonaden.

Alle anderen Ansätze zeigten eine gute Vermehrung (Tabelle 18 und Abbildung 20, Abbildung 21). Auffallend war, dass die Ansätze ohne HEPES doppelt so gut wuchsen als die Ansätze mit 100 mmol/L HEPES.

Das Wachstum des Ansatzes mit HEPES in einer Konzentration von 100 mmol/L, aber ohne MOPS war vergleichbar mit dem aus den vorangegangenen Versuchen.

Tabelle 18: Histomonadenzahlen pro Milliliter in Abhängigkeit von der MOPS-, HEPES- und NaCl-Konzentration im PBS; Inokulationsdosis: 32.500 Histomonaden pro Milliliter; s = Standardabweichung

Konzentration MOPS	Konzentration HEPES	Konzentration NaCl	Tage nach Inokulation			
			1	2	3	4
			Hm/ml			
0 mmol/L	0 mmol/l	8 g/L	112.000 (s = 2.500)	202.500 (s = 2.500)	282.500 (s = 7.500)	377.500 (s = 12.500)
0mmol/L	100 mmol/L	8 g/L	107.500 (s = 2.500)	97.500 (s = 2.500)	122.500 (s = 2.500)	177.500 (s = 2.500)
50 mmol/L	0 mmol/l	8 g/L	87.500 (s = 7.500)	167.500 (s = 17.500)	205.000 (s = 20.000)	227.500 (s = 22.500)
50 mmol/L	100 mmol/L	8 g/L	62.500 (s = 7.500)	34.375 (s = 3.125)	112.500 (s = 2.500)	102.500 (s = 2.500)
100 mmol/L	0 mmol/l	8 g/L	92.500 (s = 2.500)	105.000 (s = 5.000)	160.000 (s = 10.000)	212.500 (s = 12.500)
100 mmol/L	100 mmol/L	8 g/L	37.500 (s = 2.500)	11.250 (s = 1.250)	41.875 (s = 5.625)	92.500 (s = 2.500)
250 mmol/L	0 mmol/l	8 g/L	15.625 (s = 1.875)	7.500 (s = 1.250)	5.000 (s = 3.750)	1.250 (s = 1.250)
250 mmol/L	100 mmol/L	8 g/L	19.375 (s = 5.625)	6.875 (s = 625)	3.125 (s = 625)	1.875 (s = 625)
100 mmol/L	0 mmol/l	5 g/L	145.000 (s = 25.000)	197.500 (s = 2.500)	190.000 (s = 5.000)	247.500 (s = 12.500)
100 mmol/L	100 mmol/L	5 g/L	85.000 (s = 5.000)	87.500 (s = 7.500)	107.500 (s = 12.500)	122.500 (s = 12.500)
250 mmol/L	0 mmol/l	5 g/L	53.125 (s = 11.875)	26.250 (s = 1.250)	60.000 (s = 5.000)	77.500 (s = 7.500)
250 mmol/L	100 mmol/L	5 g/L	21.875 (s = 3.125)	10.000 (s = 2.500)	1.875 (s = 625)	625 (s = 625)

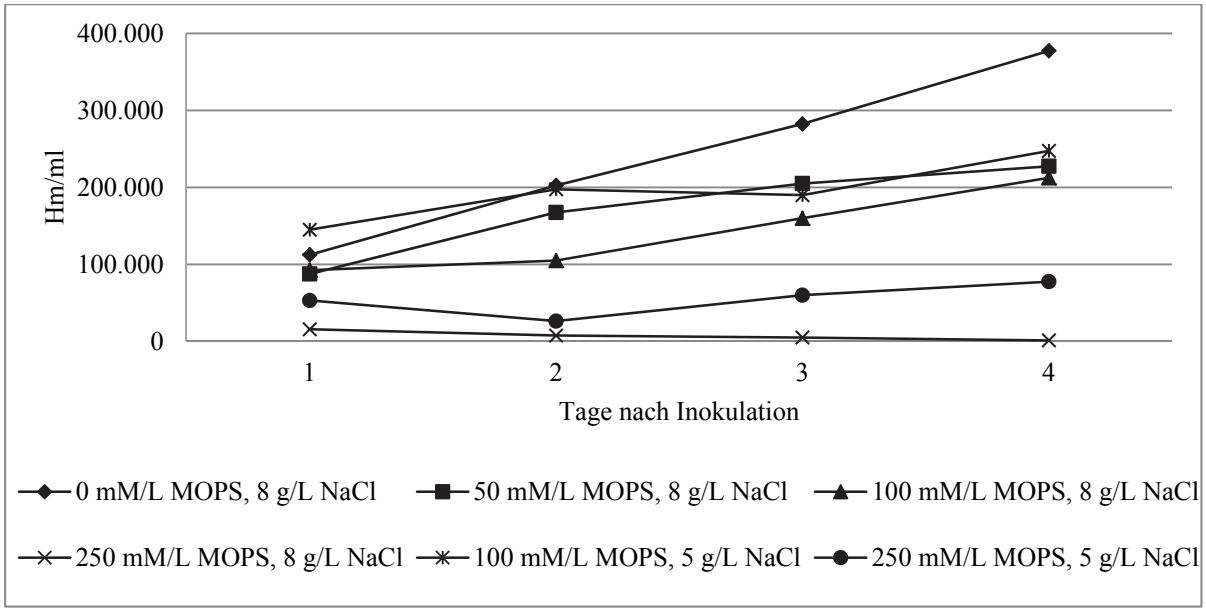


Abbildung 20: Wachstum mit unterschiedlichen MOPS-Konzentrationen ohne HEPES in PBS mit 8 g/L und 5 g/L NaCl und 2 g/L Reis

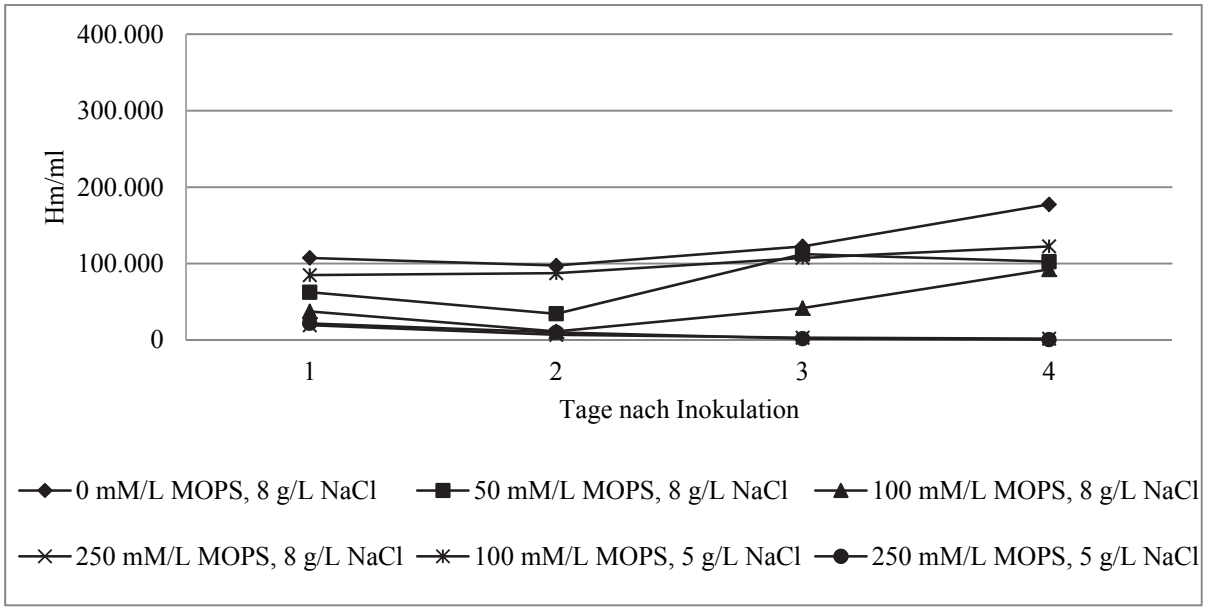


Abbildung 21: Wachstum mit unterschiedlichen MOPS-Konzentrationen und 100 mmol/L HEPES in PBS mit 8 g/L und 5 g/L NaCl und 2 g/L Reis

4.2.2 Versuche zur Eignung unterschiedlicher Kohlenhydrate in M199 und PBS

4.2.2.1 Kultivierung in M199 basiertem Medium

Folgende Stärkequellen wurden getestet: 2 g/L Reis, 4 g/L Reis, 2 g/L Kartoffelstärke, 2 g/L Amylose, 2 g/L Amylopektin, 2 g/L Glykogen sowie keine Stärkequelle. Es wurden jeweils sechs Replikate angesetzt. Aus den einzelnen Replikaten wurde für die Auswertung der Mittelwert gebildet (Tabelle 19 und Abbildung 22). Das Wachstums der Kulturen wurde täglich über fünf Tage durch Auszählen ermittelt.

Ohne Zugabe einer Kohlenhydratquelle konnte kein Wachstum festgestellt werden. Die Kulturen mit Reis vermehrten sich gut, wobei die Kulturen mit 4 g/L Reis ein höheres Wachstum zeigten.

Eine gute Vermehrung zeigten die Histomonaden in den Ansätzen mit Kartoffelstärke. Daher wurde dieser Ansatz mehr als 70 mal weiterpassagiert. Das Wachstum war zwar geringer als bei Kulturen, denen 2 g/L Reis hinzugegeben wurde. Dennoch blieb die Histomonadenzahl relativ konstant. Aufgrund der hohen Passagezahl befindet sich in dieser Kultur nun kein Restreis mehr und das Wachstum ist ausschließlich auf die Kartoffelstärke zurückzuführen.

Mit Amylose konnte zwar bis zum vierten Tag ein geringes Wachstum festgestellt werden. Danach sank die Zahl allerdings ab. Ein erneuter Ansatz mit Amylose und der Versuch der Weiterpassage waren nicht erfolgreich.

Im Gegensatz dazu starben die Histomonaden bei den Ansätzen mit Amylopektin bzw. Glykogen ab.

Tabelle 19: Histomonadenzahlen pro Milliliter in Abhängigkeit von der Kohlenhydratquelle; Inokulationsdosis: 25.000 Histomonaden pro Milliliter; s = Standardabweichung

Kohlenhydratquelle	**Tage nach Inokulation**				
	1	2	3	4	5
	Hm/ml				
ohne Stärke	4583 (s = 2.357)	3.542 (s = 1.122)	3.125 (s = 1.197)	9.167 (s = 3.118)	14.583 (s = 5.557)
Reis 2 g/L	12.500 (s = 2.976)	36.667 (s = 18.224)	335.000 (s = 34.641)	559.167 (s = 265.697)	828.333 (s = 100.360)
Reis 4 g/L	14.167 (s = 4.714)	28.542 (s = 5.372)	467.500 (s = 50.062)	1.038.333 (s = 62.361)	1.226.667 (s = 68.718)
Kartoffelstärke 2 g/L	2.083 (s = 1.382)	3.542 (s = 2834)	57.083 (s = 14.321)	97.500 (s = 21.554)	110.000 (s = 27.689)
Amylose 2 g/L	2.500 (s = 1.021)	7.500 (s = 2.165)	26.667 (s = 5.336)	35.625 (s = 8.439)	18.333 (s = 2.125)
Amylopektin 2 g/L	2.083 (s = 1.179)	2.500 (s = 722)	1.875 (s = 625)	1.042 (s = 859)	625 (s = 625)
Glykogen 2 g/L	2.292 (s = 859)	3.750 (s = 1.768)	1.250 (s = 722)	1.667 (s = 1.718)	1.042 (s =1.122)

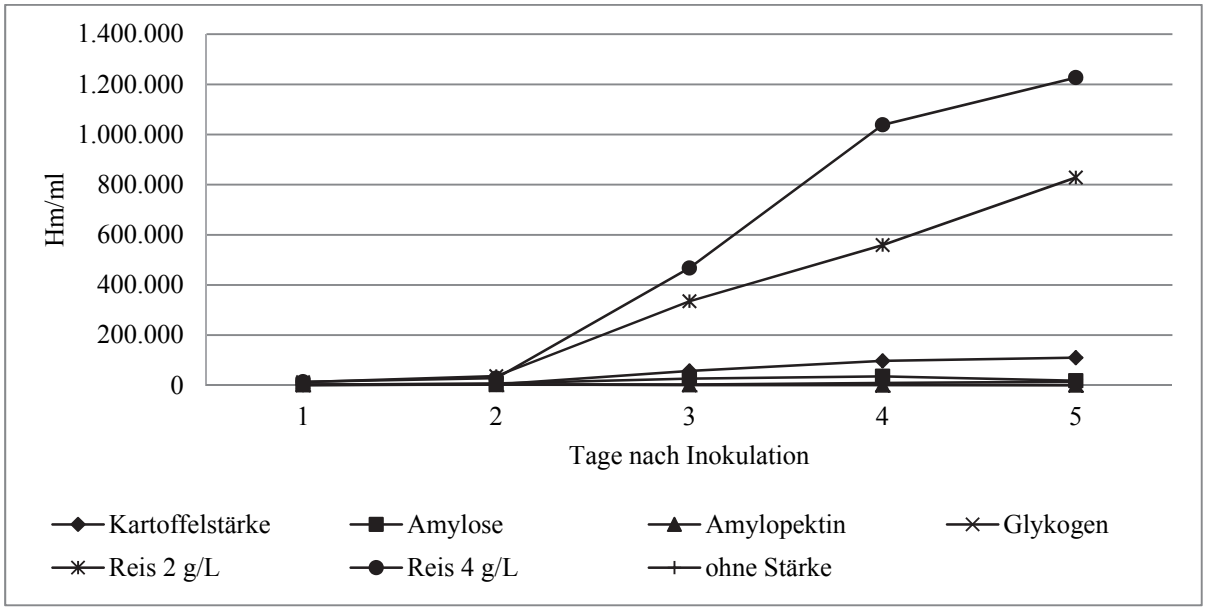


Abbildung 22: Wachstum mit unterschiedlichen Kohlenhydratquellen in M199

Histomonaden, die im Medium mit 4 g/L Reis sowie mit Kartoffelstärke kultiviert wurden, wurden fotografiert (Abbildung 23). Sowohl Reispartikel als auch Kartoffelstärkepartikel konnten dabei in den Zellen dokumentiert werden.

A B C

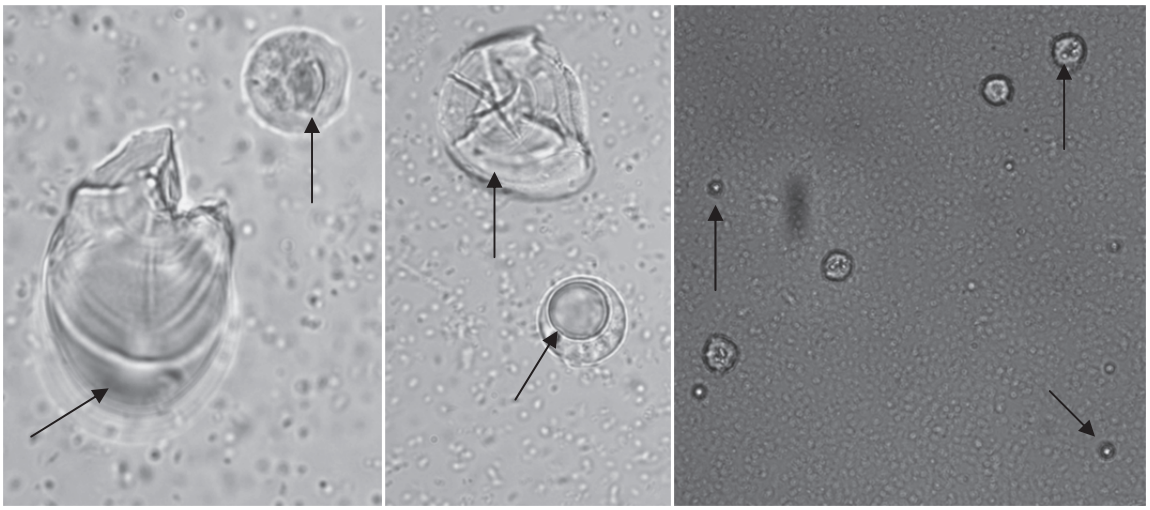


Abbildung 23: Lichtmikroskopische Aufnahmen von *H. meleagridis*; A und B: Kultur mit Kartoffelstärke, C: Kultur mit Reis;→: Kartoffelstärke-Partikel (A und B), Reispartikel (C)

4.2.2.2 Kultivierung in PBS basiertem Medium

Der vorherige Versuchsteil wurde mit Amylose, Amylopektin und Glykogen, sowie Reis jeweils in einer Konzentration von 2 g/L wiederholt. In diesen Versuchen wurden die Histomonaden in PBS mit 5 g/L NaCl sowie den beiden Puffern MOPS (100 mmol/L) und HEPES (50 mmol/L) kultiviert. Zum Vergleich wurden alle Kulturen ebenfalls in PBS mit 5 g/L NaCl angesetzt, jedoch wurde auf den Einsatz von MOPS und HEPES verzichtet. Angesetzt wurden jeweils fünf Replikate, bei welchen fünf Tage lang das Wachstum durch Auszählen ermittelt wurde. Für die Auswertung wurde der Mittelwert gebildet.

Mit keinem der getesteten Kohlenhydrate konnte ein Wachstum festgestellt werden (Tabelle 20 und Abbildung 24). Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Wachstumsergebnissen, die sich bei einer Kultivierung in M199 ohne Pufferzusatz ergaben. Bei den Kontrollkulturen im Medium mit Reis, sowohl mit als auch ohne Pufferzusatz, konnte eine gute Vermehrung beobachtet werden.

Tabelle 20: Histomonadenzahlen pro Milliliter in Abhängigkeit von der Kohlenhydratquelle; Inokulationsdosis: 15.000 Histomonaden pro Milliliter; alle Kohlenhydrate in einer Konzentration von 2 g/L; s = Standardabweichung

Kohlen-hydrat-quelle	Konzen-tration MOPS	Konzen-tration HEPES	Tage nach Inokulation				
			1	2	3	4	5
			Hm/ml				
Amylose	100 mmol/L	50 mmol/L	6.750 (s = 1.696)	5.500 (s = 1.275)	3.750 (s = 791)	1.250 (s = 1.118)	1.000 (s = 487)
Amylopektin	100 mmol/L	50 mmol/L	8.500 (s = 1.475)	7.500 (s = 2.500)	6.250 (s = 791)	3.250 (s = 1.275)	2.500 (s = 791)
Glykogen	100 mmol/L	50 mmol/L	5.750 (s = 1.696)	2.500 (s = 791)	1.500 (s = 2.000)	750 (s = 612)	750 (s = 612)
Reis	100 mmol/L	50 mmol/L	24.750 (s = 2.151)	61.000 (s = 8.602)	111.000 (s = 5.831)	157.000 (s = 8.124)	147.000 (s = 5.099)
Amylose	0 mmol/L	0 mmol/L	4.250 (s = 1.275)	3.750 (s = 2.372)	1.000 (s = 935)	750 (s = 612)	750 (s = 1.000)
Amylopektin	0 mmol/L	0 mmol/L	14.750 (s = 2.669)	4.750 (s = 2.894)	1.250 (s = 1.369)	1.500 (s = 1.225)	1.000 (s = 935)
Glykogen	0 mmol/L	0 mmol/L	5.250 (s = 1.458)	3.000 (s = 1.275)	4.250 (s = 4.583)	1.000 (s = 935)	500 (s = 612)
Reis	0 mmol/L	0 mmol/L	53.000 (s = 4.000)	78.000 (s = 12.083)	108.000 (s = 8.124)	130.000 (s = 4.472)	106.000 (s = 5.831)

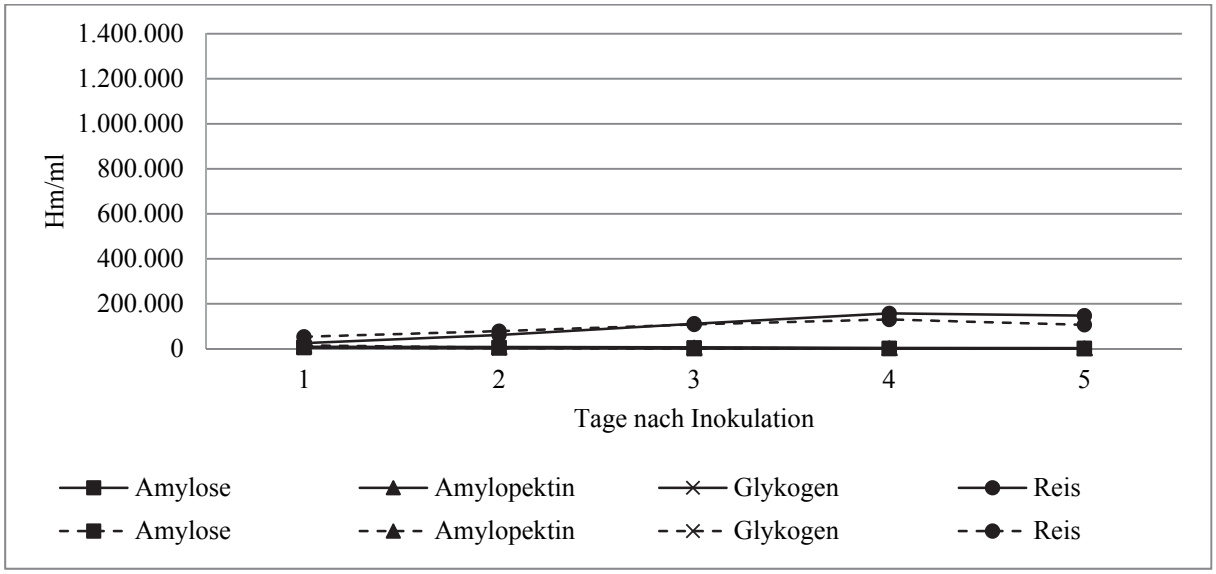


Abbildung 24: Wachstum mit unterschiedlichen Kohlenhydratquellen in PBS mit 5 g/L NaCl; Wachstumskurven mit 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES sind durch durchgehende Linien gekennzeichnet, Wachstumskurven ohne die beiden Puffer mit gestrichelten Linien

Von allen Kulturen wurde der pH-Wert gemessen (Abbildung 25). Bei allen Kulturen, denen MOPS und HEPES hinzugegeben wurde, lag der pH-Wert in einem Bereich von 6. Die einzelnen Tage über stieg er geringfügig an. Lediglich die Kulturen, denen Amylose hinzugegeben wurde, zeigten eine leicht fallende Tendenz.

Variabler zeigte sich der pH-Wert ohne Pufferzugabe. Bei Zugabe von Amylose lag er relativ konstant bei 6,8. Mit Reis stieg er leicht an, lag aber auch in einem Bereich von 6. Wurde Amylopektin bzw. Glykogen hinzugegeben, lag der anfänglich gemessene pH-Wert bei 5,3 bzw. bei 5,7. Bis zum Versuchsende stieg er jeweils auf 6,4 bzw. 6,6 an.

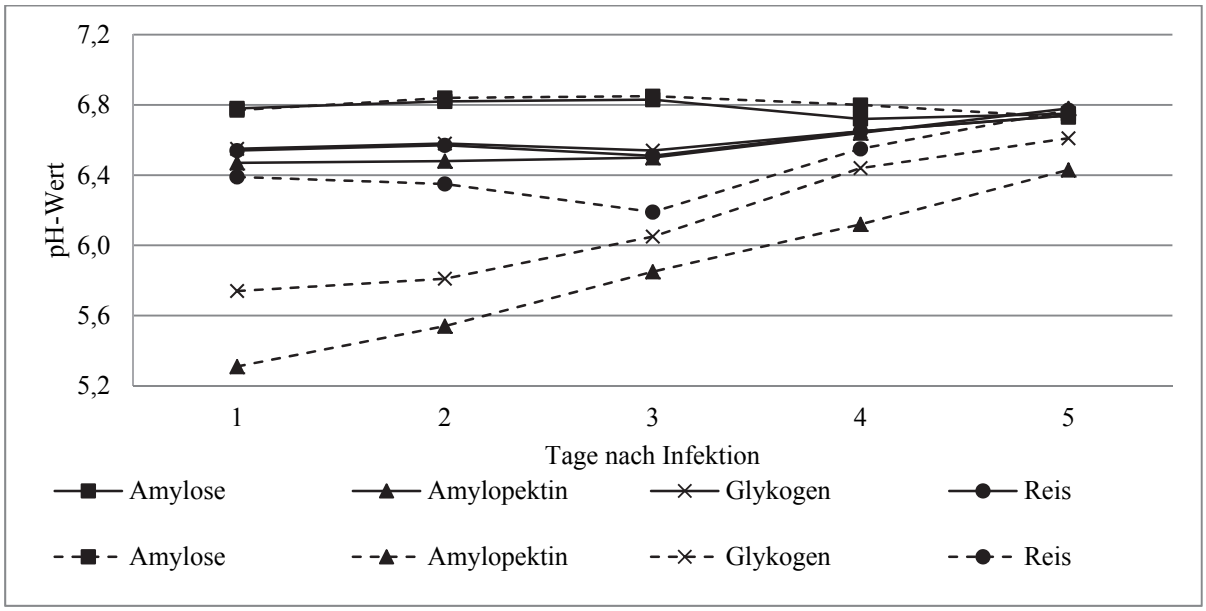


Abbildung 25: pH-Wert in Abhängigkeit von der Kohlenhydratquelle in PBS mit 5 g/L NaCl; pH-Werte mit 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES sind durch durchgehende Linien gekennzeichnet, pH-Werte ohne die beiden Puffer mit gestrichelten Linien

4.2.2 Versuche zur Eignung von Glukose

Um die Eignung von Glukose als alleinige Kohlenhydratquelle zu testen, wurden Histomonaden in PBS mit 5 g/L NaCl, ohne die Puffer MOPS und HEPES und ohne Reis kultiviert. Unterschiedliche Konzentrationen an Glukose wurden hinzugegeben: 1, 2, 3, 4 und 5 g/L. Die Ermittlung des Wachstums erfolgte über vier Tage.

Alle Versuche wurden doppelt angesetzt. In die Auswertung floss jeweils der Mittelwert ein.

In keiner der Kulturen mit Glukose kam es zu einer Vermehrung der Histomonaden. Je höher die Konzentration an Glukose war, desto stärker fiel die Zahl der Histomonaden pro Milliliter ab (Tabelle 21 und Abbildung 26).

Die beiden Kontrollkulturen mit Reis statt Glukose, einmal mit und einmal ohne 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES wuchsen beide gut.

Tabelle 21: Histomonadenzahlen pro Milliliter in Abhängigkeit von der Glukose- und Reis-Konzentration; Inokulationsdosis: 32.500 Histomonaden pro Milliliter; s = Standardabweichung

Konzentration Glukose	**Konzentration Reis, MOPS, HEPES**	**Tage nach Inokulation**			
		1	2	3	4
		Hm/ml			
Glukose 1 g/L	0 g/L	92.500 (s = 7.500)	87.500 (s = 2.500)	57.500 (s = 2.500)	14.375 (s = 4.375)
Glukose 2 g/L	0 g/L	33.125 (s = 6.875)	36.875 (s = 18.125)	11.250 (s = 2.500)	1.875 (s = 625)
Glukose 3 g/L	0 g/L	20.000 (s = 2.500)	5.000 (s = 1.250)	6.250 (s = 1.250)	625 (s = 625)
Glukose 4 g/L	0 g/L	20.000 (s = 1.250)	6.875 (s = 625)	6.250 (s = 1.250)	1.875 (s = 625)
Glukose 5 g/L	0 g/L	20.625 (s = 625)	4.375 (s = 625)	3.125 (s = 625)	625 (s = 625)
0 g/L	Reis 2 g/L	117.500 (s = 2.500)	117.500 (s = 2.500)	167.500 (s = 17.500)	210.000 (s = 10.000)
0 g/L	Reis 2 g/L, MOPS 100 mmol/L, HEPES 100 mmol/L	95.000 (s = 5.000)	72.500 (s = 12.500)	142.500 (s = 22.500)	120.000 (s = 10.000)

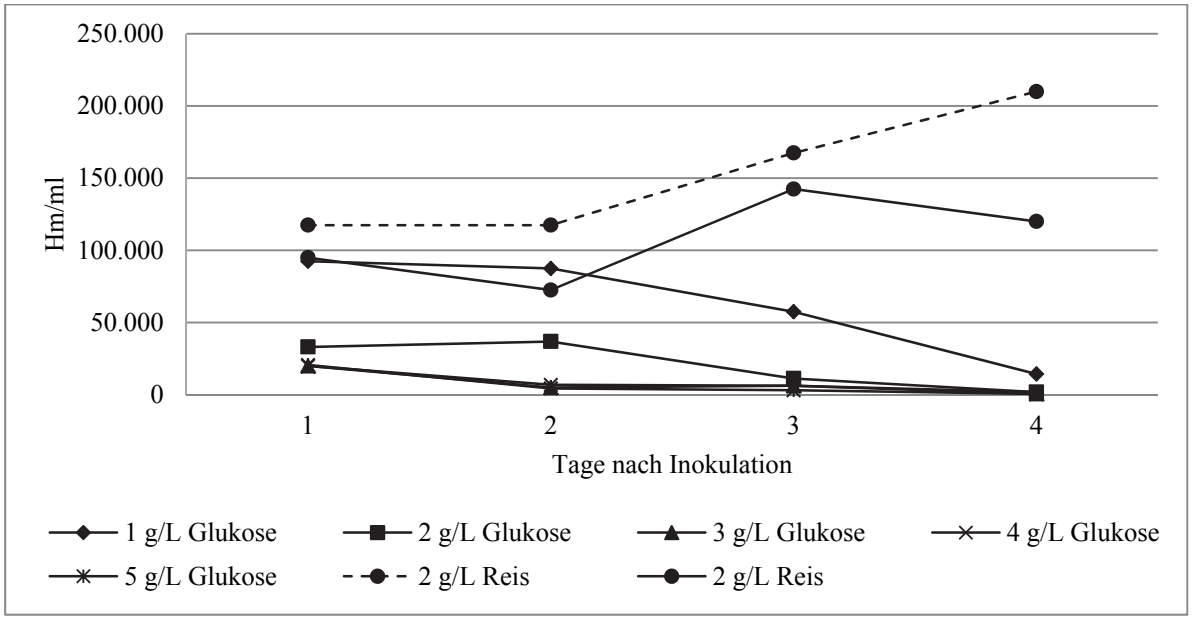


Abbildung 26: Wachstum mit unterschiedlichen Glukose-Konzentrationen in PBS mit 5 g/L NaCl; die Wachstumskurve mit 2 g/L Reis sowie 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES ist durch eine durchgehende Linie gekennzeichnet, die Wachstumskurve mit 2 g/L Reis ohne die beiden Puffer mit einer gestrichelten Linie

Zusätzlich wurde während der vier Tage der pH-Wert aller Kulturen gemessen (Abbildung 27). Wurde den Kulturen keine bzw. nur wenig Glukose (1 g/L) hinzugegeben, so blieb der pH-Wert relativ konstant bei über 6. In hohen Konzentrationen (3-5 g/L) führte die Glukose ebenfalls zu einem relativ konstanten pH-Wert. Dieser lag allerdings mit 4 bis 4,5

viel niedriger. Eine Ausnahme stellte die Kultur mit Glukose in einer Konzentration von 2 g/L dar: hier stieg der pH-Wert über die einzelnen Tage von knapp unter 5 auf fast 6 stark an.

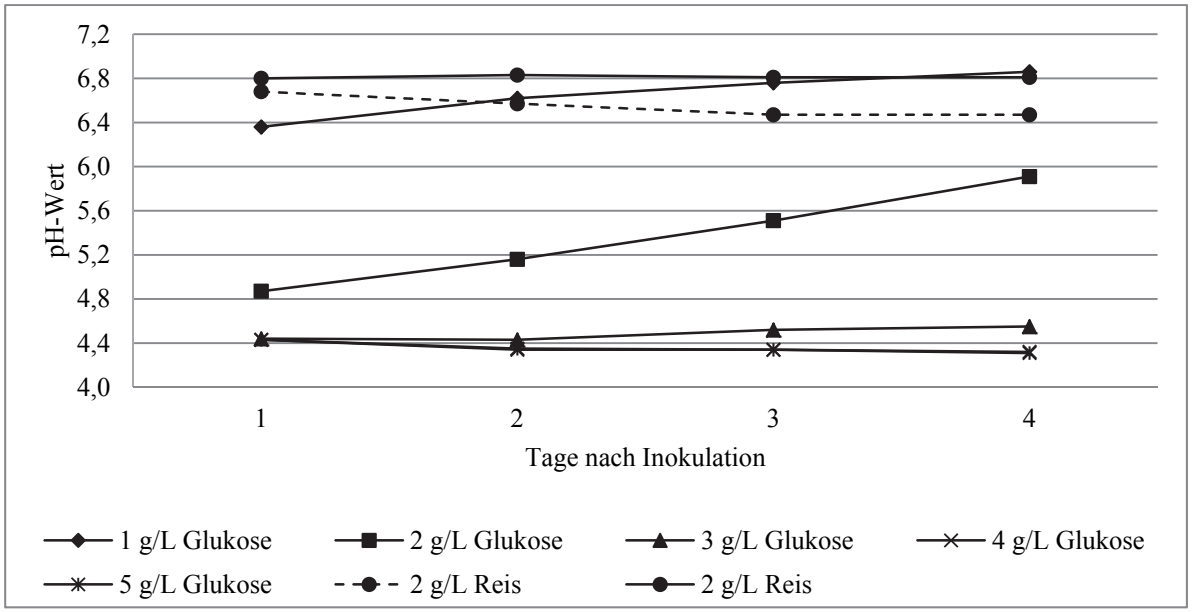


Abbildung 27: pH-Wert in Abhängigkeit von der Glukose-Konzentration in PBS mit 5 g/L NaCl; pH-Werte mit 2 g/L Reis sowie 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES sind durch eine durchgehende Linie gekennzeichnet, pH-Werte mit 2 g/L Reis ohne die beiden Puffer mit einer gestrichelten Linie

Um die teilweise stark fallenden pH-Werte abzupuffern, und so eventuell ein Histomonaden-Wachstum herbeizuführen, wurde den Kulturen mit verschiedenen Glukose-Konzentrationen 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES hinzugegeben. Die Ansätze, die jeweils im Duplikat angesetzt wurden, erfolgten mit und ohne Zugabe von Reis. Gezählt wurde fünf Tage lang. Zur Auswertung wurde der Mittelwert gebildet.

Der Ansatz mit 5 g/L Glukose, MOPS und HEPES, aber ohne Reis zeigte kein Wachstum. Alle übrigen Ansätze, denen Glukose hinzugegeben wurde, überlebten (Tabelle 22 und Abbildung 28).

Die Kontrolle ohne Glukose, mit MOPS, HEPES und Reis wuchs gut, wohingegen die Kultur ohne Reis abstarb.

Tabelle 22: Histomonadenzahlen pro Milliliter in Abhängigkeit von der Glukose- und Reis-Konzentration, mit 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES; Inokulationsdosis: 35.000 Histomonaden pro Milliliter; s = Standardabweichung

Konzentration Glukose	**Konzentration Reis**	**Tage nach Inokulation**				
		1	2	3	4	5
		Hm/ml				
0 g/L	0 g/L	52.500 (s = 2.500)	25.625 (s = 1.875)	10.625 (s = 625)	13.125 (s = 625)	9.375 (s = 625)
2 g/L	0 g/L	57.500 (s = 2.500)	60.000 (s = 5.000)	25.000 (s = 10.000)	41.875 (s = 13.125)	35.000 (s = 0)
5 g/L	0 g/L	40.625 (s = 14.375)	72.500 (s = 12.500)	35.000 (s = 1.250)	27.500 (s = 0)	21.875 (s = 1.875)
0 g/L	2 g/L	42.500 (s = 7.500)	87.500 (s = 2.500)	140.000 (s = 5.000)	122.500 (s = 2.500)	102.500 (s = 2.500)
2 g/L	2 g/L	42.500 (s = 7.500)	57.500 (s = 2.500)	82.500 (s = 2.500)	72.500 (s = 2.500)	60.000 (s = 10.000)
5 g/L	2 g/L	57.500 (s = 7.500)	26.875 (s = 3.215)	60.000 (s = 5.000)	52.500 (s = 2.500)	44.375 (s = 5.625)

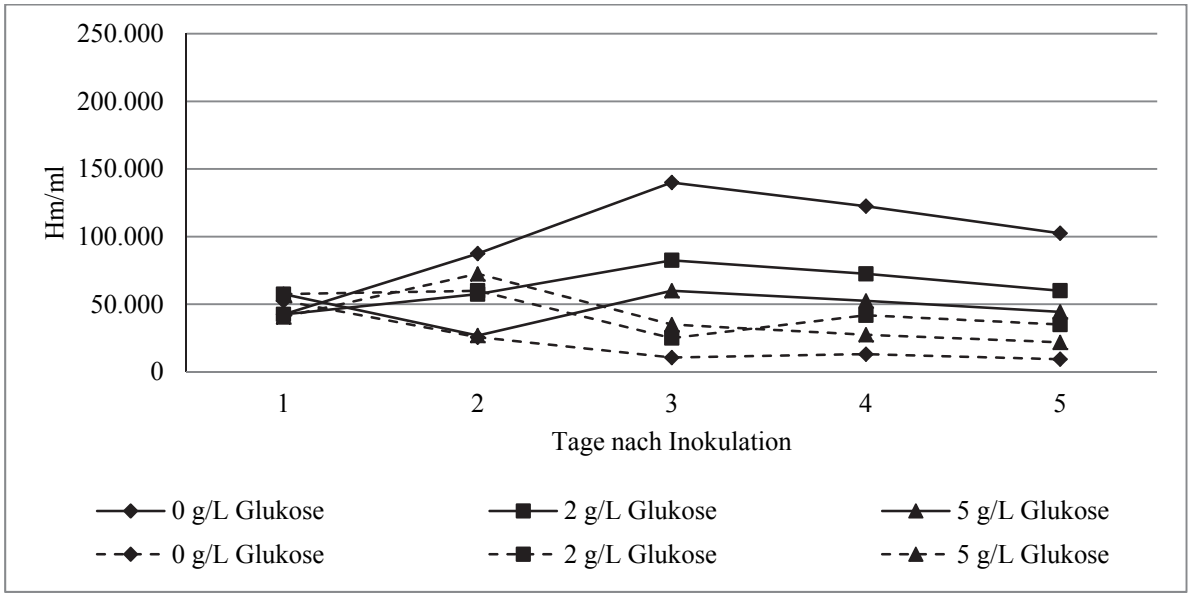


Abbildung 28: Wachstum mit unterschiedlichen Glukose-Konzentrationen mit 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES in PBS mit 5 g/L NaCl; Wachstumskurven mit 2 g/L Reis sind durch durchgehende Linien gekennzeichnet, Wachstumskurven ohne Reis mit gestrichelten Linien

Der pH-Wert der einzelnen Kulturen blieb über die fünf Tage hinweg relativ konstant in einem Bereich von 6 (Abbildung 29). Nur in den beiden Ansätzen mit einer Glukose-Konzentration von 5 g/L fiel der pH-Wert kurzzeitig unter 6, um dann wieder leicht anzusteigen.

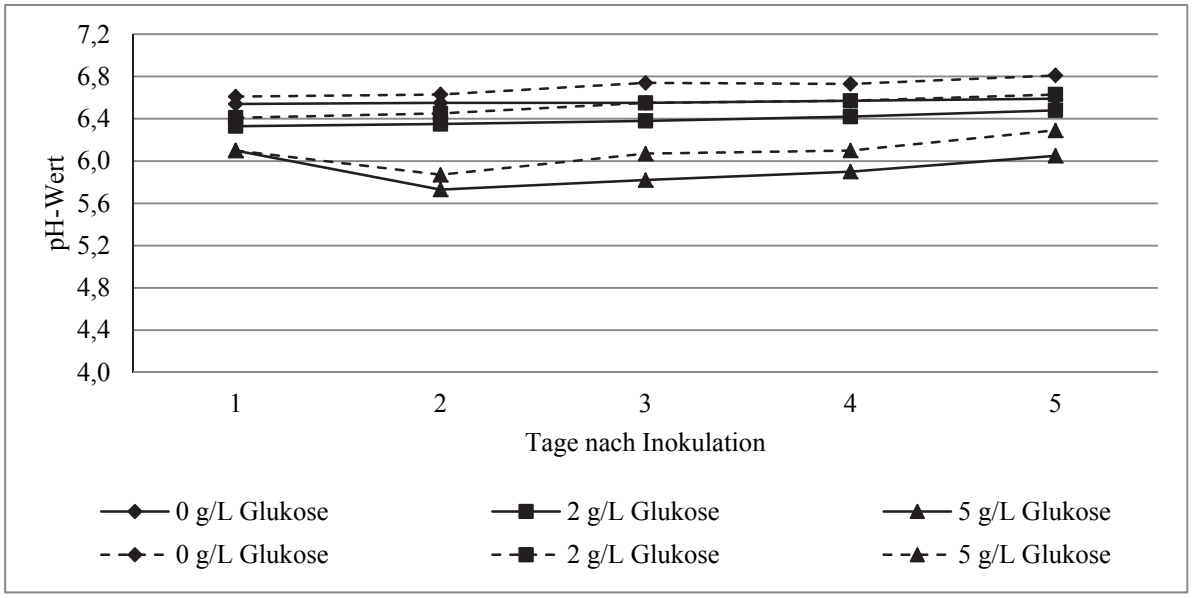


Abbildung 29: pH-Wert in Abhängigkeit von der Glukose-Konzentration mit 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES in PBS mit 5 g/L NaCl; Wachstumskurven mit 2 g/L Reis sind durch durchgehende Linien gekennzeichnet, Wachstumskurven ohne Reis mit gestrichelten Linien

Im vorangegangenen Versuchsteil wurden nur die Glukose-Konzentrationen 2 und 5 g/L getestet. Da dies eine ziemlich weite Spanne ist, wurde dieser Teil wiederholt, wobei zusätzlich die Glukose-Konzentrationen 1, 3 und 4 g/L mitgeführt wurden. Dies hatte zum Ziel, ein eventuelles Wachstum bei diesen Konzentrationen zu detektieren. Auch hier wurden jeweils zwei Replikate angesetzt und für die Auswertung wurde der Mittelwert gebildet.

Alle Kulturen, denen kein Reis hinzugegeben wurde (Tabelle 23, Abbildung 30 und Abbildung 31), starben ab. Auch im ersten Versuchsteil starben die Histomonaden unter diesen Bedingungen ab, mit Ausnahme der Kultur mit 2 g/L Glukose ohne Reis, die überlebte. Wurde zur Glukose auch Reis hinzugegeben, überlebten die Kulturen.

Die beiden Konrollen ohne Glukose, aber mit Reis vermehrten sich gut.

Tabelle 23: Histomonadenzahlen pro Milliliter in Abhängigkeit von der Glukose-, MOPS-, HEPES- und Reis-Konzentration; Inokulationsdosis: 35.000 Histomonaden pro Milliliter; s = Standardabweichung

Konzentration Glukose	Konzentration MOPS	Konzentration HEPES	Konzentration Reis	Tage nach Inokulation				
				1	2	3	4	5
				Hm/ml				
1 g/L	100 mmol/L	50 mmol/L	0 g/L	26.875 (s = 6.875)	32.500 (s = 6.250)	23.750 (s = 10.000)	10.625 (s = 3.125)	4.375 (s = 625)
2 g/L	100 mmol/L	50 mmol/L	0 g/L	41.250 (s = 18.750)	61.875 (s = 28.125)	45.000 (s = 10.000)	51.250 (s = 13.750)	25.000 (s = 8.750)
3 g/L	100 mmol/L	50 mmol/L	0 g/L	13.750 (s = 3.750)	19.375 (s = 625)	20.625 (s = 1.875)	15.000 (s = 5.000)	5.625 (s = 625)
4 g/L	100 mmol/L	50 mmol/L	0 g/L	15.000 (s = 1.250)	16.250 (s = 1.250)	16.875 (s = 5.625)	35.000 (s = 15.000)	5.625 (s = 1.875)
5 g/L	100 mmol/L	50 mmol/L	0 g/L	13.750 (s = 0)	8.750 (s = 2.500)	9.375 (s = 625)	11.250 (s = 1.250)	1.875 (s = 625)
1 g/L	100 mmol/L	50 mmol/L	2 g/L	32.500 (s = 3.750)	52.500 (s = 2.500)	62.500 (s = 2.500)	55.000 (s = 0)	62.500 (s = 2.500)
2 g/L	100 mmol/L	50 mmol/L	2 g/L	33.750 (s = 5.000)	51.250 (s = 8.750)	52.500 (s = 2.500)	72.500 (s = 7.500)	57.500 (s = 2.500)
3 g/L	100 mmol/L	50 mmol/L	2 g/L	30.625 (s = 6.875)	27.500 (s = 6.250)	30.625 (s = 13.125)	42.500 (s = 32.500)	42.500 (s = 12.500)
4 g/L	100 mmol/L	50 mmol/L	2 g/L	25.000 (s = 8.750)	27.500 (s = 2.500)	26.250 (s = 3.750)	42.500 (s = 27.500)	39.375 (s = 15.625)
5 g/L	100 mmol/L	50 mmol/L	2 g/L	43.125 (s = 16.875)	27.500 (s = 1.250)	41.875 (s = 3.125)	31.250 (s = 2.500)	33.750 (s = 7.500)
0 g/L	100 mmol/L	50 mmol/L	2 g/L	77.500 (s = 2.500)	75.000 (s = 0)	95.000 (s = 15.000)	112.500 (s = 7.500)	117.500 (s = 7.500)
0 g/L	0 mmol/L	0 mmol/L	2 g/L	55.000 (s = 5.000)	82.500 (s = 7.500)	72.500 (s = 7.500)	107.500 (s = 12.500)	80.000 (s = 5.000)

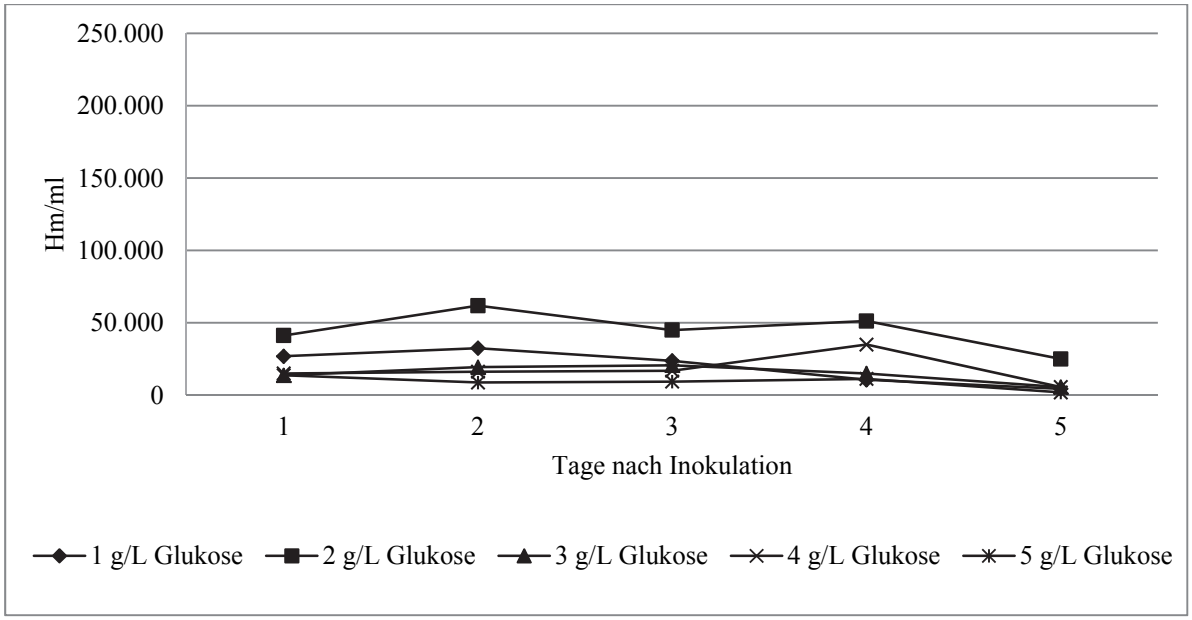


Abbildung 30: Wachstum mit unterschiedlichen Glukose-Konzentrationen mit 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES ohne Reis

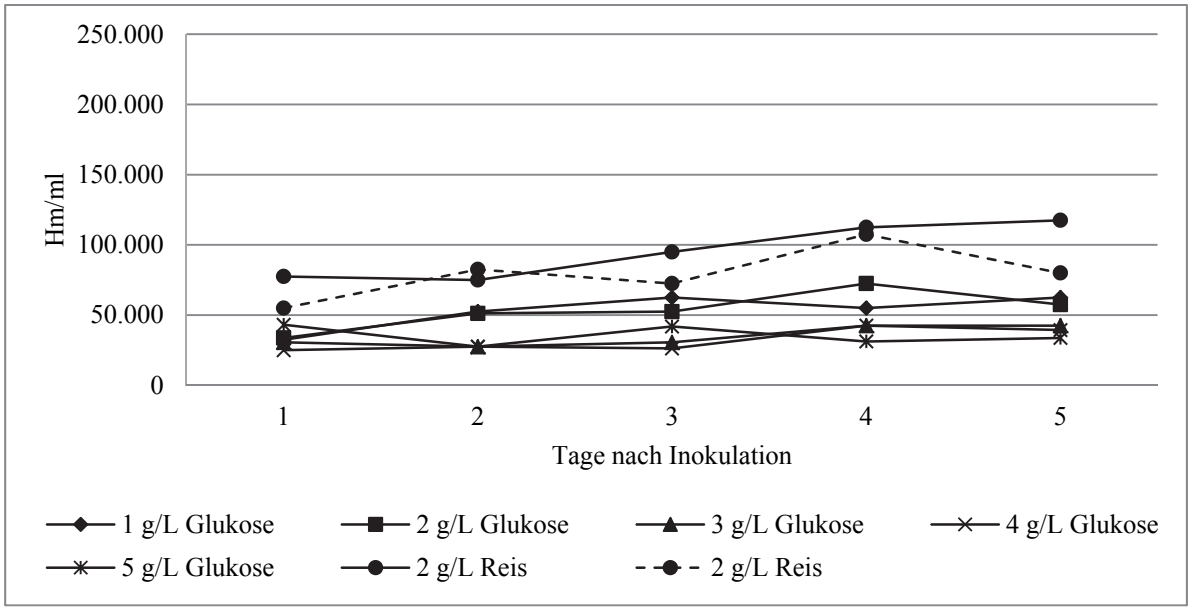


Abbildung 31: Wachstum mit unterschiedlichen Glukose-Konzentrationen mit 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES mit 2 g/L Reis; die Wachstumskurve mit 2 g/L Reis und MOPS und HEPES sind durch eine durchgehende Linie gekennzeichnet, die Wachstumskurve mit Reis ohne die beiden Puffer mit einer gestrichelten Linie

Auch die pH-Werte aus diesem Versuch waren vergleichbar mit denen aus dem vorherigen (Abildung 32 und Abbildung 33). Über die fünf Zähltage lag er in einem Bereich von 6. Auch diesmal zeigten die Kulturen mit einer Glukose-Konzentration von 5 g/L einen pH-Wert von unter 6, der diesmal allerdings nicht weiter anstieg, sondern in einem Bereich von 5,8 blieb.

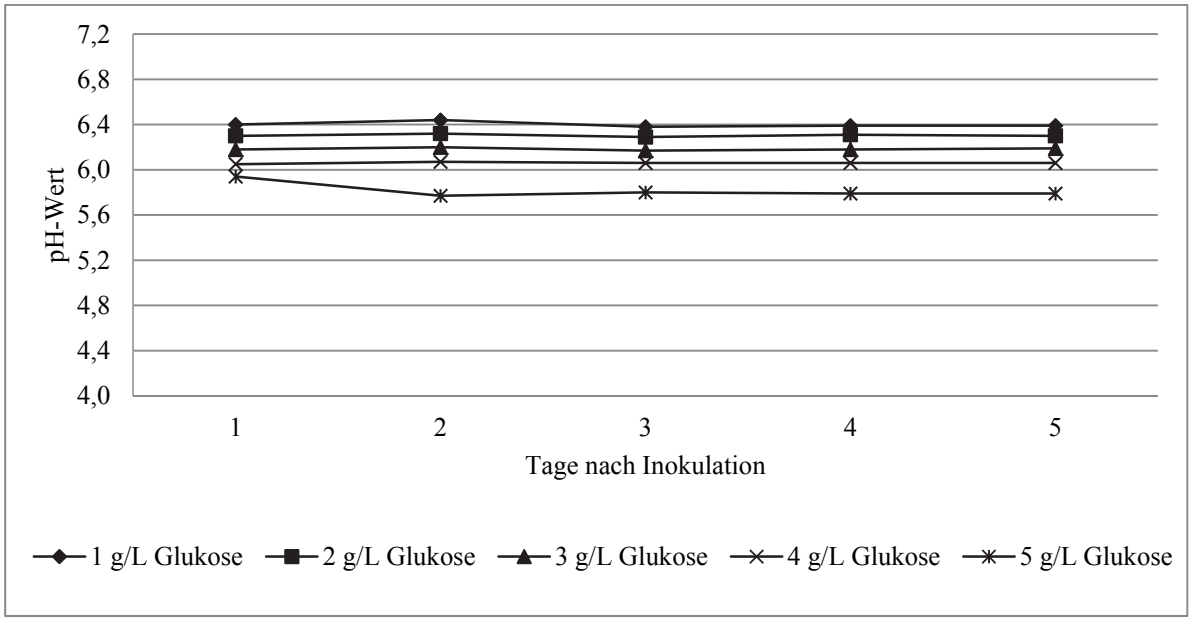


Abbildung 32: pH-Wert in Abhängigkeit von der Glukose-Konzentration mit 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES sowie ohne Reis

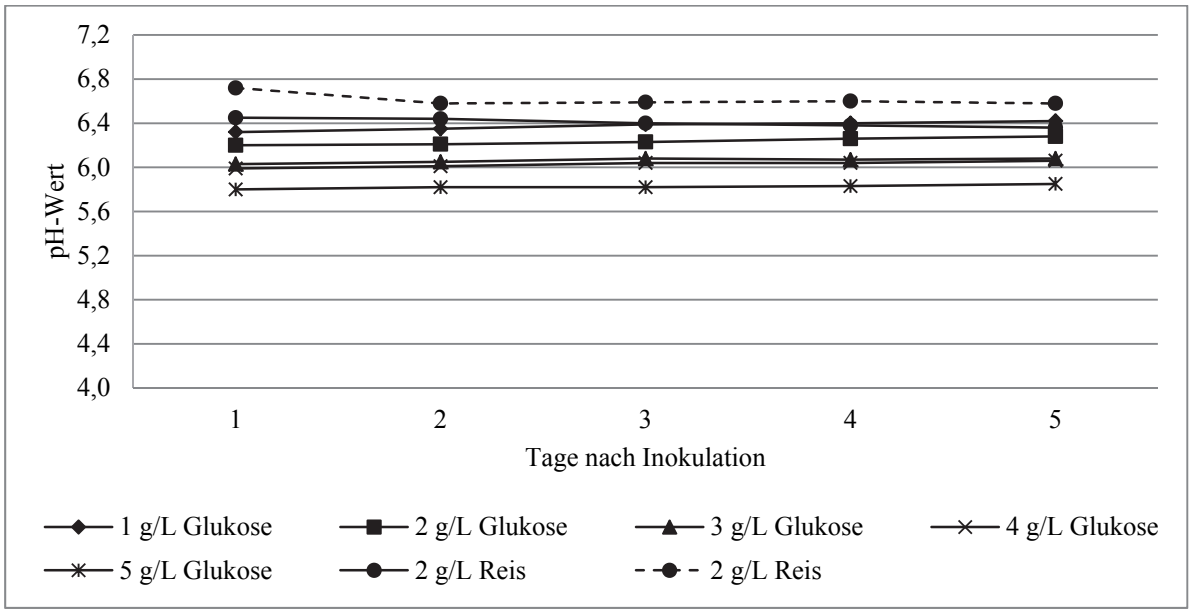


Abbildung 33: pH-Wert in Abhängigkeit von der Glukose-Konzentration mit 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES sowie mit 2 g/L Reis; pH-Werte mit 2 g/L Reis und MOPS und HEPES sind durch eine durchgehende Linie gekennzeichnet, pH-Werte mit Reis ohne die beiden Puffer mit einer gestrichelten Linie

4.2.3 Versuche zur Eignung von verschiedenen Zwischenprodukten des Kohlenhydratstoffwechsels als Kohlenhydratquelle in PBS

Ausgehend von den Ergebnissen der bisher durchgeführten Versuche wurden verschiedene Kohlenhydrate auf ihre Eignung für das Histomonaden-Wachstum getestet. Kultiviert wurden sie in PBS mit 5 g/L NaCl. Die entsprechende Kohlenhydratquelle wurde in den Konzentrationen 0 g/L, 2 g/L oder 5 g/L hinzugefügt. Das Medium wurde entweder mit MOPS und HEPES (100 mmol/L bzw. 50 mmol/L) abgepuffert oder die beiden Puffer wurden weggelassen. Zu den Ansätzen mit der jeweiligen Kohlenhydratquellen in den entsprechenden Konzentrationen mit und ohne MOPS und HEPES wurde Reis entweder in einer Konzentration von 2 g/L hinzugefügt oder Reis wurde weggelassen.

Nach diesem Schema wurden Pyruvat, Glukose-1-Phosphat, Glukose-6-Phosphat und Maltose getestet.

Von jeder Kultur wurden zwei Replikate angesetzt. Das Wachstum wurde täglich fünf Tage lang durch Zählen ermittelt. Auch der pH-Wert wurde täglich bei allen Kulturen fünf Tage lang gemessen. Anschließend wurde der entsprechende Mittelwert gebildet.

4.2.3.1 Pyruvat

In allen Ansätzen, in denen kein Reis hinzugegeben wurde, starben die Histomonaden ab. Lediglich bei einer Konzentration von 2 g/L Pyruvat und MOPS und HEPES überlebten sie.

Bei Zugabe von Reis dagegen vermehrten sich die Histomonaden gut (Tabelle 24, Abbildung 34 und Abbildung 35).

Die Kontrollkultur ohne Reis, mit MOPS und HEPES überlebte, was auf den Restreis zurückzuführen ist. Ohne MOPS und HEPES konnte kein Wachstum festgestellt werden.

Beide Kontrollen mit Reis wuchsen gut.

Tabelle 24: Histomonadenzahlen pro Milliliter in Abhängigkeit von der Pyruvat-, MOPS-, HEPES- und Reis-Konzentration; Inokulationsdosis: 36.500 Histomonaden pro Milliliter; s = Standardabweichung

Konzentration Pyruvat	**Konzentration MOPS**	**Konzentration HEPES**	**Konzentration Reis**	**Tage nach Inokulation**				
				1	2	3	4	5
				Hm/ml				
0 g/L	100 mmol/L	50 mmol/L	2 g/L	135.000 (s = 5.000)	145.000 (s = 10.000)	170.000 (s = 20.000)	215.000 (s = 20.000)	255.000 (s = 20.000)
2 g/L	100 mmol/L	50 mmol/L	2 g/L	92.500 (s = 2.500)	152.500 (s = 2.500)	167.500 (s = 2.500)	170.000 (s = 5.000)	150.000 (s = 15.000)
5 g/L	100 mmol/L	50 mmol/L	2 g/L	82.500 (s = 17.500)	60.000 (s = 5.000)	97.500 (s = 2.500)	100.000 (s = 15.000)	125.000 (s = 0)
0 g/L	100 mmol/L	50 mmol/L	0 g/L	62.500 (s = 2.500)	52.500 (s = 2.500)	55.000 (s = 5.000)	39.375 (s = 10.625)	45.000 (s = 5.000)
2 g/L	100 mmol/L	50 mmol/L	0 g/L	92.500 (s = 12.500)	60.000 (s = 0)	62.500 (s = 2.500)	65.000 (s = 0)	35.000 (s = 15.000)
5 g/L	100 mmol/L	50 mmol/L	0 g/L	80.000 (s = 10.000)	52.500 (s = 2.500)	82.500 (s = 2.500)	38.750 (s = 1.250)	28.750 (s = 5.000)
0 g/L	0 mmol/L	0 mmol/L	2 g/L	132.500 (s = 7.500)	207.500 (s = 7.500)	180.000 (s = 10.000)	205.000 (s = 5.000)	242.500 (s = 42.500)
2 g/L	0 mmol/L	0 mmol/L	2 g/L	117.500 (s = 27.500)	140.000 (s = 0)	187.500 (s = 37.500)	127.500 (s = 12.500)	210.000 (s = 10.000)
5 g/L	0 mmol/L	0 mmol/L	2 g/L	127.500 (s = 12.500)	130.000 (s = 5.000)	112.500 (s = 12.500)	140.000 (s = 40.000)	190.000 (s = 15.000)
0 g/L	0 mmol/L	0 mmol/L	0 g/L	90.000 (s = 15.000)	57.500 (s = 2.500)	22.500 (s = 5.000)	8.750 (s = 5.000)	9.375 (s = 4.375)
2 g/L	0 mmol/L	0 mmol/L	0 g/L	100.000 (s = 0)	57.500 (s = 2.500)	52.500 (s = 2.500)	28.125 (s = 3.125)	25.625 (s = 625)
5 g/L	0 mmol/L	0 mmol/L	0 g/L	70.000 (s = 0)	70.000 (s = 10.000)	55.000 (s = 5.000)	41.250 (s = 8.750)	21.875 (s = 1.875)

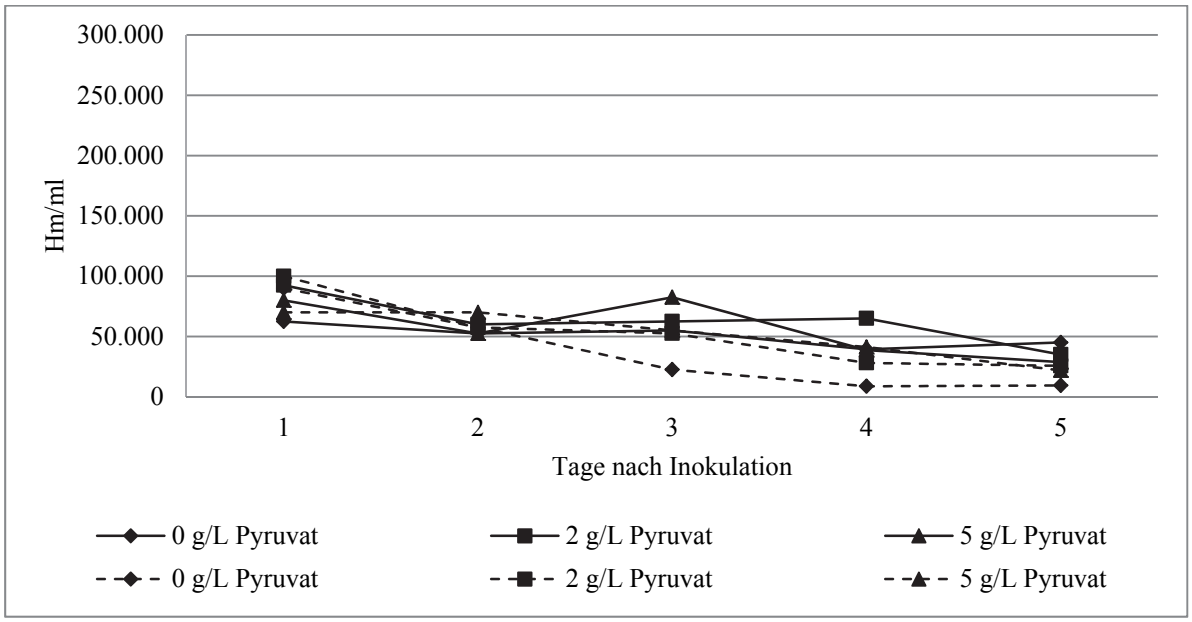


Abbildung 34: Wachstum mit unterschiedlichen Pyruvat-Konzentrationen, ohne Reis; Wachstumskurven mit 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES sind durch durchgehende Linien gekennzeichnet, Wachstumskurven ohne die beiden Puffer mit gestrichelten Linien

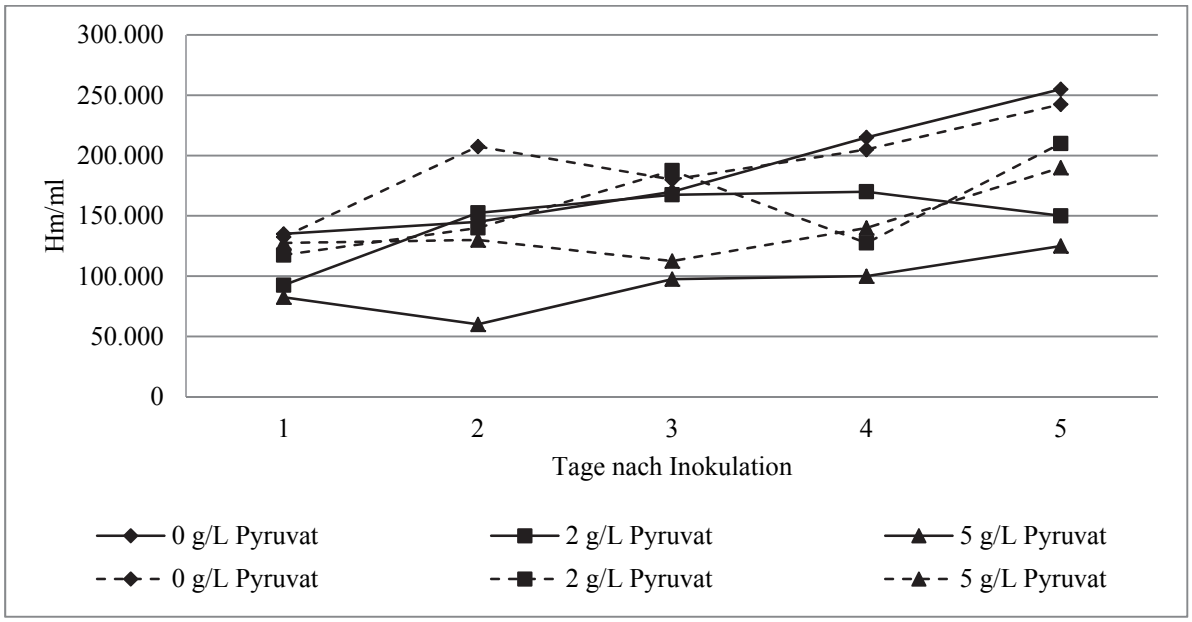


Abbildung 35: Wachstum mit unterschiedlichen Pyruvat-Konzentrationen, mit 2 g/L Reis; Wachstumskurven mit 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES sind durch durchgehende Linien gekennzeichnet, Wachstumskurven ohne die beiden Puffer mit gestrichelten Linien

Der pH-Wert aller Kulturen mit MOPS und HEPES, mit und ohne Reis lag konstant in einem Bereich von 6 (Abbildung 36 und Abbildung 37).

Bei allen Kulturen ohne MOPS und HEPES wurde ein pH-Wert über 7 gemessen. Ausnahme hiervon war die Kontrollkultur mit Reis, bei der der pH-Wert unter 7 lag.

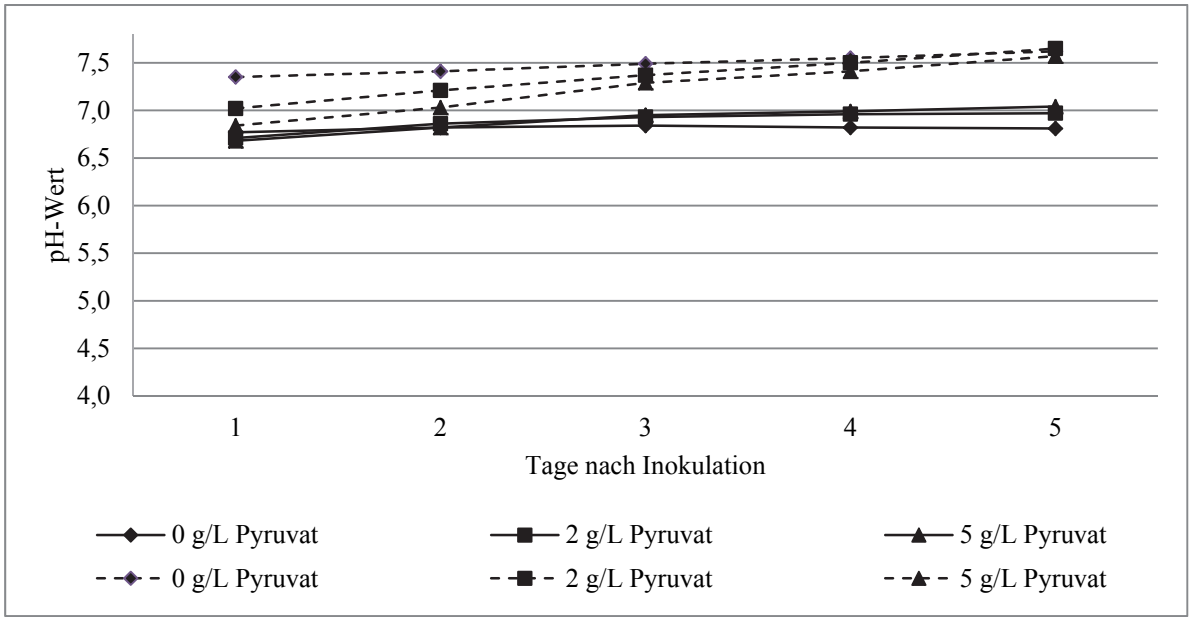


Abbildung 36: pH-Wert in Abhängigkeit von der Pyruvat-Konzentration, ohne Reis; pH-Werte mit 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES sind durch durchgehende Linien gekennzeichnet, pH-Werte ohne die beiden Puffer mit gestrichelten Linien

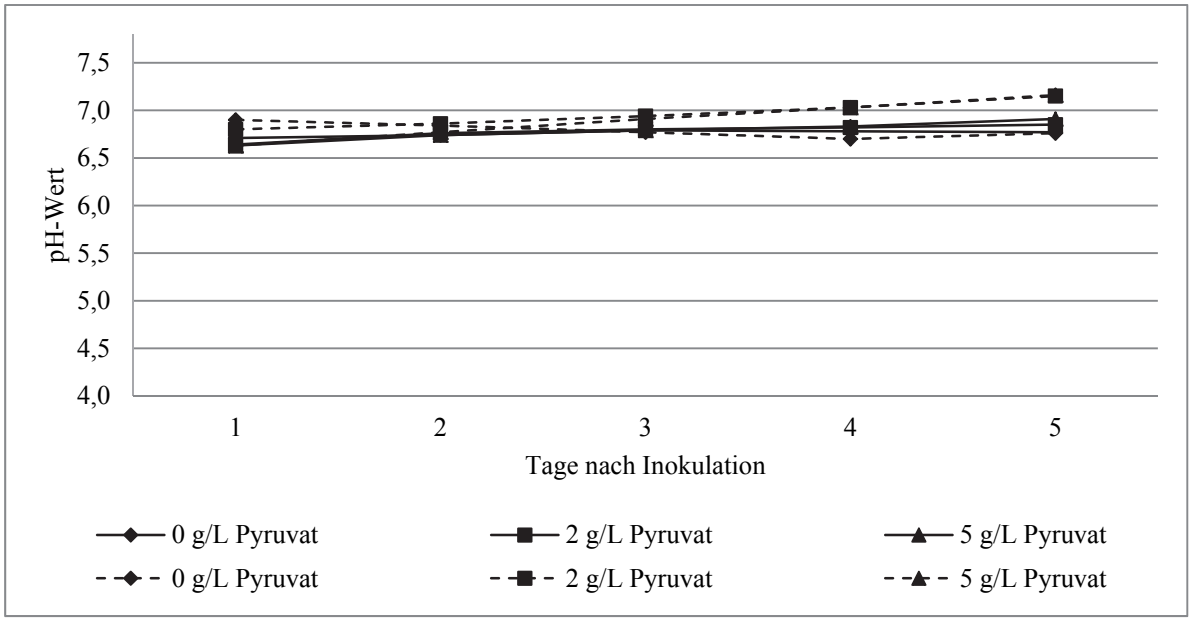


Abbildung 37: pH-Wert in Abhängigkeit von der Pyruvat-Konzentration, mit 2 g/L Reis; pH-Werte mit 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES sind durch durchgehende Linien gekennzeichnet, pH-Werte ohne die beiden Puffer mit gestrichelten Linien

4.2.3.2 Glukose-1-Phosphat

In den Ansätzen ohne Reis kam es entweder zu keinem Wachstum oder die Kulturen überlebten.

Wie bei den Ansätzen mit Pyruvat vermehrten sich die Histomonaden in allen Kulturen mit Reis gut (Tabelle 25, Abbildung 38 und Abbildung 39).

Die Kontrollen ohne Reis starben ab. Dahingegen vermehrten sie sich mit Reis gut.

Tabelle 25: Histomonadenzahlen pro Milliliter in Abhängigkeit von der Glukose-1-Phosphat-, MOPS-, HEPES- und Reis-Konzentration; Inokulationsdosis: 32.500 Histomonaden pro Milliliter; s = Standardabweichung

Konzentration Glu-1-P	**Konzentration MOPS**	**Konzentration HEPES**	**Konzentration Reis**	**Tage nach Inokulation**				
				1	2	3	4	5
				Hm/ml				
0 g/L	100 mmol/L	50 mmol/L	2 g/L	145.000 (s = 5.000)	190.000 (s = 25.000)	240.000 (s = 25.000)	245.000 (s = 0)	265.000 (s = 20.000)
2 g/L	100 mmol/L	50 mmol/L	2 g/L	95.000 (s = 5.000)	142.500 (s = 7.500)	170.000 (s = 5.000)	135.000 (s = 5.000)	152.500 (s = 12.500)
5 g/L	100 mmol/L	50 mmol/L	2 g/L	72.500 (s = 2.500)	97.500 (s = 2.500)	132.500 (s = 12.500)	117.500 (s = 7.500)	137.500 (s = 2.500)
0 g/L	100 mmol/L	50 mmol/L	0 g/L	90.000 (s = 10.000)	57.500 (s = 7.500)	41.875 (s = 13.125)	17.500 (s = 6.250)	14.375 (s = 625)
2 g/L	100 mmol/L	50 mmol/L	0 g/L	95.000 (s = 5.000)	62.500 (s = 12.500)	55.000 (s = 5.000)	42.500 (s = 7.500)	31.875 (s = 4.375)
5 g/L	100 mmol/L	50 mmol/L	0 g/L	62.500 (s = 12.500)	60.000 (s = 5.000)	60.000 (s = 0)	41.250 (s = 13750)	23.125 (s = 1.875)
0 g/L	0 mmol/L	0 mmol/L	2 g/L	155.000 (s = 5.000)	135.000 (s = 20.000)	180.000 (s = 10.000)	185.000 (s = 35.000)	225.000 (s = 25.000)
2 g/L	0 mmol/L	0 mmol/L	2 g/L	122.500 (s = 22.500)	132.500 (s = 2.500)	155.000 (s = 25.000)	182.500 (s = 2.500)	200.000 (s = 10.000)
5 g/L	0 mmol/L	0 mmol/L	2 g/L	102.500 (s = 2.500)	137.500 (s = 17.500)	157.500 (s = 12.500)	137.500 (s = 32.500)	137.500 (s = 2.500)
0 g/L	0 mmol/L	0 mmol/L	0 g/L	95.000 (s = 30.000)	36.875 (s = 13.125)	14.375 (s = 5.625)	10.625 (s = 1.875)	8.750 (s = 1.250)
2 g/L	0 mmol/L	0 mmol/L	0 g/L	57.500 (s = 2.500)	87.500 (s = 2.500)	65.000 (s = 5.000)	65.000 (s = 10.000)	60.000 (s = 10.000)
5 g/L	0 mmol/L	0 mmol/L	0 g/L	60.000 (s = 10.000)	55.000 (s = 5.000)	60.000 (s = 5.000)	52.500 (s = 2.500)	38.125 (s = 16.875)

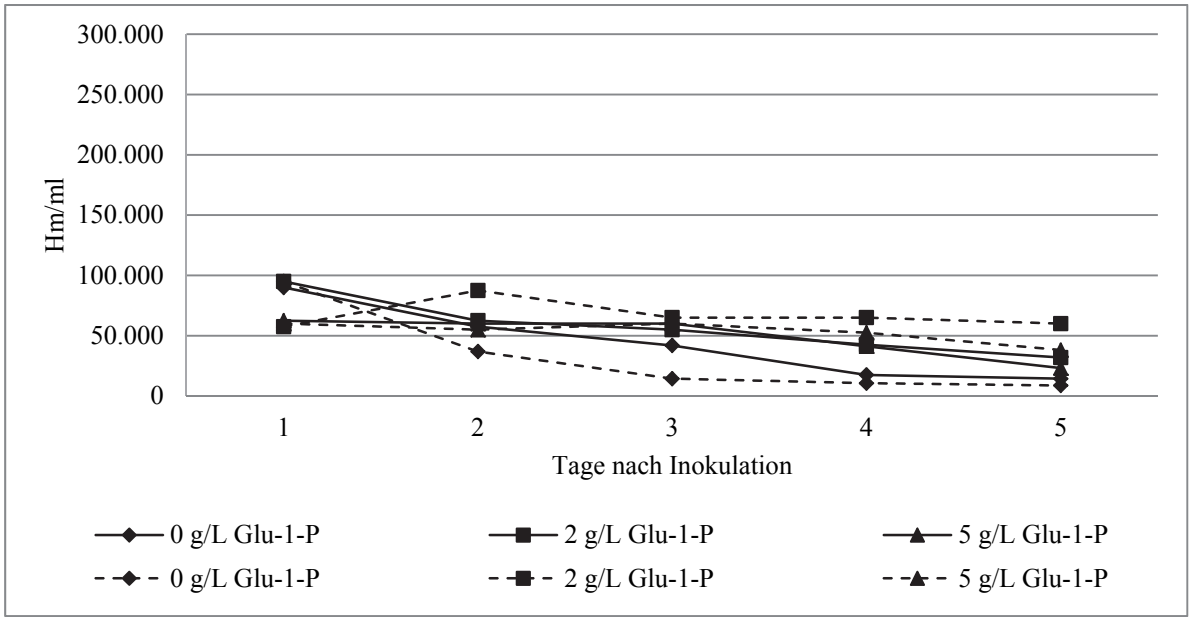


Abbildung 38: Wachstum mit unterschiedlichen Glukose-1-Phosphat-Konzentrationen, Wachstumskurven mit 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES sind durch durchgehende Linien gekennzeichnet, Wachstumskurven ohne die beiden Puffer mit gestrichelten Linien

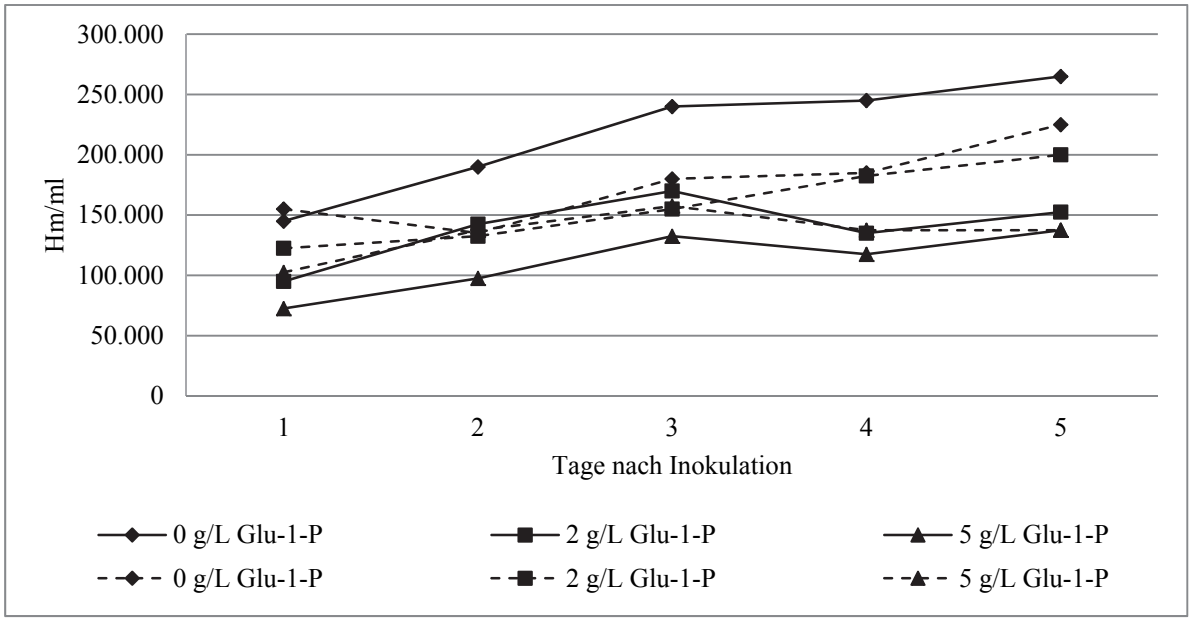


Abbildung 39: Wachstum mit unterschiedlichen Glukose-1-Phosphat-Konzentrationen, mit Reis; Wachstumskurven mit 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES sind durch durchgehende Linien gekennzeichnet, Wachstumskurven ohne die beiden Puffer mit gestrichelten Linien

Die Messung des pH-Wertes ergab bei allen Kulturen einen Bereich von 6 (Abbildung 40 und Abbildung 41). Eine Ausnahme stellte die Kultur ohne Glukose-1-Phosphat, Reis, MOPS und HEPES dar: hier lag der pH-Wert bei 7,5.

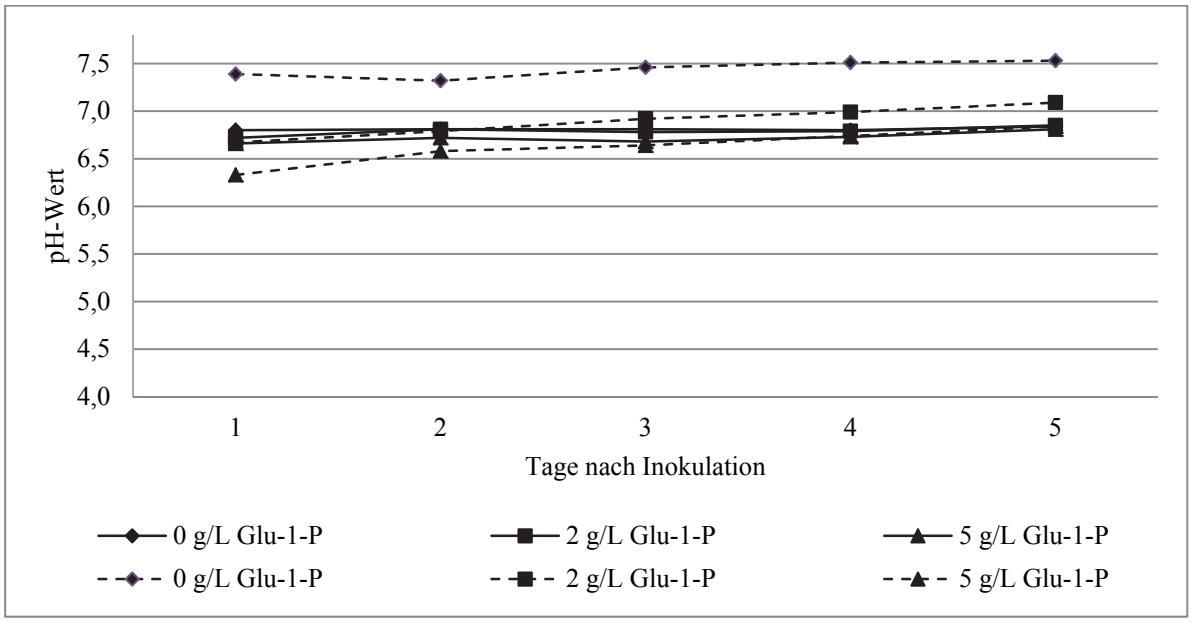


Abbildung 40: pH-Wert in Abhänhgigkeit von der Glukose-1-Phosphat-Konzentration, ohne Reis; pH-Werte mit 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES sind durch durchgehende Linien gekennzeichnet, pH-Werte ohne die beiden Puffer mit gestrichelten Linien

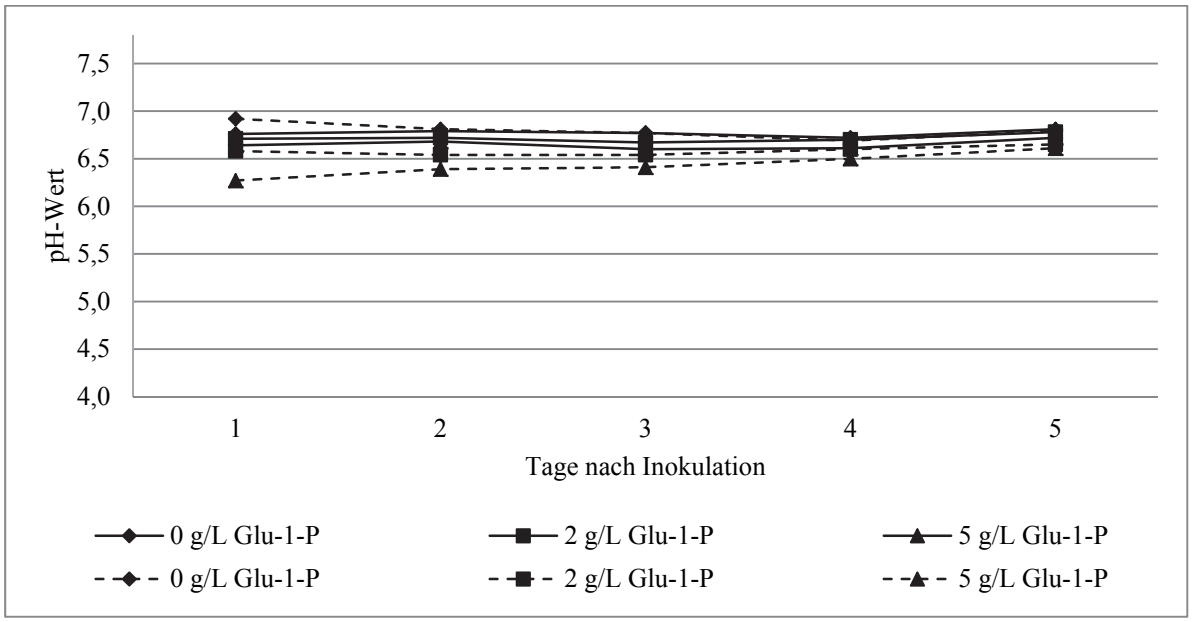


Abbildung 41: pH-Wert in Abhänhgigkeit von der Glukose-1-Phosphat-Konzentration, mit Reis; pH-Werte mit 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES sind durch durchgehende Linien gekennzeichnet, pH-Werte ohne die beiden Puffer mit gestrichelten Linien

4.2.3.3 Glukose-6-Phosphat

Ähnlich den Ansätzen mit Glukose-1-Phosphat kam es auch hier bei den Kulturen ohne Reis zu keinem Wachstum oder höchstens zu einem Überleben (Tabelle 26, Abbildung 42 und Abbildung 43).

Unter Zugabe von Reis zeigten die Histomonaden eine teilweise gute Vermehrung.

Die Kontrollkulturen wuchsen erwartungsgemäß, d. h. ohne Reis starben sie ab, mit Reis vermehrten sie sich.

Tabelle 26: Histomonadenzahlen pro Milliliter in Abhängigkeit von der Glukose-6-Phosphat-, MOPS-, HEPES- und Reis-Konzentration; Inokulationsdosis: 45.000 Histomonaden pro Milliliter; s = Standardabweichung

Konzentration Glu-6-P	**Konzentration MOPS**	**Konzentration HEPES**	**Konzentration Reis**	**Tage nach Inokulation**				
				1	2	3	4	5
				Hm/ml				
0 g/L	100 mmol/L	50 mmol/L	2 g/L	127.500 (s = 27.500)	225.000 (s = 25.000)	197.500 (s = 42.500)	202.500 (s = 7.500)	212.500 (s = 2.500)
2 g/L	100 mmol/L	50 mmol/L	2 g/L	75.000 (s = 0)	95.000 (s = 20.000)	127.500 (s = 17.500)	125.000 (s = 25.000)	162.500 (s = 12.500)
5 g/L	100 mmol/L	50 mmol/L	2 g/L	57.500 (s = 7.500)	90.000 (s = 5.000)	97.500 (s = 12.500)	77.500 (s = 7.500)	80.000 (s = 5.000)
0 g/L	100 mmol/L	50 mmol/L	0 g/L	85.000 (s = 5.000)	62.500 (s = 2.500)	52.500 (s = 2.500)	25.625 (s = 1.875)	16.875 (s = 625)
2 g/L	100 mmol/L	50 mmol/L	0 g/L	67.500 (s = 2.500)	67.500 (s = 7.500)	80.000 (s = 5.000)	92.500 (s = 7.500)	75.000 (s = 20.000)
5 g/L	100 mmol/L	50 mmol/L	0 g/L	60.000 (s = 5.000)	92.500 (s = 12.500)	82.500 (s = 7.500)	95.000 (s = 5.000)	72.500 (s = 2.500)
0 g/L	0 mmol/L	0 mmol/L	2 g/L	100.000 (s = 5.000)	147.500 (s = 7.500)	137.500 (s = 12.500)	182.500 (s = 12.500)	207.500 (s = 27.500)
2 g/L	0 mmol/L	0 mmol/L	2 g/L	112.500 (s = 7.500)	147.500 (s = 2.500)	102.500 (s = 7.500)	107.500 (s = 37.500)	107.500 (s = 17.500)
5 g/L	0 mmol/L	0 mmol/L	2 g/L	77.500 (s = 12.500)	115.000 (s = 20.000)	90.000 (s = 5.000)	117.500 (s = 17.500)	130.000 (s = 5.000)
0 g/L	0 mmol/L	0 mmol/L	0 g/L	105.000 (s = 10.000)	67.500 (s = 7.500)	21.250 (s = 1.250)	7.500 (s = 1.250)	7.500 (s = 1.250)
2 g/L	0 mmol/L	0 mmol/L	0 g/L	70.000 (s = 10.000)	87.500 (s = 2.500)	70.000 (s = 10.000)	57.500 (s = 7.500)	15.625 (s = 625)
5 g/L	0 mmol/L	0 mmol/L	0 g/L	65.000 (s = 0)	87.500 (s = 2.500)	52.500 (s = 2.500)	52.500 (s = 2.500)	42.500 (s = 17.500)

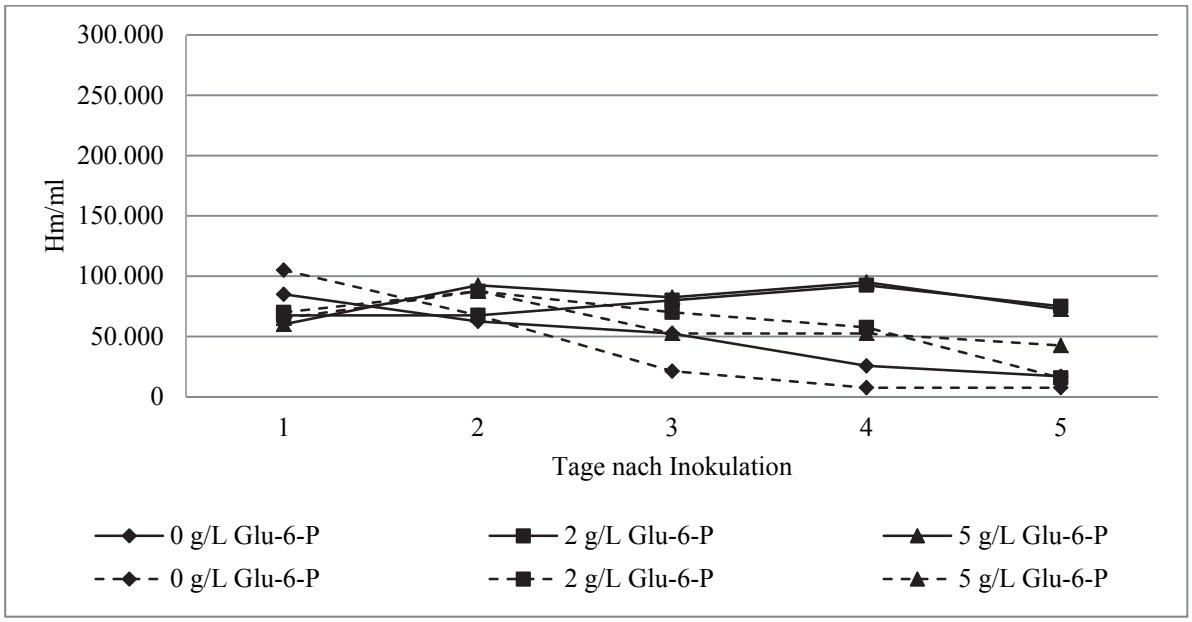


Abbildung 42: Wachstum mit unterschiedlichen Glukose-6-Phosphat-Konzentrationen, ohne Reis; Wachstumskurven mit 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES sind durch durchgehende Linien gekennzeichnet, Wachstumskurven ohne die beiden Puffer mit gestrichelten Linien

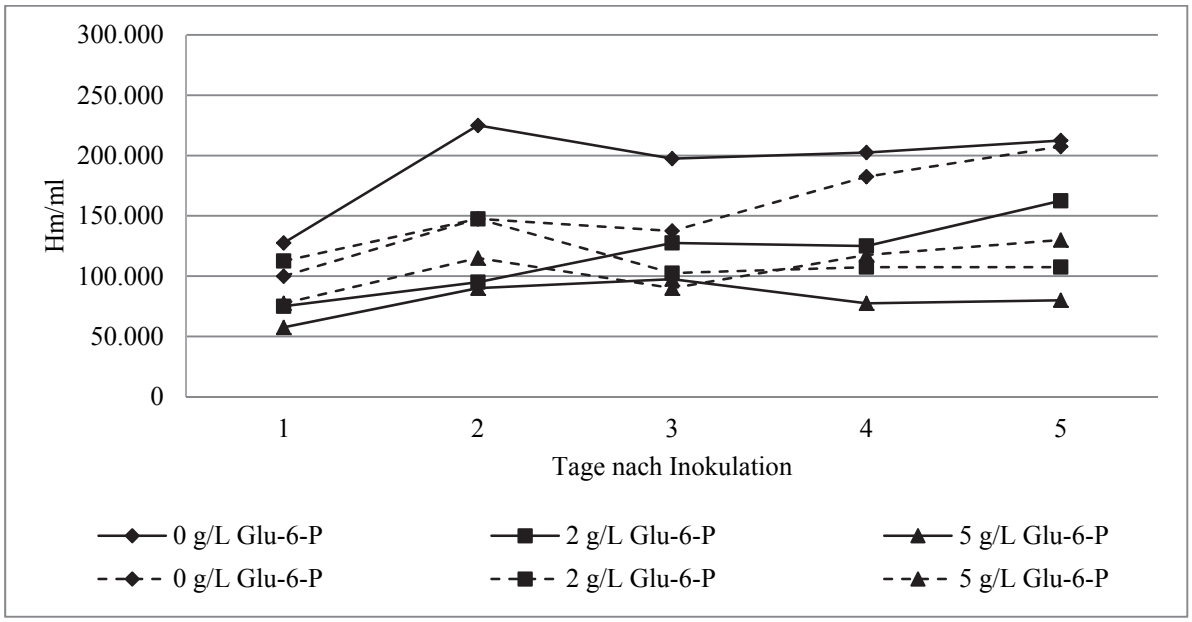


Abbildung 43: Wachstum mit unterschiedlichen Glukose-6-Phosphat-Konzentrationen, mit Reis; Wachstumskurven mit 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES sind durch durchgehende Linien gekennzeichnet, Wachstumskurven ohne die beiden Puffer mit gestrichelten Linien

Bei allen Ansätzen war der pH-Wert relativ konstant in einem Bereich von 6 (Abbildung 44 und Abbildung 45). Ausnahme hiervon waren die Ansätze ohne Reis, MOPS und HEPES: der Ansatz mit 5 g/L Glukose-6-Phosphat zeigte ebenfalls einen pH-Wert im

Bereich von 6. Bei 2 g/L Glukose-6-Phosphat stieg er auf knapp über 7 an, wohingegen er ohne Glukose-6-Phosphat ab dem ersten Tag über 7 lag.

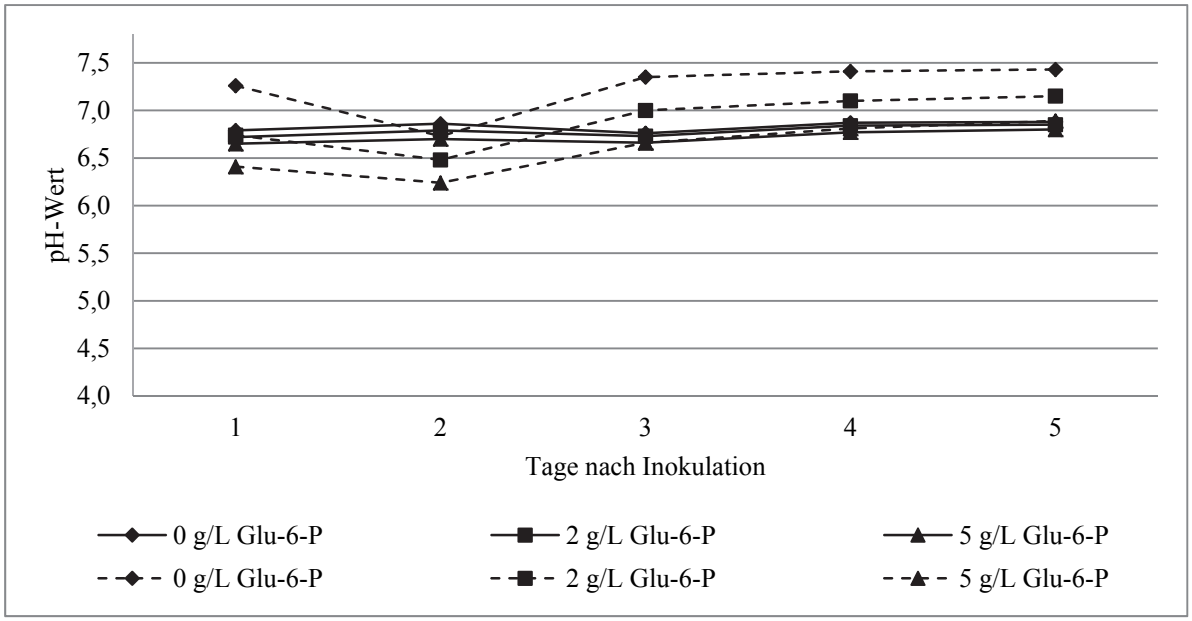


Abbildung 44: pH-Wert in Abhänhgigkeit von der Glukose-6-Phosphat-Konzentration, ohne Reis; pH-Werte mit 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES sind durch durchgehende Linien gekennzeichnet, pH-Werte ohne die beiden Puffer mit gestrichelten Linien

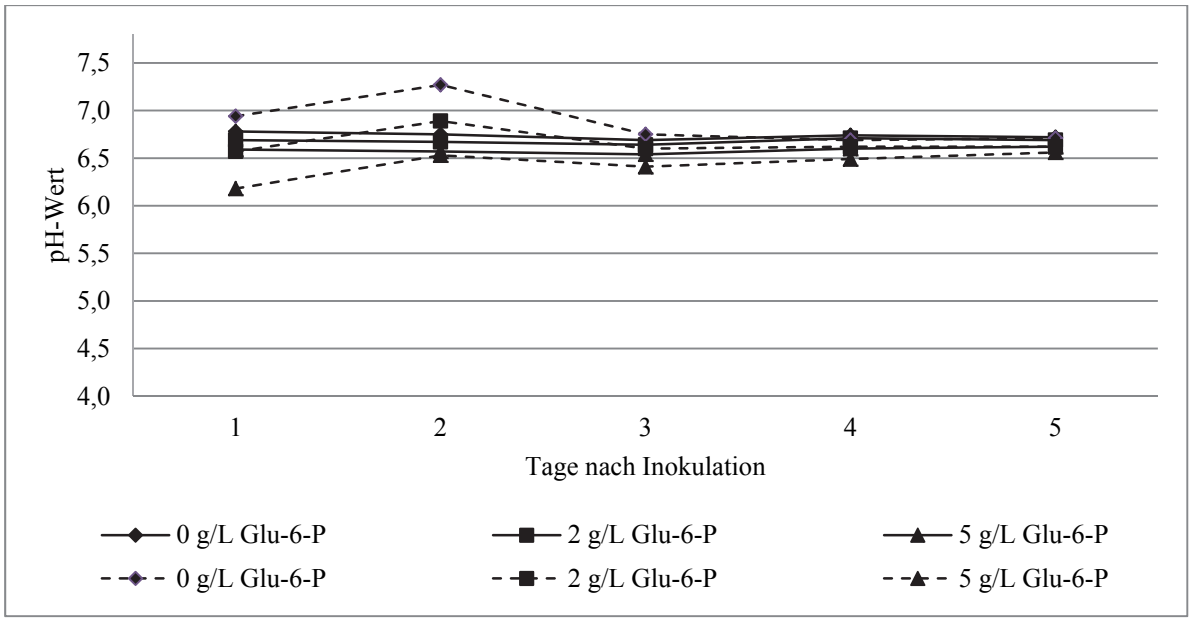


Abbildung 45: pH-Wert in Abhänhgigkeit von der Glukose-6-Phosphat-Konzentration, mit Reis; pH-Werte mit 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES sind durch durchgehende Linien gekennzeichnet, pH-Werte ohne die beiden Puffer mit gestrichelten Linien

4.2.3.4 Maltose

Von allen Versuchen wuchsen die Histomonaden mit Maltose am schlechtesten (Tabelle 27, Abbildung 46 und Abbildung 47).

Ohne Reis konnte bestenfalls ein Überleben der Kultur festgestellt werden.

Auch die Zugabe von Reis förderte das Wachstum nicht; die Kulturen überlebten lediglich. In einem Fall (5 g/L Maltose, ohne MOPS und HEPES) kam es sogar zu einem Absterben der Kultur.

Beide Kontrollen ohne Reis wuchsen nicht. Die Kontrollkulturen mit Reis wuchsen im Vergleich zu den Kontrollen aus den anderen Versuchen relativ schlecht: die Kontrolle ohne MOPS und HEPES überlebte dabei nur.

Tabelle 27: Histomonadenzahlen pro Milliliter in Abhängigkeit von der Maltose-, MOPS-, HEPES- und Reis-Konzentration; Inokulationsdosis: 22.000 Histomonaden pro Milliliter; s = Standardabweichung

Konzentration Maltose	**Konzentration MOPS**	**Konzentration HEPES**	**Konzentration Reis**	**Tage nach Inokulation**				
				1	2	3	4	5
				Hm/ml				
0 g/L	100 mmol/L	50 mmol/L	2 g/L	77.500 (s = 7.500)	82.500 (s = 17.500)	122.500 (s = 2.500)	150.000 (s = 5.000)	122.500 (s = 7.500)
2 g/L	100 mmol/L	50 mmol/L	2 g/L	67.500 (s = 2.500)	75.000 (s = 5.00)	77.500 (s = 7.500)	92.500 (s = 2.500)	80.000 (s = 5.000)
5 g/L	100 mmol/L	50 mmol/L	2 g/L	50.000 (s = 0)	52.500 (s = 2.500)	56.250 (s = 18.750)	33.125 (s = 1.875)	32.500 (s = 6.250)
0 g/L	100 mmol/L	50 mmol/L	0 g/L	75.000 (s = 10.000)	62.500 (s = 7.500)	37.500 (s = 2.500)	11.875 (s = 1.875)	9.375 (s = 1.875)
2 g/L	100 mmol/L	50 mmol/L	0 g/L	62.500 (s = 7.500)	60.000 (s = 0)	67.500 (s = 7.500)	80.000 (s = 15.000)	57.500 (s = 2.500)
5 g/L	100 mmol/L	50 mmol/L	0 g/L	50.000 (s = 0)	52.500 (s = 40.000)	20.000 (s = 0)	22.500 (s = 6250)	21.250 (s = 3.750)
0 g/L	0 mmol/L	0 mmol/L	2 g/L	24.375 (s = 3.125)	26.250 (s = 5.000)	46.250 (s = 3.750)	85.000 (s = 25.000)	55.000 (s = 5.000)
2 g/L	0 mmol/L	0 mmol/L	2 g/L	25.625 (s = 1.875)	18.125 (s = 625)	21.250 (s = 10.000)	67.500 (s = 17.500)	22.500 (s = 1.250)
5 g/L	0 mmol/L	0 mmol/L	2 g/L	11.250 (s = 2.500)	8.750 (s = 1.250)	10.625 (s = 1.875)	10.625 (s = 625)	5.000 (s = 1250)
0 g/L	0 mmol/L	0 mmol/L	0 g/L	92.500 (s = 7.500)	20.625 (s = 625)	6.875 (s = 1.875)	5.000 (s = 1.250)	3.125 (s = 625)
2 g/L	0 mmol/L	0 mmol/L	0 g/L	38.750 (s = 11.250)	47.500 (s = 12.500)	41.250 (s = 8.750)	45.000 (s = 5.000)	21.250 (s = 1.250)
5 g/L	0 mmol/L	0 mmol/L	0 g/L	13.750 (s = 2.500)	11.875 (s = 1.875)	7.500 (s = 1.250)	5.000 (s = 2.500)	5.000 (s = 1.250)

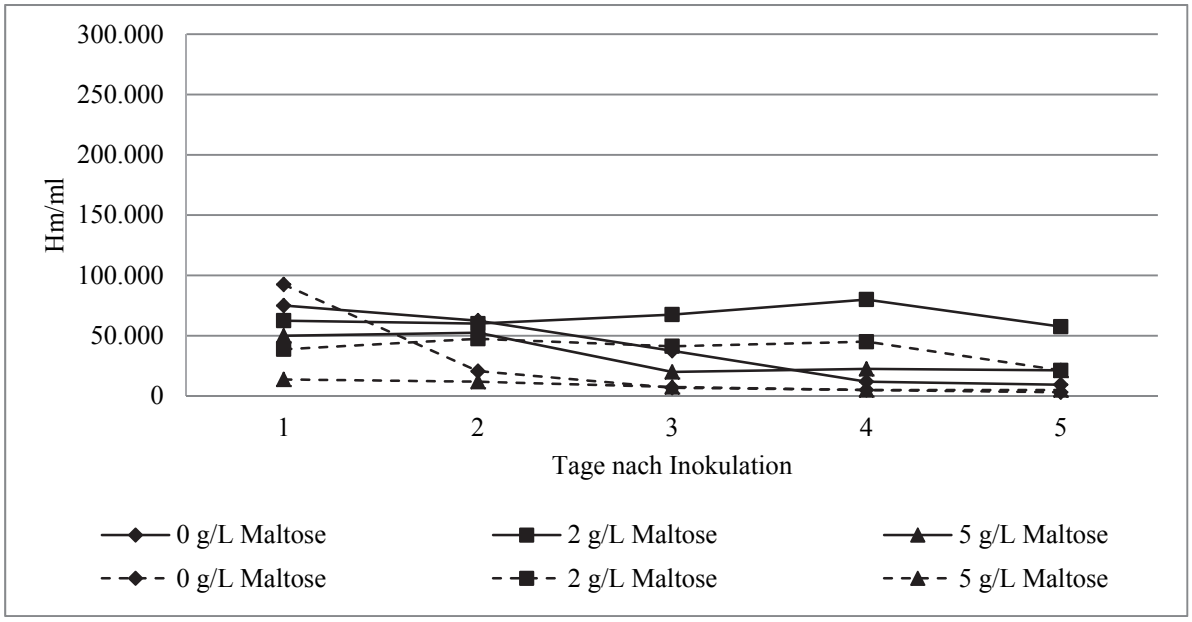


Abbildung 46: Wachstum mit unterschiedlichen Maltose-Konzentrationen, ohne Reis; Wachstumskurven mit 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES sind durch durchgehende Linien gekennzeichnet, Wachstumskurven ohne die beiden Puffer mit gestrichelten Linien

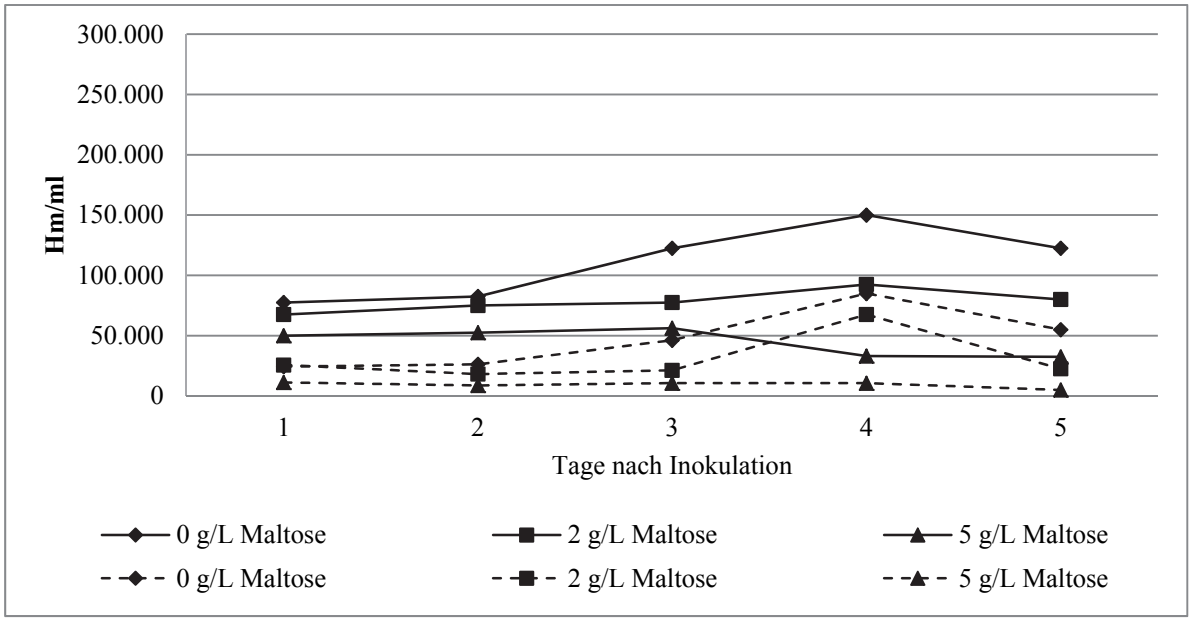


Abbildung 47: Wachstum mit unterschiedlichen Maltose-Konzentrationen, mit Reis; Wachstumskurven mit 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES sind durch durchgehende Linien gekennzeichnet, Wachstumskurven ohne die beiden Puffer mit gestrichelten Linien

In diesem Versuch zeigten die Ergebnisse der pH-Wert-Messungen deutlich die Pufferwirkung von MOPS und HEPES (Abbildung 48 und Abbildung 49).

Innerhalb der Ansätze mit MOPS und HEPES lag der pH-Wert im Bereich von 6.

Bei den Ansätzen, bei denen kein MOPS und HEPES hinzugegeben wurde, variierte der pH-Wert in Abhängigkeit von der Maltose-Konzentration: mit 2 g/L Maltose lag der pH-Wert zu Beginn des Versuchs in einem Bereich unter 5, um dann auf über 6 zu steigen. In keinem anderen Versuch lag der zu Versuchsbeginn gemessene pH-Wert unter 6. Die Ansätze mit 5 g/L Maltose zeigten mit 4,6 bis 4,4 sogar einen noch niedrigeren pH-Wert, der über die gemessenen Tage auch noch fiel.

Der pH-Wert der Kontrollkulturen mit oder ohne MOPS und HEPES lag in einem Bereich um 6,8.

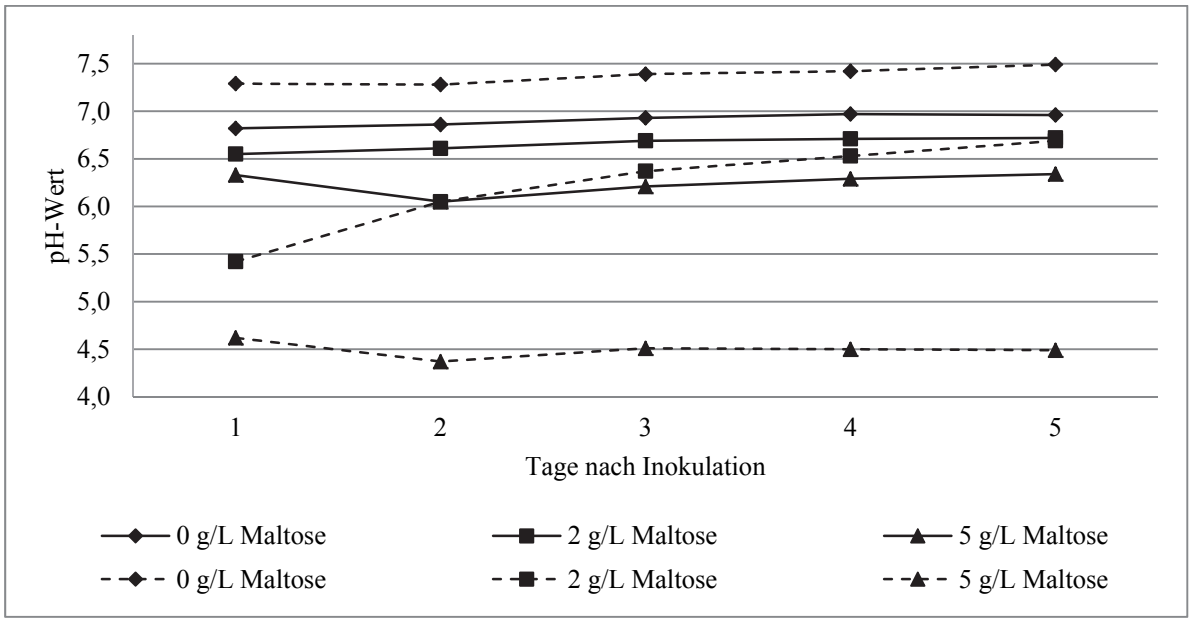


Abbildung 48: pH-Wert in Abhänhgigkeit von der Maltose-Konzentration, ohne Reis; pH-Werte mit 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES sind durch durchgehende Linien gekennzeichnet, pH-Werte ohne die beiden Puffer mit gestrichelten Linien

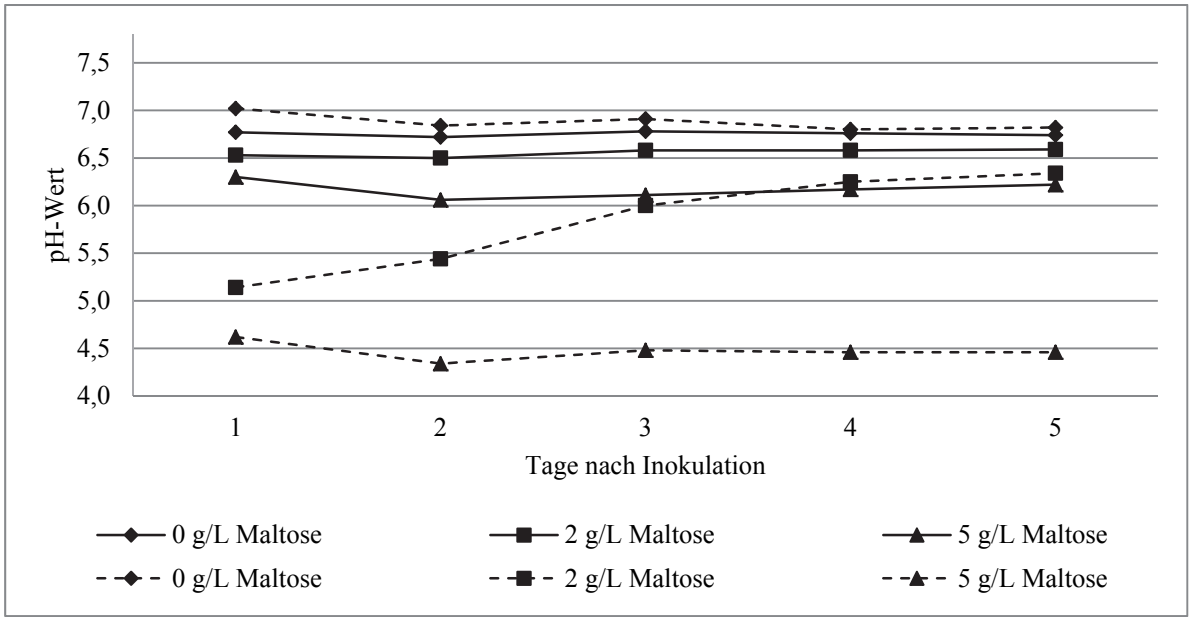


Abbildung 49: pH-Wert in Abhänhgigkeit von der Maltose-Konzentration, mit Reis; pH-Werte mit 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES sind durch durchgehende Linien gekennzeichnet, pH-Werte ohne die beiden Puffer mit gestrichelten Linien

4.2.4 Versuche zum Einfluss von Sauerstoff und CO_2 auf das Histomonaden-Wachstum

4.2.4.1 Einfluß des wiederholten Öffnens der Kulturgefäße

In diesem Versuchsteil sollte geklärt werden, inwieweit der Sauerstoff, denen die Histomonaden beim täglichen Öffnen der Zellkulturflaschen ausgesetzt sind, Einfluss auf das Wachstum von Histomonaden hat. Dafür wurden Histomonaden in PBS mit 5 g/L NaCl, 100 mmol/L MOPS und 50 mmol/L HEPES kultiviert. Des weiteren wurde 2 g/L Reismehl hinzugegeben. Als weitere Kohlenhydratquelle dienten jeweils die Kohlenhydrate aus den vorherigen Versuchen: Glukose, Pyruvat, Glukose-1-Phosphat, Glukose-6-Phosphat und Maltose jeweils in einer Konzentration von 2 g/L. Alle Kulturen wurden 14 mal angesetzt, sodass ausreichend Kulturen zur Verfügung standen, um sie jeweils nach zwei, vier, sechs, neun und zwölf Stunden sowie nach vier Tagen zu öffnen, um den pH-Wert zu ermitteln. Die Kulturen, die jeweils nach vier, sechs, neun bzw. zwölf Stunden sowie die Kulturen, die nach vier Tagen geöffnet wurden, wurden nach dem Öffnen aus dem Versuch genommen. Die Kulturen, die nach zwei Stunden geöffnet wurden, verblieben im Versuch und wurden ebenfalls zu den anderen Zeitpunkten geöffnet. Von allen Kulturen wurde das Wachstum einmalig nach vier Tagen bestimmt.

Alle Kulturen wurden im Duplikat angesetzt und für die Auswertung wurde der Mittelwert gebildet.

Insgesamt war das Wachstum aller Kulturen vergleichbar mit dem Wachstum aus den ersten Versuchsreihen. Auffallend ist, dass die Kulturen, die einmalig am vierten Tag geöffnet wurden, tendenziell eine geringere Vermehrung aufwiesen, als die Kulturen, die mehrfach geöffnet wurden. Dies wurde besonders deutlich im Ansatz mit Glukose-6-Phosphat: Hier wuchs die mehrfach geöffnete Kultur fast dreimal so gut wie die Kultur, die nur am vierten Tag einmalig geöffnet wurde. Einzige Ausnahme stellte der Ansatz mit Maltose dar, wo ein höheres Wachstum in der Kultur zu sehen war, die nur einmal geöffnet wurde. Die Kulturen mit Glukose als Kohlenhydratquelle, die in den vorangegangenen Versuchen lediglich überlebten, vermehrten sich in diesem Versuchteil, wenn auch sehr gering.

Als Kontrolle diente eine Kultur mit 2 g/L Reis ohne zusätzliche Kohlenhydratquelle, bei der das Wachstum ebenfalls höher war, wenn sie mehrfach geöffnet wurde.

Die Histomonadenzahlen pro Milliliter der einzelnen Kulturen sind in Tabelle 28 aufgeführt.

Tabelle 28: Histomonaden pro Milliliter am vierten Tag p.i. in Kulturen, die mehrfach geöffnet wurden bzw. in Kulturen, die nur einmal vier Tage p.i. geöffnet wurden bei verschiedenen Kohlenhydraten; Inokulationsdosis: 22.500 Histomonaden pro Milliliter; s = Standardabweichung

Kohlenhydrat	Kultur mehrmals geöffnet	Kultur einmal geöffnet
Glukose + Reis	57.500 (s = 2.500)	60.000 (s = 0)
Glu-1-P + Reis	97.500 (s = 2.500)	107.500 (s = 12.500)
Glu-6-P + Reis	60.000 (s = 10.000)	175.000 (s = 15.000)
Maltose + Reis	92.500 (s = 22.500)	67.500 (s = 2.500)
Pyruvat + Reis	82.500 (s = 2.500)	115.000 (s = 10.000)
Reis	215.000 (s = 10.000)	237.500 (s = 2.500)

Die Messung der pH-Werte ergab keine wesentlichen Unterschiede (Abbildung 50 und Abbildung 51). Alle gemessenen pH-Werte lagen in einem Bereich von 6, was mit den Werten der entsprechenden Ansätze aus den vorangegangenen Versuchen vergleichbar war.

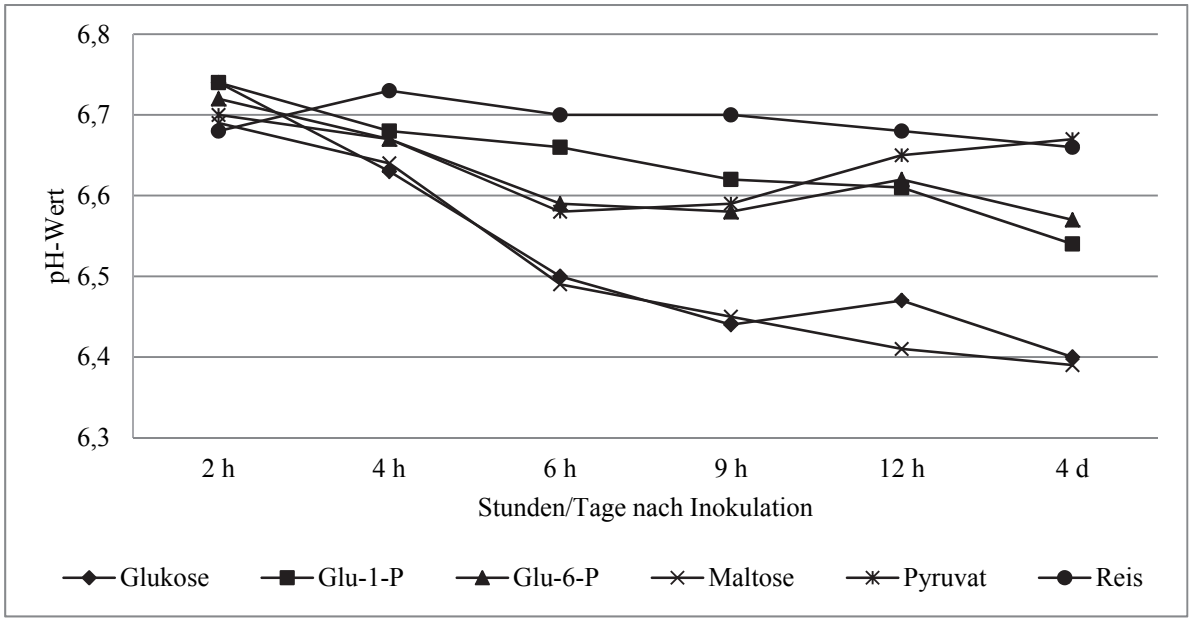


Abbildung 50: pH-Wert der einmalig geöffneten Kulturen in Abhängigkeit von unterschiedlichen Kohlenhydratquellen

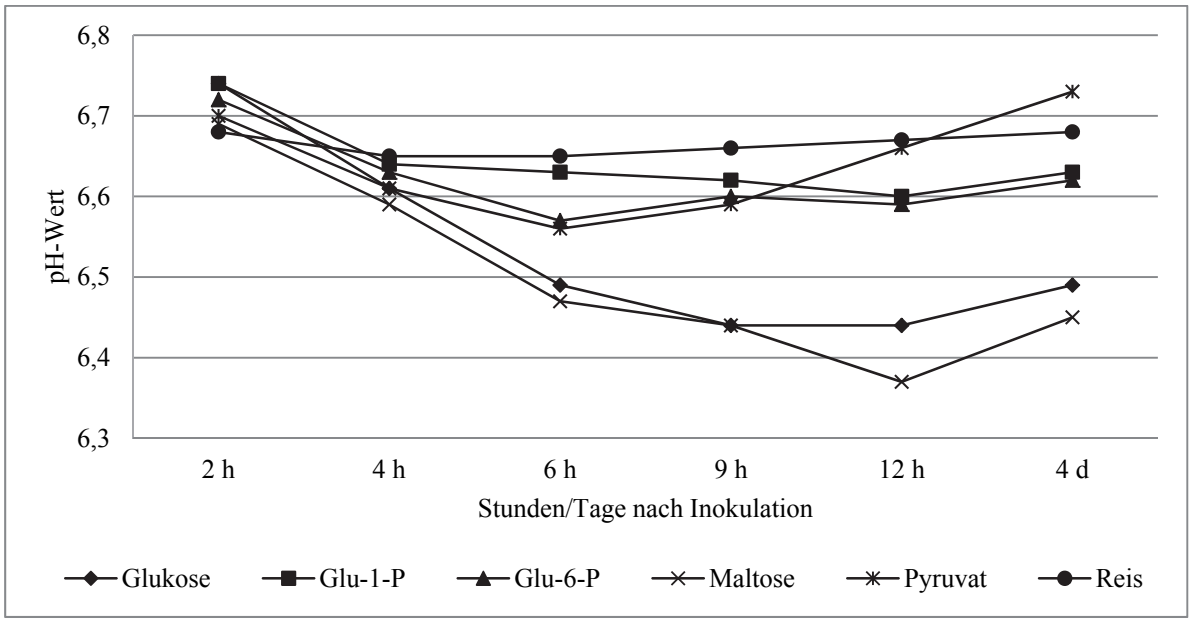


Abbildung 51: pH-Wert der mehrfach geöffneten Kulturen in Abhängigkeit von unterschiedlichen Kohlenhydratquellen

4.2.4.2 Einfluss eines anaeroben und eines mikroaerophilen Milieus

In diesem Versuchsteil wurden die Histomonaden unter Bedingungen kultiviert, bei denen statt durch das Öffnen der Kulturen zur Messung des pH-Wertes wiederholt Sauerstoff anzubieten, der Sauerstoffgehalt reduziert bzw. ganz entzogen wurde. Die Histomonaden wurden in M199 mit 10 % inaktiviertem Pferdeserum und 2 g/L Reis kultiviert. Zur Schaffung einer mikroaerophilen Atmosphäre wurden Histomonaden in Zellkulturflaschen

mit Filter im CO_2-Brutschrank mit einer CO_2-Konzentration von 9,9 % bei 41,5 °C kultiviert. Als Kontrolle dienten hier Kulturen in Zellkulturflaschen ohne Filter.

Ein anaerobes Milieu wurde in Anaerobier-Töpfen unter Zuhilfenahme von Anaerokult® A geschaffen. Es wurden wiederum Zellkulturflaschen mit Filter verwendet. Zur Überprüfung eines konstanten anaeroben Milieus wurden in die Behälter Anaerotest®-Streifen gelegt. Damit jeder Behälter nur am entsprechenden Zähltag geöffnet werden musste, wurden fünf Behälter entsprechend vorbereitet. Kontrollen waren Kulturen in Zellkulturflaschen ohne Filter im selben Brutschrank.

Das Wachstum der Histomonaden wurde vier Tage lang durch Auszählen bestimmt. Für jeden Versuchstag wurden jeweils fünf Replikate angesetzt. Nach Auszählen wurden die entsprechenden Kulturen dieses Tages verworfen. In die Auswertung floss der entsprechende Mittelwert ein.

Die Kulturen im mikroaerophilen Milieu wuchsen gut (Tabelle 29 und Abbildung 52), wobei die Kontrollen in Zellkulturflaschen ohne Filter das höchste Wachstum dieses gesamten Versuchsteils zeigten. Bis zum vierten Zähltag stieg die Anzahl pro Milliliter stetig an.

Zwar wuchsen die anaerob kultivierten Histomonaden bis zum zweiten Tag ebenfalls gut (Abbildung 53), danach stagnierte das Wachstum allerdings, um am vierten Tag wieder abzufallen. Von allen Kulturen wuchsen sie damit am schlechtesten. Die im gleichen Brutschrank kultivierten Kontrollen zeigten hingegen ein gutes, bis zum letzten Zähltag ansteigendes Wachstum.

Tabelle 29: Histomonadenzahlen pro Milliliter in Abhängigkeit von der Kulturbedingung; Inokulationsdosis: 47.100 Histomonaden pro Milliliter; s = Standardabweichung

Kulturbedingung	**Tage nach Inokulation**			
	1	2	3	4
	Hm/ml			
Zellkulturflaschen mit Filter (mikroaerophil)	183.000 (s = 2.449)	603.000 (s = 36.414)	785.000 (s = 73.144)	808.000 (s = 139.198)
Zellkulturflaschen ohne Filter (mikroaerophil)	230.000 (s = 14.142)	766.000 (s = 123.507)	1.045.000 (s = 60.663)	1.138.000 (s = 60.216)
Zellkulturflaschen mit Filter (anaerob)	178.000 (s = 16.310)	498.000 (s = 24.000)	492.000 (s = 12.884)	257.000 (s = 34.871)
Zellkulturflaschen ohne Filter (anaerob)	187.000 (s = 9.274)	690.000 (s = 45.935)	980.000 (s = 43.012)	1.039.000 (s = 71.652)

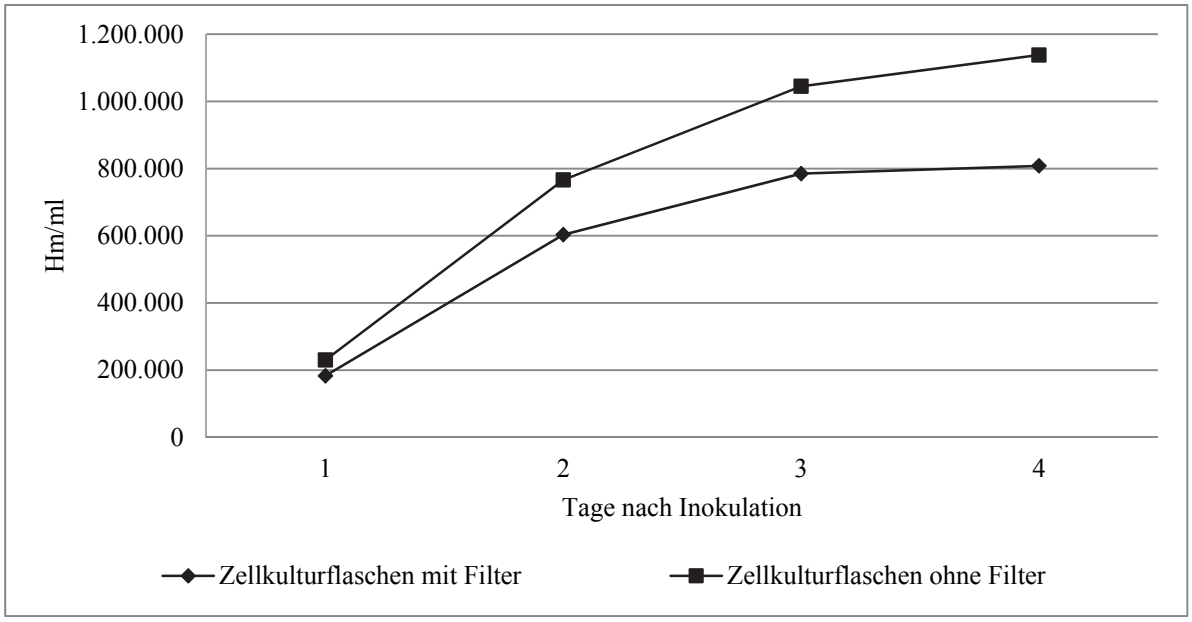


Abbildung 52: Wachstum unter mikroaerophilen Bedingungen

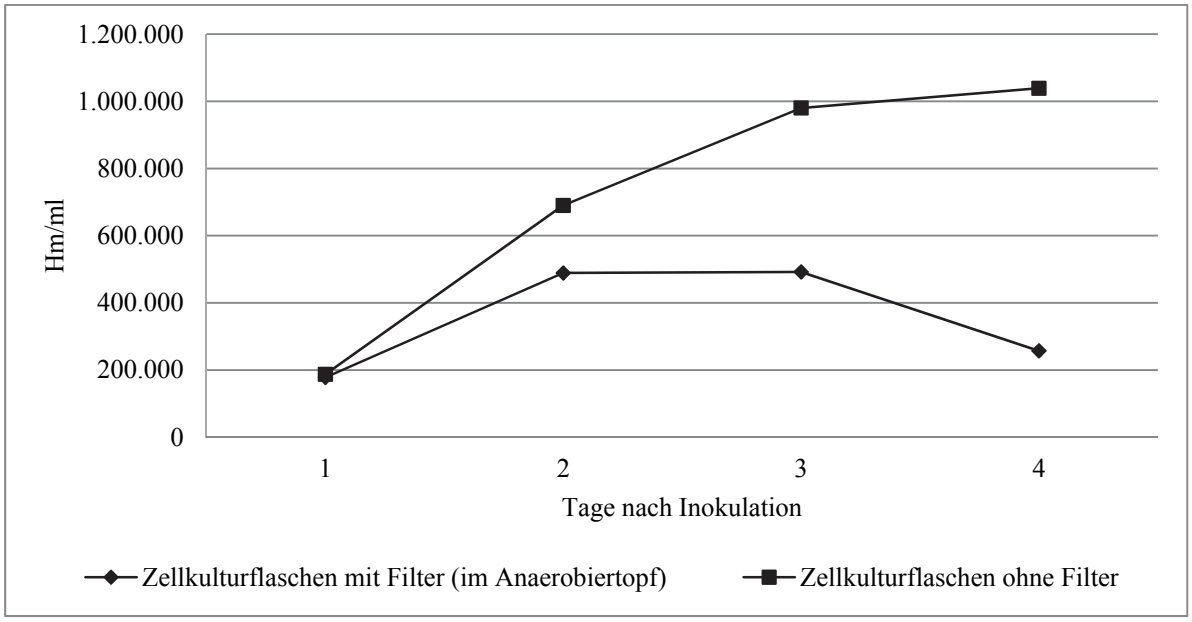


Abbildung 53: Wachstum unter anaeroben Bedingungen

4.2.5 Einfluss von Pyruvat auf die Transkription verschiedener Enzyme

In diesem Versuchsteil sollte der Einfluß der Zugabe von Pyruvat auf die Transkription bestimmter, am Kohlenhydratstoffwechsel beteiligter Enzyme untersucht werden. Von Interesse waren hierbei die Gene für Alpha-Amylase, Glykogen-Phosphorylase und GAPDH. Um eine Aussage über eine mögliche Regulierung zu treffen, wurde die Exprimierung dieser Gene mit denen von unregulierten Genen, sog. Housekeeping-Genen, verglichen. Als Housekeeping-Gene wurden die 18S rRNA sowie die Gene der beiden Strukturproteine Alpha-Tubulin und Beta-Tubulin gewählt.

Die Untersuchung fand mittels qPCR und anschließender Auswertung der cT-Werte und Effizienzen mit der Software REST2009 statt. Dieses Programm greift auf die relative Quantifizierung zurück, bei der die Expression der Zielgene mit der von nicht regulierten Housekeeping-Genen normalisiert wird (Pfaffl et al., 2002; Pfaffl, 2004).

4.2.5.1 Sequenzierung von Abschnitten des Alpha-Amylase- und Glykogenphosphorylase-Gens

Zunächst wurden Primer auf der Grundlage von Sequenzen von *T. vaginalis* aus der Gendatenbank entworfen, da es für diese beiden Gene keine bekannten Sequenzen von *H. meleagridis* gab (Tabelle 7). Aus Kulturmaterial wurde mRNA gewonnen, welche in einer RT-PCR mit den jeweiligen Primerpaaren aus Tabelle 7 eingesetzt wurde. Die entsprechenden PCR-Produkte wurden kloniert und sequenziert. Das Fragment des Alpha-Amylase-Gens (Accession-Number JQ178362) hatte eine Länge von 419 Basenpaaren, das des Glykogenphosphorylase-Gens (Accession-Number JQ178361) von 331 Basenpaaren. Ausgehend von den nun bekannten Sequenzen der beiden Gene wurden die Primer für die qPCR entworfen (Tabelle 9).

4.2.5.2 Ermittlung der Effizienzen der qPCR-Primer

Für die Auswertung mittels REST2009 mussten die Effizienzen der in Tabelle 30 aufgeführten Primer ermittelt werden. Dies geschah mittels qPCR mit dem Fluoreszensfarbstoff EvaGreen (3.2.2.3.2). Die DNA für die qPCR wurde aus Kulturmaterial des Stammes GB 542/04 gewonnen.

Von der DNA wurde eine zehnfache Verdünnungsreihe bis zu einer Verdünnung von 10:5 hergestellt. Jede Verdünnungsstufe wurde mit den jeweiligen Primerpaaren im Triplikat untersucht. Die ermittelten Effizienzen sind Tabelle 30 zu entnehmen.

Tabelle 30: Effizienzen der jeweiligen Primer

Primer	Effizienz
q18S	108 %
qatub (Alpha-Tubulin)	99,9 %
qbtub (Beta-Tubulin)	129 %
qaam (Alpha-Amylase)	130,5 %
qgp2fr (Glykogen-Phosphorylase)	102,5 %
qGAPDH	117,4 %

4.2.5.3 Expression von Alpha-Amylase, Glykogen-Phosphorylase und GAPDH unter verschiedenen Kulturbedingungen

In der qPCR wurde Material eingesetzt, welches durch eine unterschiedliche Kultivierung der Histomonaden gewonnen wurde. Zum einen wurden sie mit 2 g/L Reis angezüchtet. Des weiteren geschah die Anzüchtung mit der doppelten Menge Reis, also 4 g/L. In einem weiteren Ansatz wurde Pyruvat in einer Konzentration von 2 g/L zusätzlich zu Reis, ebenfalls in einer Konzentration von 2 g/L, hinzugegeben. Auch der Versuch einer Anzüchtung ohne Kohlenhydratquelle wurde verfolgt. Die Histomonaden wurden in PBS mit 8 g/L NaCl sowie 25 mmol/L HEPES angezüchtet. Gezählt wurden fünf Replikate über fünf Tage. Aus den ermittelten Wachstumszahlen wurde jeweils der Mittelwert gebildet.

Eine gute Vermehrung zeigten die Histomonaden mit 4 g/L Reis (Tabelle 31 und Abbildung 54). Hierbei konnte bis zum vierten Tag eine Zunahme beobachtet werden. Bis zum dritten Tag wuchsen sie auch mit 2 g/L Reis, danach kam es zu einem Abfall. Relativ konstant blieb die Anzahl nach einer Vermehrung in den ersten 24 Stunden bei den Kulturen, denen zusätzlich zu 2 g/L Reis auch 2 g/L Pyruvat hinzugegeben wurde. Auch hier zeigten sie nach dem vierten Tag einen Wachstumsabfall. Ohne jegliche Kohlenhydratquelle starben die Histomonaden ab.

Tabelle 31: Histomonadenzahlen pro Milliliter in Abhängigkeit von der Menge der Kohlenhydratquelle; Inokulationsdosis: 26.000 Histomonaden pro Milliliter; s = Standardabweichung

Kohlenhydrat	**Tage nach Inokulation**				
	1	2	3	4	5
	Hm/ml				
Reis 2 g/L	50.000 (s = 20.736)	76.000 (s = 14.629)	83.000 (s = 9.274)	59.000 (s = 8.000)	21.000 (s = 40.562)
Reis 4 g/L	64.000 (s = 8.000)	86.000 (s = 4.899)	86.000 (s = 9.695)	99.000 (s = 41.807)	98.000 (s = 9.274)
Pyruvat 2 g/L + Reis 2 g/L	54.000 (s = 3.742)	54.250 (s = 9.206)	54.000 (s = 4.899)	54.000 (s = 8.602)	34.750 (s = 7.961)
ohne Kohlenhydrat	6.750 (s = 2.318)	5.750 (s = 1.696)	2.250 (s = 1.658)	1.500 (s = 1.458)	500 (s = 612)

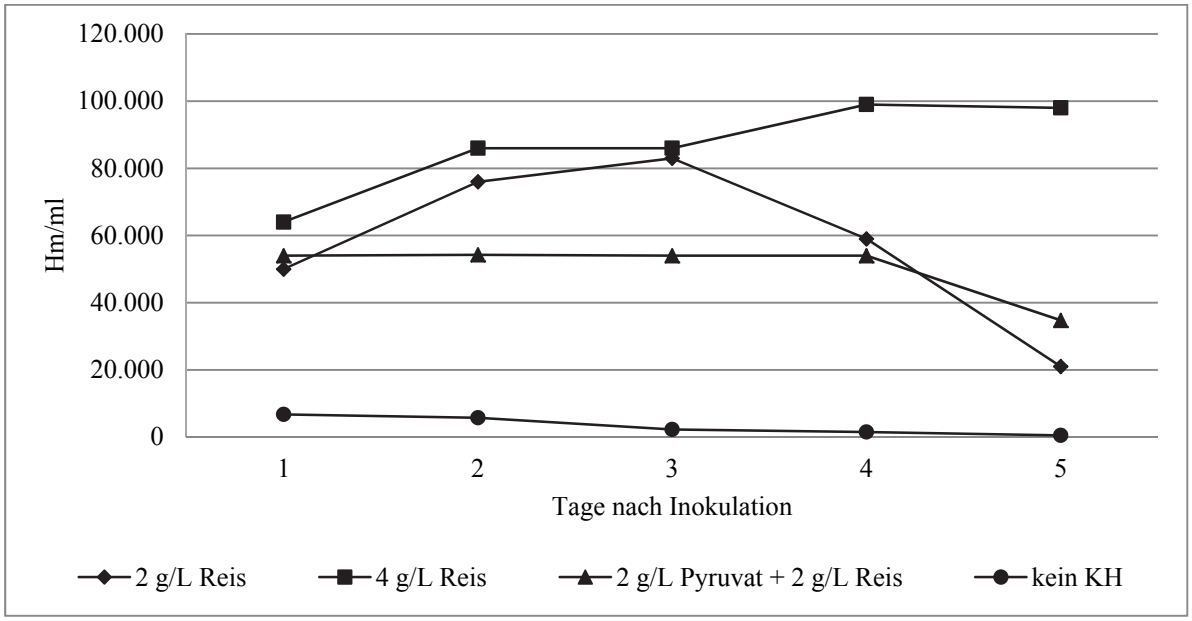


Abbildung 54: Wachstum mit unterschiedlichen Reis-Konzentrationen sowie mit der Kombination Pyruvat und Reis in PBS mit 8 g/L NaCl sowie 25 mmol/L HEPES

Von allen Kulturen wurde der pH-Wert gemessen (Abbildung 55). Relativ konstant bei etwa 6,7 blieb er bei den Kulturen mit 2 g/L Reis. Mit 4 g/L Reis sank er über die einzelnen Tage, blieb jedoch in einem Bereich weit über 6. Bei den Kulturen mit Pyruvat und Reis stieg er dagegen bis zum Versuchsende von anfänglich 6,7 auf über 7,2 an. Auch ohne Kohlenhydratquelle stieg der pH-Wert an, jedoch nur knapp über 7.

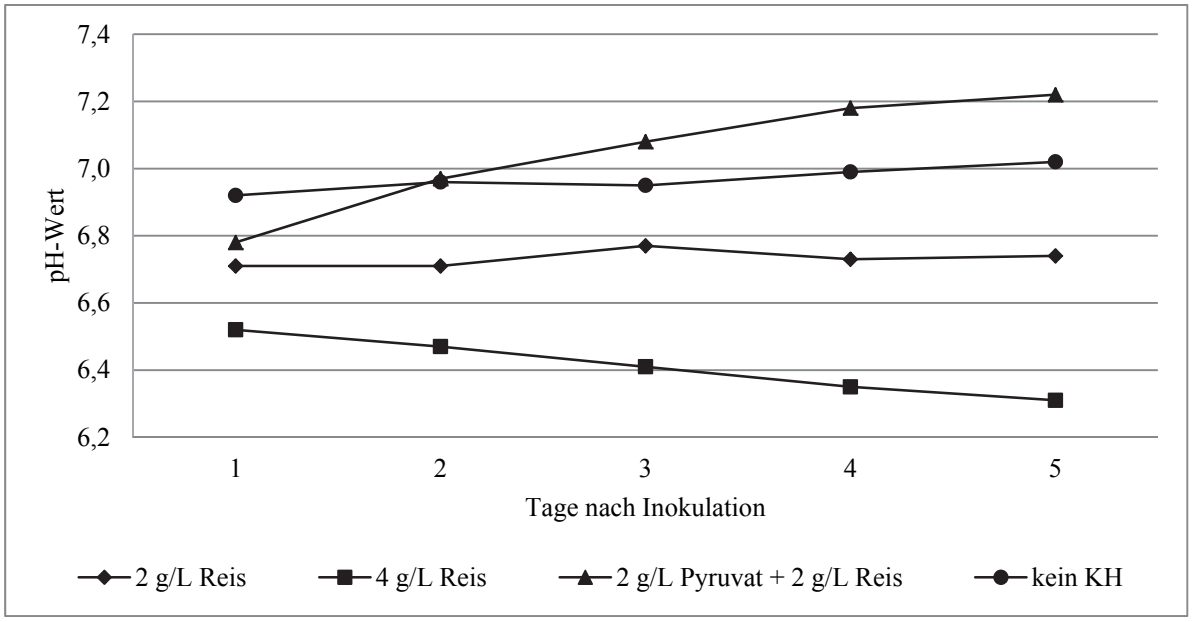


Abbildung 55: pH-Wert in Abhängigkeit von der Reis- und Pyruvatkonzentration in PBS mit 8 g/L NaCl sowie 25 mmol/L HEPES

Die cDNA wurde aus jeweils drei zufällig ausgewählten Kulturen vom dritten Versuchstag gewonnen (biologische Replikate). Zum einen stammte sie aus drei Kulturen mit jeweils 2 g/L Pyruvat sowie 2 g/L Reis. Zum anderen wurde cDNA aus je drei Kulturen mit 2 g/L Reis bzw. 4 g/L Reis gewonnen. Lediglich aus den Kulturen ohne Kohlenhydratquelle wurde keine cDNA gewonnen, da in ihnen keine Histomonaden vorhanden waren. Die Kulturen mit ausschließlich Reis dienten später in der Auswertung als Kontrollgruppen. Für die Bestimmung der cT-Werte wurden zwei qPCR-Läufe durchgeführt: Im ersten Ansatz wurden die biologischen Replikate der Kulturen mit 2 g/L Pyruvat sowie 2 g/L Reis und der Kulturen mit 2 g/L Reis in der qPCR eingesetzt (Tabelle 32), wobei aus jedem biologischen Replikat drei Replikate (technische Replikate) für jedes Gen angesetzt wurden. Im zweiten Ansatz stammten die biologischen Replikate aus drei anderen Kulturen mit 2 g/L Pyruvat sowie 2 g/L Reis und aus den Kulturen mit 4 g/L Reis (Tabelle 33). Die cT-Werte der einzelnen Replikate wurden später durch REST2009 ausgewertet. Die qPCR wurde mit dem Fluoreszenz-Farbstoff EvaGreen nach dem Temperaturprofil wie in 3.2.2.3.2 (Tabelle 10) beschrieben, durchgeführt.

Tabelle 32: cT-Werte (Mittelwert aus drei biologischen und daraus drei technischen Replikaten) der Kulturen mit 2 g/L Pyruvat sowie 2 g/L Reis; Kontrollgruppe waren Kulturen mit 2 g/L Reis

Gen	**Kulturen 2 g/L Pyruvat und 2 g/L Reis**	**Kulturen 2 g/L Reis**
Alpha-Tubulin	35,33	32,77
Beta-Tubulin	30,65	28,45
18S	27,98	24,92
Alpha-Amylase	39,97	35,87
Glykogen-Phosphorylase	34,90	33,04
GAPDH	29,31	27,86

Tabelle 33: cT-Werte (Mittelwert aus drei biologischen und daraus drei technischen Replikaten) der Kulturen mit 2 g/L Pyruvat sowie 2 g/L Reis; Kontrollgruppe waren Kulturen mit 4 g/L Reis

Gen	**Kulturen 2 g/L Pyruvat und 2 g/L Reis**	**Kulturen 4 g/L Reis**
Alpha-Tubulin	36,21	33,23
Beta-Tubulin	30,50	28,75
18S	28,00	23,49
Alpha-Amylase	41,15	35,49
Glykogen-Phosphorylase	36,25	32,33
GAPDH	29,69	27,44

Beide Läufe wurden getrennt ausgewertet: Als Kontrollgruppe dienten das eine mal die Kulturen mit 2 g/L Reis und das andere Mal die Kulturen mit 4 g/L Reis. Die zu untersuchenden Kulturen waren in beiden Fällen die Kulturen mit Pyruvat und Reis.

Die cT-Werte und die ermittelten Effizienzen wurden zusammen mit der Festlegung der Referenzgene in REST2009 eingegeben. Als Referenzgene dienten Alpha-Tubulin, Beta-Tubulin sowie das 18S-Gen. Untersucht wurden die Expression des Alpha-Amylase-Gens, des Glykogen-Phosphorylase-Gens und des GAPDH-Gens. Die Bestimmung der Regulierung erfolgte durch REST2009 (Tabelle 34, Kapitel 3.2.2.3.2).

Im Vergleich mit der Kontrollgruppe mit 2 g/L Reis wurde das Alpha-Amylase-Gen um den Faktor 0,355 herunterreguliert, wohingegen das Glykogen-Phosphorylase-Gen um den Faktor 1,674 und das GAPDH-Gen um den Faktor 2,233 heraufreguliert wurde. Wurde die Regulierung im Vergleich mit der Kontrollgruppe mit 4 g/L Reis bestimmt, so kam es im

Falle der Gene für Alpha-Amylase und für Glykogen-Phosphorylase zu keiner Regulierung. Lediglich das Gen der GAPDH wurde um den Faktor 1,768 heraufreguliert. Gleichzeitig mit der Untersuchung der Regulierung erfolgte mit REST2009 eine Bestimmung der Signifikanz (Abbildung 56, Abbildung 57, Tabelle 34).

Tabelle 34: Regulierung der Expression des Alpha-Amylase-, Glykogen-Phosphorylase- und GAPDH-Gens in Kulturen mit je 2 g/L Pyruvat und Reis im Vergleich zu zwei verschiedenen Kontrollgruppen; keine Regulierung: -; p: Signifikanz

untersuchtes Gen	**Regulierung (Faktor); Kontrollgruppe 2 g/L Reis**	**Regulierung (Faktor); Kontrollgruppe 4 g/L Reis**
Alpha-Amylase	runter (0,355 fach) p: 0,031	-
Glykogen-Phosphorylase	hoch (1,674 fach) p: 0,013	-
GAPDH	hoch (2,233 fach) p: 0	hoch (1,768 fach) p: 0,005

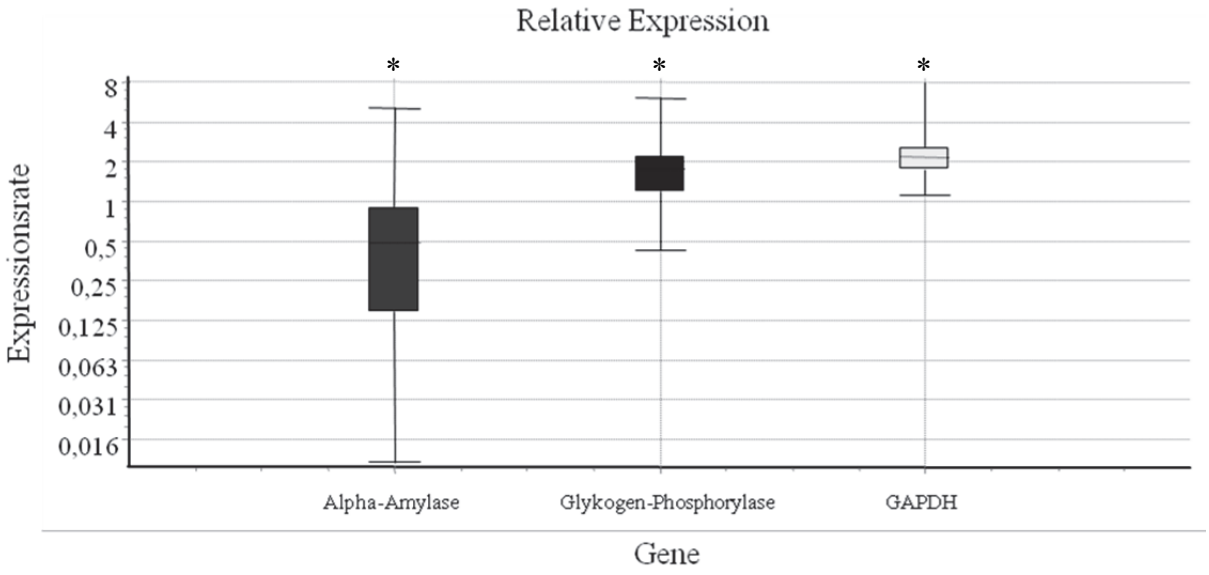


Abbildung 56: Whisker-box plot der Regulierung der Gene von Alpha-Amylase, Glykogen-Phosphorylase und GAPDH; Kontrollgruppe mit 2 g/L Reis; Referenzgene sind Alpha-Tubulin, Beta-Tubulin und 18S; *: signifikant reguliert

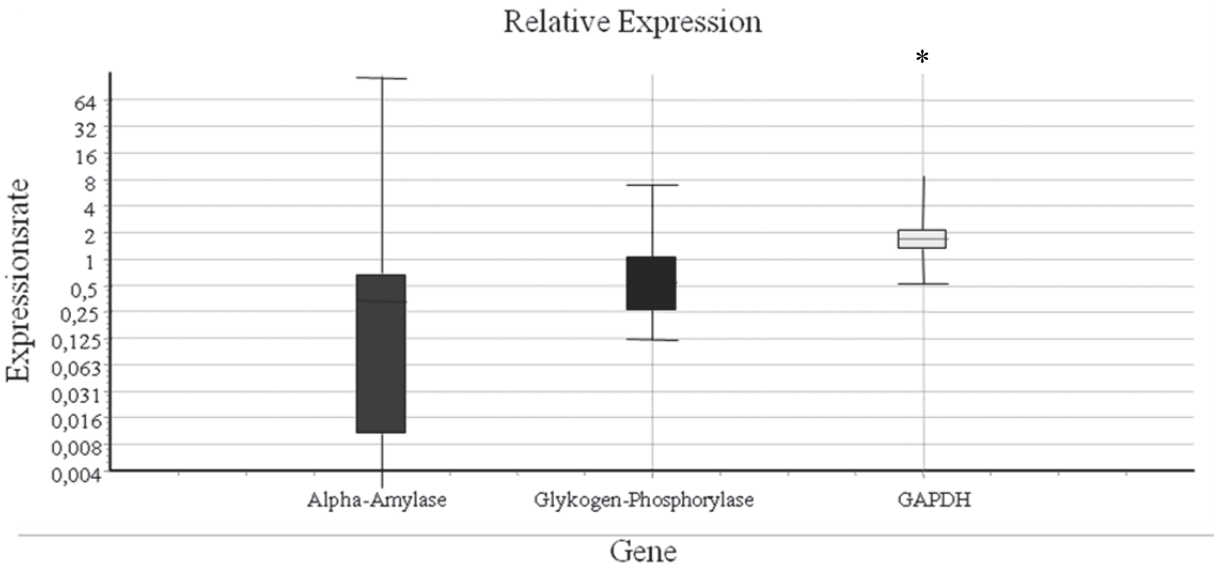


Abbildung 57: Whisker-box plot der Regulierung der Gene von Alpha-Amylase, Glykogen-Phosphorylase und GAPDH; Kontrollgruppe mit 4 g/L Reis; Referenzgene sind Alpha-Tubulin, Beta-Tubulin und 18S; *: signifikant reguliert

5 Diskussion

Die durch *H. meleagridis* verursachte Schwarzkopfkrankheit hat seit dem Verbot aller prophylaktischen und therapeutischen Mittel in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Besonders in Putenbeständen stellt sie eine ernstzunehmende Erkrankung dar, die mit sehr hohen Mortalitätsraten bis zu oder über 90 % verbunden sein kann (Popp et al., 2011; Tyzzer, 1934). Zwar sterben Hühner weniger oft an der Histomonose, aber auch hier sind die Verluste mit bis zu 10 % nicht zu vernachlässigen (Esquenet et al., 2003; Schulze, 1975). Aufgrund des Therapienotstandes und der hohen Sterblichkeit bei nicht schlachtreifen Tieren werden Putenbestände oft gekeult (Popp et al., 2011; Popp et al., 2012). Hühner können sich zwar von der Krankheit wieder erholen, aber auch hier kommt es zu hohen wirtschaftlichen Verlusten (Schulze, 1975). Die Entwicklung neuer Prophylaktika und Therapeutika, v. a. auf pflanzlicher Grundlage, hat noch nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen geführt (Hafez und Hauck, 2006).

Somit ist die Histomonose weiterhin eine ernstzunehmende Erkrankung, deren Ausbruch frühzeitig diagnostiziert werden muss. Zu diesem Zweck bietet das Institut für Geflügelkrankheiten der Freien Universität Berlin eine Real-Time-PCR (qPCR) zum Nachweis eines Teils des rRNA-Gens von *H. meleagridis* an (Hafez et al., 2005a).

In den Jahren 2004 bis 2010 wurden 568 Proben aus 252 vermutlichen Ausbrüchen eingesendet. Der Verdacht konnte bei 209 Proben bestätigt werden, bei 357 Proben gelang der Nachweis nicht und bei zwei Proben war das Ergebnis fraglich. Da gerade bei Putenbeständen aufgrund der Schwere der Krankheit mit einer hohen Mortalität eine schnelle Diagnose erforderlich ist, werden hier bei Verdacht – im Vergleich zu den betroffenen Hühnern bzw. zu anderen Tierarten – schneller Proben zur Abklärung eingesendet. Somit erklärt sich die Anzahl der einzelnen Proben bei den unterschiedlichen Tierarten. Über die Hälfte des untersuchten Probenmaterials stammte von Puten und nur etwa ein Drittel von Hühnern. Vereinzelt wurden Proben von anderen Hühnervögeln wie Pfaue oder Fasane eingesendet. Auch die geringere Nachweisrate bei Proben aus Putenbeständen im Gegensatz zu solchen aus Hühnerbeständen erklärt sich aus dem Versuch heraus, möglichst frühzeitig eine Diagnose bei Puten stellen zu wollen. Daher werden bei ersten Anzeichen Proben genommen, auch wenn andere Krankheiten hinter einer erhöhten Mortalität oder einer zunehmenden Mattigkeit in der Herde stehen können. Somit wurden bei Proben aus Putenbeständen 1,7 mal so oft eine negative wie eine positive Diagnose gestellt. Im Gegensatz dazu gelang der Nachweis von Histomonaden-DNA bei den Hühnern etwas häufiger (1,1 mal) als dass die

DNA nicht gefunden wurde. Auch dies erklärt sich durch den Verlauf der Krankheit bei Hühnern: Da die Mortalität bei Hühnern durch eine Histomonose sehr viel geringer ist als bei Puten und daher der Verdacht der Histomonose durch den einsendenden Tierarzt mehr in dem Vorliegen von konkreten Krankheitssymptomen begründet ist, werden zum einen sehr viel weniger Proben eingeschickt und zum anderen mehr in begründeten Fällen.

Bei der Histomonose handelt es sich um eine Infektiöse Typhlohepatitis (Schiefer und Mehnert, 1963). Bei Verdacht auf diese Krankheit wurden daher besonders die betroffenen Organe – Leber und Blinddärme – eingesendet. Im untersuchten Probenmaterial machten diese Proben daher über 80 % des Umfangs aus, wobei gleich oft Leber und Blinddärme vorlagen. Angefangen von der Aufnahme über die Kloake nimmt die Krankheit ihren Weg durch die Blinddärme und die Blinddarmmukosa, bis sie schließlich mit dem Pfortaderblut in die Leber gelangt und hier zu Nekrosen führt (Clarkson, 1961). Im frühen Stadium der Erkrankung ist der Erreger noch nicht in die Leber vorgedrungen (Malewitz et al., 1958; Clarkson, 1962; Beg und Clarkson, 1970a; Windisch und Hess; 2010) obwohl die Tiere schon Zeichen einer Krankheit zeigen. Daher gelang der Nachweis von Histomonaden-DNA aus Blinddarmproben häufiger als aus Leberproben.

Vereinzelt wurden andere Organe eingesendet. Lediglich in Kloakentupferproben konnte Histomonaden-DNA nachgewiesen werden. Sehr wahrscheinlicht handelte es sich um Kontaminationen mit anhaftendem Kot. Proben aus dem Drüsenmagen, dem Enddarm, der Milz, der Niere, dem Oesophagus und dem Pankreas wurden negativ getestet. Clarkson (1962), Hauck et al. (2006) und Sentíes-Cué et al. (2009) konnten Histomonaden dagegen teilweise in den Nieren, der Milz, dem Drüsenmagen und dem Pankreas bei Puten nachweisen. Grabensteiner et al. (2006) gelang der Nachweis von Histomonaden-DNA in diesen Organen nicht nur bei Puten, sondern auch bei Hühnern nach einer experimentellen Infektion. Jedoch wurde durch die Arbeit von Sentíes-Cué et al. (2009) auch die Möglichkeit des Auftretens von Histomonaden-DNA zusätzlich in der Milz, der Bursa cloacalis und der Lunge nach natürlicher Infektion aufgezeigt. Da am Institut aber nur vereinzelt Proben aus verschiedenen anderen Organen als der Leber und den Blinddärmen eingesendet wurden, konnte keine generelle Aussage über das Auftreten in diesen Organen getroffen werden.

Zwischen den Beständen wird *H. meleagridis* durch den Blinddarmwurm *H. gallinarum* alleine oder in Zusammenspiel mit verschiedenen Stapelwirten wie Regenwürmern (Lund et al., 1966; Lund, 1969; Lund und Chute, 1974b), Grashüpfern und Fliegen (Frank, 1953) oder dem Schwarzen Getreideschimmelkäfer (Huber et al., 2007)

übertragen. Innerhalb eines Stalles erfolgt die Übertragung durch das Cloacal Drinking (Hu et al., 2004).

Von den insgesamt 568 eingesandten Proben machten die Invertebraten mit 46 Proben und die Umgebungsproben mit 42 Einsendungen einen nur geringen Teil des Probenmatertials aus (etwa 15 %). Über die Hälfte der Invertebraten waren Schwarze Getreideschimmelkäfer (insgesamt 27). Neben zwei positiv getesteten Fliegen gelang nur hier bei sechs Käfern der Nachweis von Histomonaden-DNA. Die Nachweisrate von Histomonaden-DNA aus Umgebungsproben ist mit vier positiv getesteten Proben im Gegensatz zu 38 negativ getesteten Proben äußerst gering. Trotz der geringen Anzahl an positiven Insekten- und Umgebungsproben scheint eine Einbringung des Erregers in Bestände v. a. durch den Schwarzen Getreideschimmelkäfer möglich, wenn er auch nicht als Hauptüberträger der Histomonose in Frage kommt (Huber et al., 2007).

Die positiv auf *H. meleagridis* getesteten Proben wurden genotypisiert. Van der Heijden et al. (2006) nahmen eine Genotypisierung des Erregers auf der Grundlage von Sequenzen der Internal Transcribed Spacer-1 (ITS1) Region vor. Die ITS-Regionen eignen sich besonders für genotypische Untersuchungen, da sie im reifen Ribosom keine Funktion erfüllen. Es handelt sich somit um nicht konservierte Regionen. Kam es nun durch Mutationen anderer Gene (z. B. für Virulenz oder für serologische Eigenschaften) zur Ausbildung verschiedener Typen, so werden sich diese höchstwahrscheinlich auch in den ITS-Regionen unterscheiden. Für die Typendifferenzierung entwickelten van der Heijden et al. (2006) das Verfahren des C-Profilings. Nach Amplifizierung und Sequenzierung der ITS1-Region werden die erhaltenen Fluorogramme auf die Base Cytosin reduziert. Dies ist nötig, da es im Bereich der ITS-Regionen aufgrund verschiedener Sequenzen zu Überlagerungen im Fluorogramm kommt. Eine direkte Auswertung der Fluorogramme und ein Vergleich der Sequenzen ist somit nicht möglich. Die Wahl der Base Cytosin erfolgte deshalb, weil in den ITS-Regionen der Gehalt dieser Base weitaus niedriger ist als der der anderen drei Basen (van der Heijden, 2006). Das so erhaltene C-Profil weist charakteristische Gruppen von Peaks auf, die miteinander verglichen werden können. Anschließend erfolgt eine Zuordnung zu einzelnen Typen. Für eine höhere Spezifität und um auch die ITS2-Region zu amplifizieren, wurden in der vorliegenden Arbeit die Primer HmDiff2F und HmDiff2R entwickelt. Mit diesen sequenzspezifischen Primern war es möglich, lediglich die ITS-Regionen von *H. meleagridis* zu amplifizieren.

Die Primer HmDiff2F und HmDiff2R wurden so entworfen, dass sie zusätzlich zur ITS1-Region auch die ITS2-Region amplifizieren. Es sollte versucht werden, eine Typendifferenzierung mit beiden Regionen durchzuführen. Eine Typisierung der ITS2-Region stellte sich dabei als nicht praktikabel heraus. Oftmals war es nicht möglich, die genauen Grenzen zur ITS2-Region festzulegen. In den Fällen, wo ein C-Profil der ITS2-Region erstellt werden konnte, konnten keine charakteristischen Bereiche definiert werden, die eine Zuteilung zu einzelnen Typen erlauben würde. Daher wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

Die Genotypisierung von *H. meleagridis* mittels C-Profiling sollte zum einen klären, ob es auch in Deutschland verschiedene Histomonaden-Typen gibt. Falls dies der Fall ist, sollte die Genotypisierung zum anderen Aufschluss über die Epidemiologie der Erkrankung, insbesondere der Frage, ob der Erreger aus Hühnerbeständen in Putenbestände verbracht wird, geben.

Von den 209 diagnostisch positiven Proben konnten 125 C-Profile der ITS1-Region erstellt werden. Fünf verschiedene Typen (A bis E) wurden gefunden, wobei Typ E deutlich verschieden von den anderen vier Typen war. Über die Hälfte der untersuchten Proben konnte Typ A zugeordnet werden, der damit der am häufigsten vorkommende Typ war. Jeweils ein Fünftel der Proben zeigte die Zugehörigkeit zu Typ B bzw. Typ C. Nur vereinzelt fand sich Typ D. Lediglich eine Probe, die aus einem Hühnerbestand gesandt wurde, konnte Typ E zugeordnet werden. Innerhalb dieses Fluorogramms konnten die Grenzen der ITS1-Region gut lokalisiert werden. Dabei handelte es sich um einen Typ, der keine Ähnlichkeit mit den anderen Typen hatte. Möglicherweise handelt es sich hier um einen nur schwach pathogenen Typ, der kaum pathologische Veränderungen beim Geflügel hervorruft. Aus diesem Grund wurde vermutlich nur diese eine Infektion erkannt und zur Diagnose eingeschickt.

Von den erstellten C-Profilen gingen knapp zwei Drittel auf Putenproben und etwa ein Drittel auf Hühnerproben zurück. Schon bei der PCR fiel auf, dass Proben, die ein negatives Ergebnis mit den Primern HmDiff2F und HmDiff2R zeigten, überwiegend von Hühnerproben stammten: Von 91 Hühnerproben waren bei 23 Proben die Diff2-PCR negativ. Im Gegensatz dazu waren nur bei 11 von 101 Putenproben das Ergebnis dieser PCR negativ. Von den Putenproben waren sechs von 83 Fluorogrammen oder 7,23 % nicht auswertbar, d. h. eine Abgrenzung der ITS1-Region und somit das Erstellen eines C-Profils war nicht möglich. Bei den 60 Fluorogrammen aus Hühnerproben war dies dreimal so oft der Fall: 18 mal konnte kein C-Profil erstellt werden. Das betraf somit knapp ein Drittel der Hühnerproben. Aus

einem Hühnermastelterntierbetrieb wurden im Jahr 2010 59 Proben eingesendet. Dies war fast ein Drittel des gesamten Probenmaterials aus diesem Jahr. Wie auch bei vielen anderen Hühnerproben war die Erstellung eines C-Profils nicht bei allen Proben möglich. Nur von einem Drittel der 30 positiv getesteten Proben konnte das C-Profil einem Typen zugeordnet werden.

Auffallend war, dass Proben, die von Hühnern stammten, in der Diagnostik-qPCR oftmals einen cT-Wert von über 30 aufwiesen. Im Gegensatz zu der Diagnostik-qPCR waren die entwickelten Diff2-Primer weitaus weniger sensitiv, was sich in einem negativen PCR-Ergebnis dieser Proben zeigte. Häufiger als bei Puten wurden bei Hühnern aufgrund der geringeren Mortalität Kloakentupfer von lebenden Tieren eingesendet, bei denen weniger Histomonaden anhaften, als in Organen zu finden sind. Die sensitivere qPCR konnte in diesen Fällen häufig noch Histomonaden nachweisen, was mit der weniger sensitiven Diff2-PCR nicht möglich war. War die Diff2-PCR dennoch positiv, so waren die Banden im Agarose-Gel, die zur Sequenzierung weiter verarbeitet wurden, bei Hühnerproben häufig so schwach, dass für eine Sequenzierung nicht ausreichend Material zur Verfügung stand. Es wurden zwar einige Fluorogramme erstellt, bei diesen war aber eine Abgrenzung der ITS1-Region und somit die Erstellung eines C-Profils oftmals nicht möglich. Die Diff2-PCR der Putenproben zeigte hingegen in den meisten Fällen ein klar positives Ergebnis, was an einer deutlichen Bandenstärke im Agarosegel zu sehen war.

Durch das C-Profiling konnte gezeigt werden, dass sowohl bei Hühnern als auch bei Puten der Typ A als dominierender C-Profil Typ vorkommt. Auch das C-Profiling von Proben zum einen aus einem Putenelterntierbetrieb und zum anderen aus einem Hühnermastelterntierbetrieb bestätigten dies: beides Mal wurde Typ A nachgewiesen. Möglicherweise deutet dies auf eine Einschleppung des Erregers aus Hühner- in Putenbestände oder umgekehrt hin, da die Übertragung von infizierten Hühnern auf Puten in Zusammenspiel mit Heterakiden eine Rolle spielt (Swales, 1950b; Lund und Chute, 1970). In einem Betrieb, der sowohl Puten als auch Hühner hält, kam es zu insgesamt vier Ausbrüchen der Histomonose. Bei den Puten kam es zu drei Ausbrüchen, bei denen die Typen A und B nachgewiesen wurden. Die Hühner waren nur einmal betroffen, wobei Typ B detektiert wurde. Auch hier könnte es zu einer Verbreitung der Histomonaden von den Hühnern zu den Puten gekommen sein. Wie schon vorher diskutiert wurde, wird möglicherweise nicht jede Infektion mit *H. meleagridis* bei Hühnern bemerkt oder diagnostisch abgeklärt. Eventuell waren die Hühner dieses Bestandes jedesmal auch von einer vielleicht milden Form der

Histomonose betroffen, wenn die Krankheit bei den Puten nachgewiesen wurde. Im Laufe der Erkrankung wurden die Histomonaden dann von den Hühnern zu den Puten verschleppt. Genauso ist es möglich, dass der Erreger in Heterakiden-Eiern persistiert hat, mit denen er dann in die Putenherden gelangte. Die Eier sind z. B. in der Einstreu mehrere Jahre überlebensfähig und auch infektiös (Farr, 1961). Informationen zu einem Heterakiden-Befall in diesem Bestand lagen jedoch nicht vor.

Überwiegend an Puten angepasste Typen scheinen die beiden Typen B und C zu sein. Neben Typ A kamen sie – wenn auch nur halb so häufig – bei der Pute etwa gleich oft vor. Beim Huhn fand man sie dagegen nur vereinzelt. Möglicherweise handelt es sich bei Typ B und C aber auch um Typen, welche für Hühner weniger virulent sind. Sind Hühner nur Träger dieses Typs, ohne selber zu erkranken, besteht auch keine Veranlassung, Proben zur Abklärung einer Histomonose untersuchen zu lassen. Ein Screening gesunder Hühnerherden würde weiteren Aufschluss geben, ob die Typen B und C in solchen Herden vorkommen.

Anders verhält es sich mit dem Typ D. Dieser konnte in keiner Putenprobe nachgewiesen werden. Auch bei Hühnern trat er nur vereinzelt auf. Dennoch scheint eine Anpassung dieses Typs bevorzugt an Hühner stattgefunden zu haben.

Weitere C-Profile wurden aus Pfauenproben erstellt. Einmal wurde Typ A gefunden und einmal der seltene Typ D. Da es sich hierbei aber lediglich um zwei Proben handelte, können hier keine weiteren Aussagen getroffen werden.

Mittels C-Profiling fanden van der Heijden et al. (2006) drei verschiedene Typen von *H. meleagridis*. Zwei Typen (I und II), die untereinander sehr ähnlich waren, unterschieden sich dabei deutlich von einem dritten Typ (III). Aufgrund morphologischer Studien wurde vermutet, dass es sich bei Typ III um eine weitere amöboide Spezies handelt, die zwar sehr ähnlich, aber nicht identisch mit *H. meleagridis* ist (van der Heijden et al., 2006). Von Mantini et al. (2009) wurde dieser Typ schließlich als *P. wenrichi* bezeichnet.

Alle mit den in dieser Arbeit entwickelten Primern erhaltenen C-Profile der ITS1-Region zeigten keinerlei Ähnlichkeit mit den C-Profilen, die von van der Heijden et al. (2006) beschrieben wurden. Insgesamt wurden acht verschiedene Proben sowohl mit den hier entwickelten als auch mit den Primern von van der Heijden et al. (2006) amplifiziert. In allen acht Fällen ergab sich jeweils ein identisches C-Profil, unabhängig davon, welcher Primer verwendet wurde. Es bliebe abzuklären, inwieweit Proben aus den Niederlanden mit

denselben Primern zu Ergebnissen führen, wie sie van der Heijden et al. (2006) beschreiben oder ob die erhaltenen C-Profile vergleichbar mit denen dieser Arbeit sind.

Alle Fluorogramme der ITS-Regionen stellten sich sehr komplex dar: An jeder Position kam es durch die Sequenzierung unterschiedlicher Basen zu Überlagerungen. Diese Überlagerungen können zwei Gründe haben: Zum einen können sie intergenomisch bedingt sein. Dies würde bedeuten, dass in dem entsprechenden Isolat, welches jeweils sequenziert wurde, mehrere Subpopulationen vorhanden waren. Zum anderen können die Überlagerungen auf intragenomische Unterschiede zurückzuführen sein. Dies wäre der Fall, wenn das rRNA-Gen, in dem die ITS-Regionen lokalisiert sind, in Kopien innerhalb des Genoms vorliegen. Es würde sich somit um ein Multicopy-Gen mit sich unterscheidenden Kopien handeln. Nachweise, dass das rRNA-Gen ein Multicopy-Gen ist, gibt es bei verschiedenen Eukaryoten (Ghosh et al., 2000; Wittner et al., 2011) sowie bei dem mit *H. meleagridis* nahe verwandtem *T. vaginalis* (Carlton et al., 2007).

Aus Kulturmaterial des Stammes GB 1169/09 wurden durch die Methode der Mikromanipulation monoklonale Kulturen gewonnen. Bei einer monoklonalen Kultur, die alle von einer einzelnen Zelle abstammen, dürften, wenn die Überlagerungen auf das Vorhandensein unterschiedlicher Subpopulationen zurückzuführen sind, in diesem Falle keine Überlagerungen mehr im Fluorogramm auftreten. Bleiben die Überlagerungen bei den monoklonalen Kulturen auch weiterhin bestehen, so handelt es sich um intragenomische Unterschiede, falls das rRNA-Gen als Multicopy-Gen vorliegt. Die Überlagerungen stellen somit unterschiedliche Kopien des Gens dar.

Von zehn monoklonalen Kulturen wurden nach Amplifizierung und Sequenzierung Fluorogramme der ITS1-Region erhalten. Alle zehn Fluorogramme zeigten deutliche Überlagerungen. Bei intergenomischen Unterschieden hätten die Überlagerungen nicht auftreten dürfen. Somit muss es sich um intragenomische Unterschiede handeln, die in der Tatsache begründet ist, dass das rRNA-Gen als Multicopy-Gen vorliegt. Die einzelnen C-Profil Typen werden dabei durch die verschiedenen Allele als Summe der Überlagerungen bestimmt.

Das C-Profiling der Ausgangskultur und neun monoklonaler Kulturen ergab die Zuordnung zu Typ A. Eine Kultur wurde Typ C zugeordnet. Es kann kein Rückschluss darauf gezogen werden, dass die Ausgangskultur eventuell eine Mischkultur mit beiden Typen war, da zum einen die Ausgangskultur Typ A zugeordnet wurde und zum anderen nur eine Zelle

entnommen wurde. Die DNA aller 10 Kulturen geht auf die DNA dieser einzigen Zelle zurück, daher hätten diese Unterschiede nicht vorkommen dürfen. Die Methode des C-Profilings weist zwar eine hohe Reproduzierbarkeit auf, zu 100 % scheint sie jedoch nicht gegeben.

Für ein Allignment der Sequenzen wurde das PCR-Produkt des Typs A und das PCR-Produkt des Typs C kloniert. Fünf Typ A-Klone und vier Typ C- Klone wurden sequenziert. Dabei fiel auf, dass sich die Sequenzen der Klone des Typs A an einzelnen Stellen von den Klonen des Typs C unterschieden. Nicht nur die Klone der beiden Typen sondern auch Klone des jeweils gleichen Typs wiesen Unterschiede in einigen Sequenzbereichen auf. Da es sich bei den Überlagerungen um intragenomische Unterschiede handelt, war dies zu erwarten.

Auch bei vier Fällen wurden zwei unterschiedliche C-Profil Typen in verschiedenen Proben aus demselben Bestand nachgewiesen. Hier kam es eventuell zur selben Zeit zu einer Mischinfektion mit zwei verschiedenen Typen. Denkbar wäre auch, dass zum Zeitpunkt der Diagnose nicht nur Histomonaden aus dem akut auftgetretenen Fall nachgewiesen wurden, sondern auch Histomonaden, die in dem Moment im Stall persistierten. Möglicherweise zeigt sich aber auch in diesen vier Fällen, dass die Methode des C-Profilings zwar in der Regel sehr zuverlässig ist, sich aber nicht zu 100 % reproduzieren lässt.

Im Darmtrakt von Geflügel kommen neben dem Protozoen *H. meleagridis* auch die beiden Einzeller *Blastocystis* spp. und *T. gallinarum* vor. Die Bedeutung, die eine solche Infektion für das Geflügel hat, ist unklar. Blastocysten, die neben dem Geflügel auch viele andere Tiere sowie den Menschen befallen, rufen – wenn überhaupt – unspezifische Symptome des Magen-Darm-Traktes hervor (Tan, 2004). Auch die Pathogenität von *T. gallinarum*, einem Darmbewohner beim Geflügel, ist bis heute nicht zufriedenstellend geklärt. Für Enten konnte eine Pathogenität von *T. gallinarum* festgestellt werden (Richter et al., 2010). Inwieweit aber auch Puten oder Hühner Krankheitssymptome bei einem natürlichen Befall mit diesem Parasiten zeigen, ist unklar, obwohl Norton (1997) Krankheitssymptome bei Hühnern und Puten durch experimentelle Infektion erzeugten.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Histomonose und einem Befall mit einem dieser beiden Erreger aufzuzeigen, wurden 273 positiv sowie 90 negativ auf Histomonaden getestete Proben der Jahre 2004 bis 2010 auf das Vorhandensein von *Blastocystis* spp. und *T. gallinarum* untersucht. Sowohl bei den positiven als auch bei den negativen Histomonaden-Proben konnte jeweils in einem Drittel DNA von *Blastocystis* spp.

nachgewiesen werden. Bei jeweils zwei Dritteln der Proben gelang der Nachweis nicht. Anders verhielt es sich mit dem Nachweis von *T. gallinarum*. Bei den positiven Histomonaden-Proben wurde diese Erreger-DNA nur vereinzelt nachgewiesen. Ähnlich wie *Blastocystis* spp. fand sich *T. gallinarum*-DNA dagegen in etwa einem Drittel der negativen Histomonaden-Proben.

Damit ergab sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von *H. meleagridis* und dem gleichzeitigen Fehlen von *T. gallinarum*. Ein gleichzeitiger Nachweis von Histomonaden und *T. gallinarum*-DNA war selten. Möglicherweise sind die Histomonaden in der Lage, *T. gallinarum* aus dem Darm zu verdrängen. Ebenfalls möglich ist, dass durch das Vorhandensein von *H. meleagridis* die Blinddarm-Mukosa so weit geschädigt ist, dass für *T. gallinarum* hier kein geeignetes Habitat mehr vorhanden ist. Auch eine Immunantwort des Wirtskörpers auf die Histomonaden könnte in gleichem Maße *T. gallinarum* betreffen, so dass die Nachweisrate entsprechend niedrig ist. Der Fund von weitaus mehr *T. gallinarum* bei Tieren, die nicht gleichzeitig mit *H. meleagridis* befallen waren, scheint diese Vermutungen zu bestätigen. Die dabei auftretenden Läsionen stellen bei einer Feldinfektion eine Differentialdiagnose zur Histomonose dar.

Ein Zusammenhang zwischen *H. meleagridis* und *Blastocystis* ssp. stellte sich als nicht signifikant heraus. Das gleichzeitige Vorkommen von Histomonaden genau wie dessen Fehlen ist also zufällig begründet. Werden bei einer Histomonose auch Blastocysten nachgewiesen, stellt dies zwar oft einen Nebenbefund dar. Dennoch sollte der Fund von Blastocysten nicht verharmlost werden, da diese ebenfalls Läsionen im Magen-Darm-Trakt des Geflügels hervorrufen können (Tan, 2004).

Da die Histomonose bis zum Verbot aller Medikamente bei lebensmittelliefernden Tieren besonders mit Imidazolen gut zu behandeln war, bestand kaum Interesse, den Parasiten näher zu untersuchen. Zwar ist es gut möglich, Histomonaden in vitro zu kultivieren, die genauen Zusammenhänge sowie die Notwendigkeit der einzelnen Komponenten des Kulturmediums sind dabei aber nicht bekannt. Wesentliche Grundlagen z. B. zum Kohlenhydratstoffwechsel fehlen bis jetzt vollkommen.

Die Standardbedingungen für eine bis heute übliche in vitro Kultivierung von *H. meleagridis* geht auf die Beschreibungen von Dwyer (1970) zurück. Er erzielte die besten Resultate mit der Verwendung von M199 als Kulturmedium, dem er Chicken Embryo Extract (CEE), 10 % inaktiviertes Pferdeserum sowie 10 bis 12 mg steriles Reismehl hinzufügte,

womit das sogenannte Dwyers Medium entstand. Für eine optimale Wachstumsrate empfahl er eine Temperatur von 41 bis 42 °C. Die Passage einer Kultur erfolgt durch Zugabe eines Milliliters alter Kultur in neun Milliliter frisches Kulturmedium. Weiterhin hat sich auch die Anzucht in PBS statt M199 bewährt (Hauck et al., 2010b).

Für ein Wachstum der Histomonaden in vitro sind zwei Komponenten essentiell. Zum einen wird eine Kohlenhydratquelle benötigt. Diese stammt klassischerweise aus Reismehl (Dwyer, 1970), aber auch Hafer-, Roggen- und Buchweizenmehl sowie Maisstärke eignen sich gut (Hauck et al., 2010b). Mit Gerstenmehl bzw. Hopi-Maismehl ließ sich hingegen nur ein geringes Wachstum erzielen (Hauck et al., 2010b). Zum anderen kann kein Wachstum ohne Bakterien erfolgen (Bishop, 1938; DeVolt, 1943; Lesser, 1964b). Es ist noch nicht geklärt, ob sich die Histomonaden direkt von der Kohlenhydratquelle ernähren oder diese vielmehr als Nahrung für die Bakterien dient, welche zum Wachstum von *H. meleagridis* führen. Wahrscheinlich scheint eine Mischung aus beidem (Tyzzer, 1934).

Van der Heijden et al. (2005) nehmen an, dass Histomonaden nur in der Lage sind, Partikel von einer Größe unter 5 µm aufzunehmen. Dies belegten sie durch Kultivierungsversuche, in denen dem Medium ausschließlich größere Reispartikel hinzugegeben wurde. Die Histomonaden konnten die Reispartikel zwar nicht aufnehmen, dennoch kam es zu einer Vermehrung der Parasiten. Größere Partikel sind demnach nur eine indirekte Nahrungsquelle aufgrund des Zusammenspiels mit den Bakterien (van der Heijden et al., 2005). In den meisten Histomonadenzellen sind lichtmikroskopisch mehrere Partikel zu erkennen. Hierbei handelt es sich um Reispartikel, die sich in Nahrungsvakuolen befinden. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind in den Nahrungsvakuolen zudem noch Bakterien zu erkennen (Munsch et al., 2009a). Auch Schuster (1968) konnte Bakterien in Nahrungsvakuolen bei Histomonaden elektronenmikroskopisch nachweisen. Diese gelangen durch Phagocytose in die Zelle (Lee, 1971). Hauck et al. (2010b) nehmen an, dass es sich bei den in den Zellen zu findenden Partikeln um Material aus in die Zelle aufgenommenen verendeten Bakterien handelt. Die dem Kulturmedium hinzugefügte Stärke könnte demnach der Ernährung der Bakterien dienen.

In der vorliegenden Arbeit wurden den Histomonaden in mehreren Kultivierungsversuchen unterschiedliche Stärkequellen sowie Zwischenprodukte des Kohlenhydratstoffwechsels angeboten. Als Stärkequellen kamen Reis, Kartoffelstärke, Amylose, Amylopektin und Glykogen in M199 mit 10 % inaktiviertem Pferdeserum zum Einsatz. Alle Stärketypen wurden in einer Menge von 2 g/L hinzugegeben, Reis zusätzlich in

einer Menge von 4 g/L. Auschließlich mit Reis oder Kartoffelstärke konnte ein Wachstum erzielt werden. Interessanterweise unterschieden sich die Partikel in den Histomonaden, welche mit M199 und entweder Reis oder Kartoffelstärke kultiviert wurden, lichtmikroskopisch voneinander. Nach der Vermutung von Hauck et al. (2010b), wonach es sich hierbei um Bakteriendebris handelt, dürfte kein Unterschied festzustellen sein.

Um einem Abfall des pH-Wertes im Kulturmedium entgegenzuwirken, wurde in einem nächsten Versuchsteil das Medium der entsprechenden Kulturen abgepuffert. Dafür war es nötig, als Kulturmedium PBS zu verwenden, denen die beiden Puffer MOPS (100 mM/L) und HEPES (50 mM/L) hinzugegeben wurden. In diesem Ansatz wurden Reis, Amylose, Amylopektin und Glykogen, jeweils in einer Konzentration von 2 g/L getestet. Ohne die Zugabe der beiden Puffer lag der pH-Wert bei Zugabe von Reis bzw. Amylose über die einzelnen Tage in einem Bereich von 6, bei der Zugabe von Amylopektin bzw. Glykogen deutlich unter 6. Dwyer (1970) erzielte die besten Wachstumsergebnisse mit einem pH-Wert des Mediums von 7,4, welcher nach Zugabe von 1 ml Histomonadenkultur auf 7,1 abfiel. Am Wachstumspeak konnte er einen Wert von 6,6 messen. Daher wurde der pH-Wert der Puffer auf 7 eingestellt. Der Abfall des pH-Wertes läßt sich durch ein vermehrtes Wachstum der in den Kulturen vorhandenen Bakterien erklären (Hauck et al., 2010b). Das ausbleibende Wachstum in den abgepufferten Medien – Ausnahme waren die Kulturen mit Reis – ist vermutlich ebenfalls dadurch zu erklären, dass die Kulturen mit Bakterien überwachsen wurden (Lesser, 1964b).

Statt verschiedenen Stärkequellen wurden die Histomonaden im nächsten Versuch mit Zwischenprodukten des Kohlenhydratstoffwechsels kultiviert. Dies waren Glukose, Pyruvat, Glukose-1-Phosphat, Glukose-6-Phosphat sowie Maltose. Gewählt wurden diese Quellen, da sie alle eine Rolle bei der Energiegewinnung der Zelle spielen. Der Abbau von Glukose erfolgt in der Glykolyse. Hier entsteht über mehrere Zwischenprodukte – als erstes entsteht Glukose-6-Phosphat – letztlich Pyruvat, welches bei den Histomonaden in den Hydrogenosomen weiter verstoffwechselt wird. Die Verwendung von Pyruvat als Kohlenhydrat-Quelle würde die gesamte Glykolyse umgehen und könnte direkt in die weitere Energiegewinnung einfließen.

Der erste Schritt der Glykolyse besteht aus der Phosphorylierung von Glukose zu Glukose-6-Phosphat. Sowohl die Eignung der Glukose als auch die des ersten Zwischenproduktes – Glukose-6-Phosphat – wurde getestet.

In der Glykogenolyse wird Glykogen über Glukose-1-Phosphat und Glukose zu Pyruvat abgebaut. Daher wurden zwei Versuche durchgeführt, bei denen den Histomonaden statt Stärke direkt die Zwischenprodukte der Glykogenolyse angeboten wurden.

Eine alleinige Gabe von Glukose war nicht ausreichend oder sogar schädlich, ein Wachstum der Histomonaden herbeizuführen. Um die Frage zu klären, ob das nicht erfolgte Wachstum auf die Glukose selber oder auf einen möglicherweise zu niedrigen pH-Wert der Kultur zurückzuführen war, wurde Glukose ohne Reis und ohne die beiden Puffer MOPS und HEPES eingesetzt. Ein Wachstum erfolgte hier nicht. Der pH-Wert bei Gaben von 3, 4 oder 5 g/L Glukose lag in einem Bereich von 4, welcher laut Dwyer (1970) und Hauck et al. (2010b) zu niedrig ist, um ein Wachstum von *H. meleagridis* zu ermöglichen. Demgegenüber stand ein pH-Wert im Bereich von 6 bei niedrigerer Konzentration der Glukose (1 und 2 g/L), bei dem jedoch ebenfalls kein Wachstum verzeichnet werden konnte. Verschiedene Konzentrationen an Glukose (1, 2, 3, 4 und 5 g/L) wurden daraufhin zusammen mit 100 mM/L MOPS und 50 mM/L HEPES eingesetzt. Reis wurde in einer Konzentration von 2 g/L gegeben oder weggelassen. Die Zugabe von Reis führte zu einem Überleben der Kulturen. Von einem wirklichen Wachstum konnte aber auch hier nicht gesprochen werden. Jedoch ohne Reiszugabe starben die Kulturen ab. Der pH-Wert lag bei Konzentrationen von 1 bis 4 g/L Glukose in einem Bereich von 6. Das Absterben der Kulturen kann also nicht auf einen zu niedrigen pH-Wert zurückgeführt werden. Lediglich bei den Kulturen, denen Glukose in einer Konzentration von 5 g/L zugesetzt wurde, lag der pH-Wert trotz der Zugabe der beiden Puffer deutlich unter 6. Das ausbleibende Wachstum der Histomonaden gerade bei hohen enthaltenen Glukose-Konzentrationen im Medium könnte auf eine zu starke Vermehrung der Bakterien zurückgeführt werden. Möglicherweise konkurrieren die Histomonaden mit den Bakterien um die Ressourcen im Medium. Bei einem Überwachsen der Histomonadenkulturen mit Bakterien empfiehlt schon DeVolt (1943), Glukose aus dem Medium zu entfernen.

Die Eignung von Pyruvat, Glukose-1-Phosphat, Glukose-6-Phosphat und Maltose – ein Glukosedimer – wurden in den Konzentrationen 2 und 5 g/L, mit und ohne die Zugabe von 2 g/L Reis und ebenfalls mit und ohne Zugabe von 100 mM/L MOPS und 50 mM/L HEPES getestet. Bei Verwendung von Pyruvat überlebten die Kulturen ohne die gleichzeitige Gabe von Reis bestenfalls, wenn Pyruvat in einer Konzentration von 2 g/L und zusätzlich mit MOPS und HEPES gegeben wurde. Oftmals starben die Kulturen jedoch ab. Alle Kulturen, denen auch Reis zugesetzt wurde, zeigten ein gutes Wachstum. Ein vergleichbares Ergebnis

zeigten die Kulturen mit Glukose-1-Phosphat bzw. Glukose-6-Phosphat als Kohlenhydratquelle. Abgestorben waren hier nur die Kulturen ohne MOPS, HEPES und Reis mit einer Glukose-1-Phosphat-Konzentration von 5 g/L bzw. mit einer Glukose-6-Phosphat-Konzentration von 2 g/L. Auch hier wuchsen alle Kulturen mit gleichzeitiger Gabe von Reis gut. Die Zugabe von Maltose förderte unter keinen der getesteten Bedingungen das Wachstum von *H. meleagridis*. Oftmals überlebten die Kulturen, wohingegen sie bei der Gabe von 5 g/L Maltose ohne MOPS und HEPES abstarben. Auffallend war, dass hier der pH-Wert der Kulturen in einem Bereich von 4 lag, was auch beim Einsatz von Glukose zu keinem Wachstum führte.

Nach allen stattgefundenen Versuchen scheint es wahrscheinlich, dass Histomonaden nicht in der Lage sind, verschiedene Stärkequellen in die Zelle aufzunehmen und/oder abzubauen. Lediglich Reis und Kartoffelstärke wurden in den Histomonadenzellen lichtmikroskopisch nachgewiesen. Warum diese beiden Stärketypen aufgenommen und abgebaut wurden, konnte nicht geklärt werden. Auch die Metaboliten des Kohlenhydratstoffwechsels (Glukose, Glukose-1-Phosphat, Glukose-6-Phosphat, Pyruvat und Maltose) wurden offensichtlich nicht von den Histomonaden phagozytiert und abgebaut. In diesen Kulturen schien die alleinige Aufnahme von Bakterien in die Zelle nicht ausreichend gewesen zu sein, ein Wachstum der Histomonaden herbeizuführen. Erst bei zusätzlicher Gabe von Reis war ein – wenn auch geringes Wachstum – festzustellen. Dieses Wachstum war in den meisten Fällen geringer, als in Kulturen, zu denen ausschließlich Reis gegeben wurde. Möglicherweise spielt in den Fällen, in denen es nur zu einem geringen Wachstum kam, wiederum eine zu starke Vermehrung der Bakterien, die sich hemmend auf das Histomonadenwachstum auswirkt, eine Rolle. Hinweise hierauf könnten die Kultivierungsversuche mit Glukose bzw. Maltose geben. Ohne die Zugabe der beiden Puffer lag der pH-Wert in diesen Kulturen weit unter 6. Ein niedriger pH-Wert ist darauf zurückzuführen, dass die Bakterien im Kulturmedium die Kohlenhydrate verstoffwechselt haben. Bei einem sehr starken Abfall des pH-Wertes kam es vermutlich auch zu einer starken Vermehrung der Bakterien. Im Umkehrschluss könnte bei den Kulturen, bei denen verschiedene Kohlenhydrate sowie Zwischenprodukte des Kohlenhydratstoffwechsels eingesetzt wurden, ein Bakterienwachstum stark gehemmt worden sein. Hinweis hierfür ist ein relativ konstanter pH-Wert in einem Bereich von 6 bis 7, auch bei den Kulturen, denen kein Puffer hinzugegeben wurde. Zu wenig Bakterien im Kulturmedium verbunden mit der Unfähigkeit, die Stoffwechselmetaboliten sowie einige Kohlenhydrate zu phagozytieren scheinen Ursache für das ausbleibende Histomonadenwachstum gewesen zu sein.

Alle Kulturen wurden täglich ausgezählt, um das Wachstum der Histomonaden zu bestimmen. Dafür wurden die Kulturflaschen geöffnet, um Kulturmaterial zu entnehmen. Um nun einen wachstumshemmenden Einfluss des dabei an die Kulturen gelangenden Sauerstoffs auszuschließen, wurden Kulturen in PBS mit MOPS und HEPES sowie Reis und die entsprechende Kohlenhydratquelle aus den vorangegangenen Versuchen angesetzt. Der pH-Wert wurde in den ersten zwölf Stunden mehrmals gemessen (nach zwei, vier, sechs, neun und zwölf Stunden). Die Kultur, die nach zwei Stunden das erste Mal geöffnet wurde, wurde auch zu allen anderen Zeitpunkten geöffnet. Nach vier Tagen wurde bei allen Kulturen das Wachstum bestimmt. Ein negativer Einfluss des Luftsauerstoffs konnte dabei nicht festgestellt werden. Im Gegenteil wuchsen die Kulturen, die mehrfach geöffnet wurden, besser als diejenigen, die einmalig am vierten Tag geöffnet wurden. Ebenso zeigten sich keine Veränderungen im pH-Wert. Dieser lag bei allen Kulturen in einem Bereich von 6. Auch ein pH-Wertabfall in den ersten zwölf Stunden des Wachstums, der ein weiteres Wachstum hemmt, konnte ausgeschlossen werden. Hauck et al. (2010b) erzielten ähnliche Ergebnisse, wenn sie 1 g/L Glukose zu Histomonadenkulturen gaben: hier sank der pH-Wert nach 4 Stunden zwar kurzzeitig auf unter 6, stieg dann jedoch in den nächsten Stunden wieder in einen Bereich um 6 an. Bei Zugabe von 5 g/L Glukose fiel der pH-Wert in den ersten 12 Stunden dagegen auf etwa 4 und bleib auch die nächsten Tage bei diesem Wert. Im Unterschied zu den oben beschriebenen Versuchen war das Medium bei Hauck et al. (2010b) jedoch schwächer abgepuffert.

Aufgrund der Ergebnisse dieses Versuchsteils wurde versucht, Histomonaden mikroaerophil oder anaerob zu kultivieren. Die Angaben in der Literatur zu den Anforderungen der Histomonaden an die atmosphärischen Bedingungen schwanken. Delappe (1953) züchtete Histomonaden unter aeroben und anaeroben Bedingungen an. Die anaeroben Bedingungen wurden durch die Gabe von 0,1 % bzw. 0,2 % Cystein-HCl oder die Überschichtung der Kulturen mit Paraffin erzeugt. Durch Zugabe von Methylenblau als Indikator wurde das anaerobe Milieu überwacht. Bei der Zugabe von 0,1 % Cystein-HCl stellte sich keine vollständig anaerobe Atmosphäre ein. Unter diesen mikroaerophilen sowie unter aeroben Bedingungen war ein Wachstum feststellbar. Letzteres widerspricht der heute weit verbreiteten Ansicht, dass Histomonaden unter aeroben Bedingungen nicht wachsen können (Hauck et al., 2010b). In den aktuellen Versuchen hatten mikroaerophile und anaerobe Bedingungen keinerlei schädlichen Einfluss auf das Wachstum der Histomonaden. In diesem Versuchsteil konnte damit gezeigt werden, dass Histomonaden sowohl mikroaerophil als auch anaerob wachsen können. Die Ergebnisse widersprechen somit teilweise denen von Delappe

(1953), der unter anaeroben Bedingungen kein Wachstum feststellen konnte. Die Gründe hierfür sind wahrscheinlich die unterschiedlichen Methoden, die gewählt wurden, um anaerobe Bedingungen herzustellen. In den aktuellen Versuchen wurde dem Medium kein Zusatz hinzugegeben, wie es bei Delappe (1953) geschah, sondern das flüssige Medium war direkt von einer anaeroben gasförmigen Phase umgeben.

In einem letzten Versuch sollte geklärt werden, ob verschiedene, am Kohlenhydratstoffwechsel beteiligte Enzyme auf Ebene der Transkription reguliert werden, wenn den Histomonaden Pyruvat als Kohlenhydratquelle angeboten wird. Es wurde eine mögliche Regulierung der Enzyme Glykogen-Phosphorylase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Alpha-Amylase untersucht.

Stärke besteht zu 20 bis 30 % aus Amylose und zu 70 bis 80 % aus Amylopektin. Die Amylose ist aus alpha-1,4-glykosidisch verbundenen Glukosemolekülen, die helikal angeordnet sind, aufgebaut. Amylopektin besteht in den linearen Bereichen aus alpha-1,4-glykosidisch verbundenen Glukosemolekülen. An den Verzweigungsstellen befinden sich alpha-1,6-glykosidische Bindungen. Damit ist es aufgebaut wie das Glykogen.

Die Stärke wird von der Alpha-Amylase zu Dextrinen abgebaut, welche dann weiter zu Maltose und schließlich – zusammen mit einem debranching enzyme – Glukose abgebaut werden (Heldt, 1999).

Die Glykogen-Phosphorylase katalysiert die Bindung freien Phosphats an das C1-Ende der Glukose und damit die Abspaltung des letzten Glukose-Moleküls der Kette als Glukose-1-Phosphat. Im Zusammenspiel mit dem debranching enzyme, welches das letzte Glukose-Molekül an einer Verzweigung als freie Glukose abspaltet, entstehen beim Abbau des Glykogens 90 % Glukose-1-Phosphat und 10 % freie Glukose. Glukose-1-Phosphat wird zu Glukose-6-Phosphat isomerisiert. Die Glukose aus dem Stärke- und dem Glykogenabbau wird ebenfalls zu Glukose-6-Phosphat umgewandelt (Berg et al., 2003b).

Hier konnte gezeigt werden, dass Histomonaden Stärke anscheinend sowohl mittels der Alpha-Amylase als auch der Glykogen-Phosphorylase abbauen. Bei Wirbeltieren ist die Alpha-Amylase im Darm aktiv, während die Glykogen-Phosphorylase intrazellulär wirkt. Damit wäre es denkbar, dass die Alpha-Amylase bei den Histomonaden in Nahrungsvakuolen aktiv ist oder in die Umgebung abgegeben wird, während die Glykogen-Phosphorylse den intrazytoplasmatischen Stärkeabbau katalysiert.

In der weiteren Glykolyse wird Glukose-6-Phosphat letztlich zu Pyruvat abgebaut. Hieran ist das Enzym GAPDH beteiligt (Berg et al., 2003a). Eine Gabe von Pyruvat würde die gesamte Glykolyse umgehen. Damit wäre auch die Glykogenolyse nicht mehr erforderlich, welche das Produkt – Glukose – für die nachfolgende Glykolyse liefert. Ebenfalls nicht mehr nötig wäre der Abbau von Stärke, bei dem letztlich ebenfalls Glukose entsteht. Die beteiligten Enzyme würden nicht mehr benötigt und die Transkription könnte demnach herunterreguliert werden.

Die mögliche Regulierung wurde mittels qPCR untersucht, in der Material aus Kultivierungsversuchen mit Pyruvat untersucht wurde. Als Kulturmedium diente PBS mit 8 g/L NaCl, dem als Puffer 25 mM/L HEPES hinzugegeben wurde.

Als Untersuchungsgruppe dienten Kulturen, denen als Kohlenhydratquelle 2 g/L Pyruvat hinzugegeben wurde. Da es nicht möglich war, ein Wachstum ausschließlich mit Pyruvat zu erzielen, wurde als Stärkequelle Reis in einer Konzentration von 2 g/L beigefügt. Kontrollgruppen waren Kulturen, denen entweder 2 g/L Reis oder 4 g/L Reis hinzugegeben wurden.

Mittels der Berechnungssoftware REST2009 (REST = Relative Expression Software Tool) wurde die Regulation der Gene für Alpha-Amylase, Glykogen-Phosphorylase und GAPDH auf Transkriptionsebene untersucht.

Die Kulturen mit Pyruvat und Reis wurden mit Kulturen mit 2 g/L Reis bzw. 4 g/L Reis als Kontrollgruppen verglichen. Im Falle der Alpha-Amylase kam es lediglich zu einer Runterregulierung im Vergleich mit der 2 g/L Reis Kontrollgruppe. Das Glykogen-Phosphorylase-Gen wurde im Vergleich mit der 2 g/L Reis Kontrollgruppe hoch reguliert. Das GAPDH-Gen wurde im Vergleich mit beiden Kontrollgruppen hoch reguliert.

Die gemessenen Regulierungs-Faktoren sind mit weniger als 2,3 fach als niedrig einzustufen. Hätten die Histomonaden ausschließlich Pyruvat als Endprodukt der Glykolyse verstoffwechselt, dann hätte die gesamte Glykolyse umgangen werden können. Die Enzyme GAPDH und Alpha-Amylase wären in diesem Fall nicht mehr nötig gewesen und deren Expression hätte runter reguliert werden können. Für die Alpha-Amylase traf dies zu, allerdings war die Regulierung mit einem Faktor von 0,355 niedrig. Die Hochregulierung der GAPDH läßt vermuten, dass die Histomonaden den Reis als Stärkequelle in die Nahrungsvakuolen phagozytierten und nicht Pyruvat. Dies steht zwar in einem Widerspruch mit der Runterregulierung der Alpha-Amylase, aber wie bereits angemerkt, war der

gemessene Regulierungs-Faktor niedrig. Auch das Enzym Glykogen-Phosphorylase, welches den Abbau von Glykogen katalysiert, hätte in diesem Versuchsansatz nicht exprimiert werden müssen, da die Gabe und der Abbau von Pyruvat die Glykogenolyse umgeht. ter Kuile (1999) untersuchte u. a. die Enzym-Aktivität von 14 verschiedenen Enzymen durch spektrophotometrische Messungen bei *Leishmania donovani*, die am Kohlenhydrat-stoffwechsel beteiligt sind. Als Kohlenhydratquelle verwendete er Glukose, welche entweder begrenzt gegeben wurde oder unbegrenzt im Medium zur Verfügung stand. Unter den untersuchten Enzymen war auch die GAPDH, deren Aktivität erhöht war, wenn Glukose unbegrenzt gegeben wurde. Durch die Untersuchungen kam er zu dem Schluss, dass die möglichen Antworten eines Organismus auf sich ändernde Stärkequellen nahezu unendlich sind. Die Messung der Regulierung von lediglich drei Enzymen, wie in dieser Arbeit untersucht, spiegelt also die Möglichkeiten der Zelle, auf die veränderten Bedingungen zu reagieren, nicht ausreichend wider. ter Kuile und Bonilla (1999) untersuchten den mRNA-Gehalt und die zelluläre Aktivität der jeweiligen Enzyme bei *T. vaginalis* und *Trypanosoma brucei*. Auch hier wurden die Zellen unter limitierter bzw. unbegrenzter Glukosegabe kultiviert. Die Messung des mRNA-Gehalts u. a. der GAPDH erfolgte mit Hilfe des Northern Blots. Vergleichbar mit den Ergebnissen bei *L. donovani* (ter Kuile, 1999) war der mRNA-Gehalt, der für die GAPDH kodiert, in Zellen, die mit begrenzter Glukosegabe kultiviert wurden, niedriger als in Zellen, denen Glukose unbegrenzt zur Verfügung stand. ter Kuile und Bonilla (1999) geben trotz dieser Ergebnisse zu bedenken, dass die Expression bestimmter Gene nicht unbedingt mit deren zellulären Aktivität korrelieren. Ein Anstieg des mRNA-Gehalts bedeutet nicht unbedingt auch einen Anstieg in der Expression der entsprechenden Gene. Trotz Hoch- oder Runter-Regulierung muss dies also nicht zwangsläufig bedeuten, dass die schon exprimierten Enzyme nicht auch weiter reguliert werden.

Hauck et al. (2012) untersuchten ebenfalls die Regulierung der Gene der oben genannten Enzyme und zusätzlich die Regulierung der Transkription des Enolase-Gens. Allerdings setzten sie statt Pyruvat Glukose zu Kulturen mit Reis ein. Die Regulierungsrate wurde erstmals nach 6 Stunden gemessen, wobei alle drei Gene heraufreguliert wurden. Nach 24 und 48 Stunden ergab sich das gleiche Ergebnis, mit Ausnahme der Glykogen-Phosphorylase, die diesmal herunterreguliert wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde erst nach drei Tagen Kulturmaterial entnommen, um die Regulation zu bestimmen. Möglicherweise hätte sich mit den kürzeren Zeiträumen, die Hauck et al. (2012) verwendeten, ein anderes Ergebnis gezeigt. Vielleicht hätten die nach drei Tagen bestimmten

Regulierungen zu früheren Zeitpunkten ein anderes Ergebnis gezeigt. Auch die Regulierungsfaktoren könnten zu diesem Zeitpunkt höher gewesen sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde die GAPDH als zu untersuchendes Gen in REST2009 eingegeben. Die Auswertung ergab schließlich eine geringe Hochregulierung. In der Beschreibung der Berechnungssoftware REST2009 wird GAPDH dagegen als Referenzgen bzw. Housekeeping Gen verwendet (Pfaffl, 2001; Pfaffl et al., 2002). Die Rolle der GAPDH als Housekeeping-Gen ist jedoch umstritten. So kann sie z. B. in verschiedenen menschlichen Geweben in ihrer Expressionsrate durchaus variieren, obwohl sie innerhalb eines Gewebetyps die Rolle als Housekeeping-Gen erfüllt (Barber et al., 2005; Vandesompele et al., 2002). Die GAPDH als Referenzgen zu verwenden erscheint somit nicht sinnvoll, wie auch andere Arbeiten belegen (Radonic et al., 2004; Zhu et al., 2001).

Abschließend kann also nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob unter den gewählten Versuchsbedingungen eine Regulierung der Enzymgene stattfand oder eine Regulierung nur nicht ausreichend erkannt wurde.

6 Zusammenfassung

Untersuchungen zum Vorkommen verschiedener Genotypen und Untersuchungen zum Kohlenhydratstoffwechsel von *Histomonas meleagridis*

Bei der durch *H. meleagridis* hervorgerufenen Histomonose, Schwarzkopfkrankheit oder Infektiösen Typhlohepatitis der Hühnervögel handelt es sich um eine Krankheit, die durch Blinddarm- und Leberveränderungen gekennzeichnet ist. Bei Puten ist eine Mortalität von über 90 % häufig.

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit beinhaltete Untersuchungen des am Institut vorhandenen Probenmaterials sowie Untersuchungen zu verschiedenen Genotypen von *H. meleagridis*. Für ersteres wurden 568 Proben herangezogen, die am Institut für Geflügelkrankheiten vorlagen und mittels qPCR auf *H. meleagridis* getestet wurden. Die Proben stammten aus 252 Histomonose-Verdachtsfällen der Jahre 2004 bis 2010. Insgesamt waren von den 568 Proben 209 Proben positiv, 357 Proben negativ und 2 Proben fraglich. Von 473 Organproben waren 193 Blinddärme, 190 Lebern und 42 Poolproben aus Leber und Blinddarm. 48 Proben waren unterschiedliche Organe wie Drüsenmagen, Enddarm, Kloake, Milz, Niere, Oesophagus und Pankreas. 252 der Organproben stammten von Puten und 176 Organproben von Hühnern. Lediglich 16 Organproben wurden von anderen Hühnervögeln wie Pfau, Fasan, Königshuhn, Perlhuhn und Wachtel eingeschickt. Dreiviertel der letztgenannten Proben war dabei negativ. Bei 29 Organproben war die Tierart unbekannt. Von 46 Invertebratenproben bzw. 42 Umgebungsproben waren nur acht bzw. vier Proben positiv, jeweils 38 dagegen negativ.

Für die Genotypisierung wurde die Methode des C-Profilings modifiziert, indem für *H. meleagridis* spezifische Primer entwickelt wurden. 125 positiv auf *H. meleagridis* getestete Proben wurden genotypisiert. Von diesen Proben wurde ein C-Profil der ITS1-Region erstellt. Insgesamt wurden fünf unterschiedliche Profile gefunden (Typ A bis E), wobei Typ A bei über der Hälfte der Proben festgestellt wurde. Die beiden Typen B und C wurden überwiegend bei Putenproben gefunden, Typ D hingegen nur bei Hühnerproben und einer Pfauenprobe. Nur einmal wurde Typ E bei einer Hühnerprobe nachgewiesen.

Ferner wurden 273 Proben auf das Vorhandensein von *Blastocystis* spp. und *Tetratrichomonas gallinarum* untersucht. Der Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Histomonose und einem gleichzeitigen Fehlen von *T. gallinarum* stellte sich als signifikant

heraus, wohingegen es nur einen zufälligen Zusammenhang zwischen *H. meleagridis* und *Blastocystis* ssp. gab.

Der zweite Teil der Arbeit hatte zum Ziel, den Stoffwechsel der Histomonaden durch verschiedene Kultivierungsversuche zu untersuchen. Als erstes wurde die Pufferwirkung von MOPS und HEPES in verschiedenen Konzentrationen getestet. Mit 5, 25 oder 100 mmol/L HEPES bzw. mit 50 oder 100 mmol/L MOPS wuchsen die Histomonaden gut. Wurde MOPS oder HEPES hingegen in einer Konzentration von jeweils 250 mmol/L zum Medium gegeben, ließ sich kein Histomonadenwachstum erzielen.

Die nächsten Versuche betrafen den Ersatz von Reismehl durch unterschiedliche Stärkequellen bzw. Zwischenprodukte des Kohlenhydratstoffwechsels. Als Stärkequellen kamen Kartoffelstärke, Amylose, Amylopektin und Glykogen zum Einsatz. Lediglich mit Kartoffelstärke konnte ein Wachstum erzielt werden. Die Kohlenhydrate Glukose, Pyruvat, Glukose-1-Phosphat, Glukose-6-Phosphat und Maltose wurden in verschiedenen Konzentrationen entweder mit der gleichzeitigen Gabe von Reis oder ohne getestet. Die Kulturen, denen kein Reis hinzugegeben wurden, überlebten bestenfalls. Oftmals starben sie jedoch ab. Das Wachstum war mit einer gleichzeitigen Gabe von Reis besser. Ein teilweise gutes Wachstum wurde mit Puyruvat und Reis erzielt.

Die Histomonaden wurden unter verschiedenen atmosphärischen Bedingungen angezüchtet. Das mehrmalige Öffnen der Zellkulturflaschen, wobei das Medium mit den Histomonaden für eine gewisse Zeit dem Luftsauerstoff ausgesetzt war, hatte keinen negativen Einfluss auf das Wachstum. Auch unter mikroaerophilen und anaeroben Bedingungen wuchsen die Histomonaden gut.

Von Histomonaden, die als Kohlenhydratquelle Pyruvat und Reis erhielten, wurde die Expression der Gene für die Glykogen-Phosphorylase, die GAPDH und die Alpha-Amylase mittels qPCR untersucht. Alpha-Tubulin, Beta-Tubulin und 18S rRNA dienten als Referenzgene. So konnte gezeigt werden, dass die Stärke von den Histomonaden mit den beiden Enzymen Alpha-Amylase und Glykogen-Phosphorylase abgebaut wird. Die Expression der Gene der drei Enzyme wurde unterschiedlich reguliert. Das GAPDH-Gen und das Glykogen-Phosphorylase-Gen wurden signifikant hochreguliert, wohingegen das Alpha-Amylase-Gen signifikant herunterreguliert wurde.

7 Summary

Investigations on different genotypes and investigations on the carbohydrate metabolism of *Histomonas meleagridis*

Histomonosis, blackhead disease or infectious typhlohepatitis of the gallinaceous birds is caused by the protozoen parasite or Trichomonad *Histomonas meleagridis*. The disease is characterized by an inflammation of the ceca and liver damages. The mortality in turkey flocks can reach 90 %.

The first part of this thesis included investigations and analysis of different genotypes of *H. meleagridis*. The first studies were done on 568 samples, which had been send to the Institute for Poultry Diseases and were tested for *H. meleagridis* using a qPCR. The samples originated from 252 suspected cases of histomonosis of the years 2004 till 2010. Of the 568 samples 209 samples were positive, 357 samples negative and 2 samples questionable. Four hundred seventy three samples were organs including 193 ceca, 190 livers and 42 pools of ceca and liver. 48 samples were different organes like gizzard, rectum, cloaca, spleen, kidney, oesophagus or pancreas. 252 of the organ samples were from turkeys and 176 from chickens. Only 19 samples were from other gallinaceous birds like peacocks, pheasants, snow cocks, guinea fowls and quails and were tested with mostly negative result. The species of 29 samples was unknown. Of 46 samples of invertebrates and 42 samples of the environment only eight and four samples respectively were positive, while 38 each were negative.

For genotyping the method of the C-Profiling was modified by designing primers specific for *H. meleagridis*. One hundred twenty five samples, that were positiv for *H. meleagridis*, were genotyped. The ITS1-region of this samples was C-profiled. Five different profiles were found (type A through E). Type A was the most frequently detected type in over half the samples. Types B and C were mostly found in turkey samples. Type D occured only in chicken samples and in one peacock sample. Type E was found in only one chicken sample.

Furthermore 273 samples were tested for the presence of *Blastocystis* spp. and *Tetratrichomonas gallinarum*. There was a significant relationship between the occurrence of histomonosis and the concurrent absence of *T. gallinarum*. In contrast the relationship between *H. meleagridis* and *Blastocystis* ssp. was not significant.

The second part of the thesis dealt with investigations on the metabolism of *H. meleagridis*. Several experiments on the cultivation were done. First the effect of the buffers MOPS and HEPES were tested. With 5, 25 or 100 mmol/L HEPES and with 50 or 100 mmol/L MOPS respectively histomonads grew well. In concentrations of 250 mmol/L MOPS or HEPES no histomonal growth was observed.

In the following experiments the influence of different starch sources and carbohydrates instead of rice powder were tested. Starch sources were potato starch, amylose, amylopectin and glycogen. Only potato starch supported histomonal growth. The carbohydrates glucose, pyruvate, glucose-1-phosphat, glucose-6-phosphat and maltose were tested in different concentrations with or without the addition of rice. Cultures without rice survived at best. Often they died. Growth with the addition of rice was better. To some extent growth was achieved with pyruvate and rice.

Histomonads were grown under different atmospheric conditions. If the flasks were opened several times the medium with the histomonads had contact with the oxygen in the air for a certain time. This as well as microaerophilic and anaerobic conditions had no negative influence on the histomonal growth.

The expression of the genes for glycogen phosphorylase, GAPDH and alpha-amylase in histomonads which were grown with pyruvate and rice were analyzed by qPCR. Alpha-tubulin, beta-tubulin and 18S rRNA served as reference genes. It could be shown that histomonads digest the starch with both enzymes alpha-amylase and glycogen phosphorylase. The expression of the genes of the three enzymes mentioned above was regulated differently. The genes of GAPDH and glycogen phosphorylase were significantly upregulated whereas the gene of alpha-amylase was significantly downregulated.

8 Literaturverzeichnis

Abe, N. (2004): Molecular and phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from various hosts. Vet Parasitol 120: 235-242

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 Putenelterntierfarm. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 124: 2-7

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

al-Khateeb, G. H. und Hansen, M. F. (1973): Plasma glutamic oxalacetic transaminase as related to liver lesions from histomoniasis in turkeys. Avian Dis 17: 269-73

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

Allen, E. A. (1936): A pentatrichomonas associated with certain cases of enterohepatitis or "blackhead" of poultry. T Am Microsc Soc 55: 315-322

Allen, E. A. (1941): Macroscopic differentiation of lesions of histomoniasis and trichomoniasis in turkeys. Am J Vet Res 2: 214-217

Amin, A., Liebhart, D., Weissenböck, H. und Hess, M. (2011): Experimental infection of turkeys and chickens with a clonal strain of *Tetratrichomonas gallinarum* induces a latent infection in the absence of clinical signs and lesions. J Comp Pathol 144: 55-62

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 β-carboline alkaloids on certain antibiotic resistant strains of bacteria and protozoa from poultry. Phytother Res 22: 1533-1538

Barber, R. D., Harmer, D. W., Coleman, R. A. und Clark, B. J. (2005): GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. Physiol Genomics 21: 389-395

Bart, A., van der Heijden, H. M., Greve, S. und Speijer, D. (2008): Intragenomic variation in the Internal Transcribed Spacer 1 region of *Dientamoeba fragilis* as a molecular epidemiological marker. J Clin Microbiol 46: 3270-3275

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

Benchimol, M. (2008): The hydrogenosome as a drug target. Curr Pharm Design 14: 872-881

Benchimol, M., Johnson, P. J. und de Souza, W. (1996): Morphogenesis of the hydrogenosome: an ultrastructural study. Biol Cell 87: 197-205

Berg, J. M., Tymoczko, J. L. und Stryer, L. (2003a): Glykolyse und Gluconeogenese. In: Biochemie, 5. Aufl, Spektrum Akad Verl: 465-505

Berg, J. M., Tymoczko, J. L. und Stryer, L. (2003b): Der Glykogenstoffwechsel. In: Biochemie, 5. Aufl, Spektrum Akad Verl: 631-655

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. (2007): 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. (2009): 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

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

Bradley, R. E., Johnson, J. und Reid, W. M. (1964): Apparent obligate relationship between *Histomonas meleagridis* and *Escherichia coli* in producing disease. J Parasitol 50; Supplement: Program and Abstracts of the 39th Annual Meeting of American Society of Parasitologists: 51

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

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

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

Carlton, J. M., Hirt, R. P., Silva, J. C., Delcher, A. L. und Schatz, M. et al. (2007): Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. Science 315: 207–212

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

Cepicka, I., Kutišová, K., Tachezy, J., Kulda, J. und Flegr, J. (2005): Cryptic species within the *Tetratrichomnonas gallinarum* species complex revealed by molecular polymorphism. Vet Parasitol 128: 11-21

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

Chalvet-Monfray, K., Sabatier, P., Chauve, C. und Zenner, L. (2004): A mathematical model of the population dynamics of *Heterakis gallinarum* in turkeys (*Meleagridis gallopavo*). Poult Sci 83: 1629-1635

Chappel, L. R. (1973): The effect of *Histomonas meleagridis* on the development of *Eimeria tenella*. J Parasitol 59: 637-643

Chen, X. Q., Singh, M., Ho, L. C., Tan, S. W., Ng, G. C., Moe, K. T. und Yap, E. H. (1997): Description of a *Blastocystis* species from *Rattus norvegicus*. Parasitol Res 83: 313-318

Chen, X. Q., Singh, M., Howe, J., Ho, L. C., Tan, S. W. und Yap, E. H. (1999): In vitro encystation and excystation of Bastocystis ratti. Parasitology 118: 151-160

Chute, M. B. und Chute, A. M. (1969): Freeze preservation of *Histomonas meleagridis*. Poult Sci 48: 2189-2191

Chute, A. M. und Lund, E. E. (1972): Experimental histomoniasis in the guinea fowl, *Numida meleagris*. J Protozool 19: 639-643

Chute, A. M. und Lund, E. E. (1974): *Heterakis gallinarum* in the guinea fowl, *Numida meleagris*: Survival and comparative potential for transmitting *Histomonas meleagridis*. Exp Parasitol 35: 102-109

Chute, A. M., Lund, E. E. und Wilkins, G. C. (1976): Comparative responses of White Leghorn and New Hampshire chickens to experimental infections with *Histomonas meleagridis* and *Heterakis gallinarium*. Poult Sci 55: 710-713

Chute, M. B., Chute, A. M. und Wilkins, G. C. (1978): Effect of dimetridazole on transmission of *Histomonas meleagridis* by *Heterakis gallinarum*. Parasitology 77: 41-48

Clarkson, M. J. (1959): Histomoniasis and the serum proteins of the turkey. Vet Rec 71: 838

Clarkson, M. J. (1961): The blood supply of the liver of the turkey and the anatomy of the biliary tract with reference to infection with *Histomonas meleagridis*. Res Vet Sci 2: 259-264

Clarkson, M. J. (1962): The progressive pathology of *Heterakis*-produced histomoniasis in turkeys. Res Vet Sci 3: 443-448

Clarkson, M. J. (1963): Immunological response to *Histomonas meleagridis* in the turkey and fowl. Immunology 6: 156-168

Clarkson, M. J. (1966): Progressive serum protein changes in turkeys infected with *Histomonas meleagridis*. J Comp Pathol 76: 387-397

Clemens, D. L. und Johnson, P. J. (2000): Failure to detect DNA in hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis* by nick translation and immunomicroscopy. Mol Biochem Parasitol 106: 307-313

Cohen, G. und Hochstein, P. (1961): Glucose-6-phosphate dehydrogenaseand detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. Science 134: 1756-1757

Cole, L. J. und Hadley, P. B. (1908): Blackhead, a coccidial disease of turkeys. Science 27: 994

Connell, R. (1950): Enterohepatitis (blackhead) in turkeys. VI. Abnormalities, possibly caused by a stage of *Histomonas meleagridis*, occuring in second stage larvae of blackhead-transmitting *Heterakis gallinae*. Can J Comp Med Vet Sci 14: 331-337

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

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. (1953): 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

DeVolt, H. M. (1943): A new medium for the cultivation of *Histomonas meleagridis*. J Parasitol 29: 353-355

Dhillon, A. S. (1983): Histomoniasis in a captive great rhea (*Rhea americana*). J Wildl Dis 19: 274

Dobell, C. und Laidlaw, P. P. (1926): On the cultivation of *Entamoeba histolytica* and some other entozoic amoebae. Parasitology 18: 283-318

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

Duda, A., Stenzel, D. J. und Boreham, P. F. (1998): Detection of *Blastocystis* sp. in domestic dogs and cats. Vet Parasitol 76: 9-17

Duffy, C. F., Sims, M. D. und Power, R. F. G. (2004): Preliminary evaluation of dietary Natustat versus Histostat (nitarsone) 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

Dunn, L. A., Boreham, P. F. und Stenzel, D. J. (1989): Ultrastructural variation of *Blastocystis hominis* stocks in culture. Int J Parasitol 19: 43-65

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

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

Embley, T. M., van der Giezen, M., Horner, D. S., Dyal, P. L. und Foster, P. (2002): Mitochondria and hydrogenosomes are two forms of the same fundamental organelle. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 358: 191-203

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

Farmer, R. K., Hughes, D. L. und Whiting, G. (1951): Infectious enterohepatitis (blackhead) in Turkeys: A study of the pathology of the artificially induced disease. J Comp Pathol 61: 251-262

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

Flowers, A. I., Hall, C. F. und Grunmbles, L. C. (1965): Chemotherapy of histomoniasis of turkeys. I. Value of 1-2-dimethyl-5-nitroimidazole in treatment. Avian Dis 9: 394-406

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

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., Beckstead, R. B. und McDougald, L. R. (2010): Establishment of culture conditions for survival of *Histomonas meleagridis* in transit. Avian Dis 54: 948-950

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

Ghosh, S., Debnath, A., Sil, A., De, S., Chattopadhyay, D. J. und Das, P. (2000): PCR detection of *Giardia lamblia* in stool: targeting intergenic spacer region of multicopy rRNA gene. Mol Cell Probes 14: 181-189

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

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

Hackstein, J. H. P., Akhmanova, A., Boxma, B., Harhangi, H. R. und Voncken, F. G. J. (1999): Hydrogenosomes: eukaryotic adaptations to anaerobic environments. Trends Microbiol 7: 441-447

Hadley, P. B. und Amison, E. E. (1911): Further studies on blackhead in turkeys. Zentlbl Bakteriolog P 58: 34-41

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., Lüschow, 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 Lüschow, 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., 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

Hall, C. F., Flowers, A. I. und Grumbles, L. C. (1965): Chemotherapy of histomoniasis of turkeys II. The value of 5-nitro-2-furaldehyde acetylhydrazone and 4,7-phenanthroline-5,6 quinone in prevention and treatment. Avian Dis 9: 400-406

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. und Hafez, H. M. (2010): Systematic position of *Histomonas meleagridis* based on four protein genes. J Parasitol 96: 396-400

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

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

Hauck, R., Balczulat, S. und Hafez, H. M. (2013): Use of carbohydrates by *Histomonas meleagridis* cultured in vitro. In Vorbereitung

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

Heijden, H. van der und Landman, W. (2007): Improved culture of *Histomonas meleagridis* in a modification of Dwyer medium. Avian Dis 51: 986-988

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

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

Heijden, H. M. J. F. van der, McDougald, L. R. und Landman, W. J. M. (2005): High yield of parasites and prolonged in vitro culture of *Histomonas meleagridis*. Avian Pathol 34: 505-508

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

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

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

Heldt, H. W. (1999): Polysaccharide sind Speicher- und Transportform der bei der Photosynthese gebildeten Kohlenhydrate. In: Pflanzenbiochemie, 2. Aufl, Spektrum Akad Verl: 247-276

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

Hillis, D. M. und Dixon, M. T. (1991): Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. Q Rev Biol 66: 411-453

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

Hoevers, J. D. und Snowden, K. F. (2005): Analysis of the ITS region and partial ssu and lsu rRNA genes of Blastocystis and *Proteromonas lacertae*. Parasitology 131: 187-196

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 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. (2004): The efficacy of some drugs with known antiprotozoal activity against *Histomonas meleagridis* in chickens. Vet Parasitol 121: 233-238

Hu, J., Fuller, A. 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., Armstrong, P. L. und McDougald, L. R. (2006): *Histomonas meleagridis* in chickens: attempted transmission in the absence of vectors. Avian Dis 50: 277-279

Hu, J., Brooks, M., Fuller, Al. L., Armstrong, P. und McDougald, L. R. (2008): *Histomonas meleagridis* (Parabasala, Trichomonadea, Monocercomonadidae): presence of natural agglutinins in horse serum. Parasitol Res 102: 365-369

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: Sarcomastigophora). Avian Pathol 36: 279-282

Hurst, G. A. (1980): Histomoniasis in wild turkeys in Mississippi. J Wildl Dis 16: 357-358

Iordanidis, P. I., Papazahariadou, M. G., Georgiades, G. K., Papaioannou, N. G. und Frydas, S. E. (2003): Cloacal prolapse in ostrich chicks with histomoniosis. Vet Rec 153: 434-435

Jerstad, A. C. (1957): Furazolidone for infectious enterohepatitis (blackhead) of turkeys. Am J Vet Res 18: 174-179

Johnson, P. T., Lahti, C. J. und Bradley P. J. (1993): Biogenesis of the hydrogenosome in the anaerobic protist *Trichomonas vaginalis*. J Parasitol 79: 664-670

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

Karaman, M., Özen, H. und Özcan, K. (2009): Histomonadose der Pute: Pathologische Beobachtungen und Erregernachweis mittels PCR. Deut Tierärztl Woch 116: 214-219

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. M. (1964): Role of *Histomonas meleagridis* and yeastlike fungi in infectious enterohepatitis of domestic poultry. J Parasitol 50; Supplement: Program and Abstracts of the 39th Annual Meeting of American Society of Parasitologists: 51

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

Kemp, R. L. und Franson, J. C. (1975): Transmission of *Histomonas meleagridis* to domestic fowl by means of earthworms recovered from pheasant yard soil. Avian Dis 19: 741-744

Kendall, S. B. (1957): Some factors influencing resistance to histomoniasis in turkeys. Brit Vet J 133: 435

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

Kuile, B. H. ter (1999): Regulation and adaptation of glucose metabolism of the parasitic protist Leishmania donovani at the enzyme and mRNA levels. J Bacteriol 181: 4863-4872

Kuile, B. H. ter und Bonilla, Y. (1999): Influence of growth conditions on RNA levels in relation to activity of core metabolic enzymes in the parasitic protists *Trypanosoma brucei* and *Trichomonas vaginalis*. Microbiology 145: 755-765

Kulda, J. (1999): Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. Int J parasitol 29: 199-212

Kulda, J., Suchánková, S. und Svoboda, S. (1974): Studies on pathogenicity of *Tetratrichomonas gallinarum* in mice and turkey poults. Acta Vet Brno 43: 53-64

Kumar, P. (1986): Flesh eating behaviour of *Alphitobius diaperinus* Panz. (Tenebrionidae: Coleoptera). Indian J Entomol 48: 113-115

Lahti, C. J., D´Oliveira, C. E. und Johnson, P. T. (1992): Beta-succinyl coenzyme A synthetase from *Trichomonas vaginalis* is a soluble hydrogenosomal protein with an amino terminal sequence that resembles mitochondrial presequences. J Bacteriol 174: 6822-6830

Lanuza, M. D., Carbajal, J. A., Villar, J. und Borrás, R. (1997): Description of an improved method for *Blastocystis hominis* culture and axenization. Parasitol Res 83: 60-63

Lee D. L. (1971): Structure and development of *Histomonas meleagridis* in its vector *Heterakis gallinarum* (Nematoda). Parasitology 63: 439–445

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*. Parasitology 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. (1961): In vitro cultivation of *Histomonas meleagridis* free of demonstrable bacteria. J Protozool 8: 228-230

Lesser, E. (1963): Effect of Amphotericin-B on in vitro growth of *Histomonas meleagridis*. J Parasitol 49: 329

Lesser, E. (1964a): Studies on the in vitro cultivation of *Histomonas meleagridis* with three different mixed bacterial flora. Proceedings of the Helminthological Society of Washington 31: 263-264

Lesser, E. (1964b): Studies on the in vitro growth of *Histomonas meleagridis* with single species of bacteria. Proc Helm Soc Wash 31: 265-266

Ley, D. H., Ficken, M. D., Cobb, D. T. und Witter, R. L. (1989): Histomoniasis and reticuloendotheliosis in a wild turkey *(Meleagris gallopavo)* in North Carolina. J Wildl Dis 25: 262-265

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., 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., Grabensteiner, E. und Hess, M. (2008): A virulent mono-eukaryotic culture of *Histomonas meleagridis* is capable of inducing fatal histomonosis in different aged turkeys of both sexes, regardless of the infective dose. Avian Dis 52: 168-172

Liebhart, D., Windisch, M. und Hess, M. (2010): Oral vaccination of 1-day-old turkeys with in vitro attenuated *Histomonas meleagridis* protects against histomonosis and has no negative effect on performance. Avian Pathol 39: 399-403

Lindmark, D. G. und Müller, M. (1973): Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate, *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. J Biol Chem 248: 7724-7728

Lindquist, W. D. (1962): Some effects of paromomycin sulfate on blackhead in turkeys. Am J Vet Res 23: 1053-1056

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. und Hafez, H. M. (2009): Susceptibility of different turkey lines to *Histomonas meleagridi*s after experimental infection. Parasitol Res 105: 113-116

Lotfi, A., Abdel-Wahab, E.M. und Hafez, H.M. (2010): Persistence of *Histomonas meleagridis* in materials used in poultry houses. Abstract book of the 8th International Symposium on Turkey diseases Berlin (Ed. Hafez, H. M.): 21

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. (1958): Growth and development of *Heterakis gallinae* in turkeys and chickens infected with *Histomonas meleagridis*. J Parasitol 44: 297-301

Lund, E. E. (1959): Immunizing action of a nonpathogenic strain of *Histomonas* against blackhead in turkeys. J Protozool 6: 182-185

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. (1969): Histomoniasis. Adv Vet Sci Comp Med 13: 355-390

Lund, E. E. (1971): *Histomonas meleagridis* and *H. wenrichi* – time of acquisition by *Heterakis gallinarum*. Exp Parasitol 29: 59-65

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

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. (1971a): Bobwhite, *Colinus virginianus*, as host for *Heterakis* and *Histomonas*. J Wildl Dis 7: 70-75

Lund, E. E. und Chute, A. M. (1971b): Histomoniasis in the chukar partridge. J Wildlife Manage 35: 307-315

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. (1972d): Reciprocal responses of eight species of galliform birds and three parasites: *Heterakis gallinarum*, *Histomonas meleagridis*, and *Parahistomonas wenrichi*. J Parasitol 58: 940-945

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

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*, *Ascardia galli*, "blackhead" and the chicken. J Helminthol 36: 107-142

Malewitz, T. D., Runnells, R. A. und Calhoun, M. L. (1958): The pathology of experimentally produced histomoniasis in turkeys. Am J Vet Res 19: 181-185

Mantini, C., Dalia-Cornette, J., Noda, S., van der Heijden, H. M. J. F., Capron, M., Dei-Cas, E., Landman, W. J. M., 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

Mathis, G. F., McDougald, L. R. und Fuller, L. (1984): Elevated methemoglobin in the pathology of avian Coccidia (Protozoa, Apicomplexa) and Histomonas (Protozoa, Sarcomastigophora). 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

McCulloch, E. C. und Nicholson, L. G. (1941): Mapharsen therapy in enterohepatitis in turkeys. Vet Med 36: 574-576

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 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 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 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

McGinnis, S. und Madden, T. L. (2004): BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. Nucleic Acids Res 32: 20-25

McGregor, J. K. (1949): Certain drugs for enterohepatitis. Can J Comp Med Vet Sci 13: 257-261

McGregor, J. K. (1951): A report on the value of two chemotherapeutic agents in the control of enterohepatitis (blackhead) in turkeys. Can J Comp Med Vet Sci 15: 292-294

McGuire, W. C. und Morehouse, N. F. (1952): Chemotherapy studies of histomoniasis. Poult Sci 31: 603-609

McGuire, W. C. und Morehouse, N. F. (1958): Blood-induced blackhead. J Parasitol 44: 292-296

McKay, F. und Morehouse, N. F. (1948): Studies on experimental blackhead infection in turkeys. J Parasitol 34: 137-141

McMillan, E. G. und Zellen, G. (1991): Cross-Canada disease report. Can Vet J 32: 244

Mehlhorn, H., Al-Quraishy, S., Aziza, A. und Hess, M. (2009): Fine structure of the bird parasites *Trichomonas gallinae* and *Tetratrichomonas gallinarum* from culture. Parasitol Res 105: 751-756

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

Moe, K. T., Singh, M., Howe, J., Ho, L. C., Tan, S. W., Ng, G. C., Chen, X. Q. und Yap, E. H. (1996): Observations on the ultrastructure and viability of the cystic stage of *Blastocystis hominis* from human feces. Parasitol Res 82: 439-444

Moe, K. T., Singh, M., Howe, J., Ho, L. C., Tan, S. W., Chen, X. Q., Ng, G. C. und Yap, E. H. (1997): Experimental *Blastocystis hominis* infection in laboratory mice. Parasitol Res 83: 319-325

Morehouse, N. F., Rude, T. A. und Vatne, R. D. (1968): Liver regeneration in blackhead-infected turkeys treated with 1,2-dimethyl-5-nitroimidazole. Avian Dis 12: 85-95

Müller, M. (1993): The hydrogenosome. J Gen Microbiol 139: 2879-2889

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

Noël, C., Dufernez, F., Gerbod, D., Edgcomb, V. P., Delgado-Viscogliosi, P., Ho, L. C., Singh, M., Wintjens, R., Sogin, M. L., Capron, M., Pierce, R., Zenner, L. und Viscogliosi, E. (2005): Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. J Clin Microbiol 43: 348-355

Norton, R. A. (1997): Pathogenicity of a strain of *Trichomonas gallinarum* in turkeys and its possible interaction with cecal coccidia. Avian Dis 41: 670-675

Paul, B. und Sbarra, A. J. (1968): The role of the phagocyte in host - parasite interactions. 13. The direct quantitative estimation of H_2O_2 in phagocytizing cells. Biochim Biophys Acta 156: 168-178

Pennycott, T. W. (2000): Causes of mortality and culling in adult pheasants. Vet Rec 146: 273-278

Pfaffl, M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 29: e45

Pfaffl, M. W. (2004): Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. BIOspektrum, Sonderausgabe PCR 10: 92-95

Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. und Dempfle, L. (2002): Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Res 30: 1-10

Ponce Gordo, F., Castro, A. T., García Durán, B. und Martínez Díaz, R. A. (2002): Parasites from farmed ostriches (*Struthio camelus*) and rheas (*Rhea americana*) in Europe. Vet Parasitol 107: 137-160

Popp, C., Hauck, R., Balczulat, S. und Hafez, H. M. (2011): Recurring histomonosis on an organic farm. Avian Dis 55: 328-330

Popp, C., Hauck, R., Blazey, B., Hänel, A. und Hafez, H. M. (2012): An unusual outbreak of histomonosis in a commercial turkey flock. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 125: 10-15

Potts, G. R. (2009): Long-term changes in the prevalences of caecal nematodes and histomonosis in gamebirds in the UK and the interaction with poultry. Vet Rec 164: 715-718

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

Radonic, A., Thulke, S., Mackay, I. M., Landt, O., Siegert, W. und Nitsche, A. (2004): Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. Biochem Biophys Res Commun 313: 856–862

Reid, W. M. (1967): Etiology and dissemination of the blackhead disease syndrome in turkeys and chickens. Exp Parasitol 21: 249-275

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

Reynaud, M. C., Zenner, L., Alogninouwa, T. und Chauve, C. M. (2005): Comparison of the susceptibility to *Histomonas meleagridis* infection of two strains of turkey (*Meleagris gallopavo*): preliminary study. Rev Med Vet 156: 620-623

Richter, B., Schulze, C., Kämmerling, J., Mostegl, M. und Weissenböck, H. (2010): First report of necrotizing typhlitis / typhlohepatitis in duck species with *Tetratrichomonas gallinarum* similar to tetratrichomonosis in turkeys. Avian Pathol 39: 499-503

Rozen, S. und Skaletsky, H. (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Methods Mol Biol 132: 365-386

Schiefer, B. und Mehnert, B. (1963): Untersuchungen zur Ätiologie und Pathogenese der Typhlohepatitis der Hühnervögel. Zbl Vet Med B 10: 28-48

Schulze, H. W. (1975): Über das Auftreten von Schwarzkopfkrankheit bei Legehennenaufzuchten in Norddeutschland. Prakt Tierarzt 3: 164-168

Schuster, F. L. (1968): Ultrastructure of *Histomonas meleagridis* (Smith) Tyzzer, a parasitic amebo-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 co-infection 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

Singh, A., Weissenböck, H. und Hess. M. (2008): *Histomonas meleagridis*: Immunohistochemical localization of parasitic cells in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections of experimentally infected turkeys demonstrates the wide spread of the parasite in its host. Exp Parasitol 118: 505-513

Smith, T. (1895): Infectious disease among turkeys caused by protozoa (infectious enterohepatitis). U.S. Depart of Agricult, Bur of Anim Ind Bull 8: 3-50

Springer, W. T., Johnson, J. und Reid, W. M. (1969): Transmission of Histomoniasis with male *Heterakis gallinarum* (Nematoda). Parasitology 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

Steinbüchel, A. und Müller, M. (1986): Anaerobic pyruvate metabolism of *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomes. Mol Biochem Parasitol 20: 57-65

Stenzel, D. J. und Boreham, P. F. L. (1996): *Blastocystis hominis* revisited. Clin Microbiol Rev 9: 563-584

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

Sullivan, T. W., Mitchell, R. J. und Grace, O. D. (1972): Prophylactic efficacy of Nifursol against different levels of exposure to histomoniasis in turkeys 4 to 9 weeks of age. Poult Sci 51: 1956-1959

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

Swales, W. E. (1950a): Enterohepatitis (Blackhead) in turkeys V. Further experiments on chemotherapy. Can J Comp Med Vet Sci 14: 118-125

Swales, W. E. (1950b): Enterohepatitis (blackhead) in turkeys. VII. Experiments on transmission of the disease. Can J Comp Med Vet Sci 14: 298-303

Swales, W. E. (1952a): Enterohepatitis (blackhead) in turkeys.VIII. Further observations on the use and mode of action of 2-amino-nitrothiazole. Can J Comp Med Vet Sci 16: 57-62

Swales, W. E. (1952b): Enterohepatitis (blackhead) in turkeys. IX. Miscellaneous tests of chemicals for possible therapeutic or prophylactic value. Can J Comp Med Vet Sci 16: 63-65

Tan, K. S. (2004): *Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies. Vet Parasitol 126: 121-144

Tan, K. S. W. (2008): New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. Clin MicrobiolRev 21: 639-665

Tanizaki, A., Yoshikawa, H., Iwatani, S. und Kimata, I. (2005): Infectivity of *Blastocystis* isolates from chickens, quails and geese in chickens. Parasitol Res 96: 57-61

Thompson, J. D., Higgins, D. G. und Gibson, T. J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22: 4673-4680

Tyzzer, E. E. (1920a): Observations on the transmission of “blackhead” in turkeys. - the common fowl as a source of infection. J Med Res 41: 219-237

Tyzzer, E. E. (1920b): 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. (1923): Arsenical compounds in the treatment of blackhead in turkeys. J Exp Med 37: 851 -873

Tyzzer, E. E. (1934): Studies on histomoniasis, or “blackhead” infection, in the chicken and the turkey. Proc Amer Acad Arts and Sci 69: 187-264

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. und Fabyan, M. (1922): A further inquiry into the source of the virus in blackhead of turkeys, together with observations on the administration of ipecac and of sulfur. J Exp Med 35: 791 -812

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

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

Vandesompele, J., de Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., van Roy, N., de Paepe, A. und Speleman, F. (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol 3: 1-11

Vatne, R. D., Baron, R. R. und Morehouse, N. F. (1969a): Histomonastatic activity of nifursol in turkeys. Poult Sci 48: 590-596

Vatne, R. D., Baron, R. R. und Morehouse, N. F. (1969b): Histomonastatic activity of nifursol in chickens. Poult Sci 48: 2157-2160

Vennila, G. D., Kumar, G. S., Anuar, A. K., Rajah, S., Saminathan, R., Sivanandan, S. und Ramakrishnan, K. (1999): Irregular shedding of *Blastocystis hominis*. Parasitol Res 85: 162-164

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

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

Wittner, M., Hamperl, S., Stöckl, U., Seufert, W., Tschochner, H., Milkereit, P. und Griesenbeck, J. (2011): Establishment and maintenance of alternative chromatin states at a multicopy gene locus. Cell 145: 543-554

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

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

Zeakes, S. J., Hansen, H. F. und Robel, R. J. (1981): Increased susceptibility of bobwhites (*Colinus virginianus*) to *Histomonas meleagridis* after exposure. Avian Dis 25: 981-987

Zhu, G., Chang, Y., Zuo, J., Dong, X., Zhang, M., Hu, G. und Fang, F. (2001): Fudenine, a C-Terminal truncated rat homologue of mouse prominin, is blood glucose-regulated and can up-regulate the expression of GAPDH. Biochem Biophys Res Commun 281: 951-956

Publikationsverzeichnis

Teile der Arbeit wurden bereits veröffentlicht bzw. auf Kongressen und Tagungen vorgestellt und in den Proceedings veröffentlicht:

Veröffentlichungen

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

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

Hauck, R., Balczulat, S. und Hafez, H. M. (2013): Use of carbohydrates by *Histomonas meleagridis* cultured in vitro. In Vorbereitung

Popp, C., Hauck, R., Balczulat, S. und Hafez, H. M. (2011): Recurring histomonosis on an organic farm. Avian Dis 55: 328-330

Vorträge

Balczulat, S., Hauck, R. und Hafez, H. M. (2009): Epidemiologische Untersuchungen zum Auftreten der Histomonosis in Deutschland zwischen 2004 und 2009. In: Programm and Abstracts 4. Doktorandensymposium am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, Mensch und Buch Verlag: 16

Hauck, R., Balczulat, S. und Hafez, H. M. (2009): Molecular investigations on *Histomonas meleagridis* detected in Germany between 2004 – 2009. In: Proceedings of the 5th International Meeting of the Working Group, Mensch & Buch Verlag 10: 254–259

Hauck, R., Balczulat, S. und Hafez, H. M. (2011): Further investigations on the role of carbohydrates in the culture of *Histomonas meleagridis*. In: Proceedings of the XVII Congress of the WVPA: 184

Hauck, R., Balczulat, S. und Hafez, H. M. (2012): Investigations on the carbohydrate metabolism of *Histomonas meleagridis*. In: 2nd International Symposium on Protozoal Infections in Poultry: 29

Hauck, R., Balczulat, S. und Hafez, M. H. (2012): Investigations on the carbohydrate metabolism of *Histomonas meleagridis*. In: Proceedings of the 9th International Symposium on Turkey Diseases, Mensch & Buch Verlag: 219–221

Hauck, R., Popp, C., Balczulat, S. und Hafez; H. M. (2010): Reoccuring outbreaks of histomonosis on a multiple species farm. In: Proceedings of the 8th International Symposium on Turkey Diseases, Mensch & Buch Verlag: 84–87

Poster

Balczulat, S., Hauck, R. und Hafez, H. M. (2011): Untersuchungen zum Kohlenhydratstoffwechsel von Histomonas meleagridis. In: 6. Doktorandensymposium & DRS Präsentationsseminar „Biomedical Science“, Mensch und Buch Verlag: 58

Danksagungen

An erster Stelle bedanke ich mich ganz besonders bei Prof. Dr. Dr. H. M. Hafez für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Bereitstellung der nötigen Materialien, Geräte und Räumlichkeiten. Ein ganz besonderer Dank gebührt seiner immer hilfsbereiten Art in vielen Dingen, auch über die Doktorarbeit hinaus sowie für seine stets offene Tür und ein offenes Ohr. Aus seiner ihm eigenen, angenehmen Art, sein immenses Fachwissen jederzeit und mit Interesse weiter zu geben habe ich auch über das Thema der Doktorarbeit hinaus oftmals profitiert.

Mein besonderer Dank gilt ebenso Dr. R. Hauck für die unterstützende Begleitung beim Erstellen meiner Doktorarbeit, sei es durch viele anregende Diskussionen nicht nur zum Thema dieser Arbeit oder für die Engelsgeduld, die er so manches Mal bei der Einarbeitung in molekularbiologische Methoden bewiesen hat. Für seine vielen Anregungen, kritischen Bemerkungen, Korrekturen und für die zahlreichen Telefonate danke ich ihm sehr.

Bei Frau Dr. D. Lüschow bedanke ich mich für die Hilfe bei der Betreuung der Studenten im Präparationskurs und für die vielen Tipps und Gedankenanregungen bei der Arbeit im Genlabor.

Ein herzlicher Dank gilt Frau Dr. A. Kohls für die vielen interessanten Einblicke in die Arbeit der Ziervogelklinik. Danke auf diesem Wege auch für manch nette Ablenkung, wenn mal wieder so gar nichts klappen wollte.

Mein Dank gilt Frau G. Grotehenn und Frau C. Kelz für die viele liebe Einarbeitung und Hilfe im Labor und die stets gute Laune zwischen Eppis und Gelen. Danke an Frau B. Göllner für die Einblicke in die Bakteriologie und die Einarbeitung auf diesem Gebiet. Frau M. Bertram danke ich für die Hilfe im Histomonadenlabor. Ein herzliches Danke gilt Frau C. Sabl und Herrn D. Schuhmacher für die nette Arbeit mit den Institutstieren und in der Ziervogelklinik sowie für die Gesellschaft bei Frühstücks- und Mittagspausen.

Des weiteren möchte ich mich bei all meinen Mit-Doktoranden bedanken. Es war immer interessant, über den Tellerrand hinaus auch Einblicke in die anderen Arbeiten zu erhalten. Danke für viele fachliche Diskussionen, die angenehme Zusammenarbeit bei der Organisation der Geflügelsymposien oder Tag der offenen Tür, die Einblicke in äußerst verschiedene Kulturen oder einfach der vielen Pizza-, Falafel- oder scharfer Thaigerichte-Essen.

Allen bisher nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern sei für die gute Zusammenarbeit und für all die Hilfe, nicht nur im Rahmen der Doktorarbeit gedankt.

Ein ganz besonders großer Dank gilt meiner Familie, die micht nicht nur während der Doktorarbeit immer unterstützt hat, sondern auch während des Studiums und in allen Zeiten meines Lebens an mich geglaubt hat.

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.

Dortmund, den 31.11.2013

Stefanie Balczulat