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

Untersuchungen zur Pathogenese und Prophylaxe der Histomonose beim Geflügel

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

vorgelegt von

AbdulRahman Lotfi
Tierarzt aus Tabouk / Saudi-Arabien

Berlin 2011
Journal-Nr.: 3474

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin

der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Dr. Hafez Mohamed Hafez
Zweiter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Eberhard Schein
Dritter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Heike Tönhardt

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):
Histomonas meleagridis, pathogenesis, turkeys, broilers, hens, Prophylaxis, paromomycin

Tag der Promotion: 26.05.2011

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: 978-3-86664-973-6
Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2011
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 2011
Choriner Str. 85 - 10119 Berlin
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltverzeichnis

1 Einleitung und Ziele der Arbeit ---------- 1

2 Literaturübersicht ---------- 2

2.1 Geschichte ---------- 2

2.2 Vorkommen von *H. meleagridis* ---------- 2

2.2.1 Puten ---------- 3
2.2.2 Hühner ---------- 4
2.2.3 Fasanen und andere Hühnervögel ---------- 4
2.2.4 Enten ---------- 5
2.2.5 Strauße und andere Laufvögel ---------- 5

2.3 Ätiologie ---------- 6

2.3.1 Taxonomische Einordnung ---------- 6
2.3.2 Morphologie ---------- 6
2.3.3 Genom ---------- 7

2.4 Weitere Eigenschaften von *H. meleagridis* ---------- 8

2.5 Übertragung und Infektion ---------- 8

2.5.1 Orale Infektion ---------- 8
2.5.2 Übertragung mittels Vektoren ---------- 9
2.5.3 Infektion durch „cloacal drinking“ ---------- 9

2.6 Klinische Symptome ---------- 9

2.7 Pathogenese ---------- 10

2.8 Pathologisch-anatomische Läsionen ---------- 11

2.9 Histologie ---------- 11

2.9.1 Blinddarm ---------- 12
2.9.2 Leber ---------- 12
2.9.3 Gallengänge ---------- 13
2.9.4 Bursa cloacalis ---------- 13
2.9.5 Nieren ---------- 14
2.9.6 Milz ---------- 14
2.9.7 Lunge ---------- 14

2.9.8 Pankreas ---------- 14
2.9.9 Drüsenmagen ---------- 14

2.10 Diagnose ---------- 15
2.10.1 Isolierung ---------- 15
2.10.2 Histopathologie ---------- 16
2.10.3 *In-situ*-Hybridisierung ---------- 16
2.10.4 Immunhistochemie ---------- 16
2.10.5 Polymerase- Ketten- Reaktion (PCR) ---------- 16
2.10.6 Nachweis von Antikörpern ---------- 18
2.10.7 Veränderungen von Blutwerten ---------- 18

2.11 Prophylaxe und Therapie ---------- 19
2.11.1 In der Vergangenheit proyhylaktisch eingesetzte Wirkstoffe ---------- 19
2.11.2 Aktuelle Therapeutika und Prophylaktika ---------- 20
2.11.2.1 Testung von Substanten *in vitro* ---------- 20
2.11.2.2 Testung von Substanten *in vivo* ---------- 21
2.11.2.3 Paromomycin ---------- 22

2.12 Immunität ---------- 24
2.12.1 Aktive Immunität ---------- 24
2.12.1.1 Immunschutz nach überstandener Infektion ---------- 24
2.12.1.2 Immunschutz nach Impfung mit inaktivierten *H. meleagridis* ---------- 24
2.12.1.3 Immunschutz nach Impfung mit attenuierten *H. meleagridis* ---------- 25
2.12.1.4 Immunschutz nach der Impfung mit nicht-pathogen *H. wenrichi* ---------- 25
2.12.2 Passive Immunität ---------- 25

2.13 Genetische Resistenz ---------- 25

3 Material und Methoden ---------- 27

3.1 Material ---------- 27
3.1.1 Histomonaden- Stämme ---------- 27
3.1.2 Tiere ---------- 27
3.1.3 Materialen und Geräten ---------- 28
3.1.3.1 Materialien und Geräte für die Kultivierung von Histomonaden ---------- 28
3.1.3.2 Materialien und Geräte für die Durchführung der Tierversuche ---------- 28
3.1.3.3 Materialien und Geräte für die Präparation von DNA ---------- 29
3.1.3.4 Materialien und Geräte für die Durchführung von PCR ---------- 29
3.1.4 Lösungen und Medien ---------- 30
3.1.4.1 PBS (Phosphate Buffered Saline) ---------- 30

3.1.4.2 TBE–Puffer (Tris–Borat–Elektrophoresepuffer) ---------- 30
3.1.4.3 Probenladepuffer ---------- 30
3.1.4.4 Größenmarker 100 bp ---------- 30
3.1.4.5 Dwyers medium ---------- 31
3.1.4.6 Modifiziertes Dwyers medium ---------- 31
3.1.4.7 PBS-basiertes Medium ---------- 31
3.1.5 Medikamente ---------- 31
3.1.5.1 Gabbrovet 70® ---------- 31
3.1.5.2 HistoBloc® ---------- 32

3.2 Methoden ---------- 32
3.2.1 Kultivierung von *H. meleagridis in vitro* ---------- 32
3.2.1.1 Auftauen von *H. meleagridis* Isolaten aus flüssigem Stickstoff ---------- 32
3.2.1.2 Passagierung der *H. meleagridis* Kulturen ---------- 32
3.2.1.3 Zählen von *H. meleagridis* ---------- 32
3.2.1.4 Konservierung von *H. meleagridis* Isolaten in flüssigem Stickstoff ---------- 32
3.2.2 Durchführung der Tierversuche ---------- 33
3.2.2.1 Haltung ---------- 33
3.2.2.1.1 Käfige ---------- 33
3.2.2.1.2 Futter- und Wassernäpfe ---------- 33
3.2.2.1.3 Futter ---------- 33
3.2.2.1.4 Temperatur ---------- 33
3.2.2.2 Infektion ---------- 33
3.2.2.3 Blutnahme ---------- 33
3.2.2.4 Bestimmung der Blutwerte ---------- 33
3.2.2.5 Bestimmung der Medikamentendosierung Gabbrovet 70® ---------- 33
3.2.2.6 Bestimmung der Futterverwertung (FCR) ---------- 34
3.2.2.7 Bestimmung der europäischen Produktionseffizienzfaktor (EPEF) ---------- 34
3.2.2.8 Läsionsgrad in Leber und Blinddärmen ---------- 34
3.2.2.8.1 Makroskopischer Läsionsgrad ---------- 34
3.2.2.8.2 Histopathologischer Läsionsgrad ---------- 34
3.2.3 Molekularbiologische Untersuchungen ---------- 35
3.2.3.1 DNA-Extraktion ---------- 35
3.2.3.1.1 Extraktion von DNA aus Kulturmaterial ---------- 35
3.2.3.1.2 Extraktion von DNA aus Gewebeproben ---------- 35
3.2.3.2 Durchführung der PCR ---------- 36
3.2.3.2.1 Ready-To- Go Beads PCR zum Nachweis von *T. gallinarum* und *Blastocystis sp.* ---------- 36
3.2.3.2.2 Gelelektrophorese ---------- 36
3.2.3.2.3 Real time PCR zum Nachweis von *H. meleagridis* ---------- 36

3.2.4 Statistische Analyse ---------- 37

4 Versuchsdurchführung und Ergebnisse ---------- 38

4.1 Versuche zur Pathogenese ---------- 38

4.1.1 Entwicklung der Läsionen und Nachweisbarkeit des Parasiten in verschiedenen Organen nach experimentaler Infektion von Puten mit *H. meleagridis* ---------- 38

4.1.1.1 Versuchsdesign ---------- 38

4.1.1.2 Befunde ---------- 38

4.1.1.2.1 Entwicklung der makroskopischen Läsionen ---------- 38

4.1.1.2.2 Histopathologische Untersuchung ---------- 40

4.1.1.2.3 Untersuchung mittels Real-time PCR ---------- 42

4.1.2 Pathogenität bei verschiedenen Putenlinien ---------- 42

4.1.2.1 Versuchsdesign ---------- 42

4.1.2.2 Ergebnisse ---------- 42

4.1.2.2.1 Mortalität ---------- 42

4.1.2.2.2 Inkubationszeit ---------- 44

4.1.2.2.3 Läsionsgrad in Lebern und in Blinddärmen ---------- 45

4.1.2.2.4 Untersuchung mittels Real-time PCR ---------- 47

4.1.3 Pathogenität bei Lege- und Masthühnern ---------- 48

4.1.3.1 Versuchsdesign ---------- 48

4.1.3.2 Ergebnisse ---------- 48

4.1.3.2.1 Mortalität und Läsionen ---------- 48

4.1.3.2.2 Histologische Untersuchung ---------- 51

4.1.3.2.2.1 Histopathologische Veränderungen in Blinddärmen ---------- 51

4.1.3.2.2.2 Histopathologische Veränderungen in der Leber ---------- 53

4.1.3.2.3 Untersuchung mittels Real-time PCR ---------- 55

4.2 Versuche zur Wirksamkeit von Paromomycinsulfat gegen *H. meleagridis* ---------- 56

4.2.1 Versuche *in vitro* ---------- 56

4.2.1.1 Versuchsdesign ---------- 56

4.2.1.2 Ergebnisse ---------- 56

4.2.1.2.1 Vergleich der Wirkung von Paromomycin auf verschiedenen Stämme --- 56

4.2.1.2.2 Vergleich der Wirkung von Paromomycin auf verschiedenen Infektionsdosen ---------- 58

4.2.1.2.3 Vergleich der Wirkung von Paromomycin auf verschiedenen Passagen - 59

4.2.2 Wirksamkeit von Gabbrovet 70® gegenüber *H. meleagridis in vivo* ---------- 61

4.2.2.1 Versuchsdesign ---------- 61

4.2.2.2 Ergebnisse ---------- 61

4.2.2.2.1 Klinische Erscheinungen ---------- 61

4.2.2.2.2 Mortalität ---------- 62
4.2.2.2.3 Ausprägung der Läsionen in Blinddärmen und in Leber ---------- 63
4.2.2.2.4 Untersuchung mittels Real-time PCR ---------- 64
4.2.2.2.5 Körpergewicht ---------- 64
4.2.2.2.6 Blutparameter ---------- 67
4.2.2.2.6.1 Albumin ---------- 67
4.2.2.2.6.2 Aspartat-Aminotransferase (AST) „ Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)“ ---------- 68
4.2.2.2.6.3 Gallensäuren ---------- 69
4.2.2.2.6.4 Gesamteiweiß ---------- 70
4.2.2.2.6.5 Cholinesterase ---------- 71
4.2.2.2.6.6 Laktatdehydrogenase (LDH) ---------- 72
4.2.3 Wirksamkeit von HistoBloc® gegenüber *H. meleagridis in vivo* ---------- 73
4.2.3.1 Versuchsdesign ---------- 73
4.2.3.2 Ergebnisse ---------- 74
4.2.3.2.1 Klinische Erscheinungen ---------- 74
4.2.3.2.2 Mortalität ---------- 74
4.2.3.2.3 Ausprägung der Läsionen in Blinddärmen und Leber ---------- 75
4.2.3.2.4 Untersuchung mittels Real-time PCR ---------- 76
4.2.3.2.5 Körpergewicht ---------- 76
4.2.3.2.6 Futterverbrauch und Futterverwertung (FCR) ---------- 78
4.2.3.2.7 Wasserverbrauch ---------- 80
4.2.3.2.8 Europäischer Produktionseffizienzfaktor (EPEF) ---------- 80

5 Diskussion ---------- 82

6 Zusammenfassung ---------- 89

7 Summary ---------- 91

8 Literaturverzeichnis ---------- 93

Publikation ---------- 109

Danksagung ---------- 110

Selbstständigkeitserklärung ---------- 111

1 Einleitung und Ziele der Arbeit

Histomonose ist eine parasitäre Erkrankung, die durch Infektion mit dem Protozoon *Histomonas meleagridis* verursacht wird. Diese Krankheit tritt besonders bei Puten und Hühnern sowie bei anderen Vogelarten auf und führt zu schweren wirtschaftlichen Verlusten.

In den letzten drei Jahrzehnten konnte das Auftreten von Histomonose durch verbessertes Management, wie zum Beispiel die strikte Trennung der Haltung von Puten und Hühnerherden und durch verfügbare therapeutische und prophylaktische Präparate eindeutig reduziert werden.

In der jüngsten Zeit trat die Krankheit bei Puten und Hühnern in Europa verbunden mit sehr hoher Mortalität auf. Das gehäufte Wiederauftreten wird durch jetzt fehlende Therapie- bzw. Prophylaxemöglichkeiten verursacht. Seit 1995 besteht ein Therapienotstand für diese Erkrankung, da alle gegen Histomonose wirksamen Arzneimittel der Wirkgruppe der Nitroimidazole einschließlich der Nitrofurane in Anhang IV der Verordnung (EWG.) Nr. 2377/90 aufgenommen wurden. Acht Jahre später lief nach der Verordnung (EWG.) Nr. 1756/2002 am 31. März 2003 die Übergangsfrist zum Einsatz von Nifursol® als Futterzusatzstoff zur Prophylaxe von Histomonose ab, seitdem besteht zusätzlich ein Prophylaxenotstand. Seit 2003 stehen also in Europa weder Mittel zur Behandlung noch zum prophylaktischen Einsatz zur Verfügung.
Ziele dieser Arbeit waren somit Erkenntnisse über die Pathogenese von Histomonose bei verschiedenen Putenlinien und Hühnerlinien zu gewinnen. Außerdem sollte die Wirksamkeit von Paromomycinsulfat *in vitro* und *in vivo* gegen Histomonose untersucht werden, um das Potential dieses Präparates zur Prophylaxe dieser Krankheit zu überprüfen.

2 Literaturübersicht

2.1 Geschichte

Die erste Beschreibung von *Histomonas meleagridis* erfolgte 1893 in den USA (Rhode Island) durch Theobald Smith als *Amoeba meleagridis*, da zu diesem Zeitpunkt noch keine begeißelten Stadien bekannt waren (Smith, 1895). Erst knapp dreißig Jahre später wurden begeißelte Stadien des Schwarzkopferregers entdeckt (Tyzzer und Fabyan, 1922), die bereits einige Jahre zuvor auf Grund beobachteter Erregerbewegungen vermutet worden waren (Tyzzer, 1920). In Folge dessen erfolgte eine Umbenennung des Organismus in *Histomonas meleagridis*, den noch heute gültigen wissenschaftlichen Namen. Alternative Bezeichnungen von Histomonose, die sich in der Literatur finden, sind Schwarzkopfkrankheit (Blackhead disease), Typhlohepatitis, Enterohepatitis und ansteckende Blinddarm-Leberentzündung.
1901 wurde das Auftreten der Histomonose erstmals bei Hühnern festgestellt und 1908 fanden erste wirtschaftlich bedeutende Ausbrüche bei Hühnern statt (Lund 1967a). Durch verbesserte Haltungsbedingungen konnte das Auftreten der Krankheit in den USA verringert werden, allerdings blieb die Histomonose in vielen amerikanischen Bundesstaaten die Haupttodesursache bei Puten (Bushnell und Jackley, 1918). 1926 hatte sich die Krankheit auch auf andere Kontinente, wie Europa, Australien und Ostasien ausgebreitet. Anfang und Mitte der 60er Jahre des 20. Jahrhunderts verlor die Histomonose durch Medikamente bzw. den prophylaktischen Einsatz von Amöbostatika als Futterzusatzstoffe und verbessertes Management an wirtschaftlicher Bedeutung. Am Ende der 60er Jahre sank die Anzahl der Ausbrüche der Krankheit weiter ab (Hafez, 2003). 1995 wurde der Wirkstoff Nitroimidazol zur Anwendung als Medikament bei lebensmittelliefernden Tieren durch die EU verboten (EU, 2002a). Außerdem trat zusätzlich am 31. März 2003 das Verbot des Amöbostatikums Nifursol als Futterzusatzstoff im Kraft (EU, 2002b). Der Grund des Verbots von Nitroimidazol und Nifursol war, dass beide Präparate unter dem Verdacht stehen, krebserregend und mutagen zu wirken. Seitdem stehen innerhalb der EU keine Therapeutika und keine Prophylaktika für Histomonose zur Verfügung.

2.2 Vorkommen von H. meleagridis

Die Histomonose ist weltweit verbreitet. Neben Puten und Hühnern können eine Reihe anderer Vogelarten infiziert werden.
Resultierend aus dem Therapie- bzw. Prophylaxenotstand treten Fälle von Histomonose verbunden mit sehr hoher Mortalität regelmäßig in Europa auf (Hafez et al., 2005a). Da Histomonose keine meldepflichtige Krankheit ist, liegt die Anzahl der bekannt gewordenen Fälle sicherlich unter den aufgetretenen Fällen (Hauck et al., 2006).

2.2.1 Puten

In den Jahren 2004-2008 traten in Deutschland mindestens 35 Ausbrüche bei Puten auf (Hauck et al. 2010a). Allein zwischen März 2003 und November 2005 betrugen die Verluste in 14 dokumentierten Ausbrüchen über 90.000 Tiere. In fast allen Fällen waren Putenhähne im Alter zwischen 4 und 11 Wochen betroffen (Hafez et al, 2005a).

Popp und Hafez (2007) berichteten beispielsweise über eine Infektion mit *H. meleagridis* in einem Betrieb mit 5240 Puten im Alter von 53 Tagen. Die Mortalität betrug mehr als 40 % innerhalb einer Woche. Bemerkenswerterweise waren bei diesem Ausbruch, nur die männlichen Puten in zwei Ställen betroffen, während die weiblichen Tiere, die durch Maschendraht getrennt in den selben Ställen gehalten wurden, nicht erkrankten. Außerdem berichteten Jung et al. (2009) über einen natürlichen Ausbruch von Histomonose bei Mastputen. In dem betroffenen Putenbestand wurden in zwei getrennten Stalleinheiten innerhalb eines Gebäudes insgesamt 3090 Putenhähne gehalten. Am 35. Masttag wurde die Krankheit festgestellt. Der Zeitraum vom Auftreten der ersten klinischen Erscheinungen bis zum letzten Todesfall betrug 40 Tage, und die Mortalität lag bei 56,7 %. Bei diesem Ausbruch wurden in der Einstreu viele Getreideschimmelkäfer (*Alphitobius diaperinus*) festgestellt, in denen aber mittels PCR keine DNA von *Histomonas meleagridis* nachgewiesen werden konnte.

In Deutschland wurde das wiederholte Auftreten der Histomonose in einem Putenelterntierbetrieb beschrieben. Der erste Ausbruch trat im Jahr 2005 bei 17 Wochen alten Hennen und der zweite im Jahr 2009 bei 8 Wochen alten Hennen auf. Die Ausbrüche blieben auf einzelne Ställe bzw. ein durch einen Bauzaun aus Drahtgitterelementen abgetrenntes Stallabteil beschränkt. Die Mortalität stieg innerhalb weniger Tage auf 26 bzw. 65 % an, so dass die Tiere der betroffenen Ställe trotz Therapieversuche mit verschiedenen Wirkstoffen, die keinen Erfolg zeigten, getötet wurden. Die nachgewiesenen *H. meleagridis* gehörten in beiden Fällen dem Genotyp A an (Aka et al., 2011).

Aus Frankreich wurden von April 2003, kurz nach dem Verbot von Nifursol, bis März 2005 von 113 Ausbrüchen der Histomonose in Putenmastbeständen und von 15 Fällen in Elterntierbetrieben berichtet (Callait et al., 2007). Die meisten Fälle wurden in der warmen Jahreszeit, von April bis September, im Alter von 3 bis 17 Wochen beobachtet. Die Mortalität betrug meist 10-30 % in den Mastbeständen und 60,2 % in den Elterntierherden.

In weiteren europäischen Ländern wurden auch mehrere Ausbrüche von Histomonose gemeldet, beispielsweise in Österreich (Hess et al., 2005), den Niederlanden (Van der Heijen et al 2006), Belgien (Bleyen et al., 2007), Schottland (anonym, 2009), Irland (anonym, 2006) und Großbritannien (Burch et al., 2007 und anonym, 2007).

In den USA und Südamerika wurde auch über neue Ausbrüche von Histomonose berichtet, beispielsweise lag in Kalifornien im Jahr 2001 die Mortalitätsrate bei 25 bis 75 % bei einem

Ausbruch der Histomonose bei Mastputen (Shivaprasad et al., 2002) und im Jahr 2009 wurde von einem Ausbruch von Histomonose bei Mastputen im Alter von 9 bis 11 Wochen mit einer Mortalitätsrate von 24-68 % berichtet (Sentíes-Cue et al., 2009).

2.2.2 Hühner

Die Infektion von Hühnern mit *H. meleagridis* verläuft meist subklinisch. Beispielsweise wurde Histomonose im Jahr 2001 in einer Broilerherde in Kalifornien im Alter von 6 Wochen diagnostiziert. Die Morbidität betrug nur 1 % mit einem leichten Anstieg der Mortalität (Cortes et al., 2004). Im Gegensatz dazu betrug die Mortalität in einer im Freiland gehaltenen Legehennenherde in Deutschland, in der die Krankheit kurz nach einer Infektion mit Rotlauf auftrat, 50 % (Hafez et al., 2001).
In der Schweiz wurden zwischen 2000 und 2003 bei 1,1 % der zu diagnostischen Zwecken untersuchten Legehennen mikroskopisch *H. meleagridis* festgestellt (Bart und Hoop, 2009). Im Gegensatz dazu wurde in den Niederlanden bei einer seroepidemiologischen Untersuchung von 115 Legehennenbeständen aus verschiedenen Haltungssystemen (Biobetriebe, Freilandhaltung, Bodenhaltung und Käfige) mittels eines kompetetiven ELISAs bei 15 - 18 % der untersuchten Proben Antikörper gegen *H. meleagridis* gefunden.
Schulze (1975) berichtete über das Vorkommen von Histomonose bei einer Junghennenaufzucht in Norddeutschland zwischen 1971 und 1973. Vorwiegend betroffen waren Tiere im Alter von 3 bis 9 Wochen. Die Mortalität bei einer unbehandelten Herde betrug 10%. Die Erkrankung trat bei 7 Herden in Käfighaltung und bei 156 Herden in Bodenhaltung auf. Über das weitere Vorkommen von Histomonose bei einem Junghennenbestand in der 17. Lebenswoche berichteten Gerth et al., (1985).

2.2.3 Fasanen und andere Hühnervögel

Interessanterweise wird angenommen, daß der Fasan der ursprüngliche Wirt von *H. meleagridis* ist (McDougald, 2007). Außerdem wurde das Protozoon als eine häufige Ursache von Gewichtsverlust, Durchfall und Todesfälle bei Fasanen und Hühnervögel von 1996 bis 2008 in Großbritannien genannt (anonym, 2009). Die Untersuchung von 12056 verendeten, meist wildlebenden, Rebhühnern, Rothühnern und Fasanen in Großbritannien zwischen 1912 und 2003, ergab eine starke Korrelation zwischen dem Auftreten von *Heterakis* und dem Vorkommen von Histomonose (Potts, 2009). Dabei scheint das Vorkommen von *H. meleagridis* bei wildlebenden Fasanen rückläufig zu sein. Vor dem Jahr 1952 wurde eine Infektion mit *H. meleagridis* bei 62% den Rebhühnern mit Heterakidenbefall festgestellt, im Zeitraum von 1952 bis 1991 war nur 29% den Rebhühnern mit Heterakidenbefall. Nach 1992 wurde Histomonose bei den genannten Vogelarten nicht mehr diagnostiziert (Potts, 2009).

2.2.1 Enten

Ein Ausbruch von Histomonose mit hoher Mortalität wurde bei 300 Jungenten in Saudi-Arabien beobachtet. Als klinische Erscheinungen wurden blutiger Durchfall, Mattigkeit und Dehydration beschrieben. Erste Todesfälle traten am 15. Tag nach dem Auftreten der Symptome auf. Bei der pathologischen Untersuchung wurden eine akute hämorrhagische Darm- und Blinddarmentzündung festgestellt. Als weitere Ursache neben *H. meleagridis* wurde histologisch *Enterococcus spp*. nachgewiesen (Alkhalaf und Mahmoud, 2009).
Außerdem untersuchten Callait-Cardinal et al., (2006) die Empfänglichkeit von Enten bei einer experimentalen Infektion mit Histomonose. 83 Ente wurden intrakloakal mit *H. meleagridis* infiziert und 35 Tage p.i. beobachtet. Es traten keine klinischen Erscheinungen für Histomonose bei den infizierten Enten auf. Typische makroskopische Läsionen im Blinddarm wurden allerdings zwischen dem 7. und 21. Tag p.i. festgestellt. Daraus folgerten sie, dass Enten kein für *H. meleagridis* anfälliger Wirt sind, aber Überträger von *H. meleagridis* sein können.

2.2.2 Strauße und andere Laufvögel

Borst und Lambers (1985) diagnostizierten eine akute Typhlohepatitis bei zwei jungen Straußen (Struthio camelus). Die pathologischen und histopathologischen Untersuchungen zeigten eine auffallende Ähnlichkeit mit Histomonose beim Geflügel und es wurden Histomonaden ähnelnde Protozoen im Nativpräparat nachgewiesen.
Bei einem Monitoring von mehr als 500 meist klinisch unauffälligen Straußen und anderen Laufvögeln in Spanien und Österreich über einen Zeitraum von 4 Jahren wurde *H. meleagridis* bei 35 % der untersuchten Dick- und Blinddarmproben im Nativpräparat festgestellt (Gordo Ponce et al. 2002).
In Griechenland wurde *H. meleagridis* bei Straußen im Alter von 23-60 Tage in nativen Darmabstrichen und Giemsa gefärbten Kotausstrichen festgestellt (Iordanidis et al., 2003). Das einzige klinische Zeichen war ein Kloakenprolaps. Bei der Nekropsie waren die Vögel leicht dehydriert und in einem schlechten Ernährungszustand. Der Inhalt des Duodenums war wässrig und die Schleimhaut war geschwollen. Die Blinddärme waren aufgetrieben und mit braunen, wässrigen Inhalt gefüllt, während der Inhalt des Dickdarms fest war.

2.3 Ätiologie

2.3.1 Taxonomische Einordnung

Bei der Erstbeschreibung wurde *H. meleagridis* als Amoebe bezeichnet (Smith, 1895). Erst später wurden begeißelte Stadien gefunden und *H. meleagridis* als mit den Trichomonaden verwandter Parasit erkannt (Tyzzer und Fabyan 1922). In den frühen Beschreibungen erfolgte die Einordnung von *H. meleagridis* nicht immer eindeutig, da sowohl Protozoen mit einer, zwei als auch vier Geißeln beobachtet wurden. Die größere Form mit 4 Geißeln wurde später als eigene, nicht pathogene Art unter dem Namen *Parahistomonas wenrichi* beschrieben (Lund, 1963).
Die Systematik der Parabasalia wurde in den letzten Jahren mehrmals geändert (Brugerolle und Patterson, 2001, Adl et al, 2005, Cepicka et al., 2010). Die aktuelle taxonomische Einordung von *H.meleagridis* nach Cepicka et al. (2010) ist in Tabelle 1 wiedergegeben. Des Weiteren zeigte eine pyhlogenetische Analyse verschiedener Gensequenzen eine hohe Verwandschaftswahrscheinlichkeit mit verschiedenen Trichomonaden (*T. vaginalis*, *T. gallinae, Pentatrichomonas* sp., *T. foetus*) sowie mit *Dientamoeba fragilis* und *Monocercomonas sp.* (Gerbod et al., 2001; van der Heijden et al., 2006; Munsch et al., 2009a; Hauck und Hafez, 2010).

Tabelle 1 : Taxonomische Einordung von *H.meleagridis* (Cepicka et al., 2010).

Reich	*Protozoen*
Stamm	*Parabasalia*
Klasse	*3. Klasse Tritrichomonadea*
Ordnung	*Tritrichomonadida*
Familie	*Dientamoebidae*
Gattung	*Histomonas*
Art	*Histomonas meleagridis*

2.3.2 Morphologie

Histomonas meleagridis tritt in zwei Formen auf. Die begeißelte Form, die im Darmlumen auftritt und von rundlicher bis länglicher Gestalt mit einem Durchmesser von 6-20 µm ist, hat meist eine, selten zwei Geißeln, die 6-11 µm lang sind. Die zweite Form wird als Gewebeform bezeichnet. Sie hat ein amöboides Aussehen, ist unbegeißelt und parasitiert in den Geweben des Wirts (Kösters, 1992).
Die Zellbegrenzung von *H. meleagridis* besteht aus einer einfachen Membran. Das Cytoplasma von *H.meleagridis* enthält ß-Glykogen, Ribosomen und RNA (Lee et al., 1969),

sowie eine variable Anzahl an Nahrungsvakuolen und den Zellkern (Schuster, 1968). Der Kern ist meist ovoid oder U-förmig und beinhaltet einen Nukleolus. Die Kernhülle mit Doppelmembran ist klar erkennbar (Schuster, 1968; Lee et al., 1969). In der Nähe des Zellkerns ist häufig der Golgiapparat oder auch ein längs geschnittener Mikrotubulus zu identifizieren (Schuster, 1968).
Der Spindelapparat besteht aus Mikrotubuli und ist für den Transport von Partikeln in der Zelle zuständig (Schuster, 1968). Die Geißel besteht ebenfalls aus Mikrotubuli und wird von der Zellmembran umgeben (Lee et al., 1969). Sie tritt meist einzeln auf und entspringt in der Nähe der Kernmembran (Lee et al., 1969), wobei auch Zellen beobachtet wurden, die eine zweite Geißel aufwiesen (Lund, 1967a).
Sackartige Organellen wurden beschrieben, die später als Hydrogenosomen identifiziert wurden (Lindmark und Müller 1973; Müller, 1975). Da Mitochondrien bei Histomonaden und Trichomonaden nicht auftreten (Schuster, 1968), übernehmen die Hydrogenosome die Funktion der Mitochondrien im Energiestoffwechsel in sauerstoffarmer Umgebung (Embley, 1997). Das raue endoplasmatische Retikulum fehlt ebenfalls (Lee et al., 1969).

2.3.3 Genom

Die genetische Information über *H. meleagridis* ist bisher sehr begrenzt. Die Größe des Genoms und die Anzahl der Gene, sowie der Chromosomen sind unbekannt. Im Gegensatz dazu wurde das Genom von *Trichomonas vaginalis* vollständig sequenziert. Die Größe des Genoms beträgt ca. 160 Megabasenpaare. In dem Genom wurden 60,000 protein-kodierende Gene und 250 Kopien des Gens der ribosomalen DNA festgestellt (Carlton et al., 2007).
2001 wurde das ssu rRNA-Gen von *H. meleagridis* durch Gerbod et al. (2001) sequenziert. Die Sequenzanalyse des Gens war sehr hilfreich für die Entwicklung verschiedener diagnostischer PCR-Teste. Außerdem entwickelten van der Heijden et al. (2006) ein Verfahren zur Genotypisierung von *H. meleagridis*, das auf Sequenzunterschieden der nicht kodierenden internal transcribed spacer (ITS) -1-Sequenzen beruht. Zwei verschiedene Genotypen von *H. meleagridis* wurden identifiziert. Hauck und Hafez (2010) fanden mittels eines modifizierten Verfahrens vier Subtypen (A-D). Das Verfahren kann somit als eine vielversprechende Technik zur Identifizierung von *H. meleagridis* Typen angesehen werden.
Mazet et al. (2008) sequenzierten Teile der Gene der Malatdecarboxylase, Alpha-succinyl Coenzym A-Synthetase und Eisen-Hydrogenase, die am anaeroben Stoffwechsel in den Hydrogenosomen beteiligt sind. Für die Alpha-succinyl Coenzym A-Synthetase wird zusätzlich eine Rolle als Adhäsin vermutet.
Ebenso wurden Teile der beta-Tubulin-Gene fünf verschiedener *H. meleagridis* Stämme sequenziert (Hauck und Hafez, 2009). Da die Unterschiede sehr gering waren und kein Clustering der Sequenzen der gleichen Stämme festgestellt wurde, schien das Beta-Tubulin-

Gen nicht zur Stammdifferenzierung geeignet zu sein. Außerdem wiesen alle Aminosäuresequenzen auf eine Empfindlichkeit des untersuchten Protozoons gegenüber Benzimidazolen hin, was jedoch *in vitro* nicht bestätigt werden konnte.
Bilic et al., (2009) identifizierten mRNAs, die für Antigene von *H. meleagridis* kodieren. Sie fanden 37 Gene, die u. a. für strukturelle Proteine, Stoffwechselenzyme, Membran- und Zelloberflächenproteine, Protein-Kinasen, Stressproteine und verschiedene andere intrazelluläre Proteine kodierten, und an der Adhäsion und Gewebeinvasion beteiligt sein könnten.

2.4 Weitere Eigenschaften von H. meleagridis

Hu et al. (2008) bemerkten eine Agglutination von *H. meleagridis* Zellen *in vitro* nach der Zugabe von Pferdeserum. Diese Eigenschaft kann von Bedeutung für elektronenmikroskopische Studien und für die Aufbereitung von Antigenen für weitere Untersuchungen sein.
Ferner wurden zystenartige Stadien in *H. meleagridis* Isolaten festgestellt, die möglicherweise eine Rolle beim Überleben des Parasiten in der Umwelt sowie der Verschleppung von Bestand zu Bestand spielen könnten (Munsch et al., 2009a).

2.5 Übertragung und Infektion

Histomonas meleagridis ist in der Außenwelt sehr empfindlich und außerhalb des Wirtes nur für kurze Zeit lebensfähig. Der Parasit überlebt im Kot höchstens einige Stunden, jedoch bleibt er in Eiern von *Heterakis gallinarum* über mehrere Jahre infektiös (Lund und Chute, 1972).

2.5.1 Orale Infektion

Die Übertragung von *H. meleagridis* kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Ob orale Infektionen möglich sind, ist fraglich. Zahlreiche Studien kamen zu einem negativen Ergebnis (Horton-Smith und Long, 1955; 1956; Lund, 1956), da die empfindliche Struktur des Parasiten durch die Magen-Darm-Passage nicht überlebt (McDougald, 1984).
Dahingegen konnten Liebhart und Hess (2009) Eintagsputen oral auch mit geringen Dosen einer klonalen Kultur des Parasiten infizieren. Interessanterweise erkrankten die Tiere schon 2 Tage nach der Infektion und übertrugen die Infektion auf andere Tiere im gleichen Stallabteil.

2.5.2 Übertragung mittels Vektoren

Eine orale Infektion kann durch Aufnahme von Eiern des Nematoden *Heterakis gallinarum*, in denen Histomonaden vorhanden sind, erfolgen (Graybill und Smith, 1920; Graybill, 1921; Tyzzer und Fabyan, 1922). Eine Übertragung des Protozoons durch Eier anderer Nematoden, wie beispielsweise *Heterakis bonasae* war nicht möglich (Davidson et al., 1978). Eine weitere Ausbreitung des Erregers kann auch durch Regenwürmer wie zum Beispiel *Lumbricus terrestris, Allolobophora caliginosa und Eisenia foetida*, die als Stapelwirte für Heterakiden gelten, erfolgen (Lund et al., 1966a; Kemp und Franson, 1975). Diese Regenwürmer können die infizierten Eier von *H. gallinarum* aufnehmen. Die Heterakidenlarven schlüpfen im Regenwurm und bleiben dort über Jahre infektiös.
Neben dem Regenwurm können eventuell auch noch einige andere Arthropoden, beispielsweise Fliegen, Grashüpfer, Grillen und Kellerasseln als mechanische Vektoren für eine räumliche Verbreitung von *H. meleagridis* sorgen (Frank, 1953).

2.5.3 Infektion durch „cloacal drinking“

Die intrakloakale Infektion gilt als die zuverlässigste Methode, um die Krankheit experimentell zu reproduzieren (McDougald, 2005b). Unter natürlichen Bedingungen erfolgt eine Übertragung von *H. meleagridis* bei Puten oder Hühnern durch kontaminierte Einstreu, da die Histomonaden im Kot erkrankter Tiere ausgeschieden werden (Hu und McDougald, 2003; McDougald, 2007). An diesem Kot können sich andere Tiere direkt durch Aufsaugen des Kotes in die Kloake, dem sog. "cloacal drinking" infizieren (Hu et al., 2004). Dieser Mechanismus erklärt vermutlich die schnelle Ausbreitung des Erregers innerhalb eines Bestandes, auch in Abwesenheit einer Infektion mit *H. gallinarum*.

2.6 Klinische Symptome

Besonders bei Jungputen zwischen 3 und 12 Wochen führt die Infektion mit *H. meleagridis* zu einem schweren Krankheitsverlauf mit einer hohen Mortalitäts- und Morbiditätsrate von 70-90 %. Klinische Erscheinungen können nach einer Inkubationszeit von 7-12 Tagen beobachtet werden. Symptome sind Mattigkeit, Schläfrigkeit, geschlossene Augen, hängende Flügel, unsicherer Gang und Futterverweigerung. Als charakteristisches Kennzeichen gilt der schwefelgelbe Kot, der später mit wenig Blut vermischt sein kann. Die Kotfarbe wird durch hämolytische Leberschäden hervorgerufen. In Folge der schweren Kreislaufstörung tritt teilweise eine ausgeprägte Zyanose des Kopfs und seiner Anhänge auf, weswegen die Krankheit auch als Schwarzkopfkrankheit bezeichnet wurde (Kösters 1992). Der Verlauf der Infektion wird hauptsächlich von Alter und Darmflora des Wirtes beeinflusst, zusätzlich kann eine Infektion durch Bakterien wie *E. coli* und *Clostridium perfringens*

begünstigt werden (Springer et al., 1970), zudem verstärkt eine gleichzeitige Infektion mit Kokzidien den Krankheitsverlauf bei Masthähnchen (McDougald und Hu, 2001).

2.7 Pathogenese

Wenn Tiere sich oral oder über die Kloake mit Histomonaden infizieren, gelangt der Erreger in die Blinddärme und dringt in die Blinddarmschleimhaut ein. Dort vermehrt sich der Erreger und es kommt zu entzündlichen Verdickungen, kleinen bis großen Ulzerationen und atrophisch-nekrotischen Prozessen (Dwyer und Honigberg, 1970). Die Schleimhaut wird mit fibrinösen bis diphtheroiden Belägen bedeckt, die später das Blinddarmlumen ausfüllen können. Über das Pfortaderblut gelangt der Erreger in die Leber (Clarkson, 1961). Dort bilden sich unregelmäßige, gelbliche, 0,5 bis 3 cm große Nekroseherde, die sich tief in das gesunde Lebergewebe erstrecken und deutlich vom gesunden Lebergewebe abgegrenzt sind (Craig, 1930; Dwyer und Honigberg, 1970).
Von der Leber aus kann sich der Parasit weiter im Körper verbreiten (Hess et al., 2005, Hauck et al. 2006, Grabensteiner et al., 2007 und Sentíes-Cue et al., 2009). Bei Puten wurde DNA des Parasiten in Drüsenmagen, Duodenum, Jejunum, Blinddarm, Pankreas, Bursa cloacalis, Leber, Nieren, Milz, Herz, Lungen, Thymus, Gehirn und im Knochenmark nachgewiesen, wobei Läsionen in diesen Organen extrem selten sind. Im Gegensatz dazu verlief der Nachweis aus Blut und Muskeln des Oberschenkels negativ (Grabensteiner et al., 2006). Bei Hühnern konnte der Parasit im Blinddarm, Bursa cloacal, Niere, Herz und Gehirn nachgewiesen werden, aber nicht in der Leber (Grabensteiner et al., 2006). Die Verbreitung von *H. meleagridis* durch infizierte Makrophagen, die den Parasit enthalten, ist ein wahrscheinlicher Mechanismus dieser systemischen Ausbreitung (Singh et al., 2008 und Sentíes-Cue et al., 2009).
Es ist möglich, dass unter Feldbedingungen männliche Puten empfänglicher für Infektionen mit *H. meleagridis* als weibliche Puten sind (Sentíes-Cue et al., 2009; Popp und Hafez, 2007). Obwohl männliche und weibliche Puten im gleichen Stall gehalten wurden, waren nur die männlichen Puten betroffen und weibliche Puten zeigten keine klinischen Symptome. Im Gegensatz wurde von anderen Autoren kein signifikanter Unterschied zwischen Hennen und Hähnen nach natürlicher oder experimenteller Infektion mit *H. meleagridis* beobachtet (Callait et al., 2007; van der Heijden and Landman 2008b; Liebhart et al., 2008).
Es wurde festgestellt, dass der Verlauf der Krankheit von der Infektionsdosis und dem Alter der Tiere abhängig ist (Lund, 1955). Allerdings wurden von verschiedenen Autoren unterschiedliche Infektionsdosen mit Erfolg verwendet. Liebhart et al. (2008) konnten die Krankheit nach experimenteller intrakloakaler Infektion mit nur 10 Histomonadenzellen eines klonalen Stammes bei Puten in unterschiedlichem Alter reproduzieren, wohingegen van der Heijden und Landman (2008b) die Erkrankung mit einer intrakloakalen Infektion mit 100

Histomonadenzellen nicht auslösen konnten. Die mögliche Erklärung für diese Diskrepanz kann in der Verwendung unterschiedlich virulenter Stämme liegen.

2.8 Pathologisch-anatomische Läsionen

Hauptsächlich werden die Läsionen der Histomonose in Blinddärmen und Lebern beobachtet. Die Läsionen sind zuerst im Blinddarm ab dem 8. Tag p.i. feststellbar (Kemp und Springer, 1978). Die ersten Anzeichen nach einer Infektion mit *H. melegridis* sind verdickte Blinddarmwände. Im weiteren Verlauf füllen seröse und hämorrhagische Exsudate aus der Blinddarmschleimhaut das erweiterte Blinddarmlumen aus und bilden einen käseartig, festen Kern. In der Blinddarmwand befinden sich Ulzerationen, die zu einer Perforation des Organs führen können und somit eine generalisierte Peritonitis auslösen können.
Leberläsionen bei Puten beginnen oft scheinbar am 10. Tag p.i. und sehen sehr unterschiedlich aus. Oft werden die Läsionen als eine kreisförmige, eingesunkene Nekrose umgeben von einem erhabenen Ring mit einem Durchmesser von bis zu 1 cm beschrieben. Bei schweren Infektionen können die Läsionen komfluierend sein und den größten Teil der Leber befallen haben, so daß kaum noch unverändertes Lebergewebe sichtbar ist (Kemp und Springer, 1978).
Insbesondere bei Hühnern können sich die Läsionen als multiple, stecknadelkopfgroße Nekrosen darstellen (Kemp und Springer, 1978).
Läsionen in anderen Organen wie Bursa, Lunge, Niere, Milz und Mesenterien können manchmal in Form weißer oder gelber runder Nekroseherde auftreten (Shivaprasad et al., 2002; Cortes et al., 2004; Sentíes-Cué et al., 2009).

2.9 Histologie

Histopathologische Veränderungen aufgrund der Infektion von *H. meleagridis* wurden nach experimenteller oder natürlichen Infektionen bei Puten und Hühnern beschrieben (Kemp und Springer, 1978), Brener et al., 2006, Callait-Cardinal et al., 2006 und Sentíes-Cué et al., 2009). Mikroskopische Läsionen und das Vorliegen von *H. melagridis* Trophozoiten wurden vor allem in Blinddärmen und in der Leber festgestellt, aber auch in anderern Organen wie der Bursa cloacalis, Nieren, Milz, Lungen, Pankreas und Drüsenmagen (Shivaprasad et al., 2002; Singh et al., 2008 und Sentíes-Cué et al., 2009).

2.9.1 Blinddarm

Im Allgemeinen verursachen Histomonaden bei Hühnern in den Blinddärmen eine schwere diphtheroide Typhlitis mit Ausbildung zahlreicher Ulzerationen, die bis tief in die Submukosa und herdförmig in die Tunica muscularis reichen können (Gerth et al., 1985).
Bei Puten sind an den ersten 3 Tagen p.i. noch keine Läsionen feststellbar, erst am 4. Tag p.i. werden kleine Geschwüre in der Blinddarmschleimhaut sichtbar und der Inhalt wird heller. 5 - 6 Tage nach der Infektion werden die Protozoen in großer Anzahl in der Lamina propria und Muskularis mukosa als blasse, schwach gefärbte, ovale Strukturen in Lacunen sichtbar (Kemp und Springer, 1978).
Im Blinddarmlumen befindet sich ein Kern aus abgelöstem Epithel, Fibrin, Erythrozyten, Leukozyten, Parasiten und Ingesta. Eine hochgradige Typhlitis mit großflächigen Epithelennekrosen wird bei infizierten Puten zwischen dem 8. und 11. Tag p.i. nachgewiesen. In allen Schichten der Blinddarmwandstrukturen sind Histomonaden, zusammen mit mononukleären Zellen und heterophilen Infiltraten sichtbar (Kemp und Springer, 1978).
Die histologischen Veränderungen bestehen zwischen den 12.-16. Tagen p.i. bei Puten auf Riesenzellen, klumpige Nekrose und die Invasion des Protozoons weit in die Tunica muscularis, die fast bis zur Serosa reichen. 17-21 Tage p.i. wurde eine große Anzahl der Riesenzellen mit wenigen Histomonaden im Gewebe festgestellt, die größte Anzahl Histomonaden befindet sich in der Nähe der Serosa (Kemp und Springer, 1978).
Lymphoide Zentren im ganzen Blinddarmgewebe wurden in den alten Läsionen nach der Genesung nachgewiesen (Vatne et al., 1969). Es wurden auch zahlreiche Histomonaden in der Blinddarmschleimhaut zusammen mit einer hochgradigen Infiltration durch mononukleäre Zellen am 35 Tag. p.i bei Enten festgestellt (Callait-Cardinal et al., 2006).
Auch nach natürlicher Infektion bei Puten wurden Riesenzellen mit einer großen Anzahl Histomonaden festgestellt (Brener et al., 2006 und Sentíes-Cué et al., 2009). Oft gab es Geschwüre, die tief in die Muskelschichten hineinreichten.

2.9.2 Leber

Die Leberveränderung bei Hühnern stellen sich als ausgedehnte, tiefgreifende Nekrosen mit starker Infiltration von Entzündungszellen dar, hauptsächlich von Histiozyten, heterophilen Granulozyten und Lymphozyten (Gerth et al., 1985). Nach Perjod-Acid-Schiff Färbung (PAS) erscheinen die Histomonaden im Gewebeschnitt als rote granulierte Körperchen und bei Verwendung der Grocott-Färbung sind die Histomonaden als granulierte Körperchen von hellbrauner bis tiefschwarzer Farbe zu erkennen (Kemp und Reid, 1966). Die ersten mikroskopischen Läsionen in der Leber bei Puten sind von etwa 6-7 Tage p.i. zu erkennen.

Die Läsionen bestehen aus heterophilen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten, die sich in der Nähe der Pfortader ansammeln. Jedoch scheint der Nachweis von Histomonaden in diesen Bereichen schwer zu sein. Ähnliche Ergebnisse ergaben Untersuchungen von Callait-Cardinal et al. (2006), eine Infiltration mit mononukleären Zellen und heterophilen Granulozyten wurde in der Nähe der Pfortader zwischen dem 8. und 11. Tag p.i. bei 19% der untersuchten infizierten Enten sichtbar. Etwa 10-14 Tage p.i. wurde eine hochgradige Infiltration mit Lymphozyten und Makrophagen, begleitet von einer moderaten Infiltration mit heterophilen Granulozyten beobachtet. Zusätzlich wurden Nekrosen und zerfallende Leberzellen im Zentrum der Läsionen festgestellt. Viele einzeln liegende Histomonaden oder Cluster des Parasiten sind in der Peripherie der Läsionen sichtbar.
14-21 Tage p.i. wurden schwere Nekrosen, zusammen mit Histomonaden in den Makrophagen nachgewiesen. Bei der Genesung blieben eine große Anzahl Lymphozyten im Bereich der Fibrosen und sich regenerierenden Leberzellen (Vatne et al., 1969).
In der Leber von natürlich infizierten Puten trat eine schwere umfangreiche granulomatöse Hepatitis (Brener et al., 2006) oder eine multifokale klumpige Nekrose der Leberzellen (Sentíes-Cué et al., 2009) mit einer großen Menge von Riesenzellen, Makrophagen, Epithelzellen, Plasmazellen, Lymphozyten und heterophilen Granulozyten auf. Auch wurde eine große Anzahl nekrotischer Leberepithelzellen beobachtet (Brener et al., 2006).

2.9.3 Gallengänge

In den Gallengängen bei Puten wurde eine moderate bis hochgradige Dilatation festgestellt, zusätzlich wurde eine hochgradige proliferative granulomatöse Cholangitis mit Histomonaden nachgewiesen (Sentíes-Cué et al., 2009).

2.9.4 Bursa cloacalis

Eine Entzündung der Bursa cloacalis wurde sowohl nach natürlicher als auch nach experimenteller Infektion bei Puten und Hühnern beobachtet (Cortes et al., 2004; Hess et al., 2006b; Sentíes-Cué et al., 2009). Die Läsionen waren bei Puten und Hühnern von Nekrose des Parenchyms und Infiltration mit einer großen Anzahl von heterophilen Granulozyten, Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen, Riesenzellen und Histomonaden mit Fibrin geprägt (Cortes et al. 2004; Sentíes-Cué et al., 2009). Entzündliches Exsudat wurde im Subepithel und in den lymphatischen Follikel festgestellt. In schweren Fällen wurde eine Atrophie der Follikel und Ulzeration des Epithels mit hochgradiger Nekrose des Epithels sowie eine fibrinös-eitrige Entzündung festgestellt (Sentíes-Cué et al., 2009).

2.9.5 Nieren

In einigen Fällen bei Puten wurde eine gering- bis hochgradige, multifokale Nephritis charakterisiert durch Nekrosen und die Infiltration einer großen Anzahl verschiedener Entzündungszellen mit Histomonaden beobachtet (Shivaprasad et al., 2002). Außerdem wurden eine große Anzahl von Makrophagen, Riesenzellen und einige Plasmazellen mit verschiedenen großen Vakuolen nachgewiesen, die oft Histomonaden enthielten. Gelegentlich wurde eine Entzündung der Umgebung der Blutgefäße mit einer Erweiterung des Gefäßlumens und Hypertrophie der Endothelzellen bemerkt. Eine akute Koagulationsnekrose der tubulären Epithelzellen mit Gallenpigment in ihren Lumen wurde ebenfalls beobachtet, allerdings wurden keine Protozoen nachgewiesen (Sentíes-Cué et al., 2009).

2.9.6 Milz

In der Milz bei Puten wurde eine leichte bis starke Zunahme der Phagozyten in der Umgebung der Vakuolen, die Histomonaden enthielten festgestellt. Die rote Pulpa der Milz war mit heterophilen Granulozyten, Makrophagen und Plasmazellen infiltriert, aber es wurden keine vielkernigen Riesenzellen oder Nekrosen festgestellt. Im Lumen der Blutgefäße der Milz wurden einige Makrophagen beobachtet, die in ihrem Zytoplasma Histomonaden enthielten. In einem Schnitt wurde eine hochgradige fibrinös-eitrige Entzündung der Milzkapsel nachgewiesen, die allerdings nicht das Parenchym erreichte (Sentíes-Cué et al., 2009).

2.9.7 Lunge

In der Lunge bei Puten wurde eine moderate, multifokale, granulomatöse Pneumonie mit einer geringen Anzahl von Histomonaden beobachtet (Sentíes-Cué et al., 2009).

2.9.8 Pankreas

In der Bauchspeicheldrüse bei Puten wurde eine fibrinös-eitrige Entzündung beobachtet. Außerdem lagen mittelgradige multifokale Nekrose der azinösen Zellen und eine granulomatöse Entzündung mit einigen Histomonaden vor (Sentíes-Cué et al., 2009).

2.9.9 Drüsenmagen

In einem Fall bei Puten wurde eine geringgradige lokale Nekrose der Vormagenschleimhaut mit granulomatöser Entzündung und wenigen Histomonaden beobachtet (Sentíes-Cué et al., 2009).

2.10 Diagnose

Eine Diagnose ist in fast allen Fällen erst postmortal aufgrund der Veränderungen in Leber und Blinddärmen möglich (Craig, 1930). Nativpräparate von Blinddarm und Leber frisch getöteter Tiere können lichtmikroskopisch auf *H. meleagridis* untersucht werden. Das Vorliegen anderer Einzeller, die eine zuverlässige Diagnose beeinträchtigen könnte, macht die Diagnosestellung auf diesem Weg schwierig (Hafez und Zimmerman, 2003).
Zur Absicherung können Isolationsversuche sowie histopathologische Untersuchungen durchgeführt werden. Aus Organmaterial frisch getöterer Tiere kann die Isolierung der Histomonaden in unterschiedlichen Medien wie Dwyers Medium (Dwyer, 1970) oder Dwyers modifiziertem Medium (McDougald und Galloway, 1973) versucht werden. Unter Praxisbedingungen brachten die Isolierung und die Erhaltung von Histomonaden in Reinkultur viele unerwartete Probleme (Hafez und Zimmermann, 2003). Die Versuche zur Unterbindung von begleitenden Bakterien durch Supplementierung des Mediums mit Antibiotika führte zur Tötung der Histomonaden, die sich angeblich von Bakterien ernähren. Durch die Etablierung spezifischer PCR-Systeme ist es gelungen, sichere diagnostische Verfahren zu etablieren (Hafez et al., 2003).

2.10.1 Isolierung

Eine Kultivierung *in vitro* ist aus dem Organmaterial frisch getöteter Tiere. Dwyers Medium möglich (Dwyer, 1970). Dieses Medium besteht aus dem Zellkulturmedium M199 mit Pferdeserum und Reismehl mit oder ohne Hühnerembryo-Extrakt. M199 kann durch andere Zellkulturmedien oder phosphatgepufferte Salzlösung ersetzt werden. Hingegen waren verschiedene bakteriologische Medien nicht geeignet (Hauck et al., 2010b).
Van der Heijden et al. (2005) untersuchten die Wirkung der Menge des Reismehls und der Partikelgröße auf das Wachstum von *H. meleagridis*. Sie fanden heraus, dass Kulturen von *H. meleagridis* für mindestens 21 Tage ohne Subkultivierung lebensfähig waren, wenn nur eine geringe Menge Reismehl (10-12 mg pro 12,5 ml Medium) eingesetzt wurde. 50-100 mg Reismehl pro 12,5 ml Medium ergaben jedoch ein signifikant besseres Wachstum des Parasiten.
Die Konzentration von *H. meleagridis* im Medium konnte mehr als 10^7 Parasiten/ml betragen. Der Einfluss der Partikelgröße des Reismehls auf das Wachstum des Parasiten war gering. Außerdem berichteten van der Heijden und Landman (2007a) über eine bis zu 3 fache Erhöhung der Histomonaden- Anzahl, wenn der Parasit unter Zugabe von Reismehl (100 mg/12,5 ml Medium) und ohne Hühnerembryo-Extrakt kultiviert wird. Das Pferdeserum, bzw. Serum anderer Tierarten, ist ein wesentlicher Bestandteil des Mediums, ohne den kein Wachstum von *H. meleagridis* erfolgt (Hauck et al 2010b).

Hess et al. (2006a) etablierten Kulturen von *H. meleagridis*, *T. gallinarum* und *Blastocystis sp.*, aus einer einzigen Zelle, sogenannte monoklonale Kulturen. Dazu wurde die Zelle mittels Mikromanipulation in neues, mit Bakterien aus dem Blinddarminnahlt von Puten konditioniertes Medium überführt.

2.10.2 Histopathologie

Der Erreger kann im histologischen Präparat mittels PAS Färbung, Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE) und Grocott-Färbung nachgewiesen werden (Kemp und Reid, 1966). Jedoch können die beiden Färbungen zwischen Blastomyces, *Candida albicans* und *H. meleagridis* nicht deutlich unterscheiden, da die Mikroorganismen vermutlich nicht ausreichend gefärbt werden. Cortes et al. (2004) verwendeten die Wright-Färbung und berichteten, dass diese Färbung geeignet war, um den Parasit in der Leber zu erkennen. Außerdem war die PAS Färbung hilfreich bei der Identifizierung des Parasiten, jedoch gab es auch viele *H. meleagridis*-Zellen, die mittels PAS nicht gefärbt werden konnten. Möglicherweise liegen verschiedene Entwicklungsstadien des Parasiten vor, von denen einige mittels PAS nicht gefärbt werden können (Sentíes-Cué et al., 2009).

2.10.3 *In-situ*-Hybridisierung

Liebhart et al. (2006) entwickelten ein *in-situ*-Hybridisierung Verfahren zur Detektierung und Unterscheidung von *H. meleagridis* und anderen Mikroorganismen in Paraffin eingebetteten Gewebeproben. Diese Methode bietet eine höhere Spezifität für den Nachweis des Parasiten in Gewebeproben, eine Visualisierung der detektierten Nukleinsäuren in ihrer zellulären Umgebung und eine histologische Untersuchung der veränderten Gewebe.

2.10.4 Immunhistochemie

Mit spezifischen Antikörpern kann *H. meleagridis* immunhistochemisch in Paraffin eingebetteten Gewebeproben nachgewiesen werden. Diese Technik erwies sich als sensitiver als HE und PAS- Färbungen, besonders bei den Geweben mit einer geringen Anzahl an Parasiten (Singh et al., 2008).

2.10.5 Polymerase- Ketten- Reaktion (PCR)

Eine sichere Diagnose ist zurzeit mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) möglich (Hafez et al., 2005b; Huber et al., 2005; Grabensteiner und Hess, 2006; Bleyen et al., 2007). Die Primer wurden auf Grundlage der veröffentlichten Sequenz der kleiner ribosomalen

Untereinheit des rRNA- Gens (SSU- rRNA- Gen) von *H. meleagridis* entwickelt (Gerbod et al., 2001).

Eine PCR für die Diagnose *von H. meleagridis* wurde von Hafez et al., (2005b) entwickelt. Sie entwickelten eine konventionelle PCR, eine nested PCR und eine real-time PCR, um das ssu rRNA-Gen des Parasiten zu detektieren. Die konventionelle PCR ist sensitiver als die real-time PCR, aber weniger spezifisch als diese. Die Sensitivität der real-time PCR war jedoch ausreichend, um die DNA des Parasiten in Gewebeproben im Rahmen der Routinediagnostik zu detektieren.

Eine weitere PCR wurde von Huber et al., (2005) entwickelt. Diese PCR kann *H. meleagridis* detektieren, wenn die Anzahl der Parasiten in der Kultur zwischen 10 und 10^{-1} Parasiten/ml liegt. Grabensteiner und Hess (2006) entwickelten eine PCR, die DNA von 10 Protozoen detektieren kann. Zuletzt entwickelten Bleyen et al. (2007) eine PCR mit einer internen Amplifikationskontrolle, um falsch negative Ergebnisse auszuschließen. Mittels dieser PCR können 20 Parasiten in Leber- und Blinddarmproben oder 50 Parasiten in Kotproben nachgewiesen werden. Ein Vergleich der PCR-Systeme von Hafez et al. (2005b), Huber et al. (2005) und Bleyen et al. (2007) ergab bei Leberproben infizierter Puten keinen Unterschied, während die Sensitivität bei den Blinddarmproben zwischen 27,3 % und 72,7 % lag (Bleyen et al., 2007). Dieser Vergleich der PCR-Systeme wurde in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Vergleich verschiedener PCR-Systeme nach Bleyen et al. (2007)

PCR-System von	Größe des Amplikons	Probe			Nachweisgrenzen gemäß der Erstveröffentlichung
		Leber Ohne Läsionen	Leber Mit Läsionen	Blinddarm Mit Läsionen	
Hafez et al., (2005b)	476 bp conventional	0/6 positiv	13/13 positiv	7/11 positiv	n.u.
Huber et al., (2005)	209 bp	0/6 positiv	13/13 positiv	3/11 positiv	0.1 Parasiten /ml (300 in Kotproben)
Bleyen et al., (2007)	491 bp Mit interner Kontrolle (627bp)	0/6 positiv	13/13 Positiv	8/11 positiv 2/11 inhibiert	20 Parasiten (50 in Kotproben)

n.u.: nicht untersucht.

2.10.6 Nachweis von Antikörpern

Zum Nachweis von Antikörpern gegen *H. meleagridis* bei Geflügel wurde ein indirekter Sandwich- ELISA von Windisch und Hess (2009) entwickelt. In Seren experimentell mit *H. meleagridis* infizierter Hühner und Puten wurden ab der 2. Woche p.i. IgG Antikörper gegen *H. meleagridis* nachgewiesen. Außerdem setzten Bleyen et al. (2009) eine indirekte Immun-Fluoreszenzanalyse zum Nachweis von IgG im Serum von experimentell mit *H. meleagridis* infizierten Puten ein. Zuletzt entwickelten van der Heijden et al. (2010) einen kompetetiven ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen *H. meleagridis* bei Hühnern und Puten. Dazu benutzen sie einen monoklonalen Antikörper gegen ein extrahiertes Protein von *H. meleagridis*.

2.10.7 Veränderungen von Blutwerten

Die Histomonose kann durch Veränderungen der Serum und Plasma- Enzyme nicht sicher diagnostiziert werden, da diese nur eine Schädigung der Leber anzeigen können (Tabelle 3). So erhöhen sich bei Puten die Werte für Asparaginsäureaminotransferase (AST), Laktatdehydrogenase (LDH), Malatdehydrogenase (MDH), Glutamatdehydrogenase (GLDH) und Bilirubin nach experimenteller (Al-Khateeb und Hansen, 1974, Beg und Clarkson, 1970a; 1970b; McDougald und Hansen, 1970; Hirsch, 1979) und natürlicher Infektion (Koncicki et al., 1999) mit Histomonaden. Im Gegensatz dazu sinken die Werte dieser Enzyme bei Hühnern, wenn nur in den Blinddärmen Läsionen vorliegen (McDougald und Hansen, 1970). Eine Behandlung mit Salfurid, einem gegen Histomonaden wirksamen Medikament, führte entsprechend zu niedrigeren GOT-Werten (Al-Khateeb und Hansen, 1973).
Die Werte für Cholinesterase im Blut sinken nach der Infektion von Puten (McDougald und Hansen, 1970). Darüber hinaus wurden bei den Bluteiweißen niedrigere Albumin- und erhöhte Globulinwerte nach der Infektion mit Histomonaden bei Puten und Hühnern festgestellt (Clarkson, 1966; McDougald und Hansen, 1969; Beg und Clarkson, 1970a; 1970b).

Tabelle 3: Auswirkung einer Infektion mit *H. meleagridis* auf Plasmaenzyme und Bluteiweiße laut Literatur

Referenz	Tierart	Proben-nahme Tag p.i.	GOT	GPT	Albumin	Bilirubin	LDH	Globulin	Cholin-esterase
Al-Khateeb and Hansen, 1973	Puten	11	+						
Al-Khateeb and Hansen 1974	Hühner und Puten	11, 30, 45, 60	+	+			+/-		
			+	+ /-			+		
Beg and Clarkson, 1970a	Hühner	Täglich (1-21)			-			+	
Beg and Clarkson, 1970b	Puten	Täglich (1-20)	+	+			+		
Clarkson, 1966	Puten	Täglich (1-14)			-			+	
Hirsch, 1979	Puten	Täglich (1-17)	+			-			
McDougald and Hansen, 1969	Hühner	3, 6, 9, 12			-			+	
McDougald and Hansen, 1970	Hühner	3, 6, 9, 12	+	+/-			+		+/-
McDougald and Hansen, 1970	Puten	3, 6, 9, 12	+	+/-			+		-
Meier und Schultz, 1980	Hühner	1, 2, 7, 14	+/-		+	-			

+: Werte erhöht; -: Werte erniedrigt; +/-: Werte unverändert; keine Angabe: Blutwerte wurden nicht untersucht

2.11 Prophylaxe und Therapie

2.11.1 In der Vergangenheit proyhylaktisch eingesetzte Wirkstoffe

Im Laufe der Jahre wurden viele Substanzen auf ihre Wirksamkeit zur Behandlung bzw. zur Prophylaxe von Histomonose untersucht (Tabelle 4). Anfang der 20er Jahren des letzten Jahrhunderts wurden das getrocknete Rhizom und die Wurzeln von *Cephaelis ipecacuanha* (IPECAC) als erste mögliche therapeutische bzw. prophylaktische Substanz gegen Histomonose getestet (Wegeforth und Wegeforth, 1921; Graybill, 1922). Diese Substanz war jedoch nicht wirksam. Das Selbe galt für eine Reihe weiterer Substanzen wie beispielsweise Brechweinstein, Chinin Hydrochlorid und Emetin Hydrochlorid (Tyzzer und Fabyan, 1922). Danach wurden Arsenverbindungen untersucht, die zu diesem Zeitpunkt als viel versprechende Medikamente galten (Tyzzer, 1923). Das beste Ergebnis lieferte Tryparsamid, das im Vergleich zu anderen getesteten Arsenverbindungen weniger toxisch, aber teuer war (Tyzzer, 1927).

Von Anfang der 60er bis in die 90er Jahre galten Nitroimidazol- Verbindungen als Mittel der Wahl bei der Behandlung der Histomonaden (Flowers et al., 1965). Besonders waren die Wirkstoffe Dimetridazol, Ipronidazol und Ronidazol weit verbreitet. Auch für eine Reihe von Nitrofuranen wurde ein Effekt auf Histomonaden nachgewiesen. Beispielsweise führten Furazolidon, Furoxon und Nihydrazon zu einer verringerten Mortalität durch Histomonaden (Bowen et al., 1971). Aufgrund der cancerogenen und mutagenen Wirkung der Nitrofurane wurden sie innerhalb der EU im Jahr 1993 verboten, zwei Jahre später erfolgte auch ein spezielles Verbot für Furazolidon. Zudem wurden alle gegen Histomonaden wirksamen Wirkstoffe der Nitroimidazol- Gruppe in der EU in Anhang IV der Verordnung Nr. 2377/90 aufgenommen (EU, 2002a). Deswegen besteht seit 1995 ein Therapienotstand für diese Erkrankung.
Bereits 1982 erfolgte die Zulassung des Nitrofurans Nifursol (3,5-Dinitro-Salicylsäurehydrazid) in der EU. Nifursol war das Mittel der Wahl als prophylaktischer Futterzusatzstoff zur Bekämpfung der Histomonaden bei Puten und wurde über 20 Jahre in Europa verwendet. Aus den gleichen Gründen, die für das Verbot von Nitrofuranen angeführt wurden, wurde die Zulassung von Nifursol zum 31.03.2003 innerhalb der EU widerrufen (EU, 2002b). Seitdem besteht zusätzlich ein Prophylaxenotstand in der EU für diese Erkrankung.
In den USA und Kanada ist Nitarsone (4-Nitrophenylarsensäure) als Futterzusatzstoff mit dem Handelsnamen Histostat zugelassen. Eine prophylaktische Wirkung von Histostat wurde mehrmalig nachgewiesen (McNaughton und Skinner, 2000; Skinner, 2000; Sims und Danny, 2002; Duffy et al., 2004).

2.11.2 Aktuelle Therapeutika und Prophylaktika

In den jüngsten Studien wurden weitere Produkte gefunden, die *in vitro* eine anti-histomonale Aktivität haben. Dazu gehörten ätherische Öle (Zenner et al., 2003), pflanzliche Produkte (Hafez und Hauck, 2006; van der Heijden und Landman 2008a) und weitere natürliche organische Verbindungen (Grabensteiner et al., 2007). Die pflanzlichen Produkte konnten *in vivo* die Mortalität durch Histomonose reduzieren, jedoch nicht vollständig verhindern (Zenner et al., 2003; Hafez und Hauck, 2006; Grabensteiner et al., 2007, van der Heijden und Landman 2008b).

2.11.2.1 Testung von Substanten *in vitro*

Zenner et al. (2003) testete verschiedene ätherische Öle aus Cinnamomum aromaticum, Citrus limon pericarps und Allium sativum, und zeigten eine Wirkung dieser Substanzen gegen *T. gallinarum und H. meleagridis*. Wirksam waren ummantelte Extrakte aus Oregano, Zimt, Thymian, Zitrusfrüchten und Paprikagewächsen (Hauck und Hafez, 2007).

Eine antiprotozoische Wirkung gegen *H. meleagridis* zeigte die Steppenraute (*Peganum harmala*), insbesondere ihre Alkaloide Harmane und Harmalin (Arshad et al., 2008), sowie das Antibiotikum Tiamulin (Hauck et al., 2010c).
Van der Heijden und Landman (2008a) untersuchten die Wirkung von vier pflanzlichen Produkten, namentlich Aromabiotic™, Enteroguard™, Protophyt SP™, Protophyt B™ sowie von Dimetridazol und Histostat-50™, auf *H. meleagridis in vitro*. Enteroguard™ und Protophyt B™ sowie Dimetridazol und Histostat-50™ hemmten das Wachstum von *H. meleagridis*, während kein Effekt von Aromabiotic™ und Protophyt SP™ festgestellt wurde. Nicht wirksam *in vitro* waren auch die fünf Benzimidazole Albendazol, Fenbendazol, Flubendazol, Mebendazol und Nocodazol (Hauck und Hafez, 2009).

2.11.2.2 Testung von Substanten *in vivo*

Hafez und Hauck (2006) untersuchten die Wirksamkeit eines pflanzlichen Produkts (Protophyt®) *in vivo* zur Prophylaxe einer experimentellen Infektion mit *H. meleagridis* bei Puten. Das Produkt reduzierte die Mortalität, jedoch wurden die Läsionen in Leber und Blinddärmen bei den verendeten, behandelten Puten nicht reduziert. Im Gegensatz dazu war die Applikation von Protophyt® im Feld nicht erfolgreich (Chossat, 2002).
Auch die therapeutische Gabe eines pflanzlichen Produktes mit Oreganoextrakt (Ropadiarsol 7,5%) an auf natürlichem Weg infizierte Puten war nicht wirksam und reduzierte nicht die Mortalität (Popp und Hafez, 2007). Hingegen schien Tiamulin die Mortalität durch Histomonose zu reduzieren (Burch et al. 2007).
Duffy et al. (2005) verglichen Nitarson (Histostat®) und ein proprietäres pflanzliches Produkt (Natustat™) für die Prophylaxe von Histomonose nach einer experimentellen Infektion mit *H. meleagridis* bei Puten. Beide Produkte waren wirksam, jedoch führte die Gabe von Natustat™ zu einem signifikanten höheren Körpergewicht und zu einer Verringerung des Läsionsgrads in den Blinddärmen. Im Gegensatz reduzierten bei infizierten Masthähnchen beide Produkte statistisch gleichwertig die Läsionen in Leber und Blinddärmen (Duffy et al., 2004). Hier muß jedoch betont werden, dass die Mortalität der infizierten und nicht behandelten Kontrolle lediglich bei unter 0,5% lag.
Van der Heijden und Landman (2008b) untersuchten die prophylaktische Wirkung der pflanzlichen Produkte Enteroguard™ und Protophyt™ gegen eine experimentelle Infektion mit *H. meleagridis* bei Puten. Die beiden Produkte hatten keine Wirkung gegen Histomonose, auch bei einer sehr geringen Infektionsdosis mit *H. meleagridis* nicht.
Hauck et al. (2010b) untersuchten die Wirkung von Nifurtimox (NFX), eines Nitrofurans, für die Kontrolle von Histomonose *in vitro* und *in vivo* nach experimenteller Infektionen von Puten. Sie berichteten, dass 200 ppm NFX *in vitro* vollständig letal für *H. meleagridis* war. Außerdem konnte ein signifikanter Effekt der prophylaktischen Applikation von NFX im Futter

festgestellt werden. Im Gegensatz dazu war eine therapeutische Behandlung mit 400 ppm im Futter für 3 Tage p.i. nur partiell wirksam. Insgesamt war die Reduzierung der Läsionen bei verendeten und getöteten Tieren durch die prophylaktische bzw. therapeutische Applikation von NFX in der Leber ausgeprägter als in den Blinddärmen, vermutlich weil die Konzentration des Präparats in der Leber durch den Stoffwechsel höher war. Außerdem gab es keine negative Wirkung auf das Wachstum der Puten und die Futteraufnahme bei den nicht infizierten aber behandelten Gruppen. Das deutet darauf hin, daß die Anwendung von NFX zur Prophylaxe oder Therapie bei einer Infektion mit *H. meleagridis* möglich ist.

2.11.2.3 Paromomycin

Paromomycin ist ein lange bekanntes Aminoglykosid-Antibiotikum mit antiparasitärer Aktivität (Carter et al., 1962; Garin et al. 1966), das in jüngerer Zeit eine neue Bedeutung bei der Behandlung der Leishmaniose beim Menschen erworben hat (El-On et al., 1984; Vexenat et al., 1998; Minodier und Parola, 2007). Nach experimenteller Infektion von Puten mit *H. meleagridis* reduzierte Paromomycinsulfat mit einer Konzentration von 1000 oder 2000 ppm im Futter die Mortalität (Lindquist, 1962). Bei Hühnern war Paromomycinsulfat unwirksam gegen Histomonose, eine Reduzierung des Läsionsgrads in Leber und Blinddärmen wurde nicht beobachtet (Hu und McDougald, 2004). *In vitro* reduzierte Paromomycinsulfat jedoch das Wachstum von Histomonaden bei einer Konzentration von 10 µg/ml und war bei einer Konzentration von 100 µg/ml vollständig letal für *H. meleagridis* (Hu und McDougald, 2004).

Tabelle 4: Übersicht über auf ihre Wirkung gegen *H. meleagridis* untersuchte Substanzen

Substanz	Methode	Ergebnis	Literatur
IPECAC	*In vivo* (Puten)	Wirkungslos	Wegforth et al., 1921
Schwefel	*In vivo* (Puten)	Wirkungslos	Tyzzer und Fabyan, 1922
Chinin Hydrochlorid Neoarsphenamin Arsensäure (As2O3) Tryparsamid Atoxyl	*In vivo* (Puten)	Wirkungslos	Tyzzer, 1923
Bayer 205 Terpentin Mexican Bitter Bush	*In vivo* (Puten)	Wirkungslos	Tyzzer, 1927
Salvarsan Neo-Salvarsan Myo-Salvarsan Stabilarsan Vet-Stab Arsephamin Spirocid Mapharsid	*In vivo* (Puten)	Wirkungslos	Jaquette et al., 1947
Emetin Hydrochlorid	*In vivo* (Puten)	Wirkungslos	Swales et al., 1948
Chloroquin Diphosphat Di-iodohydroyquinol Phenyl-Quecksilbernitrat Acetarson Arsinobenzamid	*In vivo* (Puten)	wirksam	Swales, 1950
Paromomycinsulfat	*In vivo* (Puten)	Wirksam	Lindquist, 1962
Nitroimidazol Nitrofuran	*In vitro*	Wirksam	Caillait et al., 2002
Roxarsone Benzimidazole		Wirkungslos	
Penicillin Chlortetracyclin Tylosin Srafloxacin Salinomycin Diclazuril Doxarson, Lasalocid	*In vivo* (Broiler)	Wirkungslos	Hu et al., 2002
Ätherische Öle	*In vitro*	Wirksam	Zenner et al., 2003
Nitroimidazole	*In vivo* (Broiler)	Wirksam	Hu et al., 2004
Carbadox	*In vivo* (Broiler)	Wirkungslos	
Quinolinol Benzimidazoles Promomycinsulfate	*In vitro*	Wirkungslos	
Natustat® Histostat®	*In vivo* (Broiler)	Wirksam	Duffy et al., 2004
Natustat® Histostat®	*In vivo* (Puten)	Wirksam	Duffy et al., 2005
Protophyt®	*In vivo* (Puten)	Wirksam	Hauck und Hafez, 2006
Pflanzliche Extrakte	*In vitro*	Wirksam	
Tiamulin	*In vivo* (Puten)	Wirksam	Burch et al., 2007
Ätherische Öle	*In vivo* (Puten)	Wirksam	Grabensteiner et al., 2007
Protophyt B™ Enteroguard® Dimetridazol Histostat®	*In vitro*	Wirksam	Van der Heijden et al., 2008a
Aromabiotic™ Protophyt SP™		Wirkungslos	
Protophyt® Enteroguard®	*In vivo* (Puten)	Wirkungslos	Van der Heijden et al., 2008b
Benzimidazole	*In vitro*	Wirkungslos	Hauck und Hafez, 2009
Nifurtimox	*In vitro* und *In vivo* (Puten)	Wirksam	Hauck et al., 2010b
Tiamulin	*In vitro*	Wirksam	Hauck et al., 2010c

2.12 Immunität

Die Immunantwort des Wirts und der Anteil der verschiedenen Komponenten des Immunsystems für einen Schutz gegen Histomonose sind bisher unbekannt (Hess et al., 2008). In den letzten fünf Jahren wurden wieder Untersuchungen über die aktive oder passive Immunität gegen Histomonose durchgeführt. Die Immunantwort der Tiere gegen eine Infektion mit diesem Protozoon ist vermutlich nicht nur eine systemische humorale Immunität, sondern auch eine zelluläre Immunität unter der Beteiligung von T-Zellen und Interleukin, sowie einer Schleimhautimmunität (Hess et al., 2008; Bleyen et al., 2009; Powell et al., 2009).

2.12.1 Aktive Immunität

Die Rolle der zellulären Immunität gegen eine Infektion mit *H. meleagridis* bei Hühnern und Puten wurde von Powell et al., (2009) untersucht. Hühner zeigten eine erhöhte Expression von Interleukinen und Zytokinen im Blinddarm und eine Reduktion der Anzahl nachgewiesener Histomonaden. Im Gegensatz dazu wurde solche lokale Immunantwort bei Puten nicht nachgewiesen. Bei Hühnern und Puten wurde gleichzeitig mit der Veränderung in der Leber durch den Parasiten eine Beteiligung von T-Zellen beobachtet. Dies war bei Puten ausgeprägter als bei Hühnern. Jedoch stieg der Antikörperspiegel im Blut bei den Hühnern mehr als bei den Puten an, was als zusätzlicher Beweis für eine adaptive Reaktion gedeutet wurde.

2.12.1.1 Immunschutz nach überstandener Infektion

Puten können nach einer Infektion und Behandlung mit Dimetridazol oder Ronidazol eine Immunität ausbilden (Joyner et al., 1963, Bleyen et al 2009). Im Gegensatz dazu war in einer anderen Untersuchung eine dreimalige Wiederholung von Infektionen, Behandlung und Genesung notwendig, bevor die Puten einen deutlichen Schutz gegen eine Reinfektion mit *H. meleagridis* zeigten (McDougald, 2005a).

2.12.1.2 Immunschutz nach Impfung mit inaktivierten *H. meleagridis*

Hess et al., (2008) untersuchten bei Puten die Wirksamkeit einer inaktivierten Impfung, um einen Schutz gegen Histomonose zu erreichen. Die Impfung mit inaktivierten Vakzinen ergab kein zufriedenstellendes Ergebnis, vermutlich da die zelluläre Immunität mit T-Zellen und Interleukin die Hauptkomponenten eines Schutzes sind. Außerdem zeigten Bleyen et al. (2009), dass intrakloakal infizierte und behandelte Puten einen signifikanten höheren IgG-Titer haben als intramuskulär mit inaktivierten Histomonaden geimpfte Puten.

2.12.1.3 Immunschutz nach Impfung mit attenuierten *H. meleagridis*

Versuche zur Immunisierung von Hühnern und Puten mit *in vivo* attenuierten *H. meleagridis* waren teilweise erfolgreich (Tyzzer, 1933a; 1933b; 1934; 1936). Tyzzer produzierte eine nicht pathogene Kultur durch längere Kultivierung *in vitro* und verwendete die Kultur zur intrakloakalen Impfung von Hühnern und Puten. Jedoch waren die Tiere nicht komplett gegen einen Challenge mit einem virulenten Isolat geschützt. Ebenso attenuierten Lund et al., 1966b; 1967b Kulturen von *H. meleagridis* durch wiederholte Passagierung *in vitro*, wobei mit der Virulenz auch die Immunogenität verloren ging und keinen Schutz gegen eine Infektion vermittelt. Zuletzt produzierten Hess et al. (2008) nicht virulente Kulturen von *H. meleagridis* durch 95, 215 und 295 Passagen *in vitro* und verwendeten diese Kulturen zur intrakloakalen Impfung bei Puten. Alle Passagen vermittelten einen sehr guten Schutz der Puten gegen eine Infektion mit virulenten *H. meleagridis*.

2.12.1.4 Immunschutz nach der Impfung mit nicht-pathogen *H. wenrichi*

Histomonas wenrichi wurde zuerst von Wenrich (1943) beschrieben. Als eine apathogene, nahe verwandte Art scheint *H. wenrichi* für die Entwicklung eines Impfstoffs gegen die Histomonose geeignet. Tatsächlich schützt eine Immunisierung von Puten mit *H. wenrichi* gegen eine intrakloakale Infektion mit *H. meleagridis*, bietet aber keinen vollständigen Schutz, wenn die Puten oral mit heterakiden Eiern infiziert wurden (Lund, 1959).

2.12.2 Passive Immunität

Versuche zum Transfer der Immunität durch intraperitoneale Injektion von Serum immuner Vögel blieben bis jetzt erfolglos. Puten, die kurz vor der Infektion ein Serum mit Antikörpern gegen Histomonaden erhielten, starben und zeigten für Histomonose typische Veränderungen (Bleyen et al. 2009). Außerdem gab es keinen Unterschied im Läsionsgrad in Leber und Blinddärmen nach der Infektion von passiv immunisierten Puten.

2.13 Genetische Resistenz

Eine Züchtung von Putenlinien, die gegenüber einer Infektion *mit H. meleagridis* resistent sind, könnte ein Ansatz zur Bekämpfung der Krankheit sein. Reynaud et al. (2005) verglichen die Empfindlichkeit zweier Putenlinien, einer modernen, schweren Linie und einer traditionellen leichten Linie für eine Infektion *mit H. meleagridis*. Beide Putenlinien waren empfänglich für die Infektion und die Mortalität lag bei 100 %. Die pathologischen und

histologischen Veränderungen waren identisch und es gab keinen Unterschied im Läsionsgrad zwischen den beiden Linien.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Histomonaden- Stämme

Die Histomonaden- Stämme Pute/Deutschland/GB551/04 und Pute/Deutschland GB542/04 lagen am Institut für Geflügelkrankheiten der FU Berlin vor. Beide Stämme wurden von natürlichen Ausbrüchen bei Puten im Jahr 2004 in Deutschland in modifiziertem Dwyers Medium isoliert und nach der Angabe von Hafez et al. (2005) wurden die Stämme identifiziert.

3.1.2 Tiere

Puteneintagsküken der Linien British United Turkey (BUT-Big 6) und Kelly Bronze Turkey (KBT) wurden vom Moorgut Kartzfehn von Kameke GmbH & Co. Kg, Bösel, bezogen.
Wildputen Eintagsküken [Wild-Canadian-Turkey, (WCT)] wurden im Institut für Geflügelkrankheiten der FU Berlin ausgebrütet. Die Eier stammten aus eigener Zucht.
SPF- Lege- und Masteintagsküken wurden im Institut für Geflügelkrankheiten der FU Berlin ausgebrütet und die Eier stammten auch aus eigener Zucht.

3.1.3 Materialen und Geräten

3.1.3.1 Materialien und Geräte für die Kultivierung von Histomonaden

Deckgläser 18 x 18mm	Menzel-Glaser, Braunschweig
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
Embryonierte Eier von SPF- Hühnern	Lohmann Tierzucht, Cuxhaven
Fötales Kälber Serum	Biochrom AG, Berlin
Fuchs-Rosenthal Zählkammer (0.200mm Tiefe, 0.0625mm^2)	Hecht-Assistent, Sondheim
Glaspipetten	Hirschmann, Pliezhausen
Lichtmikroskop, Type DM/LS 11/98	Wetzlar GmbH, Bensheim
Medium 199 mit Hanks Salzen	Biochrom AG, Berlin
Nalgene Cryo Freezing Container	Thermo Fisher Scientific., Roskilde, Dänemark
Objektträger, ca. 76 x 26mm	Menzel-Glaser, Braunschweig.
Pferde Serum	Biochrom AG, Berlin
PH-Meter	Schott Geräte GmbH, Mainz
Pipetten (20,200,1000µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfen (Accuboys)	Integra Bioscience, Fernwald
Sodium Bicarbonate	Biochrom AG, Berlin
Ultra-Turrax, Typ 18/10	IKA-Werk, Staufen
Waage	Sartorius Analytik, Berlin
Zellkultur-Flaschen (25cm^2)	TPP, Deutschland
Zentrifugen Röhrchen 50ml	TPP, Deutschland

3.1.3.2 Materialien und Geräte für die Durchführung der Tierversuche

Lithium-Heparin-Röhrchen, 1,3ml	Sarstedt, Nümbrecht
Putenstarter und Mastfutter Typ15 und 16	TÜK-TÜK, Pansdorf
Spritzen und Kanülen (0.6 x 30 mm)	BSN Medical, Hamburg
Zentrifugen Röhrchen (1,5-2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Waage, Kern 440-49N	Th. Geyer, Berlin

3.1.3.3 Materialien und Geräte für die Präparation von DNA

Biophotometer	Eppendorf, AG, Hamburg
Einmalpipettenspitzen (Safeseal-Tips)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Fixvolumen-Pipetten	Abimed, Langenfeld
Lamina HeraSafe	Heraeus, Hanau
QIAamp DNA Mini Kit (Proteinase K, Lysispuffer ATL, Lysispuffer AL, Filtterröhrchen, Waschpuffer AW1, Waschpuffer AW2, Elutionspuffer AE)	Qiagen, Hilden
Schüttelbad Typ 1083	GFL, Burgwedel
Vortex-Genie	Bender & Hobein AG, Hamburg

3.1.3.4 Materialien und Geräte für die Durchführung von PCR

100bp Marker	New England Biolabs, Frankfurt
Biozym LE Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Einmalpipettenspitzen Safeseal-Tips	Biozym, Hessisch Oldendorf
Elektrophorese Kammer Horizon	Lifetechnologies Gibco Brl, Galthersburg, USA
Gel Dokumentation	Bio- RAD, Quantity One- 4.6.1, Laboratories GmbH, München
iCycler iQ und die dazugehörige Software	Bio-Rad, München
Lamina HeraSafe	Heraeus, Hanau
Mastermix	Qiagen GmbH, Hilden
Primer	Biomers Net GmbH, Ulm
Redy-To-Go PCR Beads-Kit (PCR-Gefäße Puffer-, Nukleotid und Polymerasemix in Kugelform)	Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg
Syber Green PCR Mastermix	Qiagen GmbH,Hilden
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen

3.1.4 Lösungen und Medien

3.1.4.1 PBS (Phosphate Buffered Saline)

NaCl	137mM
KCl	1,47mM
KH_2PO_4	1,47mM
Na_2HPO_4	6,46mM
pH	7,4

3.1.4.2 TBE-Puffer (Tris-Borat-Elektrophoresepuffer)

Tris	89mM
Borsäure	89mM
EDTA Dinatriumsalz	2mM
pH	7,5

3.1.4.3 Probenladepuffer

Bromphenolblau	0.25 ml
Xylencyanol	0.25ml
Glycerin	30ml
TBE–Puffer (4x)	100ml

3.1.4.4 Größenmarker 100 bp

100 bp–DNA Ladder	30µl
Probenladepuffer	30µl
ddH_2O	185µl

3.1.4.5 Dwyers medium

M 199 mit Hanks Salzen	85%
Inaktiviertes Pferdeserum	10%
Chickenembryo extract (12 Tage bebrütete SPF- Eier wurden geöffnet, danach wurde der Kopf der Embryos verworfen. Je 6 Embryos wurden in 50ml-Röhrchen überführt und für 4 min im Ultraturrax homogenisiert)	5%
pH (der pH-Wert wurde mittels Na_2Co_3 eingestellt)	7.4
Reismehl	1 mg/1ml

3.1.4.6 Modifiziertes Dwyers medium

M 199 mit Hanks Salzen	90%
Inaktiviertes Pferdeserum	10%
Reismehl	10mg/1ml

3.1.4.7 PBS-basiertes Medium

PBS	90%
Inaktiviertes Pferdeserum	10%
Reismehl	10mg/1ml

3.1.5 Medikamente

3.1.5.1 Gabbrovet 70®

Produktname	Gabbrovet 70®
Wirkstoffe	Paromomycin
Konzentration (%)	100 g/kg
Quelle & Hersteller	Ceva sante animale, Frankreich
Chargennummer	07C21
Ablaufdatum	03/2009

3.1.5.2 HistoBloc®

Produktname	HistoBloc 80®
Wirkstoffe	Paromomycin
Konzentration (%)	80 g/kg
Quelle & Hersteller	Biovet, Huvepharma, Belgien
Chargennummer	07050975002
Ablaufdatum	11/2008

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung von *H. meleagridis in vitro*

3.2.1.1 Auftauen von *H. meleagridis* Isolaten aus flüssigem Stickstoff

Histomonaden- Kulturmaterial in 2 ml Cryo-Röhrchen wurden aus flüssigem Stickstoff im 40°C warmen Wasserbad aufgetaut und sofort in Zellkulturflaschen mit vorgewärmtem Dwyers Medium (1 ml Histomonaden- Kulturmaterial / 9 ml Dwyers Medium) gegeben. Die Kulturen wurden anschließend bei 40°C inkubiert. In den nächsten Tagen erfolgte die weitere Passagierung der Histomonaden.

3.2.1.2 Passagierung der *H. meleagridis* Kulturen

1 ml der Ausgangspassage wurde zu 9 ml frischem, vorgewärmtem Dwyers Medium gegeben und bei 40°C inkubiert. Die Passagierung erfolgte alle ein bis drei Tage.

3.2.1.3 Zählen von *H. meleagridis*

Die Bestimmung der Histomonadenzahl erfolgte in einer Fuchs- Rosenthal- Zählkammer unter einem Lichtmikroskop mit 20 facher Vergrößerung.

3.2.1.4 Konservierung von *H. meleagridis* Isolaten in flüssigem Stickstoff

Im Cryo-Röhrchen wurden 150 µl fötales Kälberserum (FKS) mit 150 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) vorgelegt und mit Histomonaden- Kulturmaterial auf 2 ml aufgefüllt. Anschließend wurden die Cryo-Röhrchen in den Isopropanol gefühlten Behälter für 24 Stunden bei -70°C gekühlt. Am nächsten Tag wurden die Cryo-Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

3.2.2 Durchführung der Tierversuche

3.2.2.1 Haltung

3.2.2.1.1 Käfige

Je 10 Puteneintagsküken wurden in einem Käfig gehalten. Die Käfige bestanden aus Edelstahl und waren 85cm lang, 73cm breit und 63cm hoch.

3.2.2.1.2 Futter- und Wassernäpfe

Jeder Käfig hatte 2 Tröge, einen für Wasser und den zweiten für Futter. Die Tröge waren 82cm lang, 8cm breit und 6cm hoch. In jedem Napf konnte bis 3L Wasser oder 3kg Futter gegeben werden. Zusätzlich wurde Wasser in 2 Flaschen mit Nippeln angeboten.

3.2.2.1.3 Futter

Die Tiere wurden mit kommerziellem Pelletfutter je nach Alter der Tiere (Phase 1: 1-14 Tage; Phase 2: 14-56 Tage) gefüttert. Das Futter enthielt keine Kokzidostatika oder Amöbostatika.

3.2.2.1.4 Temperatur

Die Raumtemperatur wurde in den ersten 14 Tagen auf 26°C - 28°C eingestellt. Zusätzlich wurden Infrarot-Strahler eingesetzt, um die Temperatur des Stalls auf ca. 34°C zu bringen. Vom 14. Tag bis 28. Tag wurde die Temperatur schrittweise auf 24°C reduziert. Vom 29. Tag bis zum Ende der Versuche betrug die Raumtemperatur ca. 18°C - 22°C.

3.2.2.2 Infektion

Jeder Pute wurde mittels Kropfkanüle 1ml Dwyers Medium mit *H.meleagridis* intrakloakal verabreicht.

3.2.2.3 Blutnahme

Die Blutproben wurden vor und nach der Infektion aus der Flügelvene entnommen. Das Blut wurde in Heparinröhrchen aufgefangen. Die Blutproben wurden für 10min bei 8000xg zentrifugiert, um das Plasma zu gewinnen.

3.2.2.4 Bestimmung der Blutwerte

Die Plasmaproben wurden im Vet.Med.Labor in Berlin untersucht und Albumin, Gesamteiweiß, Cholinesterase, Gallensäuren, LDH und GOT bestimmt.

3.2.2.5 Bestimmung der Medikamentendosierung Gabbrovet 70®

Die Dosierung von Gabbrovet 70 wurde nach folgender Formel berechnet.

Paromomycin (g/Käfig) = Gewicht (kg/Käfig) x Dosierung (mg/kg) / 70

Paromomycin (g/Liter) = Paromomycin (g/Käfig) / Wasseraufnahme (vorheriger Tag L/Käfig).

3.2.2.6 Bestimmung der Futterverwertung (FCR)

Die FCR wurde für jeden Käfig aus der Gewichtszunahme der Tiere und dem Futterverbrauch berechnet.

3.2.2.7 Bestimmung der europäischen Produktionseffizienzfaktor (EPEF)

Die EPEF wurde nach folgender Formel berechnet.

EPEF= Lebensfähigkeit (%) x Körpergewicht (kg) x 100 / Alter (Tag) x FCR

3.2.2.8 Läsionsgrad in Leber und Blinddärmen

3.2.2.8.1 Makroskopischer Läsionsgrad

Makroskopische Läsionen in Blinddärmen und Leber wurden auf einer Skala von 0 – 4 nach McDougald und Hu (2001) beurteilt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Makroskopischer Läsionsgrad in Blinddärmen und Leber (McDougald und Hu, 2001)

Grad	Läsion
0	keine Läsionen
1	minimale oder kaum nachweisbare Läsionen.
2	vereinzelte, aber leicht nachweisbare Läsionen.
3	geringgradige Läsionen, die fast das gesamte Organ einbeziehen.
4	schwere Läsionen, die das gesamte Organ einbeziehen.

3.2.2.8.2 Histopathologischer Läsionsgrad

Histopathologische Läsionen in Blinddärmen und Leber wurden auf einer Skale von 0 – 3 beurteilt. Zur Beurteilung der Leberläsionen wurden die Infiltration mit Entzündungszellen sowie Zellnekrosen herangezogen (Tabelle 6). Läsionen im Blinddarm wurden anhand der Infiltration mit Entzündungszellen in Lamina propria und Submukosa, der Ablösung von Epithelzellen, der Bildung von Granulationsgewebe und dem Vorliegen von Abszessen beurteilt (Tabelle 7)

Tabelle 6: Bestimmung des mikroskopischen Läsionsgrads in der Leber

Läsionsgrad	**Art der histopathologischen Läsionen in der Leber**	
	Infiltration mit Entzündungszellen	Zellnekrosen
0	Unverändert	Unverändert
1	Geringgradig	Geringgradig
2	Mittelgradig	Mittelgradig
3	Hochgradig	Hochgradig

Tabelle 7: Bestimmung des mikroskopischen Läsionsgrads in Blinddärmen

Läsionsgrad	Art der histopathologischen Läsionen in Blinddärmen			
	Infiltration mit Entzündungszellen in Lamina propria und Submukosa	Ablösung von Epithelzellen	Granulationsgewebe	Abszesse
0	Unverändert	Unverändert	Unverändert	Unverändert
1	Geringgradig	Ablösung von Epithelzellen	Wenig Granulationsgewebe	Wenige Abszesse
2	Mittelgradig	Ablösung von Epithelzellen mit Ulzerationen	Mittelgradige Ausbildung von Granulationsgewebe	Mittelgradige Anzahl von Abszessen
3	Hochgradig	Extensive Ablösung von Epithelzellen mit Ulzerationen	Extensives Granulationsgewebe	Extensive Abszesse

Gewebeproben wurden in 4%-igem, Phosphat-gepuffertem Formalin fixiert. Nach 24 Stunden wurden die Proben in Paraffin eingebettet und Schnitte von 4 µm Stärke mittels Hämatoxylin und Eosin angefärbt. Zur besseren Visualisierung der Histomonaden wurden zusätzliche Schnitte mittels Periodic acid Schiff (PAS) angefärbt.

3.2.3 Molekularbiologische Untersuchungen

3.2.3.1 DNA-Extraktion

3.2.3.1.1 Extraktion von DNA aus Kulturmaterial

Die DNA-Präparation erfolgte mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kit . Zu 200µl Histomonden-Kultur wurden 20µl Proteinase K und 200µl Lysispuffer AL gegeben. Nach gründlichem Mischen wurde der Ansatz im Wasserbad zunächst bei 56°C eine Stunde unter leichtem Schütteln und anschließend 10min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurden 200µl Ethanol zu dem Ansatz gegeben und das Gemisch auf die mitgelieferte Säule mit Silikatmembran überführt. Nach Zentrifugation (1min 8000 rpm) wurde das Filtrat verworfen, 500µl Waschpuffer AW1 auf die Membran gegeben und wieder unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Danach wurde die Membran ein zweites Mal mit 500µl Waschpuffer AW2 und einer hochtourigen Zentrifugation (3min 14000 rpm) gewaschen. Die DNA wurde anschließend mit 100µl des auf 70°C vorgewärmten Puffers AE und einer weiteren Zentrifugation (1min, 8000xg) aus der Membran eluiert. Die Konzentration der DNA wurde im BioPhotometer bei einer Lichtwellenlänge von 260nm gegen dH_2O als Leerwert gemessen.

3.2.3.1.2 Extraktion von DNA aus Gewebeproben

Ca. 25mg Gewebe wurden mit einer sterilen Schere grob zerkleinert. Dazu wurden 20µl Proteinase K und 180µl Lysispuffer ATL gegeben und der Ansatz bei 56°C im Schüttelbad über Nacht inkubiert. Nach Zugabe von 200µl Lysispuffer AL und Inkubation für 10min bei 70°C im Wasserbad erfolgte die weitere Verarbeitung wie beim Kulturmaterial.

3.2.3.2 Durchführung der PCR

3.2.3.2.1 Ready-To- Go Beads PCR zum Nachweis von T. gallinarum und Blastocystis sp.

Für die Durchführung der PCR wurden Ready-To- Go Beads verwendet. In die PCR Gefäße des Kits wurden 25pmol je Primer und bis zu 1µg der einzusetzenden DNA pipettiert und mit nukleasefreiem Wasser auf das Gesamtvolumen von 25µl aufgefüllt. Die Sequenzen der Primeren werden in der Tabelle 8 aufgeführt. Das verwendete Temperaturprofil gibt Tabelle 9 wieder.

Tabelle 8: Übersicht über die verwandten Primer zum Nachweis von *Tetratrichomonas gallinarum* und *Blastocystis sp.* nach Grabensteiner und Hess (2006).

Primer		Sequenz	Amplifikatgröße
T. gallinarum	Tgf	5´-gca att gtt tct cca gaa gtg -3´	527 bp
	Tgr	5´-gat ggc tct ctt tga gct tg-3´	
Blastocystis sp	Blf	5´-taa ccg tag taa ttc tag ggc-3´	457 bp
	Blr	5´-aac gtt aat ata cgc tat tgg-3´	

Tabelle 9: Temperaturprofil des verwendeten PCR-Programms.

Temperaturprofil					
Initiale Denaturierung	Zyklen	Denaturierung	Anlagerung	Synthese	Finale Synthese
5 min 94°C	40	30sec 94°C	30sec 60°C	1min 72°C	10min 72°C

3.2.3.2.2 Gelelektrophorese

Zur Herstellung eines 1,2 %igen Agarosegels wurden 1,2 % Agarose in 100 ml TBE-Puffer gegeben. Das Gemisch wurde in der Mikrowelle bei 700w 3 Minuten erhitzt, bis die Lösung Agarose vollständig gelöst war. Der Kolben wurde für kurze Zeit abgekühlt. Danach wurde die Gellösung mit 2µl Ethidiumbromid (EtBr) versetzt und zu einem horizontalen Gel mit 10-20 Slots gegossen. Die Proben (5µl) wurden mit Stopmix (1µl) versetzt und in die Slots pipettiert. Ein 100bp- Marker (8µl) wurde als Standard verwendet. Anschließend wurde die Elektrophorese bei 80 Volt für 50min durchgeführt.

3.2.3.2.3 Real time PCR zum Nachweis von H. meleagridis

Zu 10µl Syber Green PCR Mastermix wurden 25pmol/µl der Primer qHr und qHf (Tabelle 10), 400-500 ng DNA der Proben und nukleasefreies Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20µl gegeben. Die Durchführung der real time PCR erfolgte im iCycler iQ nach dem in Tabelle 11 wiedergegebenen Temperaturprofil.

Um die Spezifität der real-time PCR sicherzustellen, wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dafür wurde die Temperatur von 60°C in Schritten von 0.5°C auf 95°C erhöht und die Temperatur gemessen.

Tabelle 10: Übersicht über die verwandte Primer von *H. meleagridis* mittels Real-time PCR nach Hafez et al., (2005).

Primer		Sequenz
H. meleagridis	qHr	5'-tct cta agg tcc tac ttc taa aat -3'
	qHf	5'-tgg aat tct atc gat caa ggg -3'

Tabelle 11: Temperaturprofil des verwendeten qPCR-Programms.

PCR	Temperaturprofil					
Für	Initiale Denaturierung	Zyklen	Denaturierung	Anlagerung	Synthese*	Finale Synthese
qH	15 min 95C	40	30sec 95°C	30sec 57°C	30sec 72°C	5min 72°C

* Fluoreszenzmessung

3.2.4 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen wurden mit der Software SPSS für Windows 14.0 durchgeführt. Für alle Tests wurde, soweit nichts anderes im Text erwähnt ist, der Schwellenwert 5% gewählt.

4 Versuchsdurchführung und Ergebnisse

4.1 Versuche zur Pathogenese

4.1.1 Entwicklung der Läsionen und Nachweisbarkeit des Parasiten in verschiedenen Organen nach experimentaler Infektion von Puten mit *H. meleagridis*

4.1.1.1 Versuchsdesign

10 Puteneintagsküken (BUT-Big 6) wurden in Käfige eingestallt. Im Alter von 42 Tagen wurden die Puten mit *H. meleagridis-Stamm* (Pute/Deutschland/GB551/04) intrakloakal infiziert. Jede Pute erhielt intrakloakal 1ml Dwyers Medium mit 200,000 *H. meleagridis*. Im Zeitraum von 1-10 Tagen nach der Infektion wurde jeden Tag eine Pute euthanasiert und auf Veränderungen in Blinddarm, Leber, Lunge, Herz, Bursa, Jejunum, Niere, Milz, Gehirn und Duodenum untersucht.

Von allen Tieren wurden Proben der genannten Organe entnommen und mittels Real-time PCR und histopathologisch auf Histomonaden untersucht. Der Läsionsgrad wurde in Lebern und in Blinddärmen bestimmt.

4.1.1.2 Befunde

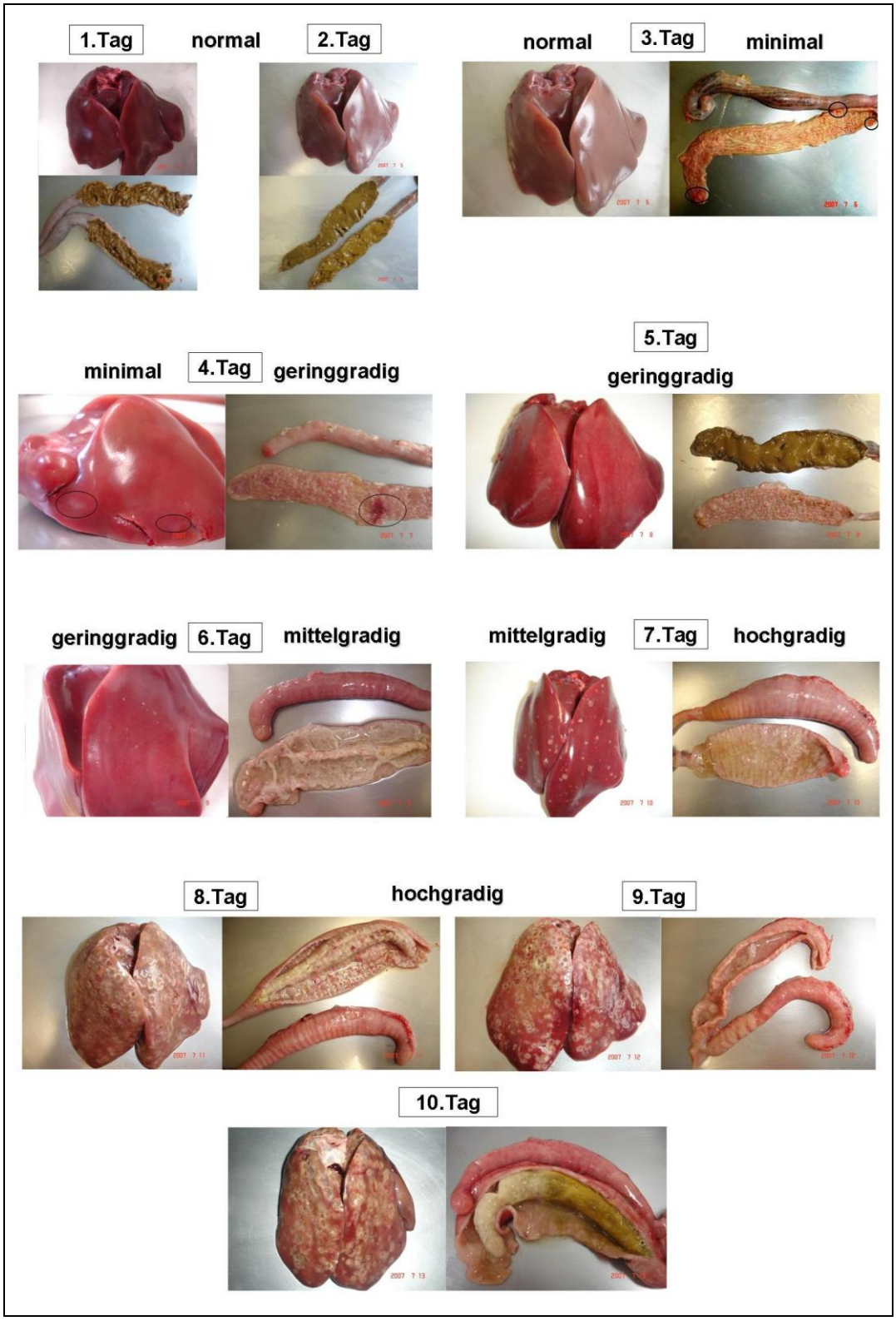
4.1.1.2.1 Entwicklung der makroskopischen Läsionen

Für Histomonaden typische Läsionen traten zuerst in den Blinddärmen am 3.Tag p.i und in der Leber am 4.Tag p.i. auf. Der Läsionsgrad zwischen dem 1. und 10.Tag p.i in Blinddärmen und in Lebern ist in Tabelle 12 und Abbildung 1 dargestellt. In allen anderen Organen konnten keine makroskopischen Veränderungen festgestellt werden.

Tabelle 12: Entwicklung der makroskopischen Läsionen in Blinddärmen und Leber zwischen dem 1. und 10. Tag p.i.

<table>
<tr><th>Tag.p.i.</th><th>Läsionsgrad in den Blinddärmen</th><th>Läsionsgrad in der Leber</th></tr>
<tr><td>1</td><td rowspan="2">0 Grad</td><td rowspan="3">0 Grad</td></tr>
<tr><td>2</td></tr>
<tr><td>3</td><td>1 Grad</td></tr>
<tr><td>4</td><td rowspan="2">2 Grad</td><td>1 Grad</td></tr>
<tr><td>5</td><td rowspan="2">2 Grad</td></tr>
<tr><td>6</td><td>3 Grad</td></tr>
<tr><td>7</td><td rowspan="3">4 Grad</td><td>3 Grad</td></tr>
<tr><td>8</td><td rowspan="3">4 Grad</td></tr>
<tr><td>9</td></tr>
<tr><td>10</td></tr>
</table>

Abb.1: Entwicklung der makroskopischen Läsionen in Blinddärmen und Leber zwischen dem 1. und 10. Tag p.i.



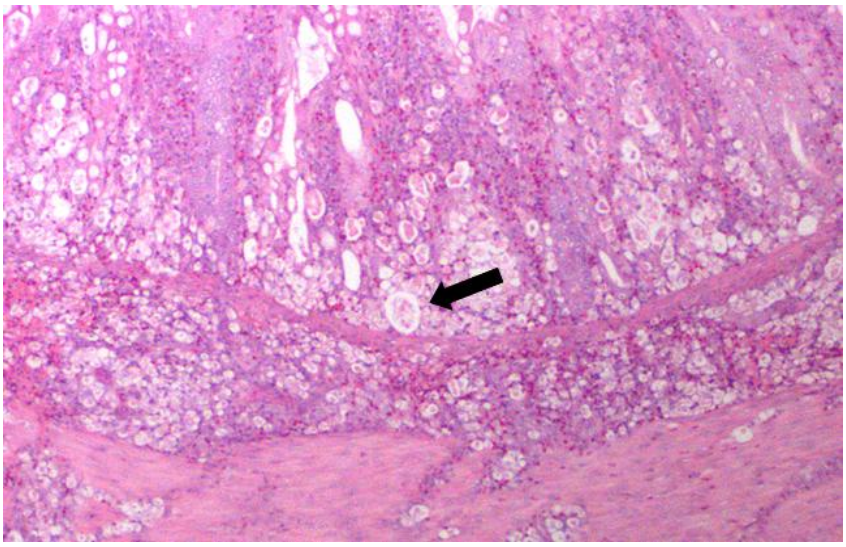
4.1.1.2.2 Histopathologische Untersuchung

Die histopathologischen Veränderungen zwischen dem 1. und 10.Tag p.i in Blinddärmen und Leber ist in Tabelle 13 dargestellt. Der Nachweis von *H. meleagridis* erfolgte erstmalig am 5. Tag p.i. in den Blinddärmen (Abb.2) und am 6. Tag p.i. in der Leber (Abb.3). In den anderen Organen konnten durch die histopathologische Untersuchung keine Veränderungen bzw. keine *H. meleagridis* festgestellt werden.

Tabelle 13: Entwicklung der mikroskopischen Läsionen in Blinddärmen und Leber zwischen dem 1. und 10. Tag p.i.

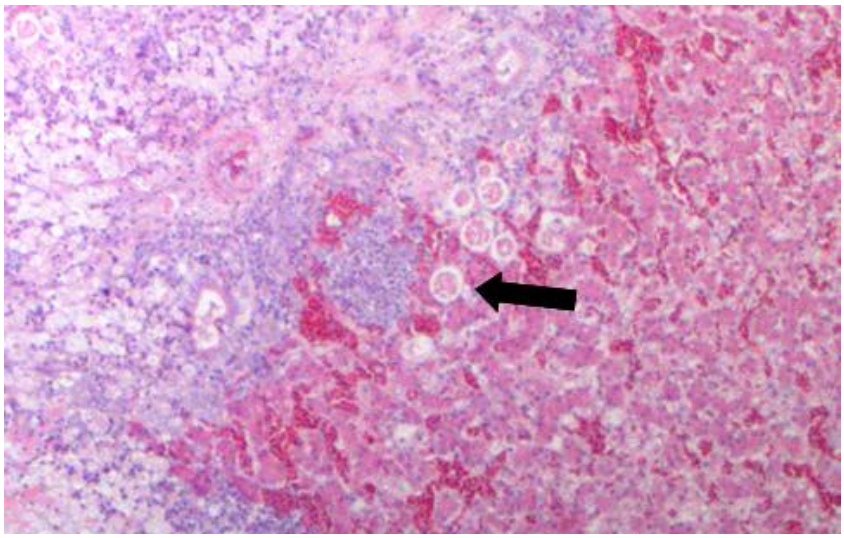
<table>
<tr><th rowspan="2">Tag.p.i</th><th colspan="2">Läsionsgrad in</th></tr>
<tr><th>Blinddärmen</th><th>Leber</th></tr>
<tr><td>1</td><td rowspan="2">0</td><td rowspan="3">0</td></tr>
<tr><td>2</td></tr>
<tr><td>3</td><td rowspan="2">1</td></tr>
<tr><td>4</td><td rowspan="2">1</td></tr>
<tr><td>5</td><td rowspan="2">2</td></tr>
<tr><td>6</td><td rowspan="2">2</td></tr>
<tr><td>7</td><td rowspan="3">3</td></tr>
<tr><td>8</td><td rowspan="3">3</td></tr>
<tr><td>9</td></tr>
<tr><td>10</td></tr>
</table>

Abb.2: histopathologische Veränderungen und Nachweis von *H. meleagridis* im Blinddarm am 5. Tag p.i.



200µ X PAS X 10

Abb.3: histopathologische Veränderungen und Nachweis von *H. meleagridis* in der Leber am 6. Tag p.i.



200µ X PAS X 10

4.1.1.2.3 Untersuchung mittels Real-time PCR

Der Nachweis von Histomonaden- DNA mittels Real-time PCR erfolgte erstmalig am 1. Tag p.i. im Blinddarm, 3. Tage p.i. in der Leber, 6. Tage p.i. in Lungen, Herz, Bursa und Jejunum und 8. Tage p.i. in Nieren, Milz und Gehirn. Während des gesamten Zeitraumes konnte Histomonaden DNA nicht im Duodenum nachgewiesen werden (Tabelle 14).

Tabelle 14: Nachweis von Histomonaden DNA in verschiedenen Organen mittels Real-time PCR zwischen dem 1. und 10. Tag p.i.

Tag (p.i.)	**Organ**									
	Blinddarm	Leber	Lunge	Herz	Bursa	Jejunum	Niere	Milz	Gehirn	Duodenum
1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
7	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

4.1.2 Pathogenität bei verschiedenen Putenlinien

4.1.2.1 Versuchsdesign

19 Puteneintagsküken der Linien Wild Canadian Turkeys (WCT), 20 Kelly Bronze Turkeys (KBT) und 18 British United Turkeys (BUT-Big6) wurden in Käfigen gehalten. Im Alter von 28 Tagen wurden die Puten mit *H. meleagridis*-Stamm Pute/Deutschland/GB551/04 intrakloakal infiziert. Jede Pute erhielt 1ml Dwyers Medium mit 300,000 *H. meleagridis* intrakloakal. Alle Puten wurden für 4 Wochen nach der Infektion beobachtet und die Mortalität täglich protokolliert. Nach der Beobachtungszeit wurden die überlebenden Tiere euthanasiert. An allen verendeten und am Ende des Versuchs euthanasierten Puten wurde eine Sektion durchgeführt und der Grad der Veränderungen in Blinddärmen und Leber bestimmt (3.2.2.8.1). Von allen Tieren wurden Proben von Blinddärmen und Leber entnommen und mittels Real-time PCR auf Histomonaden-DNA untersucht (3.2.3.2.3).

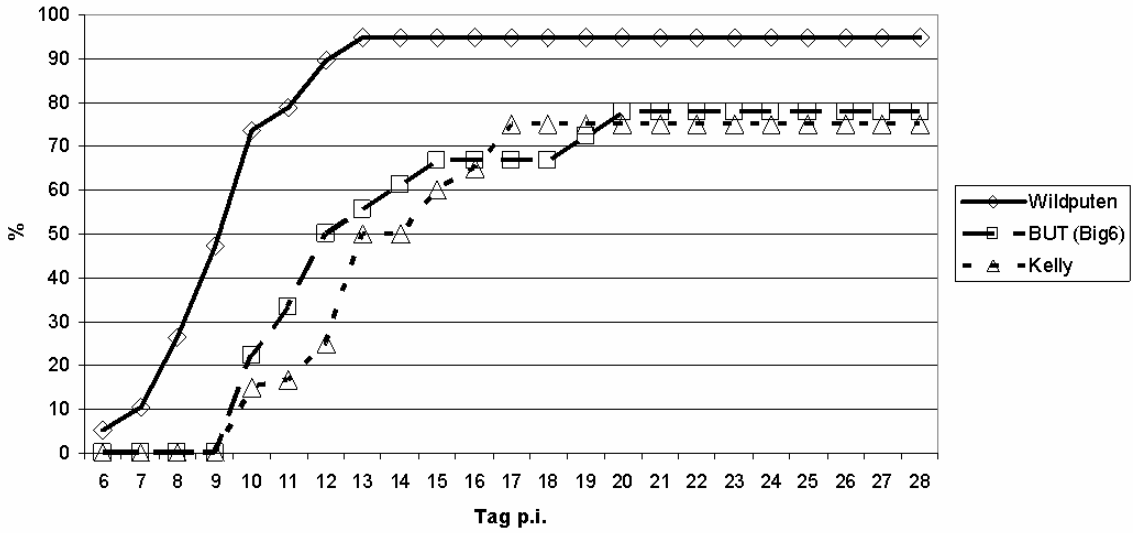
4.1.2.2 Ergebnisse

4.1.2.2.1 Mortalität

Die Mortalität betrug 94,73 % bei WCT, 77,77 % bei BUT-Big 6 und 75 % bei KBT (Abb.4). Die Mortalität fing am 6.Tag p.i bei WCT an und dauerte bis zum 20.Tag p.i bei BUT-Big6.

Der Mortalitätsverlauf wird in Tabelle 15 dargestellt. Mittels Chi-Quadrat-Test wurde die Mortalität der Wildputen als statistisch signifikant höher als bei den anderen getesteten Linien festgestellt.

Abb.4: Mortalitätsverlauf nach experimenteller Infektion von WCT, KBT und BUT-Big6 mit *H. meleagridis*.



[WCT vs. BUT-Big6 (P≤0.001); WCT vs. KBT (P≤0.001) und KBT vs. BUT (P≤0.837)].

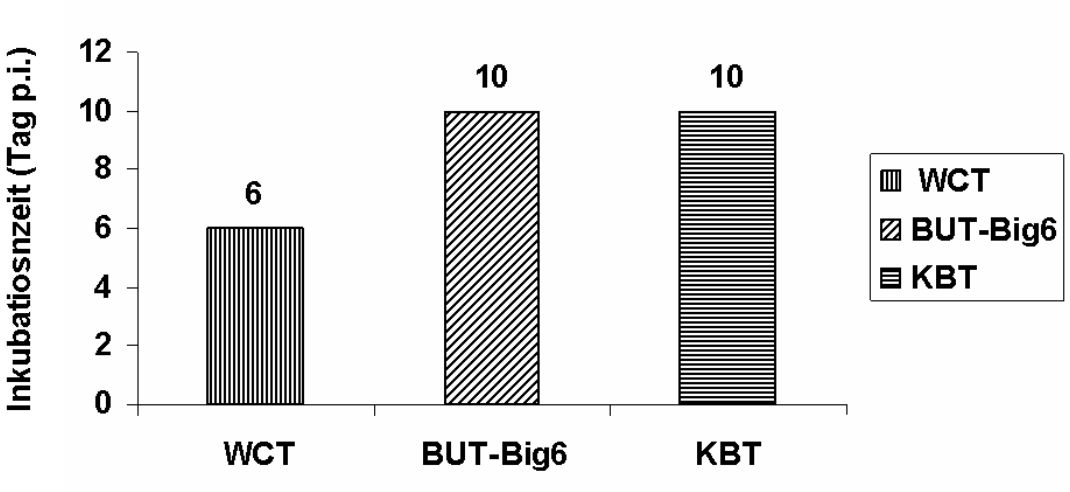
Tabelle 15: Mortalitätsverlauf nach experimenteller Infektion von WCT, KBT und BUT-Big6 mit *H. meleagridis*.

Tag.p.i.	**Anzahl verendeter Tiere pro Gruppe /Tag**		
	WCT	BUT-Big 6	KBT
6	1	0	0
7	1	0	0
8	3	0	0
9	4	0	0
10	5	4	3
11	1	2	0
12	2	3	2
13	1	0	5
14	0	1	0
15	0	1	2
16	0	1	1
17	0	0	2
18	0	0	0
19	0	1	0
20	0	1	0
Anzahl der Tiere	19	18	20
Anzahl verendeter Tiere	18	14	15
Mortalität %	94,73	77,77	75

4.1.2.2.2 Inkubationszeit

Die Inkubationszeit betrug bei den WCT ungefähr 6 Tage, jedoch bei KBT und BUT-Big 6 ungefähr 10 Tage (Abb. 5).

Abb.5: Inkubationszeit nach experimenteller Infektion von WCT, KBT und BUT-Big6 mit *H. meleagridis*.



4.1.2.2.3 Läsionsgrad in Lebern und in Blinddärmen

Alle verendeten Puten zeigten die nach einer Infektion mit Histomonaden typischen Läsionen in Blinddärmen und in Lebern (Abb.6). Der Läsionsgrad war in Blinddärmen und in Lebern bei allen Gruppen fast identisch (Abb.7). Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

Abb.6: Für Histomonose typische Läsionen in Blinddärmen und in Lebern.

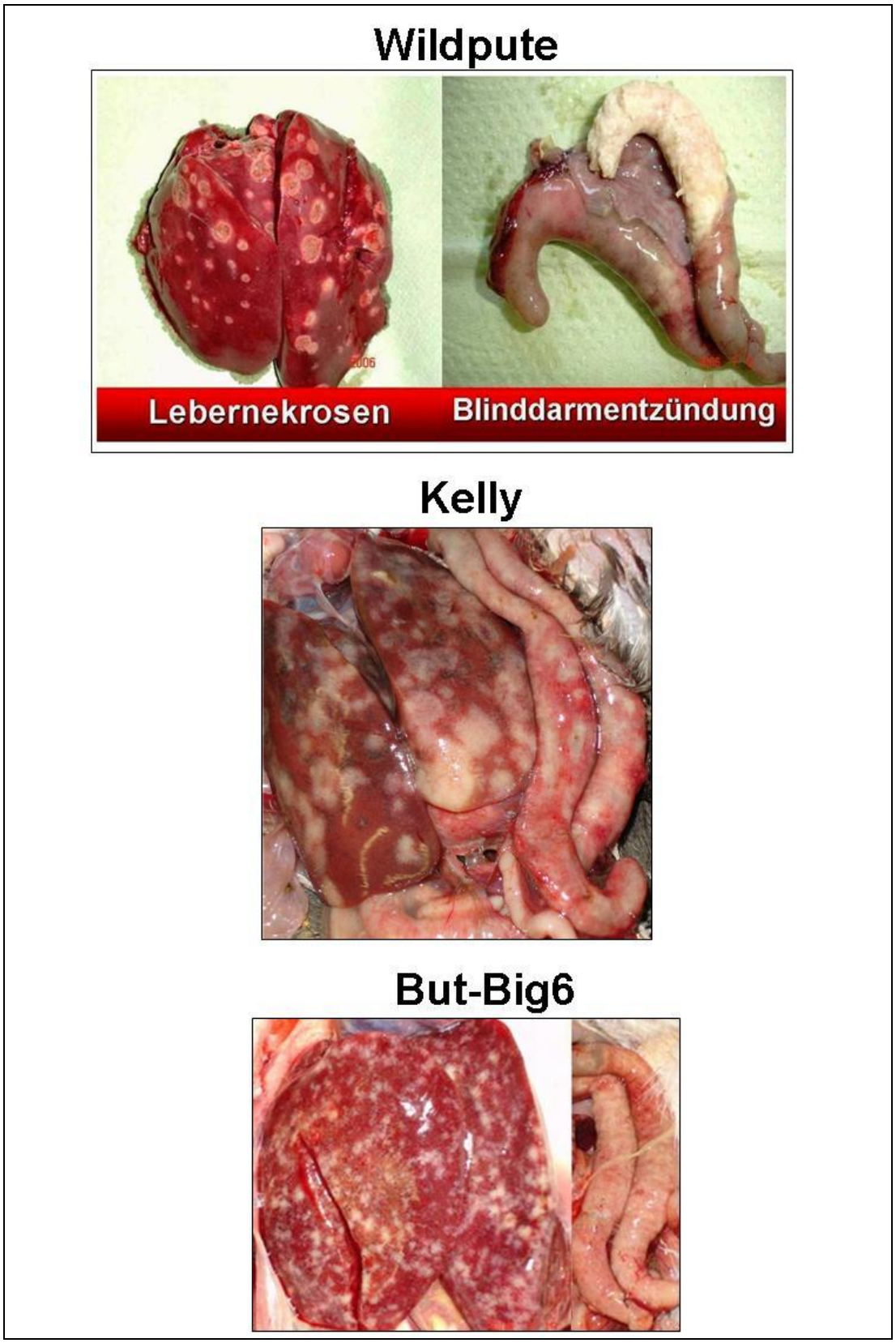


Abb.7: Arithmetische Mittel der Läsionsgrade in Blinddärmen und in Lebern nach experimenteller Infektion von WCT, KBT und BUT-Big6 mit *H. meleagridis*.

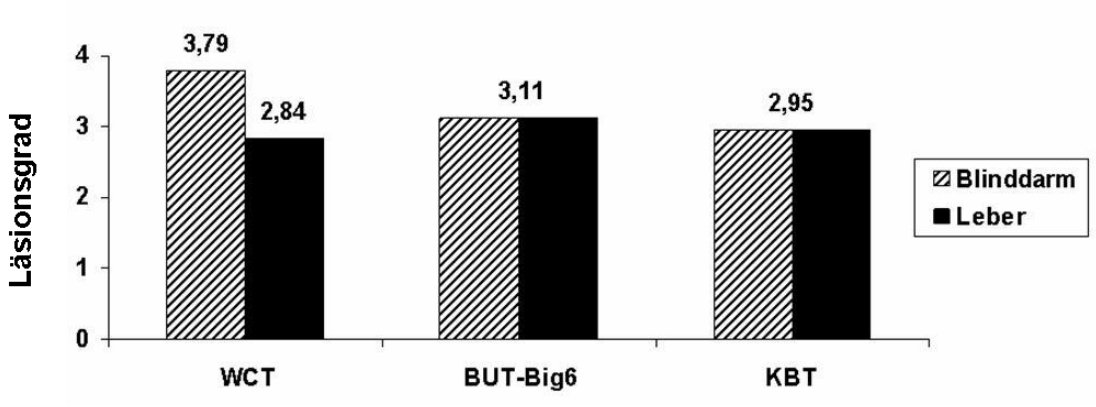


Tabelle 16: Übersicht über Befunde nach experimenteller Infektion von WCT, KBT und BUT-Big6 mit *H. meleagridis*.

Parameter		Gruppen		
		WCT	**BUT-Big6**	**KBT**
Anzahl der Tiere		19	18	20
Inkubationszeit (Tag)		< 6	< 10	< 10
Mortalität (%)		94.73	77.77	75
Läsionsgrad	Leber	2.84	3.11	2.95
	Blinddarm	3.79	3.11	2.95

4.1.2.2.4 Untersuchung mittels Real-time PCR

Die DNA von *H. meleagridis* konnte in Blinddärmen und in Lebern aller verendeten Tiere nachgewiesen werden. Bei den überlebenden, euthanisierten Tieren gelang dieser Nachweis nicht (Tabelle 17).

Tabelle17: Ergebnisse der Untersuchung von Blinddärmen und iLebern mittels Real-time PCR.

Gruppe	Blinddarmprobe		Leberprobe	
	positiv	negativ	positiv	negativ
WCT	18	1*	18	1*
BUT-Big6	14	4*	14	4*
KBT	15	5*	15	5*

* : überlebende Tiere

4.1.3 Pathogenität bei Lege- und Masthühnern

4.1.3.1 Versuchsdesign

SPF-Eintagsküken einer Mastlinie sowie SPF-Eintagsküken einer Legelinie wurden in Käfigen gehalten. Im Alter von 5 Wochen wurden die Tiere in 4 Gruppen aufgeteilt (Tabelle 18). Die Tiere, jeweils eine Gruppe in Mast bzw. Legelinie, wurden intrakloakal mit 200.000 *H. meleagridis*-Stamm Pute/Deutschland/GB542/04 infiziert. Die restlichen zwei Gruppen wurden als nicht infizierte Kontrollgruppen gehalten. Alle Hühner wurden für 3 Wochen nach der Infektion beobachtet. Wöchentlich wurden die Hühner einzeln gewogen und der Futterverbrauch pro Käfig bestimmt, gleichzeitig wurden 3 Tiere pro Gruppe euthanasiert. An allen euthanasierten Hühnern wurde eine Sektion durchgeführt und der makroskopische Läsionsgrad in der Leber und Blinddärmen bestimmt. Außerdem wurde von allen Tieren Proben von Leber, Blinddarm, Milz, Niere und Lunge entnommen und mittels Real-time PCR auf Histomonaden-DNA und histopathologisch untersucht.

Tabelle 18: Anzahl der Tiere in den Gruppen beim Vergleich der Anfälligkeit von Mast- und Legehühnern für eine Infektion mit *H. meleagridis*.

Nr.	Gruppe	Anzahl der Tiere
1	Nicht infizierte Masthühnchen (NIM)	11
2	Infizierte Masthühnchen (IM)	12
3	Nicht infizierte Legehühner (NIL)	09
4	Infizierte Legehühner (IL)	10

4.1.3.2 Ergebnisse

4.1.3.2.1 Mortalität und Läsionen

Die Mortalität betrug bei allen Gruppen 0%. Tabelle 18 zeigt die Bewertung der Läsionen in Blinddärmen und Lebern. In Blinddärmen waren die Läsionen 7 und 14 Tage p.i. vergleichbar. Im Gegensatz dazu war die Ausprägung der Läsionen in Lebern14 Tage p.i. am stärksten ausgeprägt. Die mittleren Läsionsgrade an jedem Tag wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse und Bonferronitest auf signifikante Unterschiede getestet. ein signifikanter Unterschied durch die Läsionen in den Blinddärmen wurde am 7. und 14. Tag p.i. zwischen den infizierten Tieren und nicht infizierten Tiere festgestellt. Bezüglich der Linien gab es keinen signifikanten Unterschied durch die Mortalität oder den Läsionsgrad in Blinddärmen und Leber (Tabelle 19 und Abb.8, 9). Bei den anderen Organen konnten in allen Gruppen keine Veränderungen festgestellt werden.

Tabelle 19: Mittlerer makroskopischer Läsionsgrad in Blinddärmen und Leber bei Mast- und Legetieren.

Gruppe		Läsionsgrad in					
		Blinddarm			Leber		
		Tag p.i.					
		7	14	21	7	14	21
NIM	Mw.	0,00*	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Stab.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	n	3	3	5	3	3	5
IM	Mw.	2,17*	2,33	0,33	1,17	0,33	0,50
	Stab.	0,76	1,15	0,52	0,29	0,61	0,50
	n	3	3	6	3	3	6
NIL	Mw.	0,00**	0,00	0,00	0,00**	0,00	0,00
	Stab.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	n	3	3	3	3	3	3
IL	Mw.	3,33**	3,00	0,25	1,50**	0,38	0,50
	Stab.	0,58	1,00	0,50	0,50	0,48	0,50
	n	3	3	4	3	3	4

Mw.: Mittelwert. Stab.: Standardabweichung. n.: Anzahl der Tiere. *Signifikanter Unterschied zwischen infizierten Masttieren (IM) und nicht infizierten Masttieren (NIM) ($P \leq 0,05$). **Signifikanter Unterschied zwischen infizierten Legetieren (IL) und nicht infizierten Legetieren (NIL) ($P \leq 0,05$).

Abb.8: Mittlerer makroskopischer Läsionsgrad in Blinddärmen bei Mast- und Legetieren.

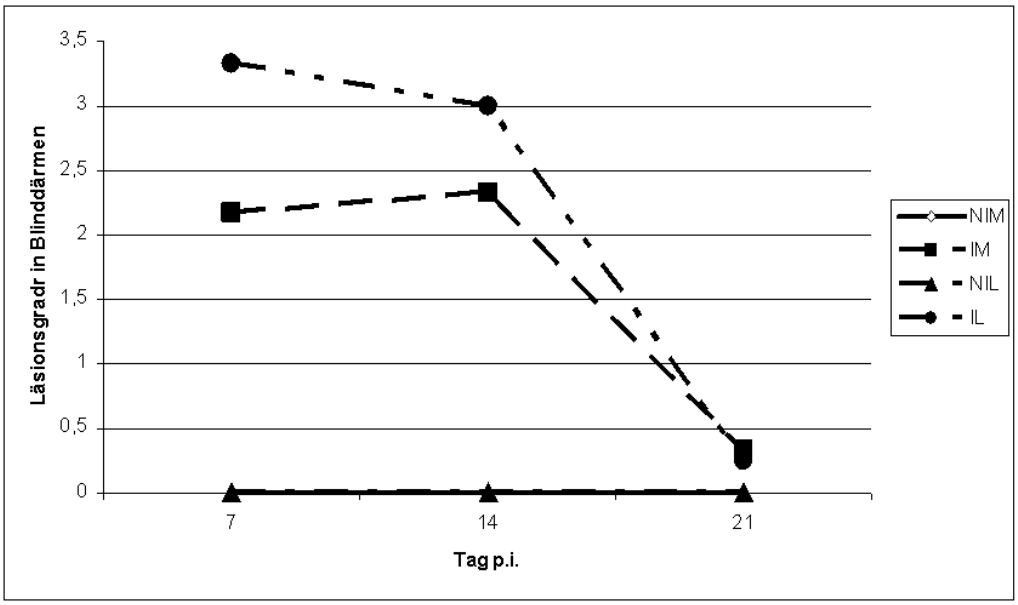
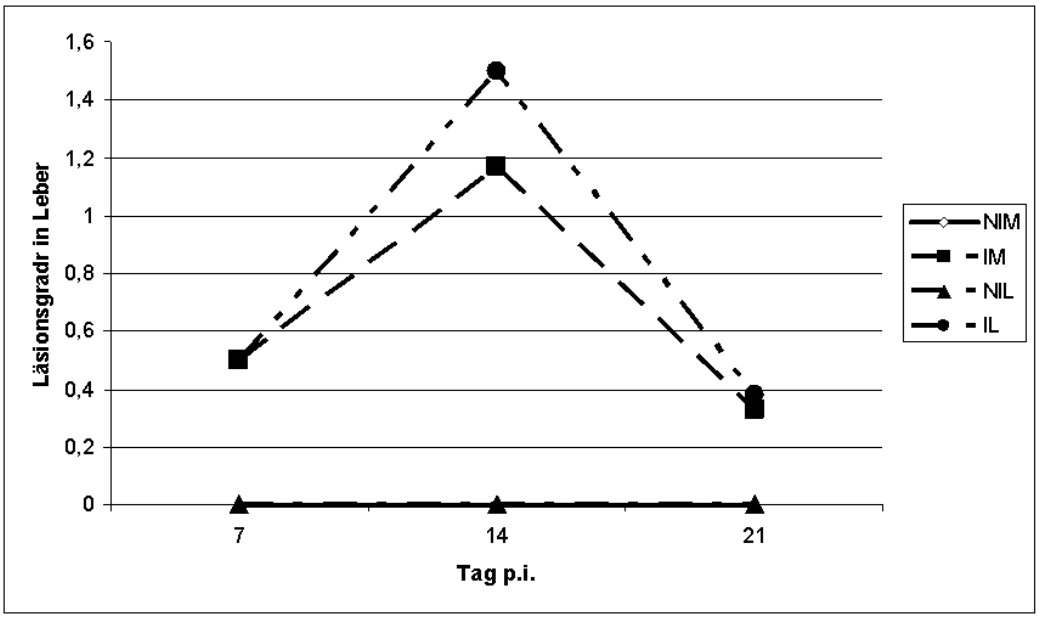


Abb.9: Mittlerer makroskopischer Läsionsgrad in der Leber bei Mast- und Legetieren.



4.1.3.2.2 Histologische Untersuchung

Blinddarm, Leber, Milz, Niere und Lunge wurden histopathologisch und mittels Real-time PCR untersucht. Obwohl histopathologische Veränderungen nur in Blinddärmen und Leber festgestellt wurden, konnte die Parasit- DNA in meisten untersuchten Organen detektiert werden.

4.1.3.2.2.1 Histopathologische Veränderungen in Blinddärmen

Die histopathologischen Veränderungen in den Blinddärmen bestanden aus Infiltrationen mit Entzündungszellen in der Lamina propria und der Submukosa, Ablösung der Epithelzellen, Bildung von Granulationsgeweben und Abszessen (Tabelle 20 und Abb.10, 11). Die Stärke der entzündlichen Infiltrationen sowie die Ablösung von Epithelzellen war bei den infizierten und den nicht infizierten Tieren am 7. und 14. Tag p.i. mittels einfaktorieller Varianzanalyse und Bonferronitest signifikant unterschiedlich. Bei den infizierten Legetieren waren am 7. Tag p.i. mehr Abszesse nachweisbar als bei den nicht infizierten Legetieren. Im Gegensatz wurde bei der Bildung von Granulationsgewebe kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt.

Tabelle 20: Mittlerer histopathologischer Läsionsgrad in Blinddärmen bei Mast- und Legetieren.

Gruppe		Histopathologische Läsionen in Blinddärmen											
		Infiltration von Entzündungszellen in Lamina propria und Submukosa			Ablösung von Epithelzellen			Bildung von Granulationsgewebe			Abszesse		
		Tag p.i.											
		7	14	21	7	14	21	7	14	21	7	14	21
NIM	Mw.	0 [a]	0 [a]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Stab.												
IM	Mw.	1,67 [ac]	1,33 [a]	1	0,67 [c]	0,33	0,67	0	0	0	0,67	0,33	0,33
	Stab.	0,58	0,58	0	0,58	0,58	0,52	0	0	0	0,58	0,58	0,52
NIL	Mw.	0 [b]	0 [b]	0	0 [b]	0 [b]	0	0	0	0	0 [b]	0 [b]	0
	Stab.												
IL	Mw.	3 [bc]	2,33 [b]	1	2,67 [bc]	1,33 [b]	0,25	1	0,33	0	1 [b]	1 [b]	0
	Stab.	0	0,58	0	0,58	0,58	0,5	0	0,58	0	0	0	0

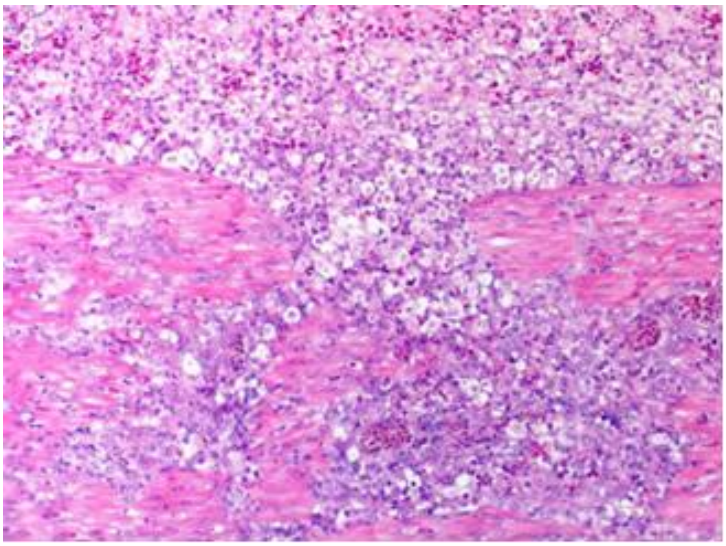
Mw.: Mittelwert. Stab.: Standardabweichung.

[a] Signifikanter Unterschied zwischen infizierten Masttieren (IM) und nicht infizierten Masttieren (NIM) ($P \leq 0,05$).

[b] Signifikanter Unterschied zwischen infizierten Legetieren (IL) und nicht infizierten Legetieren (NIL) ($P \leq 0,05$).

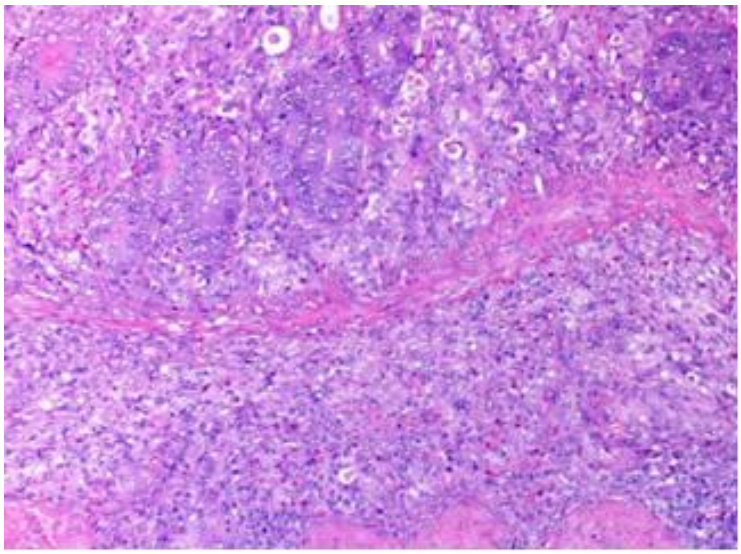
[c] Signifikanter Unterschied zwischen infizierten Masttieren (IM) und infizierten Legetieren (IL) ($P \leq 0,05$).

Abb.10: Hochgradige Infiltration mit Entzündungszellen (Makrophagen und Lymphozyten) in der Lamina propria und der Submukosa, extensive Ablösung der Epithelzellen mit Ulzirationen, Granulationsgewebe, Abszesse im Blinddarm bei Legetieren am 7. Tag p.i.



(50µm x PAS x 10)

Abb.11: Mittelgradige Infiltration mit Entzündungszellen (Makrophagen und Lymphozyten) in der Lamina propria und der Submukosa, Ablösung der Epithelzellen mit Ulzirationen, Abszesse im Blinddarm bei Masttieren am 7. Tag p.i.



(50µm x PAS x 10)

4.1.3.2.2.2 Histopathologische Veränderungen in der Leber

Die histopathologischen Veränderungen in der Leber beschränkten sich auf Infiltrationen von Entzündungszellen und Zellnekrosen (Tabelle 21 und Abb.12, 13). Ein signifikanter Unterschied wurde nur bei der Ausprägung der Nekrosen zwischen den infizierten und den nicht infizierten Masttieren am 14. Tag p.i. mittels einfaktorieller Varianzanalyse und Bonferronitest festgestellt.

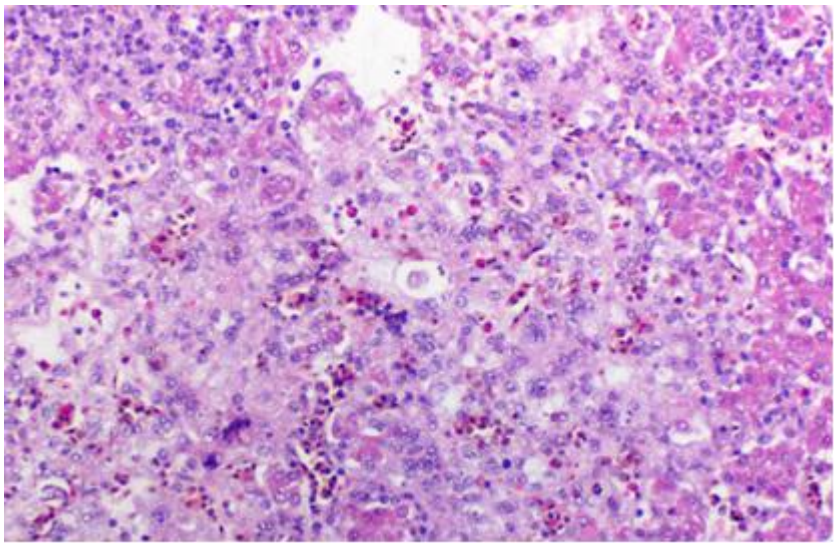
Tabelle 21: Mittlerer histopathologischer Läsionsgrad in der Leber bei Lege- und Masttieren

Gruppe		Histopathologische Läsionen in der Leber					
		Infiltration mit Entzündungszellen			Nekrose		
		Tag p.i.					
		7	14	21	7	14	21
NIM	Mw.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00*	0,00
	Stab.						
IM	Mw.	0,00	1,67	0,17	0,00	2,33*	0,17
	Stab.	0,00	1,53	0,41	0,00	1,15	0,41
NIL	Mw.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Stab.						
IL	Mw.	0,33	1,33	0,50	0,33	2,00	0,25
	Stab.	0,58	1,53	0,58	0,58	1,00	0,50

Mw.: Mittelwert. Stab.: Standardabweichung.

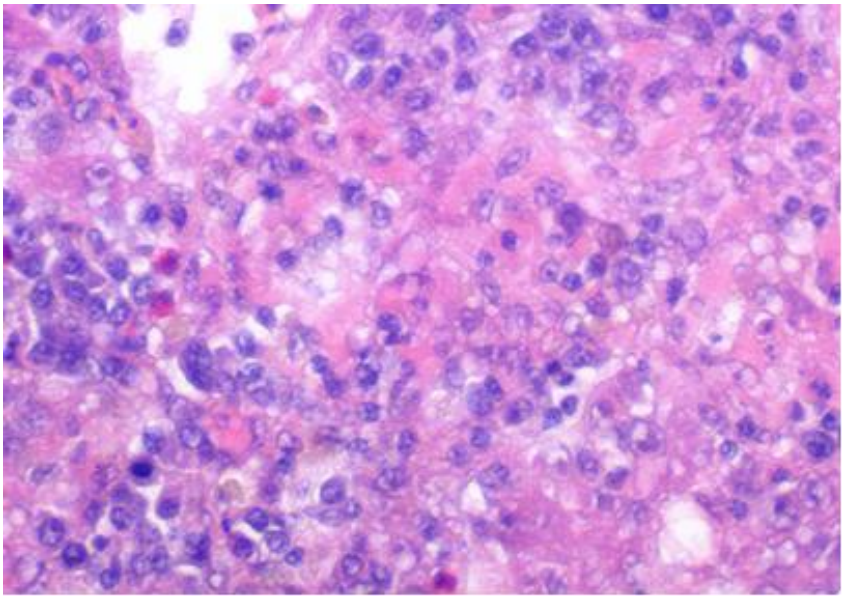
*Signifikanter Unterschied zwischen infizierten (IM) und nicht infizierten Masttieren (NIM) ($P \leq 0,05$).

Abb.12: Geringgradige Infiltration mit Entzündungszellen (Makrophagen und Lymphozyten) und geringgradige Nekrose in der Leber bei Legetieren am 7. Tag p.i.



(50µm x PAS x 10)

Abb.13: Hochgradige Infiltration mit Entzündungszellen (Makrophagen und Lymphozyten) und hochgradige Nekrose in der Leber bei Masttieren am 14. Tag p.i.



(20µm x PAS x 10)

4.1.3.2.3 Untersuchung mittels Real-time PCR

Die DNA von *H. meleagridis* konnte in den Blinddärmen und Lebern aller infizierten Tiere nachgewiesen werden. Ebenso gelang dies bei den meisten Milz- und Lungenproben unabhängig vom Untersuchungstag und nur in wenigen Nieren infizierter Tiere am 14. und 21. Tag p.i. Bei allen nicht infizierten Tieren wurde keine DNA von *H. meleagridis* detektiert. Die Ergebnisse zeigten insbesondere in der Leber eine größere Sensitivität der Real-time PCR, insgesamt erbrachten die beiden Verfahren aber weitgehend übereinstimmende Ergebnisse (Tabelle 22).

Tabelle 22: Nachweis des Parasiten mittels histologischer Untersuchung und Real-time PCR.

Tier Nr.	Gruppe	Tag. p.i.	Gewebeprobe									
			Blinddarm		Leber		Milz		Lunge		Niere	
			Histo	PCR	Histo	PCR	Histo	PCR	Histo	PCR	Histo	PCR
1	IM	7	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
2	IM	7	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
3	IM	7	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
4	IM	14	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
5	IM	14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	IM	14	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
7	IM	21	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
8	IM	21	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
9	IM	21	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
10	IM	21	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
11	IM	21	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
12	IM	21	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-
13	IL	7	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
14	IL	7	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
15	IL	7	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
16	IL	14	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
17	IL	14	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
18	IL	14	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
19	IL	21	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
20	IL	21	+	+	-	+	+	+	fehlt	-	-	-
21	IL	21	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
22	IL	21	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

Histo: Histologische Untersuchung

4.2 Versuche zur Wirksamkeit von Paromomycinsulfat gegen H. meleagridis

4.2.1 Versuche *in vitro*

4.2.1.1 Versuchsdesign

Drei verschiedene Versuche wurden über die Wirksamkeit von Paromomycin gegen *H. meleagridis in vitro* durchgeführt. Im ersten Versuch wurde der Effekt von Paromomycin unter der Anwendung von zwei verschiedenen Stämmen (Pute/Deutschland/GB- 542/04 und 551/04) von *H. meleagridis* verglichen. Im zweiten Versuch wurde der Effekt von Paromomycin nach Inokulation mit 20.000 oder 40.000 Trophozoiten des *H. meleagridis*-Stammes Pute/Deutschland/GB- 542/04 untersucht. Der dritte Versuch verglich den Effekt von Paromomycin bei zwei verschiedenen Passagen des *H. meleagridis*- Stamm Pute/Deutschland/GB- 542/04.

In jedem Versuch wurden 100 µl Histomonas- Kultur mit etwa 20.000 bzw. 40.000 *H. meleagridis* zu 890 µl frischem modifiziertem Dwyers Medium gegeben. Dazu kamen 10µl von in Medium verdünnten Paromomycin. Es wurden Paromomycinkonzentrationen von 10, 20, 40 und 80ppm in der Kultur getestet. Jede Konzentration wurde in sechs Repplikationen untersucht. Die Kulturen wurden unter anaeroben Bedingungen bei 40 °C inkubiert und täglich bis zum 4. Tag p.i. in einer Fuchs- Rosenthal- Zählkammer unter dem Lichtmikroskop gezählt. Für jede Konzentration und Zeitpunkt wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die Mittelwerte wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse und Bonferronitest auf signifikante Unterschiede getestet.

4.2.1.2 Ergebnisse

4.2.1.2.1 Vergleich der Wirkung von Paromomycin auf verschiedenen Stämme

Im ersten Versuch wurde der Effekt von Paromomycin auf zwei verschiedene Stämme (Pute/Deutschland/GB- 542/04 und 551/04) von *H. meleagridis* verglichen. 10, 20, 40 und 80ppm Paromomycin zeigten ab dem 1. Tag p.i. eine hemmende Wirkung auf *H. meleagridis*, wobei die Wirkung mit der Konzentration zunahm. Nur 80ppm waren ab dem 1. Tag p.i. für beide Stämme letal (Tabelle 23).

Um die Hemmung bei den beiden Stämmen zu vergleichen, wurde das Histomonadenwachstum in den Kulturen mit Paromomycin als Prozent der Histomonadenzahl in den entsprechenden Kontrollen ohne Paromomycin ausgedrückt (Tabelle 24). Zwischen den Stämmen gab es einen signifikanten Unterschied bei einer Konzentration von 10ppm am 1., 2. und 3. Tag p.i., bei einer Konzentration von 20ppm am 1., 3. und 4. Tag p.i. und bei einer Konzentration von 40ppm nur am 1. Tag p.i., wobei in allen Fällen 542/04 resistenter war. Bei der höchten Dosierung (80ppm) gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Stämmen.

Tabelle 23: Mittelwert der Histomonadenzahl (Stamm 542/04 und 551/04) pro ml in modifiziertem Dwyers Medium bei verschiedenen Konzentrationen Paromomycin.

Konz. (ppm)		Tag p.i. 1		2		3		4	
		Stamm							
		542/04	**551/04**	**542/04**	**551/04**	**542/04**	**551/04**	**542/04**	**551/04**
0	Mw.	110000,00	108333,33	178333,33	176666,67	319166,67	320833,33	416666,67	420000
	Stab.	10488,09	6831,30	15705,63	12110,6	22453,66	17440,37	18348,48	14142,14
10	Mw.	54166,67*	29583,33*	27916,67*	20277,78*	18333,33*	14583,33*	11250*,00	9375*,00
	Stab.	4915,96	3679,90	2922,61	1948,41	1490,71	1513,83	1581,14	684,65
20	Mw.	18055,56*	13750*,00	10833,33*	7916,67*	14583,33*	6250*,00	5833,33*	3333,33*
	Stab.	1638,65	1581,14	1513,83	1290,99	1707,83	1581,14	1020,62	1020,62
40	Mw.	10833,33*	7291,67*	1875*,00	1875*,00	6041,67*	5000*,00	2916,67*	2291,67*
	Stab.	1513,83	940,97	684,65	684,65	1228,99	1369,31	645,5	940,97
80	Mw.	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*
	Stab.								

Konz.: Konzentration, Mw.: Mittelwert, Stab.: Standardabweichung.

*Signifikanter Unterschied zwischen der Positivkontrolle (0ppm) und den anderen Dosierungen (P≤0,05).

Tabelle 24: Wachstum von *H. meleagridis* (Stamm 542/04 und 551/04) in modifiziertem Dwyers Medium bei verschiedenen Konzentrationen Paromomycin; das Histomonadenwachstum in den Kulturen mit Paromomycin ist als Prozent der Histomonadenzahl in den entsprechenden Kontrollen ohne Paromomycin ausgedrückt.

Konz. (ppm)		Tag p.i. 1		2		3		4	
		Stamm							
		542/04	**551/04**	**542/04**	**551/04**	**542/04**	**551/04**	**542/04**	**551/04**
0	Mw.	100	100	100	100	100	100	100	100
	Stab.	9,53	6,31	8,81	6,86	7,04	5,44	4,4	3,37
10	Mw.	49,24*	27,31*	15,65*	11,48*	5,74*	4,55*	2,7	2,23
	Stab.	4,47	3,4	1,64	1,1	0,47	0,47	0,38	0,16
20	Mw.	16,41*	12,69*	6,07	4,48	4,57*	1,95*	1,4*	0,79*
	Stab.	1,49	1,46	0,85	0,73	0,54	0,49	0,24	0,24
40	Mw.	9,85*	6,73*	1,05	1,06	1,89	1,56	0,7	0,55
	Stab.	1,38	0,87	0,38	0,39	0,39	0,43	0,15	0,22
80	Mw.	0	0	0	0	0	0	0	0
	Stab.								

Konz.: Konzentration, Mw.: Mittelwert, Stab.: Standardabweichung.

*Signifikanter Unterschied zwischen beiden Stämmen (P≤0,05).

4.2.1.2.2 Vergleich der Wirkung von Paromomycin auf verschiedenen Infektionsdosen

In diesem Versuch wurde die Wirksamkeit von Paromomycin nach Inokulation mit 20.000 oder 40.000 Trophozoiten des *H. meleagridis*- Stammes Pute/Deutschland/GB-542/04 untersucht. Alle getesteten Konzentrationen von Paromomycin (10, 20, 40 und 80ppm) zeigten ab dem 1. Tag p.i. eine signifikant hemmende Wirkung auf *H. meleagridis*, wobei die Wirkung mit steigender Paromomcin-Konzentration zunahm. Einen vollständig letalen Effekt zeigten nur 80ppm ab dem 1. Tag p.i. bei einer Infektionsdosis von 20.000 *H. meleagridis*/ml (Tabelle 25).

Um die Hemmung bei den beiden Infektionsdosen zu vergleichen, wurde das Histomonadenwachstum in den Kulturen mit Paromomycin als Prozent der Histomonadenzahl in den entsprechenden Kontrollen ohne Paromomycin ausgedrückt (Tabelle 26). Zwischen den beiden Infektionsdosen gab es einen signifikanten Unterschied bei 10ppm am 1. und 3. Tag p.i., bei 20ppm nur am 1. Tag p.i. und bei 40ppm am 2. und 3. Tag p.i. Bei der höchsten Dosierung (80ppm) gab es ab dem 1. Tag p.i. einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Infektionsdosen (Tabelle 26).

Tabelle 25: Mittelwert der Histomonadenzahl bei Infektionsdosen von 20.000 und 40.000 *H. meleagridis*/ml in modifiziertem Dwyers Medium bei verschiedenen Konzentrationen Paromomycin.

Konz. (ppm)		Tag p.i. 1		2		3		4	
		Infektionsdosis							
		20000	**40000**	**20000**	**40000**	**20000**	**40000**	**20000**	**40000**
0	Mw.	92500,00	177500,00	150833,33	240757,58	286666,67	415000	421666,67	678333,33
	Stab.	5244,04	5244,04	12006,94	106176,47	10801,23	11832,16	14719,60	16329,93
10	Mw.	26666,67*	42083,33*	53333,33*	81666,67*	27083,33*	52500*	20000*,00	31250*,00
	Stab.	2041,24	2457,98	4082,48	6055,30	1881,93	2738,61	1490,71	2622,02
20	Mw.	14791,67*	19722,22*	18611,11*	30833,33*	17500*,00	25833,33*	7083,33*	10208,33*
	Stab.	940,97	1254,62	1948,41	2581,99	912,87	1290,99	1707,83	940,97
40	Mw.	6250*,00	13750*,00	6250*,00	17777,78*	3333,33*	8541,67*	2708,33*	5000*,00
	Stab.	1118,03	1118,03	1118,03	1360,83	1020,62	1228,99	940,97	790,57
80	Mw.	0*	6250*,00	0*	6250*,00	0*	4375*,00	0*	2916,67*
	Stab.	0	1118,03	0	1118,03	0	684,65	0	645,50

Konz.: Konzentration, Mw.: Mittelwert, Stab.: Standardabweichung.

*Signifikanter Unterschied zwischen der Positivkontrolle (0ppm) und den anderen Dosierungen ($P \leq 0,05$).

Tabelle 26: Mittelwert des Wachstums von *H. meleagridis* bei Infektionsdosen von 20.000 und 40.000 H. meleagridis/ml in modifiziertem Dwyers Medium bei verschiedenen Konzentrationen Paromomycin; das Histomonadenwachstum in den Kulturen mit Paromomycin ist als Prozent der Histomonadenzahl in den entsprechenden Kontrollen ohne Paromomycin ausgedrückt.

Konz. (ppm)		Tag p.i. 1		2		3		4	
		Infektionsdosis							
		20000	**40000**	**20000**	**40000**	**20000**	**40000**	**20000**	**40000**
0	Mw.	100	100	100	100	100	100	100	100
	Stab.	5,67	2,95	7,96	44,1	3,77	2,85	3,49	2,41
10	Mw.	28,83*	23,71*	35,36	33,92	9,45*	12,65*	4,74	4,61
	Stab.	2,21	1,38	2,71	2,52	0,66	0,66	0,35	0,39
20	Mw.	15,99*	11,11*	12,34	12,81	6,1	6,22	1,68	1,5
	Stab.	1,02	0,71	1,29	1,07	0,32	0,31	0,41	0,14
40	Mw.	6,76	7,75	4,14*	7,38*	1,16*	2,06*	0,64	0,74
	Stab.	1,21	0,63	0,74	0,57	0,36	0,3	0,22	0,12
80	Mw.	0*	3,52*	0*	2,60*	0*	1,05*	0*	0,43*
	Stab.	0	0,63	0	0,46	0	0,16	0	0,1

Konz.: Konzentration, Mw.: Mittelwert, Stab.: Standardabweichung.

*Signifikanter Unterschied zwischen beiden Infektionsdosen (P≤0,05).

4.2.1.2.3 Vergleich der Wirkung von Paromomycin auf verschiedenen Passagen

In diesem Versuch wurde die Wirksamkeit von Paromomycin auf *H. meleagridis*- Stamm Pute/Deutschland/GB- 542/04, der vier Mal und 126 Mal *in vitro* passagiert worden war, untersucht. Alle getesteten Konzentrationen von Paromomycin (10, 20, 40 und 80ppm) zeigten ab dem 1. Tag p.i. eine hemmende Wirkung auf *H. meleagridis*, wobei die Wirkung mit steigender Paromomcin-Konzentration zunahm. Einen vollständig letalen Effekt ab dem 1. Tag p.i. bewirkten nur 80ppm bei beiden Passagen (Tabelle 27).

Zwischen den Passagen gab es einen signifikanten Unterschied nur bei 10 und 20ppm am 1. Tag p.i., wobei das Wachstum der höheren Passage (P126) stärker gehemmt wurde (Tabelle 28).

Tabelle 27: Mittelwert der Histomonadenzahl der Passagen 4 und 126 pro ml in modifiziertem Dwyers Medium bei verschiedenen Konzentrationen Paromomycin.

Konz. (ppm)		Tag p.i. 1		2		3		4	
		Passage							
		4	**126**	**4**	**126**	**4**	**126**	**4**	**126**
0	Mw.	93333,33	93333,33	192500	190833,33	400000	381666,67	562500	556666,67
	Stab.	10801,23	9831,92	12144,96	11583,03	7071,07	15705,63	15411,04	28577,38
10	Mw.	54166,67*	43333,33*	90000*,00	90000*,00	29166,67*	27083,33*	13958,33*	13958,33*
	Stab.	4915,96	3027,65	14491,38	11832,16	3027,65	2457,98	1228,99	1461,31
20	Mw.	35416,67*	27500*	27916,67*	25833,33*	18333,33*	17222,22*	11458,33*	11041,67*
	Stab.	3679,90	2236,07	2457,98	1290,99	1490,71	860,66	940,97	940,97
40	Mw.	13125*,00	11250*,00	9166,67*	8333,33*	4166,67*	4375*,00	2083,33*	2083,33*
	Stab.	1311,01	1118,03	1020,62	1020,62	645,50	684,65	645,50	645,50
80	Mw.	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*
	Stab.								

Konz.: Konzentration, Mw.: Mittelwert, Stab.: Standardabweichung.

*Signifikanter Unterschied zwischen der Positivkontrolle (0ppm) und den anderen Dosierungen (P≤0,05).

Tabelle 28: Mittelwert des Wachstums von *H. meleagridis* der Passagen 4 und 126 pro ml in Dwyers Medium bei verschiedenen Konzentrationen von Paromomycin; das Histomonadenwachstum in den Kulturen mit Paromomycin ist als Prozent der Histomonadenzahl in den entsprechenden Kontrollen ohne Paromomycin ausgedrückt.

Konz. (ppm)		Tag p.i. 1		2		3		4	
		Passage							
		4	**126**	**4**	**126**	**4**	**126**	**4**	**126**
0	Mw.	100	100	100	100	100	100	100	100
	Stab.	11,57	10,53	6,31	6,07	1,77	4,12	2,74	5,13
10	Mw.	58,04*	46,43*	46,75	47,16	7,29	7,1	2,48	2,51
	Stab.	5,27	3,24	7,53	6,2	0,76	0,64	0,22	0,26
20	Mw.	37,95*	29,46*	14,5	13,54	4,58	4,51	2,04	1,98
	Stab.	3,94	2,4	1,28	0,68	0,37	0,23	0,17	0,17
40	Mw.	14,06	12,05	4,76	4,37	1,04	1,15	0,37	0,37
	Stab.	1,4	1,2	0,53	0,53	0,16	0,18	0,11	0,12
80	Mw.	0	0	0	0	0	0	0	0
	Stab.								

Konz.: Konzentration, Mw.: Mittelwert, Stab.: Standardabweichung.

*Signifikanter Unterschied zwischen beiden Passagen (P≤0,05).

4.2.2 Wirksamkeit von Gabbrovet 70® gegenüber *H. meleagridis in vivo*

4.2.2.1 Versuchsdesign

120 weibliche Puteneintagsküken (BUT-Big 6) wurden in Käfige eingestallt. Im Alter von 18 Tagen wurden die Puten in 5 Gruppen aufgeteilt (3 behandelte Gruppen mit unterschiedlichen Dosierungen von Paromomycin, eine nicht behandelte infizierte Gruppe und eine nicht behandelte nicht infizierte Gruppe) (Tabelle 29). Die Applikation des Präparats erfolgte über das Trinkwasser zwischen dem 18. und 32. Lebenstag. Im Alter von 21 Tagen wurden die Tiere intrakloakal mit 150.000 Histomonaden des Stamms Pute/Deutschland/GB551/04 infiziert.

Die Tiere wurden nach der Infektion für 3 Wochen beobachtet und klinische Erscheinungen und Mortalität protokolliert. Alle Tiere wurden wöchentlich einzeln gewogen. Zusätzlich wurden die behandelten Gruppen am 18., 24., 27. und 30. Tag als Gruppe gewogen. Der Wasserverbrauch zwischen dem 18. und 32. Tag wurde täglich bestimmt, um die korrekte Dosierung des Medikamentes zu gewährleisten. Von individuell markierten Puten jeder Gruppe wurden Blutproben im Alter vom 21., 28., 35. und 42. Tag aus der Flügelvene entnommen, um Albumin, Gesamteiweiß, Cholinesterase, Gallensäuren, AST und LDH zu bestimmen.

An allen verendeten und am Ende des Versuchs euthanasierten Puten wurde eine Sektion durchgeführt und der Grad der Veränderungen in Leber und Blinddärmen bestimmt. Von allen Tieren wurden Proben von Leber und Blinddärmen genommen und mittels Real-time PCR auf Histomonaden-DNA untersucht.

Tabelle 29: Gruppen im Versuch zur Prophylaxe mittels Gabbrovet 70®

Gruppe	Infektion	Dosierung	Zahl der Tiere
PK	infiziert	nicht behandelt	30 (10 pro Käfig)
G25	infiziert	25 mg/kg /Tag	30 (10 pro Käfig)
G50	infiziert	50 mg/kg /Tag	30 (10 pro Käfig)
G100	infiziert	100 mg/kg /Tag	30 (10 pro Käfig)
NK	nicht infiziert	nicht behandelt	10

4.2.2.2 Ergebnisse

4.2.2.2.1 Klinische Erscheinungen

Die nicht infizierten Tiere zeigten keine klinischen Symptome. Bei den infizierten Tieren traten für Histomonase typische klinische Erscheinungen ab dem 8. Tag nach der Infektion bei den unbehandelten Tieren sowie in den Gruppen G25 und G50 auf. Bei der Gruppe G100 begannen die Symptome ab dem 11. Tag nach der Infektion. Bei allen Gruppen hielten sie über 4-8 Tage an (Tabelle 30).

Tabelle 30: Zeitraum des Auftretens klinischer Erscheinungen.

Gruppe	Klinischen Erscheinungen (Tag p.i.)
PK	8-12
G25	8-16
G50	8-16
G100	11-16
NK	Keine

4.2.2.2.2 Mortalität

Kein nicht infiziertes Tier verendete. Die Mortalität betrug bei den unbehandelten, infizierten Tieren 90%. Mit steigender Paromomycin- Dosis sank die Mortalität und lag in der Gruppe G100 bei 10% (Abb. 14). Hingegen betrug die Mortalität bei Gruppe G50 23 % und bei Gruppe G25 50%.

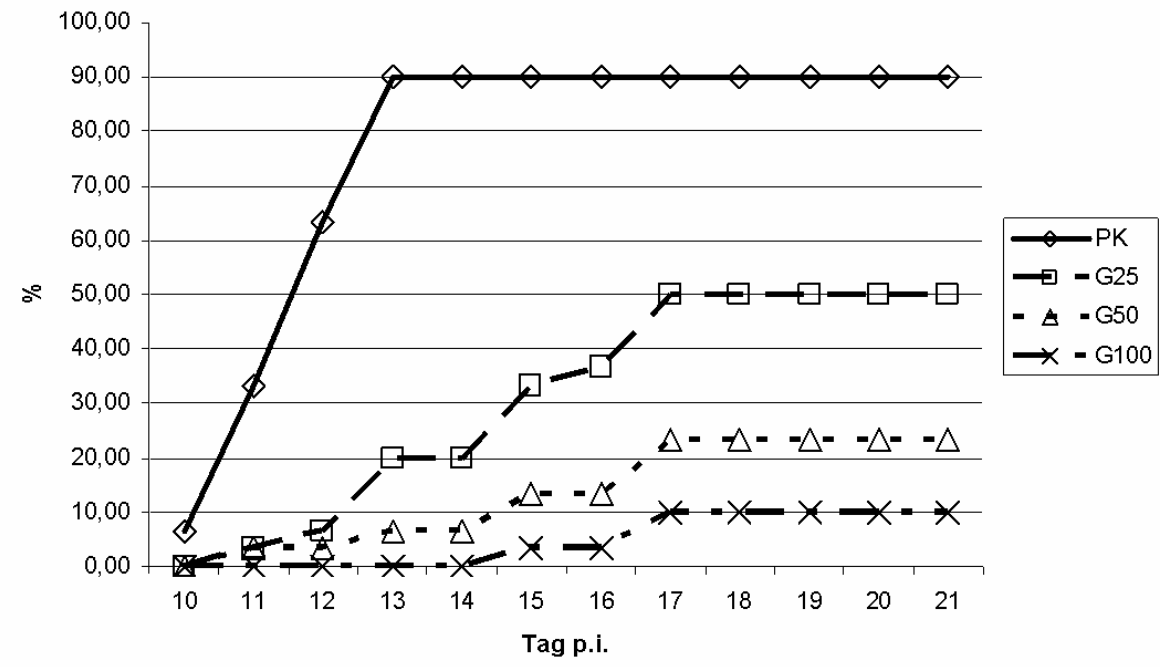
Die Mortalität begann 10 Tage p.i. in Gruppe PK und einen Tag später in den Gruppen G25 und G50. In der Gruppe PK trat der letzte Todesfall am 13. Tag p.i. auf, während sich die Mortalität in den Gruppen G25 und G50 bis Tag 17 p.i. hinzog. In Guppe G100 traten die einzigen Todesfälle am 15. und 17. Tag p.i. auf (Tabelle 31). Die Mortalität in den Gruppen wurde mittels Fisher's exact test verglichen und es gab einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Die Mortalität in G100 und G50 war signifikant niedriger als die andere infizierte Gruppe.

Tabelle 31: Verlauf der Mortalität.

Tag.p.i.	Gruppe				
	PK	G25	G50	G100	NK
10	2	0	0	0	0
11	8	1	1	0	0
12	9	1	0	0	0
13	8	4	1	0	0
14	0	0	0	0	0
15	0	4	2	1	0
16	0	1	0	0	0
17	0	4	3	2	0
Anzahl der Tiere	30	30	30	30	10
Anzahl verendeter Tiere	27	15	7	3	0
Mortalität %	90^{A}	50^{B}	$23{,}3^{C}$	10^{C}	0^{C}

Hochgestellte Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($P \leq 0{,}05$).

Abb.14: Verlauf der Mortalität.



4.2.2.2.3 Ausprägung der Läsionen in Blinddärmen und in Leber

Alle verendeten Puten zeigten für Histomonose typische Läsionen in Blinddärmen und in Leber, wobei die Stärke mit steigender Paromomycindosis abnahm (Tabelle 32 und Abb.15). Nur bei einem überlebenden, euthanasiertem Tier aus Gruppe G50 wurden für Histomonose typische Läsionen in Blinddärmen und Leber festgestellt.

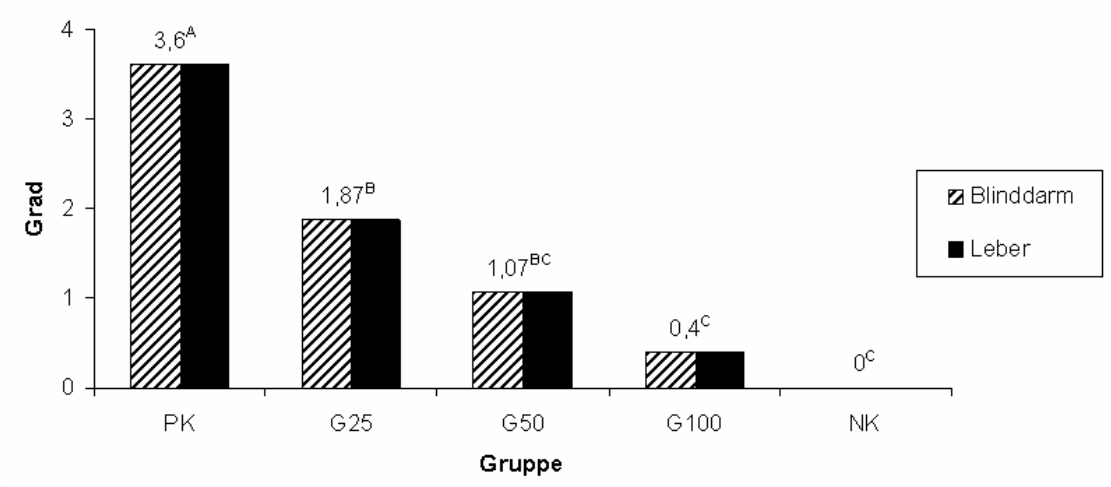
Die Unterschiede in der Ausprägung des Läsionsgrads wurden mittels Fisher's exact test verglichen. Ein signifikanter Unterschied wurde zwischen den Gruppen festgestellt. Der Läsionsgrad war in G100 signifikant niedriger als die anderen infizierten Gruppen und ohne signifikanten Unterschied mit NK.

Tabelle 32: Mittlerer Läsionsgrad in Blinddärmen und in Leber.

Gruppe	Läsionsgrad	
	Blinddarm	Leber
PK	3.6^{A}	3.6^{A}
G25	1.87^{BC}	1.87^{BC}
G50	1.07^{BC}	1.07^{BC}
G100	0.4^{C}	0.4^{C}
NK	0^{C}	0^{C}

Hochgestellte Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($P \leq 0,05$).

Abb.15: Mittlerer Läsionsgrad in Blinddärmen und in Leber.



Hochgestellte Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (P≤0,05).

4.2.2.2.4 Untersuchung mittels Real-time PCR

DNA von *H. meleagridis* konnte in Blinddärmen und Leber aller verendeten Tiere nachgewiesen werden. Nur bei einem überlebenden euthanasierten Tier aus Gruppe G50 gelang dieser Nachweis in Leber und Blinddärmen (Tabelle 33).

Tabelle 33: Ergebnisse der Untersuchung von Lebern und Blinddärmen mittels Real-time PCR.

Gruppe	Überlebende Tiere			Verendete Tiere		
	Anzahl der Proben	positives Leber	positive Blinddarm	Anzahl der Proben	positive Leber	positives Blinddarm
PK	3	0	0	27	27	27
G25	15	0	0	15	15	15
G50	23	1	1	7	7	7
G100	27	0	0	3	3	3
NK	10	0	0	0	0	0

4.2.2.2.5 Körpergewicht

7 Tage p.i. konnte bei allen behandelten Gruppen ein signifikant höheres (P≤0,05) Körpergewicht mittels Fisher's exact test im Vergleich zu den infizierten nicht behandelten Tieren festgestellt werden (Tabelle 34). 14 Tage p.i. war das Gewicht bei der nicht infizierten Gruppe NK signifikant höher als bei den behandelten Gruppen. Jedoch gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen PK und NK, da alle erkrankten Puten der infizierten und nicht behandelten Gruppe PK zwischen der letzten Wiegung verendet waren.

21 Tage p.i. konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (Tabelle 34 und Abb. 16).
Die käfigweisen Wiegungen der behandelten Gruppen am 18., 24., 27. und 30. Tag dienten nur der korrekten Dosierung des Medikaments (Tabelle 35).

Tabelle 34: Mittleres Gewicht der Tiere in Gramm.

Gruppe		**Alter in Tagen (Tag p.i.)**						
		1	**7**	**14**	**21 (0)**	**28 (7)**	**35 (14)**	**42 (21)**
PK	M	74.48	151.42^{B}	311.04	581.57^{A}	917.00^{A}	1683.33^{AB}	2416.67
	Stab	4.65	14.17	34.96	64.79	144.26	76.38	76.38
	n	30	30	30	30	30	3	3
G25	M	75.39	145.03^{A}	298.33	577.03^{A}	980.20^{B}	1458.75^{B}	2226.67
	Stab	4.34	7.87	41.05	64.26	116.58	274.93	242.65
	n	30	30	30	30	30	24	15
G50	M	75.85	155.98^{BC}	300.21	605.47^{AB}	1006.40^{BC}	1471.03^{B}	2132.61
	Stab	5.31	12.94	35.08	54.55	62.84	211.29	262.25
	N	*30*	*30*	*30*	*30*	*30*	*28*	*23*
G100	M	75.30	157.86^{C}	323.37	631.01^{B}	1058.33^{BC}	1563.67^{B}	2218.52
	Stab	4.81	12.60	39.73	65.35	88.72	208.85	169.36
	N	*30*	*30*	*30*	*30*	*30*	*30*	*27*
NK	M	78.19	151.27^{ABC}	303.84	561.71^{A}	938.2^{ABC}	1862.5^{A}	2315
	Stab	3.60	13.83	29.55	68.39	88.84	106.12	108.14
	n	10	10	10	10	10	10	10

M: Mittelwertgewicht. Stab: Standerabweichung. n: Anzahl der Puten.
Hochgestellte Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($P \leq 0,05$).

Abb.16: Mittleres Gewicht der Tiere in Gramm.

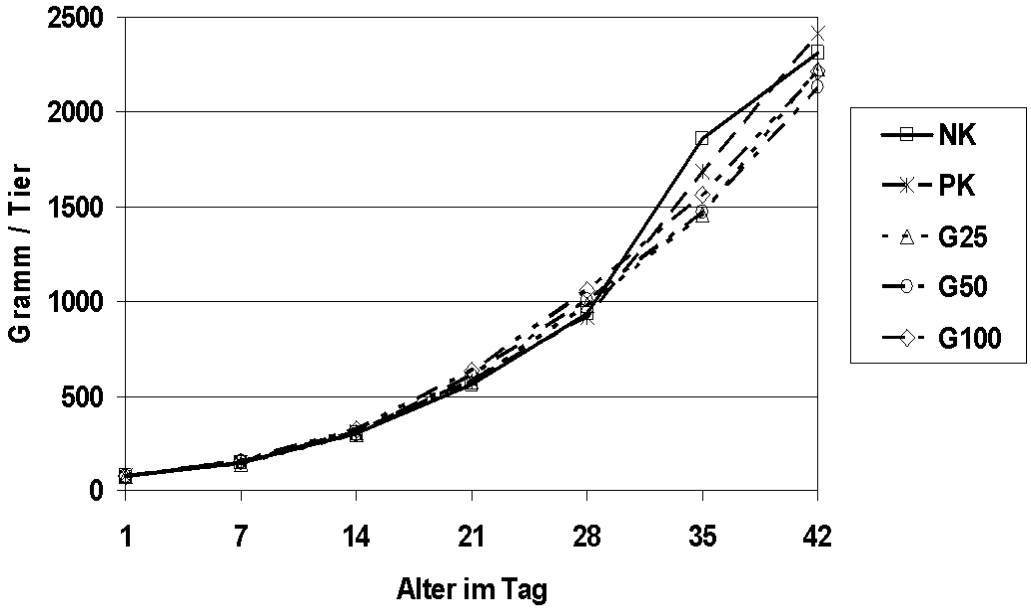


Tabelle 35: Gewicht der behandelten Gruppen bei der käfigweisen Wiegung im Alter vom 18., 21., 24., 27. and 30. Tag in Gramm.

Gruppe	Käfig	Tag				
		18	21	24	27	30
G25	1	4233.0	5842.2	7451.4	9151.52	12410.4
	2	4187.7	5522.3	6857.5	8192.7	11139.3
	3	4671.1	5946.5	7240.7	8511.32	11903.7
	M	4363.9	5770.3	7183.2	8618.5	11817.8
G50	1	4576.2	6277.8	7979	9680.2	12354.6
	2	4482.5	6019.2	7556.4	9093.6	12134.4
	3	4469.3	5867.2	7265.4	8663.6	11716.9
	M	4509.3	6054.7	7600.2	9145.8	12068.6
G100	1	4616.3	6205.4	7794.6	9383.8	12368.3
	2	4549.0	6345.4	8141.6	9937.8	13021.3
	3	4700.6	6379.6	8058.8	9738.0	12770.2
	M	4621.9	6310.1	7998.3	9686.5	12719.9

M: Mittelwert der Gruppe.

4.2.2.2.6 Blutparameter

Die Blutwerte wurden paarweise durch t-Test verglichen.

4.2.2.2.6.1 Albumin

7 Tage nach der Infektion mit *H. meleagridis* sank der Albuminwert im Blut von 1,17g/dl auf 0.83g/dl bei den unbehandelten Tieren. Dies war signifikant niedriger, als bei den nicht infizierten Tieren. 14 Tage p.i. wurde der Ausgangwert wieder erreicht.

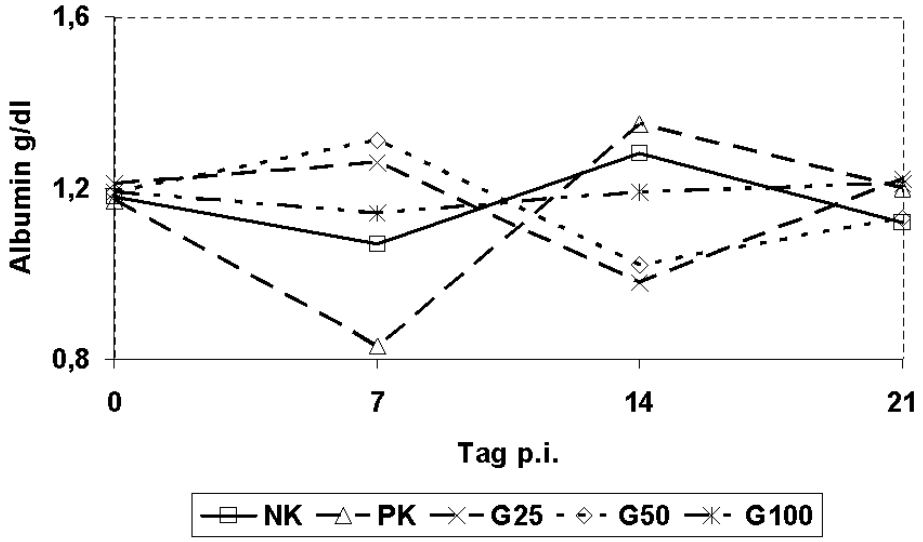
14 Tage nach der Infektion sank der Albuminspiegel auch bei der Gruppe G25 von 1,21g/dl auf 0,098g/dl und von 1,19g/dl auf 1,02g/dl bei der Gruppe G50. Beide Werte waren signifikant geringer als bei den nicht infizierten Tieren. In der Woche danach wurde der Ausgangwert wieder erreicht. Die Werte der Gruppen G100 wiesen keine signifikanten Abweichungen von den Werten der Gruppe NK auf (Tabelle 36 und Abb. 17).

Tabelle 36: Mittelwerte des Albuminwertes (g/dl)

Alter (Tag)	Tag.p.i.	Wert	Gruppe				
			PK	G25	G50	G100	NK
21	0	M	1.17	1.21	1.19	1.19	1.18
		Stab	0.08	0.07	0.07	0.03	0.08
		n	10	10	10	10	10
28	7	M	0.83^{B}	1.26^{AC}	1.31^{C}	1.14^{AC}	1.07^{A}
		Stab	0.21	0.28	0.27	0.29	0.14
		n	10	9	10	10	10
35	14	M	1.35^{AB}	0.98^{B}	1.02^{B}	1.19^{AB}	1.28^{A}
		Stab	0.07	0.29	0.31	0.25	0.13
		n	2	8	9	10	10
42	21	M	1.2	1.22	1.13	1.21	1.12
		Stab	0.00	0.11	0.10	0.12	0.08
		n	2	5	6	9	10

M: Mittelwerte des Albuminwertes (g/dl). Stab: Standerabweichung. n: Anzahl der Puten. Hochgestellte Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($P \leq 0,05$).

Abb.17: Mittelwerte des Albuminwertes (g/dl)



4.2.2.2.6.2 Aspartat-Aminotransferase (AST) „ Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)“

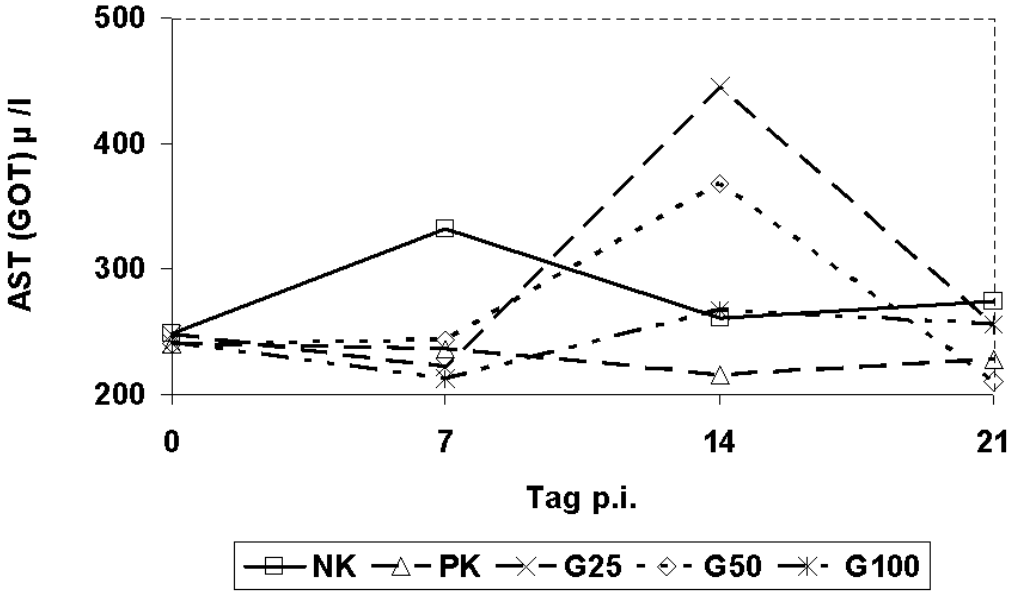
7 Tage p.i. lag der AST-Wert bei allen infizierten Gruppen signifikant unter den nicht infizierten Tieren. 14 Tage nach der Infektion stieg die AST im Blut bei der Gruppe G25 von 246,92µ/l auf 445,03µ/l und von 240,68µ/l auf 367,59µ/l bei der Gruppe G50 an, danach wurde der Ausgangwert wieder erreicht. Die Werte der Gruppen PK und G100 zeigten diese Schwankungen nicht (Tabelle 37 und Abb. 18).

Tabelle 37: Mittelwerte des AST Wertes (µ/l)

Alter (Tag)	Tag.p.i.	Wert	Gruppe				
			PK	G25	G50	G100	NK
21	0	M Stab n	240.48 14.73 10	246.92 21.89 10	240.68 17.23 10	241.58 15.64 10	248.95 14.40 10
28	7	M Stab n	236.21^{B} 66.49 10	222.10^{B} 20.30 9	242.89^{B} 9.96 10	212.26^{B} 64.19 10	332.00^{A} 78.14 10
35	14	M Stab n	215.75 0.49 2	445.03 309.23 8	367.59 201.55 9	266.64 108.78 10	260.70 21.53 10
42	21	M Stab n	227.95 13.93 2	255.60 14.45 5	210.00 99.23 6	255.90 17.26 9	273.75 20.08 10

M: Mittelwerte des AST Wertes (µ/l). Stab: Standerabweichung. n: Anzahl der Puten.
Hochgestellte Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (P≤0,05).

Abb.18: Mittelwerte des AST Wertes (µ/l)



4.2.2.2.6.3 Gallensäuren

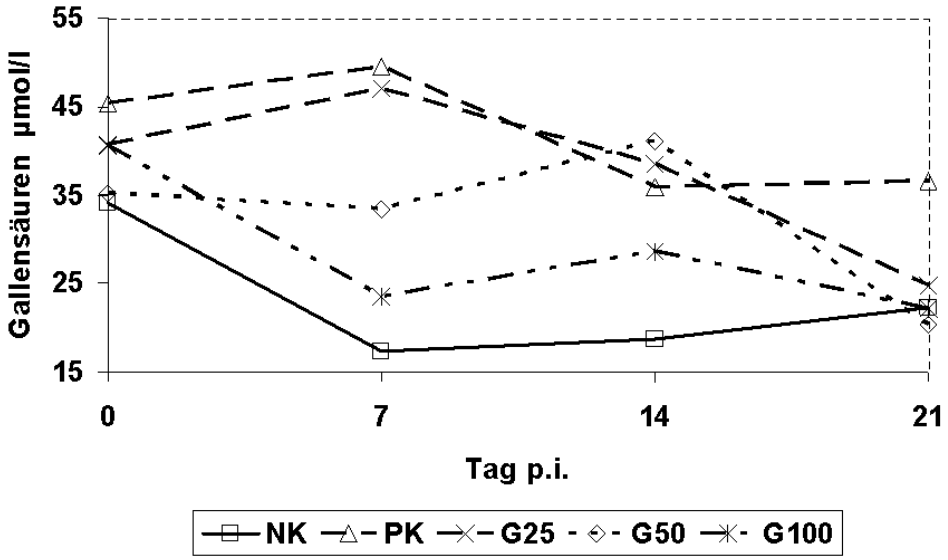
Die Gallensäurekonzentration im Blut war bei den infizierten Tieren tendenziell höher als bei den nicht infizierten Tieren. Wegen der hohen Schwankungsbreite war jedoch meist kein signifikanter Unterschied feststellbar (Tabelle 38 und Abb. 19).

Tabelle 38: Mittelwerte des Gallensäurenwertes (µmol/l)

Alter (Tag)	Tag.p.i.	Wert	Gruppe				
			PK	G25	G50	G100	NK
21	0	M	45.42	40.76	35.23	40.53	34.10
		Stab	17.94	9.24	5.28	5.22	19.70
		n	10	10	10	10	10
28	7	M	49.45	46.96	33.41	23.53	17.38
		Stab	57.04	81.62	39.05	4.32	7.69
		n	10	9	10	10	10
35	14	M	35.95	38.51	41.11	28.60	18.73
		Stab	11.95	43.01	28.58	11.77	6.12
		n	2	8	9	10	10
42	21	M	36.6	24.80	20.30	22.13	22.35
		Stab	11.46	6.13	7.99	6.42	10.29
		n	2	5	6	9	10

M: Mittelwerte der Gallensäurenkonzentration (µmol/l). Stab: Standerabweichung. n: Anzahl der Puten.

Abb.19: Mittelwerte des Gallensäurenwertes (µmol/l)



4.2.2.2.6.4 Gesamteiweiß

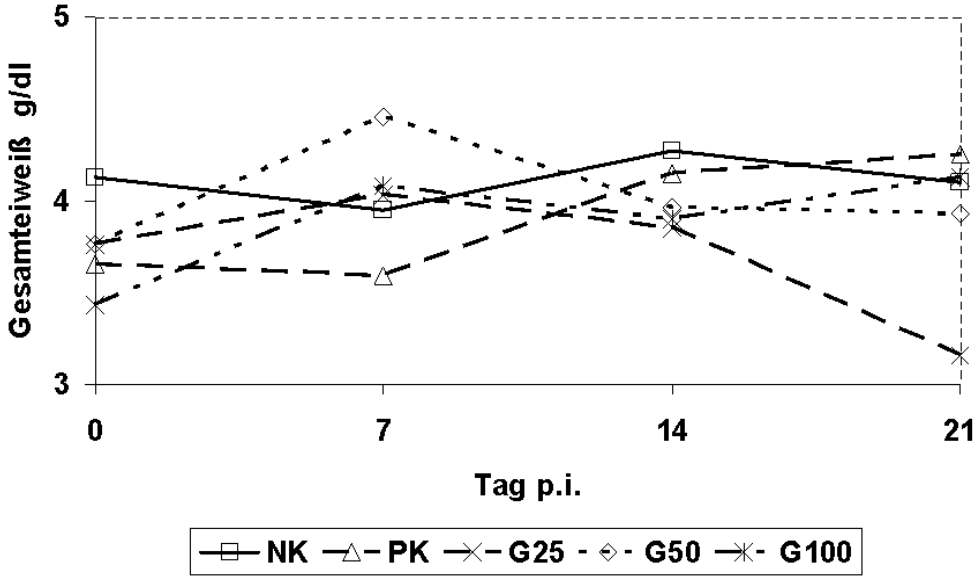
7 Tage nach der Infektion mit *H. meleagridis* lag das Gesamteiweiß im Blut bei den unbehandelten Tieren signifikant unter dem Wert der Gruppen G50 und G100. Weitere signifikante Unterschiede waren nicht feststellbar (Tabelle 39 und Abb.20).

Tabelle 39: Mittelwerte des Gesamteiweißwertes (g/dl)

Alter (Tag)	Tag.p.i.	Wert	Gruppe				
			PK	G25	G50	G100	NK
21	0	M	3.65	3.76	3.76	3.43	4.13
		Stab	0.19	0.23	0.21	0.80	0.50
		n	10	10	10	10	10
28	7	M	3.59^{AC}	4.03^{A}	4.46^{B}	4.08^{AB}	3.95^{AC}
		Stab	0.55	0.36	0.40	0.40	0.57
		n	10	9	10	10	10
35	14	M	4.15	3.85	3.96	3.90	4.27
		Stab	0.07	0.22	0.35	0.45	0.42
		n	2	8	9	10	10
42	21	M	4.25	3.16	3.93	4.13	4.10
		Stab	0.07	1.66	0.23	0.19	0.37
		n	2	5	6	9	10

M: Mittelwerte des Gesamteiweißwertes (g/dl). Stab: Standerabweichung. n: Anzahl der Puten. Hochgestellte Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (P≤0,05).

Abb.20: Mittelwerte des Gesamteiweißwertes (g/dl)



4.2.2.2.6.5 Cholinesterase

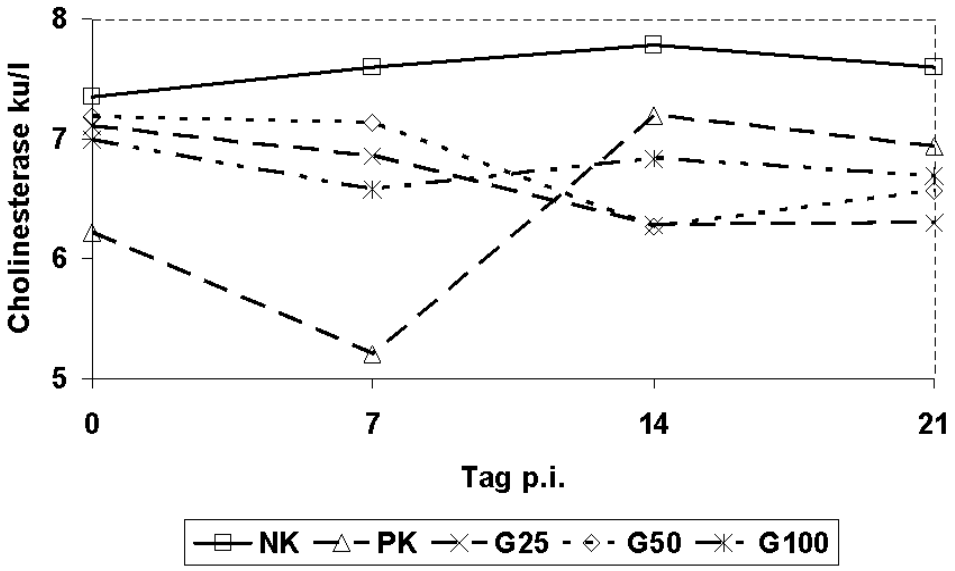
7 Tage nach der Infektion mit *H. meleagridis* sank die Cholinesterase im Blut bei den infizierten unbehandelten Tieren von 6,22 ku/l auf 5,21 ku/l, signifikant niedriger als bei den anderen Gruppen, danach wurde der Ausgangwert wieder erreicht. Im Gegensatz dazu war bei allen behandelten Gruppen die Cholinesterase am 14. und 21. Tag p.i. unter dem Wert der Gruppe NK (Tabelle 40 und Abb.21).

Tabelle 40: Mittelwerte des Cholinesterasenwertes (ku/l)

Alter (Tag)	Tag.p.i.	Wert	Gruppe				
			PK	G25	G50	G100	NK
21	0	M	6.22	7.10	7.19	6.99	7.35
		Stab	2.18	0.50	0.53	0.54	1.09
		n	10	10	10	10	10
28	7	M	5.21^{B}	6.86^{A}	7.13^{A}	6.58^{A}	7.60^{A}
		Stab	1.23	0.75	0.71	1.21	1.16
		n	10	9	10	10	10
35	14	M	7.2^{AB}	6.28^{B}	6.27^{B}	6.84^{B}	7.78^{A}
		Stab	0.00	0.68	1.30	0.68	0.87
		n	2	8	9	10	10
42	21	M	6.935^{AB}	6.30^{B}	6.57^{B}	6.69^{B}	7.60^{A}
		Stab	0.05	0.56	0.69	0.43	0.68
		n	2	5	6	9	10

M: Mittelwerte des Cholinesterasenwertes (ku/l). Stab: Standerabweichung. n: Anzahl der Puten. Hochgestellte Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (P≤0,05).

Abb.21: Mittelwerte des Cholinesterasenwertes (ku/l)



4.2.2.2.6.6 Laktatdehydrogenase (LDH)

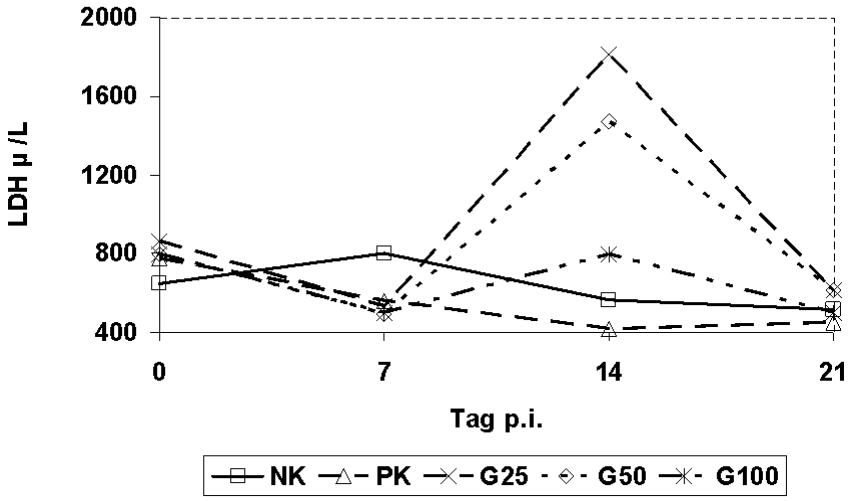
14 Tage nach der Infektion mit *H meleagridis* stieg die LDH bei den behandelten Gruppen stark an und lag signifikant über dem Wert der Gruppe NK. 21 Tage p.i. waren die Werte wieder abgefallen, aber immer noch höher als in der Gruppe NK. Die Gruppe PK zeigte diese Schwankung nicht, da 14 Tage p.i. alle erkrankten Tiere bereits verendet waren (Tabelle 41 und Abb.22).

Tabelle 41: Mittelwerte des LDH Wertes (µ/l)

Alter (Tag)	Tag.p.i.	Wert	Gruppe				
			PK	G25	G50	G100	NK
21	0	M Stab n	776.3 52.15 10	863.10 198.25 10	797.8 109.37 10	794.00 81.44 10	649.67 138.24 10
28	7	M Stab n	559.5 440.68 10	533.22 78.91 9	494.8 80.53 10	499.70 98.31 10	800.83 92.59 10
35	14	M Stab n	415^{AB} 65.05 2	1814.38^{B} 1876.11 8	1470.56^{B} 1290.54 9	793.50^{B} 803.12 10	566.00^{A} 82.67 10
42	21	M Stab n	452^{A} 2.83 2	616.60^{A} 77.10 5	612.67^{A} 169.20 6	499.78^{A} 128.86 9	517.17^{B} 34.82 10

M: Mittelwerte des LDH- Wertes (µ/l). Stab: Standerabweichung. n: Anzahl der Puten.
Hochgestellte Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (P≤0,05).

Abb.22: Mittelwerte des LDH Wertes (µ/l)



4.2.3 Wirksamkeit von HistoBloc® gegenüber *H. meleagridis in vivo*

4.2.3.1 Versuchsdesign

120 männliche Puteneintagsküken (BUT-Big 6) wurden in Käfige eingestallt, in 5 Gruppen aufgeteilt (3 behandelte Gruppen mit unterschiedlichen Dosierungen von Paromomycin, eine nicht behandelte infizierte Gruppe und eine nicht behandelte nicht infizierte Gruppe) (Tabelle 42). Die Applikation des Präparates erfolgte über das Futter zwischen dem 1. und 42. Lebenstag. Im Alter von 21 Tagen wurden die Tiere intrakloakal mit 150.000 Histomonaden des Stamms Pute/Deutschland/GB551/04 infiziert.

Alle Puten wurden nach der Infektion für 3 Wochen beobachtet. Die klinischen Erscheinungen und Mortalität wurden protokolliert. An allen verendeten und am Ende des Versuchs euthanasierten Puten wurde eine Sektion durchgeführt und der Grad der Veränderungen in Blinddärmen und in Lebern bestimmt. Von allen Tieren wurden Proben von Blinddärmen und Lebern entnommen und mittels Real-time PCR auf Histomonaden-DNA untersucht. Außerdem wurden der Futter- und Wasserverbrauch vor und nach der Infektion bestimmt.

Tabelle 42: Gruppen im Versuch zur Prophylaxe mittels HistoBloc® als Futterzusatzstoff *in vivo*

Gruppe	Infektion	Dosierung	Zahl der Tiere
PK	infiziert	nicht behandelt	30 (10 pro Käfig)
H100	infiziert	100 ppm	30 (10 pro Käfig)
H200	infiziert	200 ppm	30 (10 pro Käfig)
H400	infiziert	400 ppm	30 (10 pro Käfig)
NK	nicht infiziert	nicht behandelt	10

4.2.3.2 Ergebnisse

4.2.3.2.1 Klinische Erscheinungen

Die nicht infizierten Tiere (NK) zeigten keine klinischen Symptome. Für Histomonose typische klinische Erscheinungen traten ab dem 9. Tag nach der Infektion bei der infizierten unbehandelten Gruppe (PK) und ab dem 11. Tag bei den behandelten Gruppen auf (H100, H200 und H400). Bei allen Gruppen hielten sie über 5-10 Tage an (Tabelle 43).

Tabelle 43: Zeitraum des Auftretens klinischer Erscheinungen.

Gruppe	Auftreten von klinischen Erscheinungen (Tag p.i.)
PK	9-19
H100	11-19
H200	11-19
H400	11-16
NK	Keine

4.2.3.2.2 Mortalität

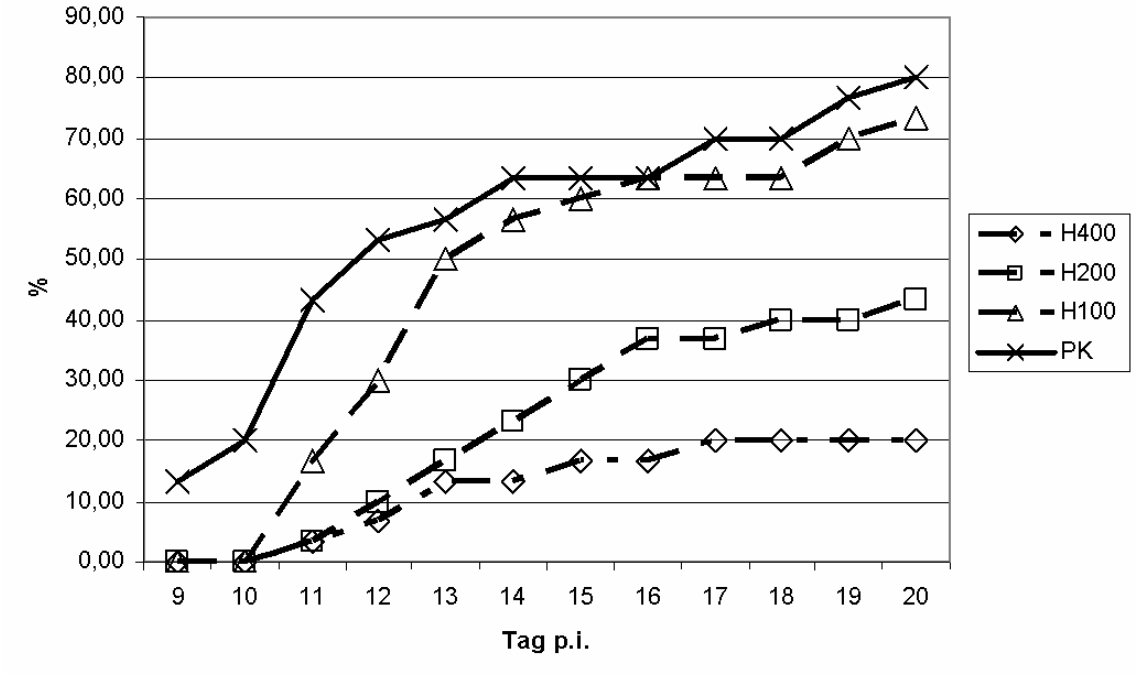
Die Mortalität betrug bei den unbehandelten, infizierten Tieren 80%. Mit steigender Paromomycin- Dosis sank die Mortalität und lag bei Gruppe H400 bei 20% (Abb.23). Der Mortalitätsverlauf wird in Tabelle 44 und Abb. 23 gezeigt. Signifikante Unterschiede ($P \leq 0,05$) zwischen den Gruppen wurden mittels one way ANOVA und Duncan's multiple range test festgestellt.

Tabelle 44: Verlauf der Mortalität.

Tag.p.i.	Gruppe				
	PK	H100	H200	H400	NK
10	4	0	0	0	0
11	2	0	0	0	0
12	7	5	1	1	0
13	3	4	2	1	0
14	1	6	2	2	0
15	2	2	2	0	0
16	0	1	2	1	0
17	0	1	2	0	0
18	2	0	0	1	0
19	0	0	1	0	0
20	2	2	0	0	0
21	1	1	1	0	0
Anzahl verendeter Tiere	24	22	13	6	0
Mortalität %	80^{A}	$73,33^{B}$	$43,33^{C}$	20^{D}	0^{E}

Hochgestellte Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($P \leq 0,05$).

Abb.23: Verlauf der Mortalität.



4.2.3.2.3 Ausprägung der Läsionen in Blinddärmen und Leber

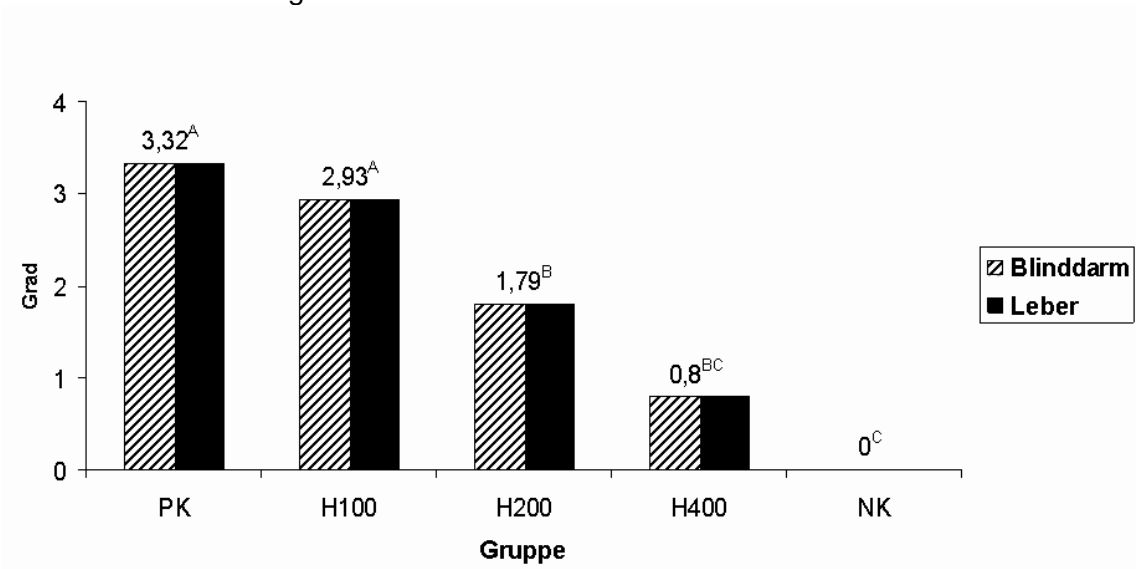
Alle verendeten Puten zeigten für Histomonose typische Läsionen in Blinddärmen und in Lebern. Die Schwere der Veränderungen in Blinddärmen und Leber nahm mit steigender Paromomycin- Dosis ab, signifikante Unterschiede (P≤0,05) wurden mittels one way ANOVA und Duncan's multiple range test festgestellt (Tabelle 45 und Abb.24).

Tabelle 45: Mittlerer Läsionsgrad in Blinddärmen und Leber.

Gruppe	Läsionsgrad	
	Blinddarm	Leber
PK	$3{,}32^{A}$	$3{,}32^{A}$
H100	$2{,}93^{A}$	$2{,}93^{A}$
H200	$1{,}79^{B}$	$1{,}79^{B}$
H400	$0{,}8^{BC}$	$0{,}8^{BC}$
NK	0^{C}	0^{C}

Hochgestellte Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (P≤0,05).

Abb.24: Mittlerer Läsionsgrad in Blinddärmen und Leber.



Hochgestellte Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (P≤0,05).

4.2.3.2.4 Untersuchung mittels Real-time PCR

Die DNA von *H. meleagridis* konnte in Blinddärmen und in Lebern aller verendeten Tiere nachgewiesen werden. Bei den überlebenden Tieren gelang dieser Nachweis nicht.

4.2.3.2.5 Körpergewicht

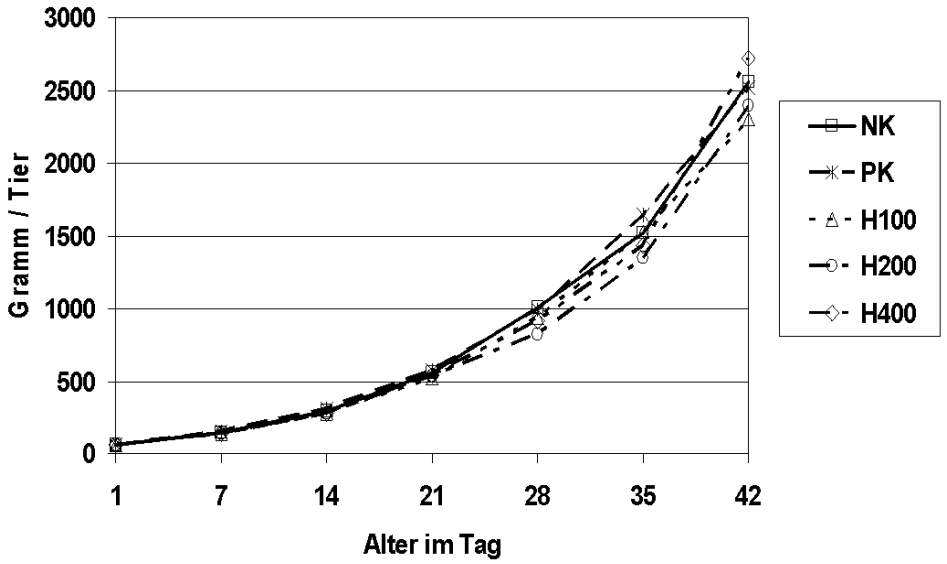
Um das Körpergewicht zwischen den Gruppen zu vergleichen, wurden die Mittelwerte mittels one way ANOVA und Duncan's multiple range test (P≤0,05) verglichen. Im Alter von 1 Tag gab es einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen NK und H400. Am Tag der Infektion im Alter von 21 Tagen waren die Tiere der Gruppen H400, H200 und H100 schwerer als die unbehandelten Tiere (NK) (Tabelle 46 und Abb.25). Am Ende des Versuchs (42. Tag) wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen NK und H400 festgestellt. Die Tiere der Gruppe H400 waren signifikant schwerer als die unbehandelten Tiere (NK).

Tabelle 46: Mittleres Gewicht der Tiere in Gramm.

Gruppe		Tag (Tag p.i.)						
		1	**7**	**14**	**21 (0)**	**28 (7)**	**35 (14)**	**42 (21)**
PK	M	64.16^{AB}	139.59^{B}	277.38^{B}	534.10^{B}	818.00^{C}	1339.18^{B}	2398^{AB}
	Stab	4.45	16.73	37.01	64.77	137.55	367.91	125.47
	n	30	30	30	30	30	11	6
H100	M	62.66^{B}	140.49^{B}	282.18^{B}	540.82^{AB}	913.77^{B}	1422.62^{B}	2258.38^{B}
	Stab	4.80	13.76	30.73	49.73	126.65	175.07	260.36
	n	30	30	30	30	30	13	8
H200	M	64.19^{AB}	145.22^{AB}	295.31^{AB}	558.95^{AB}	1004.40^{A}	1511.25^{AB}	2555.41^{A}
	Stab	4.77	17.08	49.28	72.98	125.91	311.87	232.59
	n	30	30	30	30	30	24	17
H400	M	65.15^{A}	152.69^{A}	313.88^{A}	570.91^{A}	994.33^{A}	1639.27^{A}	2522.83^{A}
	Stab	3.43	11.89	30.59	51.57	107.24	198.68	183.75
	n	30	30	30	30	30	26	24
NK	M	61.93^{B}	136.22^{B}	275.88^{B}	523.17^{B}	937.60^{AB}	1529.00^{AB}	2305.2^{B}
	Stab	6.11	16.06	26.67	46.64	66.15	112.37	179.33
	n	10	10	10	10	10	10	10

M: Mittelwertgewicht. Stab: Standerabweichung. n: Anzahl der Puten.
Hochgestellte Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (P≤0,05).

Abb.26: Mittleres Gewicht der Tiere in Gramm.



4.2.3.2.6 Futterverbrauch und Futterverwertung (FCR)

Mittels one way ANOVA und Duncan's multiple range test wurde vor der Infektion kein statistisch signifikanter Unterschied (P≤0,05) beim Futterverbrauch pro Tier und bei der Futterverwertung zwischen den Gruppen festgestellt.

Nach der Infektion stieg der tägliche Futterverbrauch pro Pute mit höherer Dosierung von histoBloc® statistisch signifikant an. Die Gruppen H200 und H400 hatten eine signifikant bessere Futterverwertung als die Gruppen PK und H100 (Tabelle 47 und Abb.27, 28).

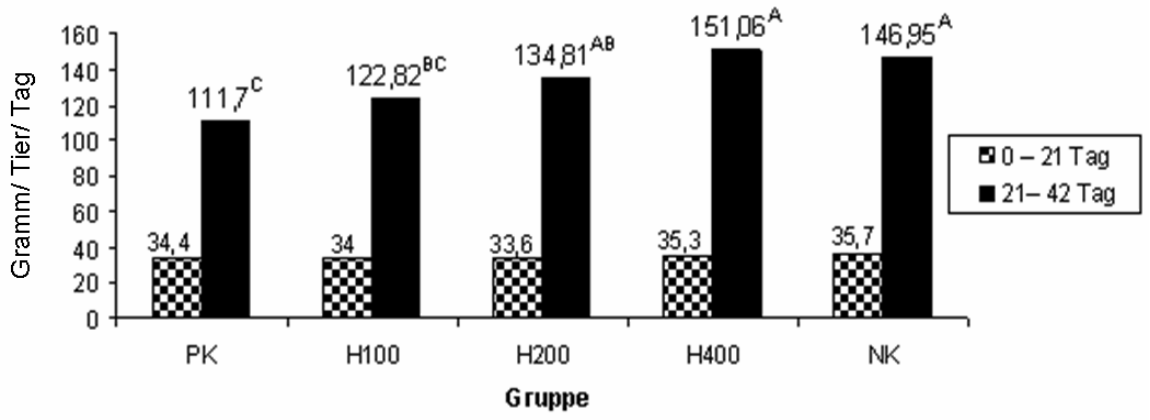
Tabelle 47: Mittlerer Futterverbrauch der Gruppen in Gramm pro Tier und Tag zwischen Tag 0 und Tag 42, sowie mittlere Futterverwertung (FCR).

Group	Mittlerer Futterverbrauch Gramm/ Pute/ Tag		Mittlere FCR	
	Tag			
	0 – 21	21– 42	0 – 21	21– 42
PK	34.4	111.7^{C}	1.5	4.12^{B}
H100	34	122.82^{BC}	1.32	4.05^{B}
H200	33.6	134.8^{AB}	1.26	2.05^{A}
H400	35.3	151.06^{A}	1.30	1.76^{A}
NK	35.7	146.95^{A}	1.43	1.66^{1}

Hochgestellte Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (P≤0,05).

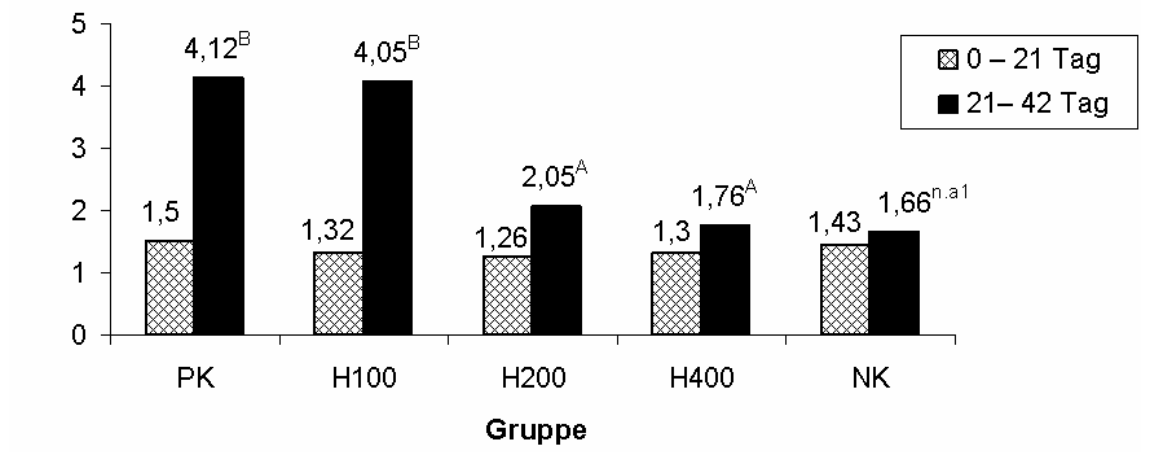
[1]Da der Wert kein Mittelwert ist, konnte er nicht in der ANOVA berücksichtigt werden.

Abb.27: Mittlerer Futterverbrauch der Gruppen in Gramm pro Tier und Tag zwischen Tag 0 und 42.



Hochgestellte Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (P≤0,05).

Abb.28: Mittlere Futterverwertung (FCR)



Hochgestellte Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (P≤0,05).

[1]Da der Wert kein Mittelwert ist, konnte er nicht in der ANOVA berücksichtigt werden.

4.2.3.2.7 Wasserverbrauch

Mittels one way ANOVA und Duncan's multiple range Test wurde vor und nach der Infektion kein statistisch signifikanter Unterschied (P≤0,05) beim täglichen Wasserverbrauch pro Tier und Tag zwischen den Gruppen festgestellt (Tabelle 48 und Abb.29).

4.2.3.2.8 Europäischer Produktionseffizienzfaktor (EPEF)

Die EPEF verbesserte sich mit höherer Dosierung von histoBloc®, wobei die Gruppe H400 signifikant besser war als alle anderen Gruppen und die Gruppe H200 als die Gruppen H100 und PK (Tabelle 48 und Abb.30).

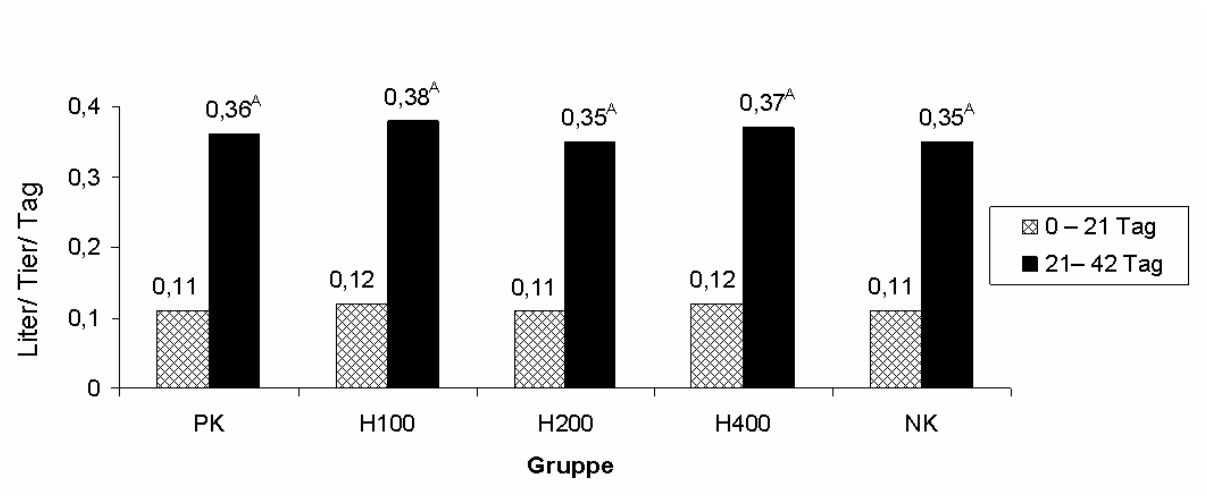
Tabelle 48: Mittlerer Wasserverbrauch der Gruppen in Liter pro Tier und Tag zwischen dem 0. und 42. Tag, sowie Europäischer Produktionseffizienzfaktor.

Group	Mittlerer Wasserverbrauch Liter/ Pute/ Tag		EPEF
	Tag		
	(0 – 21)	(21– 42)	
PK	0.1157	0.36^{A}	87^{C}
H100	0.1215	0.38^{A}	96^{C}
H200	0.1194	0.35^{A}	243^{B}
H400	0.1213	0.37^{A}	302^{A}
NK	0.1150	0.35^{A}	321^{1}

Hochgestellte Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (P≤0,05).

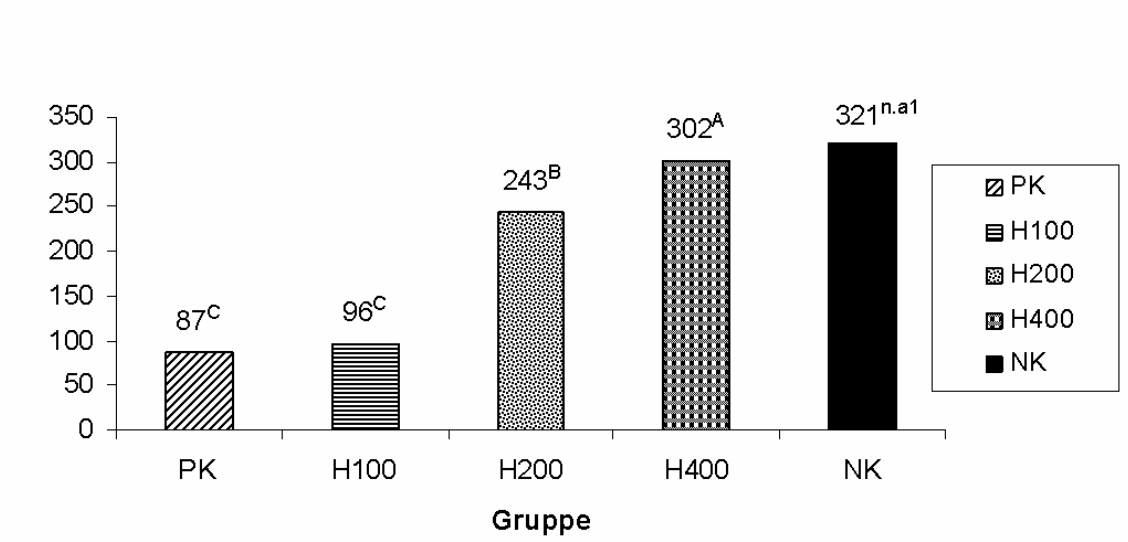
[1]Da der Wert kein Mittelwert ist, konnte er nicht in der ANOVA berücksichtigt werden.

Abb.29: Mittlerer Wasserverbrauch der Gruppen in Liter pro Tier und Tag zwischen dem 0. und 42. Tag.



Hochgestellte Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (P≤0,05).

Abb.30: Europäischer Produktionseffizienzfaktor (EPEF)



Hochgestellte Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (P≤0,05).

[1]Da der Wert kein Mittelwert ist, konnte er nicht in der ANOVA berücksichtigt werden.

5 Diskussion

Die Histomonose ist eine parasitäre Krankheit mit in der Regel unspezifischen klinischen Symptomen, einem chronischen Verlauf bei Hühnern und einem akuten Verlauf bei Puten. Gekennzeichnet ist sie durch Läsionen in Blinddärmen und Leber. Diese Krankheit wird durch eine Infektion mit dem *Protozoon Histomonas meleagridis* verursacht.

In den letzten drei Jahrzehnten konnte das Auftreten der Histomonose durch verbessertes Management, wie zum Beispiel die strikte Trennung der Haltung von Puten- und Hühnerherden und durch verfügbare therapeutische und prophylaktische Präparate eindeutig reduziert werden. Gegenüber den in früheren Jahren aufgetretenen Fällen liegt die Problematik des Auftretens der Erkrankung zurzeit in den jetzt fehlenden Therapie- bzw. Prophylaxemöglichkeiten. Seit dem Verbot aller Therapie- und Prophylaxemedikamente trat die Histomonose in der EU verbunden mit sehr hoher Mortalität auf (Hafez et al., 2005a; Hauck et al., 2010a).

Während verschiedene getestete Antikokzidia fast keine Wirksamkeit gegen *H. meleagridis* hatten, konnten einige Antibiotika wie Dimetridazol, Metronidazol, Ornidazol und Tinidazol die Läsionen in Blinddärmen und in der Leber und bei Hühnern nach experimenteller Infektion mit *H. meleagridis* verringern (Hu und McDougald 2002, 2004). Jedoch ist der Einsatz von Nitroimidazolen bei lebensmittelliefernden Tieren in der EU veboten (EU, 2002a). Deswegen wurde ein deutliches Interesse auf die Alternative „pflanzlichen“ Produkten gezeigt. Viele Produkte wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mit unterschiedlichen, oft nicht zufriedenstellenden, Ergebnissen untersucht (Chossat, 2002; Zenner et al., 2003; Duffy et al., 2005; Hafez und Hauck, 2006; Grabensteiner et al., 2007, Hauck und Hafez, 2007).

Der Zeitpunkt des Auftretens von Läsionen in Blinddärmen und Leber wurde nach einer experimentellen Infektion mit *H. meleagridis* bei Puten bestimmt und die Verbreitung des Parasiten in verschiedenen Organen mittels PCR und histologisch untersucht. Bei dem Auftreten von Läsionen gab es einen Unterschied zwischen Blinddärmen und Leber. Im Blinddarm fingen am 3. Tag p.i. die typischen Veränderungen von Histomonaden mit minimalen Läsionen (1. Grad) an. Am 4. und 5. Tag p.i. fanden sich dort geringgradige Läsionen (2.Grad). Mittelgradig Läsionen (3.Grad) traten am 6. Tag p.i. auf und ab den 7. Tag p.i. konnten hochgradige Läsionen (4. Grad) festgestellt werden. In der Leber traten Läsionen des entsprechenden Schweregrades mit etwa einem Tag Verzögerung auf. Das zeigt, dass die Infektion in den Blinddärmen anfing, von dort aus das Protozoon mit dem Portalblut zur Leber gelangte (Hauck et al. 2006).
Gleichzeitig wurde die Verbreitung der DNA des Parasiten von den Blinddärmen (ab dem 1. Tag p.i.) über die Leber (ab dem 3. Tage p.i.) in Bursa cloacalis, Jejunum, Lungen und Herz

(ab dem 6.Tage p.i.), sowie Nieren, Milz, und Gehirn (ab dem 8. Tage p.i.) festgestellt. Im Duodenum konnte keine *H. meleagridis*- DNA nachgewiesen werden. Histologisch wurde der Parasit erst am 5. Tag p.i. im Blinddarm und am 6. Tag p.i. in der Leber nachgewiesen.
Über den Nachweis von DNA des Parasiten in verschiedenen Organen wurde von vielen Autoren schon berichtet (Grabensteiner et al. 2006., Hauck et al. 2006., Huber et al. 2006., Singh et al. 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Empfindlichkeit verschiedener Putenlinien (WCT, KBT und BUT-Big6) für eine experimentelle Infektion mit *H. meleagridis* untersucht. Die erzielten Ergebnisse zeigten, dass alle untersuchten Putenlinien empfindlich für eine Infektion mit *H. meleagridis* waren, jedoch war die Mortalität bei Wildputen statistisch signifikant höher als bei den anderen untersuchten Putenlinien.
Es steht wenig Literatur über die genetische Resistenz oder Empfindlichkeit verschiedener Geflügelarten durch eine Infektion mit *H. meleagridis* zur Verfügung. Curtis (1907) zeigte, dass Puten für Histomonose empfindlicher als Hühner sind, während Hühner wichtiger bei der Verbreitung von *H. meleagridis* durch die Eier von *H. gallinarum* sind. Außerdem zeigten Al-khateeb und Hansen (1974) durch eine experimentelle Infektion *mit H. meleagridis*, dass Babcockhühner empfindlicher für Histomonose als Cornish Rockshühner waren. Ähnliche Ergebnisse wurden durch Chute et al. (1976) bei einem Vergleich der Empfindlichkeit von weißem Leghorn, New Hampshire Hühner und Beltsville-Puten (small white turkey) nach einer experimentellen Infektion *mit H. meleagridis* und *H. gallinarum* erzielt. Die Infektion verursachte Läsionen in der Leber und in Blinddärmen mit höherer Mortalität bei Puten, während bei Hühnern nur Läsionen in Blinddärmen ohne Mortalität auftraten. Außerdem verglichen Reynaud et al. (2005) die Empfindlichkeit für die Infektion mit *H. meleagridis* bei zwei Putenlinien, einer modernen, schweren Putenlinie und einer traditionellen leichten Linie. Beide Putenlinien waren empfindlich für die Infektion. Bei beiden Putenlinien lag die Mortalität bei 100%, allerdings bei der schweren Putenlinie 7 Tage später als bei der leichten Linie. Pathologische und histologische Veränderungen waren identisch und es gab keinen Unterschied in dem Läsionsgrad zwischen den beiden Linien.
Wie bereits erwähnt waren auch bei dem Versuch im Rahmen dieser Arbeit alle getesteten Putenlinien für eine Infektion mit *H. meleagridis* empfänglich, jedoch war die Mortalität bei den Wildputen statistisch signifikant höher als bei den anderen Linien. Die Mortalität der getesteten Linien lag zwischen 75-95%. In Versuchen von Van der Heijden und Landman (2008b) betrug die Mortalität bei BUT-Big 6 Puten nach experimenteller Infektion mit einer wesentlich niedrigeren Infektionsdosis von 3162 Histomonas/Pute 100% nach 2 Wochen. Sie spekulierten, dass die Mortalität trotz der niedrigeren Infektionsdosis wegen der hohen Virulenz des verwendeten Stammes sehr hoch war. Im Allgemeinen kann die Mortalität durch verschiedene Faktoren wie Alter, genetische Herkunft der Tiere, Infektionsdosis und das Isolat variieren (Lund 1955; Hu et al. 2004; Hauck et al. 2006; Hess et al. 2006a).

Der Läsionsgrad in der Leber war bei BUT-Big 6 und KBT höher als WCT, obwohl die Mortalität bei WCT höher als bei den anderen beiden Linien war. Eine mögliche Erklärung ist, dass WCT anfälliger sind, nicht gegenüber den Parasiten selbst, sondern gegenüber den von ihnen verursachten Schädigungen der Leber. Daher könnte ein geringer Grad der Leberzerstörung eine höhere Sterblichkeit verursachen.

In einem nächsten Versuch wurde die Pathogenese der Krankheit bei Mast- und Legetieren nach einer experimentellen Infektion mit *H. meleagridis* untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass Mast- und Legetieren empfindlich für eine Infektion mit *H. meleagridis* waren, jedoch traten bis zum 21. Tag p.i. weder klinische Erscheinungen noch Mortalität bei beiden Linien auf, und es gab keinen signifikanten Unterschied beim makroskopischen Läsionsgrad in Blinddärmen und Leber. Nur histologisch waren die Infiltration von Entzündungszellen in Lamina propria und Submukosa sowie die Ablation von Epithelzellen in den Blinddärmen bei den Legehühnern am 7 .Tag p.i. ausgeprägter als bei den Masthühnern. Außerdem konnte bei den beiden Hühnerlinien der Parasit histologisch und seine DNA mittels PCR in Blinddärmen, Lebern, Herz, Nieren, Milz und Lungen festgestellt werden.

Nach McDougald (2005a) kann die Mortalität bei Puten durch eine Infektion mit *H. meleagridis* bis 100% und bei Hühnern bis 20% betragen. Als mögliche Erklärung wird genannt, dass die Läsionen in der Leber bei Puten durch eine Infektion mit *H. meleagridis* immer vorhanden sind und die höhere Mortalität verursachen. Im Gegensatz dazu ist die Leber bei Hühnen durch Histomonaden selten betroffen, infolgedessen ist normalerweise die Mortalität geringer. Es wird somit angenommen, dass der primäre Todesgrund bei einer Infektion mit Histomonose die Zerstörung der Leber ist. Nur zweitrangig führt die diphtheroide Blinddarmentzündung, und die durch sie ausgelöste Peritonitis zum Tod.
Schon Curtis (1907) berichtete, dass Puten für Histomonose empfindlicher als Hühner sind. Das deutet darauf hin, dass das Ausmaß der Läsionenen durch Histomonose insbesondere in der Leber bei Hühnern größer als bei Puten sein muß, um die erhöhte Sterblichkeit zu verursachen. Im vorliegenden Versuch war die Mortalität bei beiden Hühnerlinien 0% und bei allen euthanasierten und infizierten Hühnern war der Läsionsgrad in der Leber weniger als Grad 2 und in den Blinddärmen weniger als 3,5.

In der Literatur wurde die über Ausbreitung von *H. meleagridis* von Blinddarm und Leber zu anderen Organen wie Drüsenmagen, Duodenum, Jejunum, Pankreas, Bursa cloacalis, Nieren, Milz, Herz, Lunge, Thymus und Gehirn berichtet (Cortes et al., 2004; Grabensteiner et al., 2006; Hauck et al. 2006; Huber et al. 2006; Singh et al. 2008; Senties Cue et al. 2009). Dies stimmt mit unseren Ergebnissen durch die Feststellung von DNA des Parasiten in unterschiedlichen Organen bei infizierten Puten und Hühnern zu. Der Nachweis des Parasiten und der Läsionen in den betroffenen Organen bestätigen, dass der Parasit in

diesen Organen überlebt, wobei ungeklärt bleibt, warum die Läsionen in diesen Organen nur manchmal auftreten und in anderen Fällen fehlen.
In der Literatur wurden die Läsionen in weiteren Organen außer Blinddärmen und Leber meist nur nach natürlichen Ausbrüchen der Histomonose berichtet (Cortes et al., 2004; Senties-Cue et al., 2009). Das könnte daran liegen, dass der Stamm des Protozoons in diesen Fällen ein hoch pathogener Wildstamm war und deshalb zu Läsionen in den weiteren Organen führte, wobei bei den meisten Tierversuchen *in vitro* passagierte Isolate zum Einsatz kommen. Deswegen wurden vermütlich in den vorliegenden Versuchen keine großen Läsionen in weiteren Organen festgestellt.
In diesem Versuch wurde die 3. Passage des *H. meleagridis*-Stamm Pute/Deutschland/GB542/04 verwendet. Hess et al. (2008) infizierten die Tiere mit der 95., 215. und 295. Passage des *H. meleagridis*-Stamm Hm /Turkey/ Austria/2922-C6/04. Die 95. Passage schien besser als die anderen Passagen geeignet zu sein, da weniger Tiere als in den anderen geimpften Gruppen die Läsionen zeigten.

Die gesamte Verbreitung von *H. meleagridis* lässt sich durch die Anatomie des Blutsystems erklären. Da die Blutversorgung des Darms und des Blinddarms eng mit der Leber verbunden ist, kann der Parasit erst über das Pfortaderblut zur Leber gelangen (Clarkson, 1961; McGuire und Morehouse, 1958).
In der Leber wird das Blut gefiltert, wobei entweder die Pathogenität des Parasiten oder einen Teil der Pathogenität verliert, oder die Zahl der Parasiten im Blut stark vermindert wird, so dass normalerweise keine pathologischen Läsionen in den weiteren Organen vorkommen.
Durch die Blutbahn erreicht der Parasit mit dem Blut zuerst das Herz und dann die Lungen. Im Kapillarbett der Lungen wird wahrscheinlich die Zahl der Parasiten weiter deutlich reduziert. Aus den Lungen gelangen die übrig gebliebenen Parasiten mit dem Blut zum Herz zurück und durch den systemischen Blutkreislauf zu weiteren Organen.
In die Nieren gelangt der Parasit vermutlich durch die *Vena mesenterica caudalis*, die die Blinddärme und Nieren verbinden (Clarkson, 1961). Bei der Bursa cloacalis wird angenommen, dass *H. meleagridis* die Bursa direkt aufsteigend aus der Kloake erreichen könnte (Marx, 1973; Cortes, 2004). Daher wurde vermutlich in der vorliegenden Arbeit die Feststellung von DNA des Parasiten in Blinddärmen, Lebern, Bursa cloacalis, Jejunum, Lungen, Herz, Nieren, Milz und Gehirn erklärt.
Der derzeitige Mangel an wirksamen Mitteln zur Behandlung bzw. zur Prophylaxe von Histomonose und die hohe Empfänglichkeit aller in dieser Arbeit getesteten Putenlinien zeigen die Bedeutung der Suche nach neuen wirksamen Medikamenten zur Bekämpfung dieser Krankheit. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Versuche durchgeführt, um die Wirksamkeit von Paromomycinsulfat *in vitro* sowie *in vivio* festzustellen.

Paromomycin ist ein Antibiotikum mit antiparasitärer Aktivität, welche beim Menschen zur Behandlung von Leishmaniose und bei Säugetieren zur Behandlung bzw. Prophylaxe von Kryptosporidien und anderen Darmlumenparasiten eingesetzt wird. Das Wirkungsspektrum von Paromomycin umfasst die meisten gramnegativen und viele grampositive Bakterien, Protozoen sowie viele Cestoden. Darüber hinaus ist dieses Produkt für alle lebensmittelliefernden Tierarten registriert, aber nicht für die Anwendung bei Tieren, von denen Milch oder Eier für den menschlichen Verbrauch gewonnen werden (EEU, 1990).
Lindquist (1962) berichtete, dass die Mortalität durch Histomonose bei der Gabe einer hohen Dosierung von Paromomycin im Futter (1000-2000 ppm) reduziert wurde. Zu einem anderen Ergebnis kamen Hu und McDougald (2004). *In vitro* reduzierten 10 µg/ml Paromomycinsulfat das Wachstum von *H. meleagridis* in Kulturen mit 12.500 *H. meleagridis* / ml. 100 µg/ml Paromomycinsulfat waren vollständig letal. *In vivo* war jedoch die Gabe 200 oder 400 ppm Paromomycinsulfat im Futter beginnend am Tag der Infektion mit 200.000 *H. meleagridis*/ml bei Hühnern unwirksam und reduzierte nicht die Läsionen in Blinddärmen und in der Leber.

In der vorliegenden Untersuchung von Paromomycinsulfat auf seine Wirksamkeit gegen Histomonaden *in vitro* zeigten die Ergebnisse, dass die Empfindlichkeit gegen Paromomycin nicht nur durch, Infektionsdosis und Dauer der Passagierung *in vitro* beeinflußt wird, sondern auch unterschiedliche Stämme eine unterschiedliche Empfindlichkeit besitzen. Es ist daher möglich, dass es Stämme von *H. meleagridis* gibt, die voll resistent gegen Paromomycin sind. Ferner lagen bei Hu und McDougald (2004) 12500 *H. meleagridis*/ml beim Start des Versuchs in den getesteten Kulturen vor, wobei die vollständig letale Dosierung von Paromomycin für *H. meleagridis* bei 100 µg/ml lag. In der vorliegenden Untersuchung wurden mit 20000 und 40000 *H. meleagridis*/ml zwei unterschiedliche Histomonadenzahlen beim Start des Versuchs verglichen. Nur bei der niedrigen Ausgangszahl von 20000 *H. meleagridis* /ml war die höchste getestete Dosierung (80 ppm) von Paromomycin vollständig letal für *H. meleagridis* ab dem 1. Tag p.i. Es konnte daher gezeigt werden, dass die Infektionsdose einen Einfluss auf die Medikationsdosierung hat. Bei dem Test unterschiedlicher Passagen zeigten sich Unterschiede in der Resistenz gegen Paromomycin nur am 1. und 2. Tag p.i. bei einer Dosierung von Paromomycin von 10 und 20ppm. Danach wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Passagen festgestellt.
Daher spielt vermutlich die Anzahl der Passagen bei Untersuchung der Wirksamkeit von Präparaten auf *H. meleagridis in vitro* eine untergeordnete Rolle.

Die Untersuchung von Paromomycinsulfat auf seine Wirksamkeit gegen Histomonaden bei Puten in *vivo* zeigte, dass die Gabe von Paromomycinsulfat (Gabbrovet®) im Trinkwasser ab 3 Tage vor der Infektion bis 12 Tage nach der Infektion zu einer erheblichen Senkung der Mortalität führte. So lag die Mortalität nach einer Gabe von 100mg/kg Gabbrovet® bei 10% und bei einer ständigen Gabe von 400 ppm HistoBloc® im Futter wurde die Mortalität

auf 20% verringert. Bei beiden Dauerreichungsformen von Paromomycinsulfat wurde der Läsionsgrad in Blinddärmen und Leber reduziert.

Die Ergebnisse der beiden Versuche stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen von Hu und McDougald (2004). Vermutlich spielt die Applikationsdauer des Medikaments vor der Infektion eine wichtige Rolle. Beim Gabbrovet® 70 Versuch begann die Behandlung 3 Tage vor der Infektion, beim histoBloc® Versuch wurde den Puten kontinuierlich ab dem Schlupf das Präparat verabreicht, während beim Versuch von Hu und McDougald (2004) die Behandlung erst am Tag der Infektion begann. Deshalb war bei den Versuchen im Rahmen der vorliegenden Arbeit zum Zeitpunkt der Infektion vermutlich ein ausreichender Wirkstoffspiegel vorhanden und daher wurde die Mortalität reduziert.

Außerdem könnte das Alter „Puten im Alter von 3-12 Wochen sind empfindlicher“ (McDougald, 2003), Tiere Spezies „Puten sind empfindlicher als Hühner“ (Curtis, 1907), Infektionsdosis „je höher desto kürzer die Inkubationszeit“ (Lund, 1955), der Histomonas-Stamm (hoch pathogen führt zur höheren Mortalität) und die Mischinfektion mit *E. Tenella* (die Mischinfektion mit *E. Tenella* macht den Infektionsverlauf stärker) die Mortalität beeinflussen (Hu et al. 2004; Hauck et al. 2006; Hess et al. 2006a). In der vorliegenden Arbeit können alle diese Faktoren die Ergebnisse beeinflussen.

Da die Läsionen bei Histomonose in der Leber auftreten, beeinflußt sie auch die Werte von Serum und Plasmaenzymen, die Indikatoren für Schäden in der Leber sind. So erhöhen sich die Blutwerte von AST (Asparaginsäureaminotransferase), LDH (Laktatdehydrogenase), MDH (Malatdehydrogenase), GLDH (Glutamatdehydrogenase) und Bilirubin bei Histomonose nach experimentellen Infektionen von Puten (Beg und Clarkson, 1970a; 1970b; McDougald und Hansen, 1970; Al-Khateeb und Hansen, 1974; Hirsch, 1979). Außerdem wurde eine Erhöhung der Werte von AST und LDH auch nach einer natürlichen Infektion von Puten mit Histomonaden nachgewiesen (Koncicki et al., 1999), dagegen fielen die Blutwerte dieser Enzyme bei Hühnern, wenn nur Läsionen im Blinddarm vorliegen (McDougald und Hansen, 1970). Eine Senkung des GOT-Spiegels gegenüber unbehandelten Gruppen wurde nach der Behandlung mit dem antihistomonalen Wirkstoff Salfuride erreicht (Al-Khateeb und Hansen, 1973).

Die Werte der Cholinesterase im Blut sinken nach der Infektion von Puten mit *H. meleagridis* (McDougald und Hansen, 1970). Ferner wurden ein Fallen des Albuminspiegels und eine Erhöhung des Globulins im Blut nach der Infektion von Puten und Hühnern mit Histomonaden festgestellt (Clarkson, 1966; McDougald und Hansen, 1969; Beg und Clarkson, 1970a; 1970b).

In dem vorliegenden Versuch fielen am 7.Tag p.i. bei der infizierten, unbehandelten Gruppe Albumin, Cholinesterase und LDH ab, außerdem stieg die Gallensäurekonzentration im Blut an, während die Werte für GOT und Gesamteiweiß unverändert blieben. Der Albuminspiegel im Blut nimmt nach der Infektion ab, wahrscheinlich da die Albumine in den entzündeten Geweben aus der Blutbahn austreten (Clarkson, 1966), während sich die Globulinwerte

erhöhen (McDougald und Hansen, 1970). Infolgedessen ist das Gesamteiweiß unverändert. Da bei den zwei überlebenden Puten am Ende des Versuchs keine Histomonaden nachgewiesen wurden, mag dies die abweichenden Ergebnisse von LDH und GOT erklären. Die Cholinesterase im Blut ist ein Maß für die Funktion der Leber, eine Erniedrigung der Enzymemenge im Blut durch Leberschäden wurde auch in anderen Untersuchungen bei mit Histomonaden infizierten Puten festgestellt (McDougald und Hansen, 1970). Da bei einer geschädigten Leber ebenfalls die Aufnahme von Gallensäuren in die Leber behindert ist, wird ihre Konzentration im Blut erhöht.

Bei der mit der höchsten Dosierung (100 mg/kg) behandelten Gruppe blieben das Albumin und die Plasmaenzyme zwischen dem 1. und 21. Tag p.i. im Bereich der Werte der nicht infizierten Gruppe. Die Ähnlichkeit zwischen beiden Gruppen deutet darauf hin, dass diese Tiere keine Leberschädigung hatten, weil die Läsionen in der Leber durch Paromomycinsulfat verhindert wurden. Bei den mit 25 mg/kg und 50 mg/kg behandelten Gruppen lagen die Werte von Albumin und Cholinesterase im Vergleich zu der nicht behandelten Gruppe niedriger, während AST und LDH 7 Tage später als dies bei den nicht behandelten Tieren erhöhte Werte aufwiesen. Die beiden Dosierungen konnten somit die Läsionen in der Leber verzögern aber nicht voll verhindern.

Schließlich wurde auch gezeigt, daß eine prophylaktische Anwendung von Paromomycin als Futterzusatzstoff gegen eine Infektion mit *H. meleagridis* wirksam ist. Die prophylaktische Anwendung kann somit dazu beitragen, bei Feldausbrüchen die Verluste ganzer Putenherden zu verhindern.

Nach Artikel 2 der EU-Verordnung Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung (EU. 2003) sind Futtermittelzusatzstoffe Stoffe die bewusst Futtermitteln oder Wasser zugesetzt werden, um spezielle Wirkungen zu erzielen. Die Bedingungen für die Zulassung sind in Artikel 5 (Nr. 3) beschrieben: “Der Futtermittelzusatzstoff muss eine kokzidiostatische oder histomonostatische Wirkung haben.“ Alle diese Definitionen und Anforderungen werden von Paromomycin (HistoBloc®) erfüllt.

Außerdem ist Paromomycin mit der Verordnung Nr. 1181/2002 (EU. 2002a) in Anhang I der Verordnung Nr. 2377/90 aufgeführt (EEU. 1990) und ist somit für lebensmittelliefernde Tierarten, außer für Tiere, von denen Milch oder Eier für den menschlichen Verbrauch gewonnen werden, als Wirkstoff zugelassen.

Im Ergebnis sind die Vorschriften zum Schutz der Tiere und der Konsumenten erfüllt. Im Hinblick auf diese Ergebnisse hat Paromomycin eine gute Chance als Futtermittelzusatzstoff in der nahen Zukunft registriert zu werden.

6 Zusammenfassung

Untersuchungen zur Pathogenese und Prophylaxe der Histomonose bei Geflügel

Zunächst wurden Versuche zur Pathogenese und Pathogenität vom *H. meleagridis* bei Puten und bei Hühnern durchgeführt. Nach der Infektion von Puten breitete sich der Erreger bis zum 10. Tag p.i. in fast allen Organen aus. Mittels Real-time PCR wurde die DNA von *H. meleagridis* ab dem 1. Tag p.i. im Blinddarm und ab dem 3. Tag p.i. in der Leber nachgewiesen. Ab dem 6. bzw. 8. Tag p.i. gelang der Nachweis in Lunge, Herz, Bursa cloacalis, Jejunum, Niere, Milz und Gehirn. Histopathologisch wurde der Parasit ab dem 5. Tag p.i. im Blinddarm und ab dem 6. Tag p.i. in der Leber nachgewiesen.

Danach wurde die Pathogenität von *H. meleagridis* nach experimenteller Infektion verschiedener Putenlinien verglichen. Die Mortalität betrug 95% bei Wildputen, 78% bei BUT-Big6 und 75% bei Kelly Bronzeputen. Wildputen hatten verglichen mit Kelly Bronzeputen und BUT-Big6 Puten mit weniger als 6 Tagen die kürzeste Inkubationszeit. Jedoch war bei allen Gruppen der Läsionsgrad in Lebern und Blinddärmen fast identisch.

Ferner wurde die Pathogenität von *H. meleagridis* nach einer experimentellen Infektion je einer Mast- und Legehühnerlinie verglichen. Die Mortalität betrug bei beiden Linien 0%. Histopathologisch waren die Infiltration von Entzündungszellen in Lamina propria und Submukosa sowie die Ablösung des Epithels in den Blinddärmen bei Legehühnern am 7. Tag p.i. deutlich ausgeprägter als bei Masthühnern. Der Parasit und seine DNA konnten histopathologisch sowie mittels Real-time PCR nicht nur in Blinddärmen und Lebern festgestellt werden, sondern auch in Herz, Lungen, Milz und Nieren.

Bei den Versuchen zur Prophylaxe der Histomonose wurde die Aktivität verschiedener Konzentrationen von Paromomycinsulfat gegen *H. meleagridis in vitro* und *in vivo* untersucht. Die Wirksamkeit von Paromomycinsulfat *in vitro* wurde von der Dosierung, dem verwendeten Stamm und der Inokulationsdosis beinflußt. *In vitro* zeigten alle getesteten Konzentrationen (10, 20, 40 und 80ppm) von Paromomycinsulfat ab dem 1. Tag p.i. eine hemmende Wirkung auf *H. meleagridis*. Einen vollständig letalen Effekt für *H. meleagridis* konnte nur bei 80ppm festgestellt werden.

In vivo wurde gezeigt, dass die Gabe von Gabbrovet® bei einer Dosierung von 100 mg/kg/Tag im Trinkwasser, 3 Tage vor der Infektion bis 12 Tage nach der Infektion zur Reduzierung der Mortalität führt. In allen Versuchsgruppen war ein Dosis-Wirkungs-Effekt erkennbar. So betrug die Mortalität der Gruppe 100 mg/kg 10%, der Gruppe 50 mg/kg 23%

und der Gruppe 25 mg/kg 50%. Die Mortalität der infizierten, nicht behandelten Gruppe, lag bei 90%.

Die Blutwerte GOT, LDH, Albumin, Gesamteiweiß, Cholinesterase und Gallensäuren wurden am 0., 7., 14. und 21. Tag p.i. bei mit *H. meleagridis* infizierten Puten und bei infizierten behandelten Puten mit Gabbrovet® sowie bei nicht infizierten Puten bestimmt. Bei der infizierten und nicht behandelten Gruppe wurde am 7.Tag p.i. eine Erniedrigung von Albumin, Cholinesterase und LDH festgestellt. Außerdem stieg die Gallensäure im Blut an, während GOT und Gesamteiweiß unverändert blieben. Bei der mit 100 mg/kg/Tag Gabbrovet® behandelten Gruppe blieben die Blutwerte im Bereich der Werte der nicht infizierten Tiere. Bei den mit niedrigeren Dosierungen behandelten Tiere traten die Verschiebungen der Blutwerte 14 Tage p.i. und somit eine Woche später als bei den unbehandelten Tieren auf.

Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Anwendung von HistoBloc® als Futterzusatzstoff im Putenfutter ab dem 1. Lebenstag erzielt. Die Infektion erfolgte am 21. Lebenstag. Die Mortalität der infizierten, nicht behandelten Gruppe betrug 80%. Hingegen betrug die Mortalität 73% bei der Gruppe 100 ppm, 43% bei der Gruppe 200 ppm und 20% bei der Gruppe, die 400 ppm erhielt. Eine Reduzierung der Läsionen in Lebern und Blinddärmen war erkennbar.

7 Summary

Investigations on Pathogenesis and Prophylaxis of Histomonosis in Poultry

Several experiments on the pathogenesis and pathogenicity of *H. meleagridis* were carried out, both in turkeys and in chickens. After infection of turkeys the parasite spreads within 10 days p.i. to almost all organs. Using Real-time PCR the DNA of *H. meleagridis* could be detected from 1st day p.i. in the caecum and 3rd day p.i. in the liver. In addition, the parasite's DNA was found in lung, heart, bursa cloacalis, jejunum, kidney, spleen and brain between day 6 to 8 p.i.. Histopathologically, the parasite was visible in the caecum and liver at 5th and 6th day p.i., respectively.

The pathogenicity of *H. meleagridis* after experimental infection was compared in different turkey lines. Mortality was 94.7% in wild turkeys, 77.7% in BUT-Big 6 and 75% in Kelly Bronze turkeys. The incubation period of less than 6 days in Wild turkeys was shorter than in the other two lines (Kelly Bronze turkeys and BUT-Big 6 turkeys). However, in all groups the lesion scores in livers and caeca were almost identical.

Furthermore, the pathogenicity of *H. meleagridis* was compared in a laying line and meat type chickens after experimental infection. Mortality was 0% in both lines. However, the histopathological changes were more pronounced in the laying line. They included Infiltration of inflammatory cells in lamina propria and submucosa and detachment of the epithelium in the caecum at day 7th p.i. The parasite and its DNA could be detected by histology and by PCR not only in the caecum and liver but also in heart, lung, spleen and kidneys.

Several trials were carried out *in vitro* to determine the efficacy of Paromomycin-Sulfat against *H. meleagridis.* The results showed that the effectiveness of Paromomycin-Sulfat was influenced by the used dose of the drug, the *H. meleagridis* strain and the inoculation dose of the parasite. All tested concentrations (10, 20, 40 and 80 ppm) of Paromomycin-Sulfat showed an inhibitory effect on *H. meleagridis* from 1 day p.i.. A complete lethality was obtained only by using 80 ppm Paromomycin-Sulfat.

Finally, two different experiments were carried *in vivo* to determine the efficacy of Paromomycin-Sulfat after experimental infection of turkey poults with *H. meleagridis*.
In the first experiment, administration of Gabbrovet® at a dose level of 100 mg/kg/day in drinking water 3 days before infection throughout 12 days after infection lead to significant reduction of the mortality. In all experimental groups a dose-response effect was seen. The mortality rate in group 100 mg/kg was 10 %. On the other hand the mortality rates in groups

50 mg/kg and in group 25 mg/kg were 23% and 50% respectively. Mortality in the untreated, infected group was 90%. A marked reduction of lesions in caeca and livers of treated groups could be observed.

The blood level of GOT, LDH, total protein, albumin, cholinesterase, and bile acids were measured 0, 7, 14, and 21 days p.i. in *H. meleagridis* infected turkeys, infected and Gabbrovet® 70 treated birds, and a non-infected, untreated control group. A decrease of the level of LDH, albumin, and cholinesterase and increased levels of the bile acids were observed in infected, untreated turkeys at 7th days p.i., meanwhile the level of GOT and total protein remained unchanged. In the 100 mg/kg/day Gabbrovet® treated group, the blood values remained in the range of values of the uninfected group. In birds treated with lower doses, shifts in the blood level were observed on the 14th day p.i. and thus one week later than in the untreated animals.

In the 2nd experiment HistoBloc®, a product based on Paromomycin-Sulfat, was administrated in the feed from day 1 till the end of experiment (day 42). The infection with *H. meleagridis* was done at the 21st day of age. Mortality in infected, untreated group was 80%. In contrast, the mortality was 73% in the group that received feed with 100 ppm, 43% in the group that received feed with 200 ppm, and 20% in the group that received 400 ppm. A marked reduction of lesions in caeca and livers of treated groups could be observed.

8 Literaturverzeichnis

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

Al-Khateeb, G. and Hansen, M. F. (1973): Plasma glutamic oxalacetic transaminase as related to liver lesions from histomoniasis in turkeys. Avian Dis. 17:269–273.

Al-Khateeb, G. and Hansen, M. F. (1974): Plasma enzymes as a measure of susceptibility of chickens and turkeys to infection with *Histomonas meleagridis*. Avian Dis.18:507-514.

Anonym (2006): Northern Ireland disease surveillance report, October to December 2005. Vet. Rec. 158: 845 – 848.

Anonym (2007): Parasitic gastroenteritis prevalent in calves and lambs, VLA surveillance report in August. Vet. Rec.161: 467-470.

Anonym (2009): Scottish agricultural college veterinary services disease surveillance report. Vet. Rec. 164: 256- 259

Arshad, N., Zitterl-Eglseer, K., Hasnain, S. and Hess, M. (2008): Effect of Peganum harmala or its beta-carboline alkaloids on certain antibiotic resistant strains of bacteria and protozoa from poultry. Phytother. Res. 22 (11): 1533-1538.

Bart, M. K. and Hoop, R. K. (2009): Diseases in chicks and laying hens during the first 12 years after battery cages were banned in Switzerland. Vet. Rec. 164:203-207.

Beg, M. K. and Clarkson, M. J. (1970a): Effect of Histomoniasis on the serum proteins of the fowl. J. Cow. Path. 80. 281-285.

Beg, M. K. and Clarkson, M. J. (1970b): Serum enzymes in Histomoniasis in the turkey. J. Cow. Path. 80:415-418.

Bilic, I., Leberl, M. and Hess, M. (2009): Identification and molecular characterization of numerous Histomonas meleagridis proteins using a cDNA library. Parasitol. 136 (4):379-391.

Bleyen, N., De Gussem, K., De Gussem J. and Goddeeris, B. M. (2007): Specific detection of Histomonas meleagridis in turkeys by a PCR assay with an internal amplification control. Vet. Parasitol. 143 (3-4):206-213.

Bleyen, N., Ons, E., Gussem, M. D. and Goddeeris, B. M. (2009): Passive immunization against Histomonas meleagridis does not protect turkeys from an experimental infection. Avian Path. 38(1):71-76.

Borst, G.H. and Lambers, G.M. (1985): Typhlohepatitis in ostriches (*Struthio camelus*) caused by a *Histomonas* infection. Tijdschr Diergeneeskunde. 110:536.

Bowen, T. E., Sullivan, T. W. and Grace, O. D. (1971): Effect of cupric sulfate on the prophylactic efficacy of three arsonic acid compounds against histomoniasis in young turkeys Poult Sci. 50(3):861-866.

Brener, B., Tortelly, R., Menezes, R. C., Muniz-Pereira, L. C. and 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., Watson, E. (2007): Treatment of histomonosis in turkeys with tiamulin.Vet.Rec.161:864.

Bushnell, L.D. and Jackley, J.G. (1918): Poultry diseases. Agricultural Experiment Station – Kansas State Agricultural College Circular No. 70:13-15.

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

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

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

Carlton, J. M., Hirt, R. P., Silva, J. C., Delcher, A. L., Schatz, M., Zhao, Q., Wortman, J. R., Bidwell, S. L., Alsmark, U. C., Besteiro, S., Sicheritz-Ponten, T., Noel, C. J., Dacks, J. B., Foster, P. G., Simillion, C., Van de, P. Y., Miranda-Saavedra, D., Barton, G. J., Westrop, G. D., Muller, S., Dessi, D., Fiori, P. L., Ren, Q., Paulsen, I., Zhang, H., Bastida-Corcuera, F. D., Simoes-Barbosa, A., Brown, M. T., Hayes, R. D., Mukherjee, M., Okumura, C. Y., Schneider, R., Smith, A. J., Vanacova, S., Villalvazo, M., Haas, B. J., Pertea, M., Feldblyum, T. V., Utterback, T. R., Shu, C. L., Osoegawa, K., de Jong, P. J., Hrdy, I., Horvathova, L., Zubacova, Z., Dolezal, P., Malik, S. B., Logsdon, J. M., Jr., Henze, K., Gupta, A., Wang, C. C., Dunne, R. L., Upcroft, J. A., Upcroft, P., White, O., Salzberg, S. L., Tang, P., Chiu, C. H., Lee, Y. S., Embley, T. M., Coombs, G. H., Mottram, J. C., Tachezy, J., Fraser-Liggett, C. M. and Johnson, P. J. (2007). Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. Sci. 315:207–212.

Carter, C. H., Bayles, A. and Thompson, P. E. (1962): Effects of paromomycin sulfate in man against *Entamoeba histolytica* and other intestinal protozoa. J Trop Med Hyg. 11:448-51.

Cepicka, I., V. Hamp and J. Kulda (2010): Critical Taxonomic Revision of Parabasalids with Description of one new Genus and three new Species. Protist.161: 400–433.

Chossat, L. (2002): L'Histomonose en production A.O.C. ''Dinde fermiere de Bresse'' essai de prevention par phytotherapie. Doctoral thesis, École Nationale Veterinaire D'Alfort Lyon, 20 Feb. 2002.

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

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. (1963): Immunological responses to *Histomonas meleagridis* in the turkey and fowl. Immun. 6:156-68.

Clarkson, M. J. (1966): Progressive serum protein changes in turkeys infected with *Histomonas meleagridis*. J. Cow. Path. 76:387-396.

Cortes, P. L., Chin, R. P., Bland, M. C., Crespo, R. and Shivaprasad, H. L. (2004): Histomoniasis in the bursa of fabricius of chickens. Avian Dis. 48:711-715.

Craig, J.F. (1930): Blackhead or infectious entero-hepatitis in turkeys. 4th World Poultry Congress (London). P.: 506-509.

Curtis, C. (1907): Notes on experiments with black-head of turkeys. USDA. Cir. 119., cited from Chute et al. (1976).

Duffy, C. F., Sims, M. D. and Power, R. F. (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. and Power, R. F. G. (2005): Evaluation of dietary Natustat™ for control of Histomonas meleagridis in male turkeys on infected litter. Avian Dis. 49: 423-425.

Dwyer, D. M. (1970): An improved method for cultivating *Histomonas meleagridis*. J. of Parasit. 56:191–192.

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

EU (2002a): Commission Regulation (EC) No. 1181/2002 of 1 July 2002 amending Annex I of Council Regulation (EEC) No. 2377/90: laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. Official J. of the Euro. Uni. L172:13–20.

EU (2002b): Council Regulation (EC) No 1756/2002 of 23 September 2002 amending directive 70/524/EEC concerning additives in feedingstuffs as regards withdrawal of the authorisation of an additive and amending Commission Regulation (EC) No 2430/1999. Official J. of the Euro. Uni. L 265-266.

EU (2003): Regulation (EC) No. 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. Official J. of the Euro. Uni. L 268:29-43.

EEU (1990): Council Regulation (EEC) No. 2377/90 of 26 June 1990: laying down a community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. Official J. of the Euro. Comm. L224: 1-48.

El-On, J., Jacobs, G. P.,Witztum, E. and Greenblatt, C. (1984): Development of topical treatment for cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania major in experimental animals. Antimicrob Agents Chem. 26:745-51.

Embley, T. M. (1997): Anaerobic eucaryote evolution: Hydrogenosomes as biochemically modified mitochondria Trends in Ecology and Evolution. 12:437-441.

Flowers, A.I., Hall, C.F. and Grumbles, L.C. (1965): Chemotherapy of histomoniasis of turkeys I. The value of 1:2-Dimethyl-5-Nitroimidazole in prevention and treatment. Avian Dis. 22:394-400.

Frank, J.F. (1953): A note on the experimental transmission of enterohepatitis of turkeys by arthropods. Can. Jou. of Comp. Med. and Vet. Sci. 17:230-231.

Garin, J. P., Despeignes, J. and Sirot, M. (1966): Paromomycin sulfate, an antibiotic active on digestive tract protozoa revealed also as a good taenicide. Lyon Med. 215:979-92.

Gerbod, D., Edgcomb, V. P., Noel C., Zenner L., Wintjens, R., Delgado-Viscogliosi, P., Holder, M. E., Sogin, M. L., and Viscogliosi, E. (2001): Phylogenetic position of the trichomonad parasite of turkeys, Histomonas meleagridis (Smith) Tyzzer, inferred from small subunit rRNA sequence. J. Eukaryotic Microbiol. 48:498–504.

Gerth, Ch., Rüdiger-Boesch, B., Schmidt, U., Mumme, j. and Friedhoff, K.T. (1985): Histomoniasis in einer Junghennenherde und deren Auswerkung auf die spätere Leistung. Tierärztl. Prax. 13:519-527.

Grabensteiner, E. and Hess, M. (2006): PCR for the identification and differentiation of Histomonas meleagridis, Tetratrichomonas gallinarum and Blastocystis spp. Vet. Parasitol. 142: 223-230.

Grabensteiner, E., Arshad, N. and 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. and 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.

Grabensteiner, E., Liebhart, D., Weissenbock, H. and 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.

Graybill, H.W. (1921): The incidence of Blackhead and occurrence of *Heterakis papillosa* in a flock of artificially reared turkeys. Jour. of Exp. Med. 33:667-673.

Graybill, H.W. (1922): IPECAC in the treatment of blackhead in turkeys. J. of Pharm. and Exp. Thera. 20:115-119.

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

Hafez, H. M. and Hauck, R. (2005): Histomonas meleagridis: allgemeine Situation in Deutschland und Bekämpfungsansätze in: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft/ Fachgruppe Geflügelkrankheiten. Hannover, 69 Fachgespräch 21.5.2005. P. 53-59.

Hafez, H. M. and Zimmerman, M. (2003): Histomoniasis. Problems related to diagnosis, therapy and prophylaxis. In Turkey Production: Bbalance act between consumer protection, animals wefare and economic aspects. Ed. Hafez, H.M. Verlag Ulmer, ISBN 3-8001-3850-6. P.22-28.

Hafez, H. M., Hauck, R., Lüschow, D. and McDougald, L. R. (2005b): 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. and Lüschow, D. (2005a): Histomonas meleagridis: the situation after the ban of the last available drug in the EU. Proceedings of the 54th Western Poultry Disease Conference, Vancouver, BC. P. 36–38.

Hafez, H.M. (2003): New emerging and recurrent diseases in poultry. Prax. Vet. 51(3):159-174.

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

Hafez, H.M., Hauck, R., Hoffmann, T. and Lüschow, D. (2004): Dissemination of *Histomonas meleagridis* in different organs after natural infection in meat turkeys. Proceedings of the 5th International Symposium on Turkey Diseases Berlin (Ed. Hafez, H.M.). P. 250-253.

Hafez, H.M., Mazaheri, A., Prusas, C., Böland, K., Pöppel, M. and Schulze, D. (2001): Aktuelle Geflügelkrankheiten bei Legehennen im Zusammenhang mit alternativen Haltungssystemen. Tierärzt Prax. 29:168-74.

Hafez, H.M., Zimmermann, M. and Lüschow, D. (2003): Aktuelle Untersuchungen zur Histomonadose. 64. Fachgespräch, 6 -7 November 2003. Hannover. ISBN 3-930511-91-6. P. 30- 35.

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

Hauck, R., Armstrong, P. L. and McDougald, L. R. (2010b): Histomonas meleagridis (Protozoa: Trichomonadidae): analysis of growth requirements in vitro. J Parasitol 96:1-7.

Hauck, R., Lotfi, A. and Hafez, H. M. (2010c): Factors Influencing the Activity of Tiamulin Against Histomonas meleagridis in vitro. Avian Dis. 54:936–938.

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

Hauck, R. and Hafez, H. M. (2010): Systematic position of histomonas meleagridis based on four Protein genes. J. Parasitol. 96: 396-400.

Hauck, R. and McDougald, L. R. (2007): Interaction between Histomonas meleagridis and bacteria. Proceedings of the 4th International Symposium on Turkey production Berlin, Germany 21st – 23rd June pp. 247- 254. Edited by Hafez M. H. ISBN-10: 3-86664-356-X.

Hauck, R., Fuller, A. L., Greif G. and L. R. McDougald (2010d): Evaluation of Nifurtimox for Potential Use in Control of Histomoniasis in Turkeys. Avian Dis. 54:28-32.

Hauck, R. and 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., Lüschow, D. and 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.

Hess, M., Grabensteiner, E. and Liebhart, D. (2005): The benefit of molecular methods to detect Histomonas meleagridis, Tetratrichomonas gallinarum and Blastocystis spp. Proceedings of the 3rd International Symposium on Turkey production Berlin, Germany 9th - 11th June. pp 250-253. Edited by Hafez M. H. ISBN 3-89820-993-8.

Hess, M., Grabensteiner, E. and 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 Path. 35: 280-285.

Hess M., Liebhart D., Grabensteiner E. and Singh A. (2006b): Clonal cultures of Histomonas meleagridis, Tetratrichomonas gallinarum and a Blastocystis sp. established through micromanipulation. Parasitol. 133: 547-554.

Hess, M., Liebhart, D., Grabensteiner, E. and 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.

Hirsch, R. P (1979): Dynamics of protozoan population density, plasma glutamic oxalacetic transaminase and plasma bilirubin concentrations during histomoniasis in turkeys. Int. J. Parasit. 9:395-399.

Horton-Smith, C. and Long, P.L. (1955): The infection of chickens (*Gallus gallus*) with suspension of blackhead organism *Histomonas meleagridis*. Vet. Rec. 67:478.

Horton-Smith, C. and Long, P.L. (1956): Studies on histomoniasis. I. The infection of chickens (*Gallus gallus*) with histomonad suspensions. Parasit. 46:79-90.

Hu, J. and McDougald, L. R. (2003): Direct lateral transmission of Histomonas meleagridis in turkeys. Avian Dis. 47: 489-92.

Hu, J., Brooks, M., Fuller, A. L., Armstrong, P. and McDougald, L. R. (2008): Histomonas meleagridis (Parabasala, Trichomonadea, Monocercomonadidae): presence of natural agglutinins in horse serum. Parasitol. Res. 102(3): 365-369.

Hu, J. and McDougald, L. R. (2002): Effect of anticoccidials and antibiotics on the control of blackhead disease in broiler breeder pullets. J. Appl. Poult. Res. 11:351-357.

Hu, J. and McDougald, L. R. (2004): The efficacy of some drugs with known antiprotozoal activity against *Histomonas meleagridis* in chickens. Vet. Parasit. 121:233-238.

Hu, J., Fuller, L. and McDougald, L.R. (2004): Infection of turkeys with *Histomonas meleagridis* by the cloacal drop method. Avian Dis. 48:746-750.

Huber, K., Chauve, C. and Zenner, L. (2005): Detection of Histomonas meleagridis in turkey's cecal droppings by PCR amplification of the small subunit ribosomal DNA sequence. Vet. Parasitol. 131(3-4): 311-6.

Huber, K., Reynaud, M. C., Callait, M. P. and Zenner, L. (2006): Histomonas meleagridis in turkeys: dissemination kinetics in host tissues after cloacal infection. Poult. Sci. 85: 1008-1014.

Jaquette, D. S. and Marsden, S. J. (1947): Tests with Mapharsen and Metachloridine in the Treatment of Blackhead in Turkeys. Poult. Sci. 26: 218-219.

Joyner, L. P. (1963): Immunity to histomoniasis in turkeys following treatment with dimetridazole. J. Comp Path. 73:201–207.

Jung, A., Ryll, M., Glünder, G. und Rautenschlein, S. (2009): Course of infection with Histomonas meleagridis in a turkey flock. Dtsch tierärztl Wochenschr 116, 392–397. DOI 10.2376/0341-6593-116-392. ©2009 M. & H. Schaper GmbH, ISSN 0341-6593.

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

Kemp, R.L. and Franson, J.C. (1975): Transmission of Histomonas meleagridis to domestic fowl by means of earthworms recovered from pheasant yard soil. Avian Dis. 19(4):741-744.

Kemp, R.L. and Springer, W.T. (1978): Protozoa, Histomoniasis. In Diseases of poultry. Seventh edition. Edited by Hofstad, M. S., Calnek, B. W., Hemboldt, C. F., Reid, W. M. and Yoder, H.W., Iowa State University Press, Ames, P. 832-840.

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

Kösters, J. (1992): Histomonadose: in Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels Band 2 Spezieller Teil 2, Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart. P. 345-352.

Lee, D. L., P. L. Long, Millard, B. J. and Bradley, J. (1969): The fine structure and method of feeding of the tissue parasitizing stages of *Histomonas meleagridis*. Parasit. 59:171-184.

Liebhart, D. and Hess, M. (2009): Oral infection of turkeys with in vitro-cultured Histomonas meleagridis results in high mortality. Avian Pathol. 38(3): 223-227.

Liebhart, D., Grabensteiner, E. and 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., Weissenbock, H. and Hess, M. (2006): In-situ hybridization for the detection and identification of Histomonas meleagridis in tissues. J. Comp. Pathol. 135: 237-242.

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

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

Lund, E. E. (1955): The progress of histomoniasis (blackhead) in turkeys as related to the size of the infective dose. Poult. Sci. 34:127-130.

Lund, E. E. (1956): Oral transmission of *Histomonas* in turkeys. Poult. Sci. 35:900-904.

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

Lund, E. E. (1963): *Histomonas wenrichii* n. sp. (Mastigophora: Mastigamoebidae), a nonpathogenic parasite of gallinaceous birds. J. of Protozool. 10:401-404.

Lund, E. E. (1967a): 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. (1967b): *H. meleagridis* after 1000 in vitro passages. J. of Protozool. 14:349-351.

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

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

Lund, E. E., Wehr, E. E. and Ellis, D. J. (1966a): Earthworm transmission of *Heterakis* and *Histomonas* to turkeys and chickens. J. of Parasit. 52(5):899-902.

Marx, D. J. (1973): Turkey bursa of Fabricius infected with *Histomonas meleagridis*. J. of Protozool. 20:519.

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

McDougald, L. R. (2005b): Blackhead disease: the continuing saga. Proceedings of the 3rd International Symposium on Turkey production Berlin, Germany 9th - 11th June. Edited by Hafez M. H. ISBN 3-89820-993-8. P 244-249.

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

McDougald, L. R. (2003): Protozoal infections coccidiosis. In: Diseases of poultry. Saif, Y. M., Barnes, H. J., Glisson, J. R., Fadly, A. M., McDougald, L. R., and Swayne, D. E. eds. Iowa State University Press, Ames, IA. P. 974-991.

McDougald, L. R. (2005a): Blackhead Disease (Histomoniasis) in Poultry: A critical review. Avian Dis. 49:462-476.

McDougald, L. and Galloway, R. (1973): Blackhead Disease: In vitro isolation of Histomonas meleagridis as a potentially useful diagnostic aid. Avian Diseases 17, 847-850.

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

McDougald, L. R. and Hansen, M. F. (1970): *Histomonas meleagridis*: Effect on Plasma Enzymes in Chickens and Turkeys. Exp. Parasit. 27:229-235.

McDougald, L. R. and 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. (2007): Control of blackhead disease (Histomoniasis) for today and in the future. Proceedings of the 4th International Symposium on Turkey production Berlin, Germany 21st – 23rd June. Edited by Hafez M. H. ISBN-10: 3-86664-356-X. P. 240-246.

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

McNaughton, J. L. and Skinner, J. T. (2000): Effects of nitarsone as an aid in the prevention of blackhead in replacement chickens challenged with *Histomonas meleagridis* carried by nematodes. (August 18–20, 2000) Montreal, Quebec, Canada. Poultry Science Association P. 208.

Mielewczik, M., Mehlhorn, H., Al-Quraishy, S., Grabensteiner, E. and Hess M. (2008): Transmission electron microscopic studies of stages of Histomonas meleagridis from clonal cultures. Parasitol. Res. 103: 745-750.

Minodier, P. and Parola, P. (2007): *Cutaneous leishmaniasis* treatment. Travel Med. Infect. Dis. 5:150-158.

Müller, M. (1975): Biochemistry of protozoan microbodies: peroxisomes, alphaglycerophosphate oxidase bodies, hydrogenosomes. Ann. Rev. of Microb. 29:467-483.

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

Ponce, G. F., Herrera, S., Castro, A. T., Garcia Duran, B. and Martinez Diaz, R. A. (2002): Parasites from farmed ostriches (Struthio camelus) and rheas (Rhea americana) in Europe. Vet. Parasit. 107: 137-60.

Popp, C. and Hafez, H. M. (2007): Recent Histomonas meleagridis outbreak in commercial turkey flock: a case report. Proceedings of the 4th International Symposium on Turkey production Berlin, Germany 21st – 23rd June. Edited by Hafez M. H. ISBN-10: 3-86664-356-X. P. 233- 239

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. and Kaiser P. (2009): The turkey, compared to the chicken, fails to mount an effective early immune response to Histomonas meleagridis in the gut. Parasit. Immun. 31: 312-327.

Reynaud, M. C., Zenner, L., Alogninouwa, T. and Chauve, C. M. (2005): Comparison of the susceptibility to Histomonas meleagridis infection of two strains of turkey (Meleagris gallopavo): preliminary study. Rev. Méd. Vét. 156:620–623.

Schulze, HW. (1975): Über das Auftreten von Schwarzkopfkankheiten bei Legehennenaufzuchten in Norddeutschland. Prakt. Tierarzt. 3: 164-168.

Schuster, F.L. (1968): Ultrastructure of *Histomonas meleagridis* (Smith) Tyzzer, A parasitic amebo-flagellate. J. of Parasit. 54:725-737.

Senties-Cué, G., Chin, R. and Shivaprasad, P. (2009): Systemic Histomoniasis associated with high mortality and unusual lesions in the bursa of Fabricius, kidneys and lungs in commercial turkeys. Avian Dis. 53: 231–238.

Shivaprasad, H. L., Sentíes-Cué, G., Chin, R. P., Crespo, R., Charlton, B. and Cooper, G. L. (2002): Blackhead in turkeys, a re-emerging disease? In: Proceedings of the 4th International Conference on Turkey Diseases. Berlin, Germany. 15- 18 May. Ed. Hafez H. M. ISBN 3 936815-58-5. P. 143-144.

Sims, M.D. and Danny, M.H. (2002): Efficacy of Nitarsone, Monensin or Nitarsone Followed by Monensin, in Female Turkeys in Litter Pens and Exposed to Coccidial (25 Days) and Cochlosomal (28 Days) Inoculations. Int. J. of Poult. Sci. 1:164-166.

Singh, A., Weissenbock, H. and 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. Parasit.118: 505-513.

Skinner, J. T. (2000): Effects of nitarsone as an aid in prevention of blackhead in turkeys challenged with Histomonas meleagridis carried by nematodes. In Proc. Arkansas Poult. Symp, Springdale. P. 97-99.

Smith, T. (1895): An infectious disease among turkeys caused by protozoa (infectious enterohepatitis). Bureau of animal industry united States, Department of Agriculture. Bull. 8:7-15.

Springer, W.T., Johnson, J. and Reid, W.M. (1970): Histomoniasis in gnotobiotic chickens and turkeys: biological aspects of the role of bacteria in the etiology. Exp. Parasit. 28:383-92.

Swales, W. E. (1948): Enterohepatitis (Blackhead) in turkeys – Observations on transmission by the caecal worm (Heterakis gallinae). Canadian J. of Comp. Med. and Vet. Sci. 12:97-100.

Swales, W. E. (1950): Enterohepatitis (Blackhead) in turkeys – V. Further experiments on chemotherapy. Canadian J. of Comp. Med. and Vet. Sci. 14:118-125.

Tyzzer, E. E. (1923): Arsenical compounds in the treatment of blackhead in turkeys. J. of Exp. Med. 37:851-873.

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

Tyzzer, E. E. (1933b): The immunizing properties of an attenuated strain of *Histomonas meleagridis*. J. Parasit. 19:158.

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

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

Tyzzer, E. E. and 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 sulphur. J. of Exp. Med. 35:791-812.

Tyzzer, E.E. (1920): The flagellate character and reclassification of the parasite producing“blackhead” in turkeys - *Histomonas* (gen. nov.) *meleagridis* (Smith). J. of Parasit. 6:124-131.

Tyzzer, E.E. (1927): Entero-Hepatitis in turkeys and its transmission through the agency of *Heterakis Vesicularis*. Proc. 3rd World’s Poultry Congress, Toronto, Canada. P.286–290.

Van der Heijden H. and Landman W. (2007b): In vitro and in vivo activity of herbal products against Histomonas meleagridis. Proceedings of the 4th International Symposium on Turkey production Berlin, Germany 21st – 23rd June. Edited by Hafez M. H. ISBN-10: 3-86664-356-X. P255-257.

Van der Heijden, H. M. and Landman, W. J. (2007a): Improved culture of Histomonas meleagridis in a modification of Dwyer medium. Avian Dis. 51:986-988.

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

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

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

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

Van der Heijden, H. M., Landman, W. J., Greve, S. and Peek, R. (2006): Genotyping of Histomonas meleagridis isolates based on Internal Transcribed Spacer-1 sequences. Avian Path. 35: 330-334.

Vexenat, J. A., Olliaro, P. L., Fonseca de Castro, J. A., Cavalcante, R., Furtado Campos, J. H., Tavares, J. P. and Miles, M. A. (1998): Clinical recovery and limited cure in canine visceral *leishmaniasis* treated with aminosidine (paromomycin). J. Trop. Med. Hyg. 58:448-53.

Vatne, R. D., Baron, R. R., and Morehouse, N. F. (1969): Histomonastatic activity of nifursol in chickens. Poult. Sci. 48:2157-2160.

Wegeforth, H. M. and Wegeforth, P. (1921): Observations on the effect of ipecac in the treatment of infectious enterohepatitis (blackhead) in turkeys. J. of Pharm. and Exp. Thera. 17:249-259.

Wenrich, D. H. (1943): Observations on the morphology of Histomonas (Protozoa, Mastigophora) from pheasants and chickens. J. Morph. 72: 279-303.

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

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

Teile der Arbeit wurden bereits in folgenden Veröffentlichungen vorgestellt:

1. Lotfi, A. und Hafez, H. M. (2007): Untersuchung zur Histomoniasis bei Puten nach experimenteller Infektion. In 2. Doktoranden Symposium, Freien Universität Berlin. Berlin, 08 Juni 2007. pp.15.

2. Lotfi, A. and Hafez, H. M. (2007): *Histomonas meleagridis* infection in different turkey lines. 4th International Symposium on Turkey Production. Berlin, 21st – 23rd June 2007. Edited by Hafez M. H. pp. 228-262.

3. Hafez, H. M., Lotfi, A. and Comte, S. (2008): Efficacy of drinking water application of paromomycin at different doses against *Histomonas meleagridis* in experimentally challenged turkey poults. 7th International Symposium on Turkey Diseases Berlin, 19th - 21st May 2008. Edited by Hafez M. H. pp. 69-72.

4. Lotfi, A. und Hafez, H. M. (2008): Untersuchungen zur Wirksamkeit von Paromomycin-Sulfat (Gabbrovet) gegen Histomoniasis bei Puten. In 3. Doktoranden Symposium, Freien Universität Berlin, Berlin, 27 Juni 2008. pp. 65-66.

5. Lotfi, A., and H. M. Hafez (2009): Susceptibility of different turkey lines to *Histomonas meleagridis* after experimental infection". Parasitol Res. Parasitol Res (2009) 105:113-116.

6. Hafez, H. M., Lotfi, A., Hauck, R. and De Gussem, K. (2009): Efficacy of Paromomycin in the feed against *Histomonas meleagridis* in experimentally challenged turkey poults. 5th International Symposium on Turkey Production Berlin, 28th - 30st May 2009. Edited by Hafez M. H. pp. 53-54.

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

Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich sehr bei Herrn Prof. Dr. Dr. H. M. Hafez, Leiter des Institutes für Geflügelkrankheiten der Freien Universität Berlin, für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Unterstützung bei allen Fragen. Er hat mir Einblicke in die Arbeit in allen Bereichen der Geflügelmedizin und der Geflügelwirtschaft gewährt und mir die Mitarbeit an aktueller Forschung und die Mitwirkung bei Kongressorganisationen ermöglicht. Ich möchte Herrn Prof. Dr. Dr. H. M. Hafez auf diesem Weg auch dafür danken, dass Prof. Dr. Dr. H. M. Hafez als Chef des ganzen Instituts hinter seinen Mitarbeitern steht und seine Menschlichkeit behalten hat.

Mein Dank gilt Dr. R. Hauck für das wissenschaftliche Korrekturlesen und die Unterstützung bei Durchführung sowie Auswertung der Arbeit.
Frau Dr. D. Lüschow möchte ich danken für die Einarbeitung in die Molekularbiologie sowie die freundliche Unterstützung.
Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. M. Lierz für die kompetente Beantwortung von Fragen zur Diagnostik und Therapie von Ziervogelkrankheiten.
Des Weiteren bedanke ich mich bei allen weiteren Mitarbeitern des Institutes für die jeweilige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeiten.
Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. H. Mehlhorn, Leiter des Institutes für Zoomorphologie, Zytologie und Parasitologie der Heinrich Heine Universität Düsseldorf, und seiner Diplomandin Frau M. Munsch für die nette Zusammenarbeit und die gemeinsamen Veröffentlichungen.
Ich bedanke mich bei Frau H. Czech für das grammatische Korrekturlesen und die freundliche Unterstützung.
Ich bedanke mich bei Herrn Elsayed Abdelwahab für die nette Zusammenarbeit.
Ich bedanke mich bei Herrn Philipp Olias vom Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin für die Einarbeitung in die Histopathologie und die nette Zusammenarbeit.
Mein Dank gilt auch meinen Mitdoktoranden für die schöne Zeit, die wir zusammen im Doktorandenzimmer vorgebracht haben.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meiner syrischen Regierung, die mich während meiner Zeit in Deutschland finanziert hat, und ohne die diese Dissertation nicht durchführbar gewesen wäre.

Mein besonders herzlicher Dank gilt meiner lieben Frau Taghred für die Betreuung unserer Kinder Jawad, Jody und Jory, die dauernde Unterstützung, einfach für die ganze Zeit und Hilfe, die sie mir gegeben hat, um die Doktorarbeit zu erledigen. Ohne Sie wäre meine Doktorarbeit schwer zu schaffen gewesen!

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig ausschließlich der angegebenen Literatur und Hilfen angefertigt zu haben.

Berlin, den 04.02.2011

AbdulRahman Lotfi