

**Morphologische und molekularbiologische
Untersuchungen (PCR und REA der 5,8S rRNA-Region)
an *Trichomonas gallinae* und *Tetratrichomonas gallinarum*
verschiedener Vogelarten**



Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Birgit Heidi Marion Knispel

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2005

© 2005 by Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH, Gießen
Printed in Germany

ISBN 3-938026-64-2

Verlag: DVG Service GmbH
Frankfurter Straße 89
35392 Gießen
0641/24466
geschaeftsstelle@dvg.net
www.dvg.net

Aus der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische
der Justus Liebig Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. E. F. Kaleta

**Morphologische und molekularbiologische
Untersuchungen (PCR und REA der 5,8S rRNA-Region)
an *Trichomonas gallinae* und *Tetratrichomonas gallinarum*
verschiedener Vogelarten**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Birgit Heidi Marion Knispel

Tierärztin aus Koblenz

Gießen 2005

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. F. Kaleta
2. Berichterstatter: Prof. Dr. C. Greveling

Tag der mündlichen Prüfung: 22.11.2005

Inhaltsverzeichnis**Abkürzungen**

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	<i>Trichomonas</i> spp.	3
2.1.1	Taxonomie von <i>Trichomonas</i> spp.	3
2.1.2	Terminologie der Erkrankungen durch Trichomonaden	6
2.1.3	Vorkommen von Trichomonaden	6
2.1.3.1	Vorkommen beim Vogel	6
2.1.3.2	Vorkommen beim Säugetier	8
2.1.3.3	Vorkommen beim Mensch	9
2.1.4	Morphologie der Trichomonaden	9
2.1.5	Aufbau der Trichomonaden	10
2.1.6	Vermehrung der Trichomonaden	11
2.2	Trichomonosis der Vögel	12
2.2.1	Epidemiologie der Trichomonosis	12
2.2.2	Pathogenese der Trichomonosis	14
2.2.3	Immunologie der Trichomonosis	16
2.2.4	Klinisch-manifeste Erkrankung Trichomonosis	17

2.2.4.1	Trichomonosis der Taube	17
2.2.4.2	Trichomonosis des Greifvogels	18
2.2.4.3	Trichomonosis des Wellensittichs	18
2.2.4.4	Trichomonosis des Huhns, der Pute und der Ente	19
2.2.4.5	Trichomonosis des Fasans und der Wildente	19
2.2.5	Pathologie der Trichomonosis	20
2.2.5.1	Pathologie bei Taube, Greifvogel und Wellensittich	20
2.2.5.2	Pathologie bei Huhn, Pute und Ente	22
2.2.6	Histopathologie der Trichomonosis	23
2.3	Nachweis- und Differenzierungsmöglichkeiten	25
2.3.1	Diagnostik der Trichomonosis	25
2.3.2	Differentialdiagnosen der Trichomonosis	28
2.3.3	Molekularbiologische Methoden	28
2.3.3.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	30
2.3.3.1.1	rRNA	30
2.3.3.2	Restriktionsenzymanalyse (REA)	32
2.3.3.3	Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)	32
2.3.3.4	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	32
2.4	Therapie	33

2.4.1	Chemotherapeutika gegen Trichomonosis	33
2.4.2	Chemoprophylaxe gegen Trichomonosis	34
2.5	Fragestellungen der eigenen Untersuchungen	35
3	Material und Methoden	37
3.1	Material	37
3.1.1	Herkunft der Isolate	38
3.1.2	Medien, Lösungen und Reagenzien	47
3.1.3	Anzuchtmedien für Trichomonaden	52
3.1.3.1	Diamond-TYM-Medium	52
3.1.3.2	Hühner-Embryo-Fibroblasten	53
3.1.3.3	Hühner-Embryo-Leber-Zellen	53
3.1.4	DNA-Präparations Kit	54
3.1.5	Oligonukleotidprimer und Thermocycler Temperaturprogramm	54
3.1.6	Restriktionsenzyme	56
3.1.7	Geräte und Verbrauchsmaterialien	57
3.2	Methoden	59
3.2.1	Probenentnahme	59
3.2.2	Anzüchtung und Konservierung der Isolate	59
3.2.3	Überprüfung der Beweglichkeit	60

3.2.4	Färberische Darstellung der Trichomonaden	60
3.2.4.1	Dauerpräparat ohne vorherige Fixierung	60
3.2.4.2	Dauerpräparat mit vorheriger Fixierung	61
3.2.5	PCR-vermittelte Speziesidentifizierung	61
3.2.5.1	Polymerasekettenreaktion	61
3.2.5.2	Präparation der Protozoen-DNA	62
3.2.5.3	Durchführung der PCR	64
3.2.5.4	Restriktionsverdau	65
3.2.5.5	Agarosegelelektrophorese	65
3.2.5.6	Ethidiumbromidfärbung und Dokumentation	67
3.2.6	Typisierungsverfahren	68
3.2.6.1	RAPD	68
3.2.6.1.1	DNA-Präparation und Durchführung der PCR	68
3.2.6.1.2	Agarosegelelektrophorese, Färbung und Dokumentation	68
3.2.6.2	Pulsfeldgelelektrophorese	69
3.2.6.2.1	DNA-Präparation	69
3.2.6.2.2	Restriktionsverdau	69
3.2.6.2.3	Pulsfeldgelelektrophorese	70
3.2.6.2.4	Färbung und Dokumentation	70

4	Ergebnisse	71
4.1	Klinische Befunde	71
4.2	Pathologische Befunde	72
4.3	Befunde beim Nativpräparat	73
4.4	Befunde beim fixierten und gefärbten Präparat	73
4.5	Folgerungen aus der Morphologie für die Systematik	77
4.6	Anzucht von Trichomonaden	78
4.7	Konservierung angezüchteter Trichomonaden	78
4.8	Speziesidentifizierung	79
4.8.1	Amplifizierung des 5,8S rRNA-Abschnitts	79
4.8.2	Nachweis von Genpolymorphismen mittels Enzymverdau	79
4.8.2.1	<i>Bse</i> LI	80
4.8.2.2	<i>Mse</i> I	83
4.8.2.3	<i>Taq</i> I	86
4.8.2.4	<i>Tas</i> I	88
4.8.2.5	<i>Vsp</i> I	91
4.9	Typisierung	93
4.9.1	Typisierung durch RAPD-PCR	93
4.9.2	Typisierung durch Pulsfeldgelelektrophorese	94

5	Diskussion	95
5.1	Klinik der Trichomonose	95
5.2	Identifizierung der Trichomonaden	97
5.3	Differenzierung von Trichomonaden	97
5.4	Anzucht und Konservierung von Trichomonaden	98
5.5	Molekularbiologische Untersuchungen	101
5.5.1	PCR	101
5.5.1.1	REA	101
5.5.1.1.1	Beurteilung nach Enzymen	102
5.5.1.1.2	Beurteilung nach Vogelgruppen	103
5.5.1.1.3	Folgerung	106
5.5.2	Sequenzierung	109
5.6	Folgerungen aus den morphologischen und genetischen Befunden für die Systematik	110
5.7	Abschlussbemerkungen	112
6	Zusammenfassung	113
7	Summary	115
8	Literaturverzeichnis	116
	Danksagung	

Abkürzungen

Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
ATCC	American Type Culture Collection
BME	Basal Medium Eagle mit Earle'schen Salzen
bp	Basenpaare
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPB	Dulbecco's Phosphate Buffer
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FKS	fetales Kälberserum
HEF	Hühner-Embryo-Fibroblasten
HELZ	Hühner-Embryo-Leber-Zellen
LMP	low melting point
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
pH	Potentia hydrogenii (negativer dekadischer Logarithmus der Hydronium-Ionen-Konzentration)
p.i.	post infectionem
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
REA	Restriktionsenzymanalyse
REM	Restriktionsenzymmuster
rRNA	ribosomale DNA
S	Svedberg-Einheit
SPF	spezifiziert pathogenfrei
sp.	Spezies
spp.	Spezies (Plural)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

1 Einleitung

Die Erfindung des Lichtmikroskops im 18. Jahrhundert erschloss den Forschern die bis dahin unbekannte Welt des Mikrokosmos. Es dauerte nicht lange, bis MÜLLER (1773) die ersten Trichomonaden fand, die er als *Cercaria tenax* ansprach. DONNÉ (1836) isolierte solche „Tierchen“ an den Geschlechtsorganen des Menschen und konnte Trichomonaden einer bestimmten Erkrankung zuordnen. Er nannte sie *Trico-monas vaginale*. Es folgte eine intensive Erforschung, bei der viele verschiedene Arten gefunden und lichtmikroskopisch unterschieden wurden (RIVOLTA, 1878; RIEDMÜLLER, 1928; SIMITCH, 1939 und andere). In den 50er Jahren wurden die ersten trichomonadenspezifischen Chemotherapeutika erprobt und zugelassen (STABLER und MELLENTIN, 1953), die mit der Zeit immer weiter verbessert wurden. Bedingt durch die großen Therapieerfolge wurde die bis dahin rege Forschung stark zurückgefahren, da allein bei Betrachtung der klinischen Heilung die wesentlichen praktischen Probleme als gelöst erschienen. Und wirklich scheint die Deckseuche des Rindes und die Trichomoniasis des Menschen dank Hygienemaßnahmen und der Chemotherapie fast besiegt zu sein. Beim Vogel hat sich trotz Medikamentengabe die Trichomonose in den Beständen gehalten (KALETA et al., 1990). Es muss regelmäßig mit einem Nitroimidazolpräparat behandelt werden, um wirtschaftlichen Schäden vorzubeugen.

1995 wurden Nitroimidazole in Anhang IV der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 aufgenommen, da eine für den Menschen schädliche Wirkung nicht ausgeschlossen werden kann (KROKER et al., 2002). Somit wurden die chemotherapeutischen Möglichkeiten zur Behandlung lebensmittelliefernder Tiere immer weiter eingeschränkt. Am 31. März 2003 lief die Übergangsfrist für das letzte Mittel zur Prophylaxe (Nifursol®) nach der Verordnung (EWG) Nr. 1756/2002 ab, in der dem Mittel die Zulassung entzogen wird. Dadurch stehen die Tierärzte und

Tierhalter vor den alten Problemen, die bereits vor der Zulassung von Chemotherapeutika mit nachgewiesener Wirkung gegen Flagellaten bestanden (SCHAAF, 1937). Wegen der heutzutage gehaltenen großen Tierbestände hat sich die Lage erheblich verschärft. Mehrfach ist es bereits bei Puten zum seuchenhaften Auftreten von *Histomonas meleagridis* in Intensiv-Beständen gekommen (REDMANN et al., 2003) und ähnliches steht für Trichomonaden zu befürchten (BONDURANT and HONIGBERG, 1994).

Vor diesem Hintergrund wird klar, warum die Wiederaufnahme von intensiver Forschung sehr wichtig ist. Taxonomische Klarheit ist eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche epidemiologische und klinische Forschung. Leider sind die bisherigen Untersuchungsergebnisse zur Taxonomie noch sehr unbefriedigend.

Diese Arbeit soll einen Beitrag leisten (i) zum Nachweis von Flagellaten beim Hausgeflügel sowie bei Zier- und Wildvögeln, (ii) zur Mikromorphologie der angezüchteten Flagellaten und (iii) zur systematischen Einordnung mittels genetischen Untersuchungen der 5,8S rRNA-Region. Von diesen Erkenntnissen sollen später hygienische und klinische Maßnahmen abgeleitet und gezielte Prophylaxemaßnahmen durchgeführt werden können.

2 Literaturübersicht

2.1 *Trichomonas* spp.

Bei den Protozoen der Gattung *Trichomonas*, die umgangssprachlich meist als Trichomonaden bezeichnet werden, handelt es sich um Flagellaten, also begeißelte Einzeller.

2.1.1 Taxonomie von *Trichomonas* spp.

Die Protozoen der Gattung *Trichomonas* wurden zum ersten Mal von MÜLLER (1773) als *Cercaria tenax* beschrieben. DONNÉ (1836) fand *Trichomonas vaginalis* beim Menschen und konnte sie als Erster einer bestimmten Erkrankung zuordnen. Die Erstbeschreibung beim Vogel erfolgte von RIVOLTA (1878) als *Cercomonas gallinae* des Huhns.

Zunächst wurden die Namen *Trichomonas gallinae* und *Trichomonas columbae* als Synonyme gebraucht (LEVINE, 1985; VOGEL, 1992). 1938 spricht sich STABLER gegen den Namen *Trichomonas columbae* und für den Namen *Trichomonas gallinae* aus, da RIVOLTA (1878) als Erstautor die Trichomonaden aus dem Kropf *Cercomonas gallinae* nannte. Erst 1880 kam durch RIVOLTA und DELPRATO der Zusatz *columbae* auf. Sie beschrieben dabei jedoch Flagellaten des Dünndarms bei der Taube, bei denen es sich auch um Hexamiten gehandelt haben könnte. So kommt STABLER (1938) zu der Auffassung, dass allein *Trichomonas gallinae* (RIVOLTA, 1878) der korrekte Name für Trichomonaden aus dem Kropf der Taube ist.

Tetratrichomonas gallinarum besitzt üblicherweise ebenso wie *Trichomonas gallinae* vier Vorderflagellen. McDOWELL (1953) weist jedoch darauf hin, dass einige Individuen mit drei oder fünf Vorderflagellen zu finden sind. Eine Konsequenz für die Taxonomie zieht er daraus jedoch nicht.

Trichomonaden werden in der neueren einschlägigen Literatur vielfach anhand des Wirtes und der Morphologie unterschieden. LEVINE (1985) unterteilt die Familie Trichomonadidae in die Unterfamilien Trichomonadinae und Tritrichomonadinae. Trichomonadinae unterteilt er anhand der Zahl der Geißeln in vier Gattungen

Trichomonas	das hintere Flagellum ragt nicht über den Körper hinaus, 4 Vorderflagellen
Trichomitus	das hintere Flagellum ragt über den Körper hinaus, 3 Vorderflagellen
Tetratrachomonas	das hintere Flagellum ragt über den Körper hinaus, 4 Vorderflagellen
Pentatrachomonas	das hintere Flagellum ragt über den Körper hinaus, 5 Vorderflagellen

Die Unterfamilie Tritrichomonadinae hat 3 Vorderflagellen und keine Pelta.

Die vogelrelevanten Trichomonadidae unterteilt LEVINE (1985) weiter allein anhand der Wirtsvogelart in

<i>Tritrichomonas eberthi</i>	bei Hühnern und Puten
<i>Trichomonas gallinae</i>	bei Tauben
<i>Tetratrachomonas gallinarum</i>	bei Hühnervögeln
<i>Tetratrachomonas anatis</i>	bei Enten
<i>Tetratrachomonas anseris</i>	bei Gänsen
<i>Pentatrachomonas</i> spp.	bei Hühnern und Puten

HIEPE (1992) unterscheidet beim Vogel die Familie Trichomonadidae in die Gattungen Trichomonas und Tritrichomonas. Er unterteilt sie nach der Wirtsvogelart und zusätzlich nach der Lokalisation im Verdauungstrakt in

Gattung Trichomonas

<i>Trichomonas gallinae</i>	Tauben	Oropharynx, Ösophagus
<i>Trichomonas gallinarum</i>	Puten und Hühnern	Blinddärmen
<i>Trichomonas anatis</i>	Enten	vorderer Digestionstrakt
<i>Trichomonas phasiani</i>	Fasane	Blinddärme

Gattung Tritrichomonas

<i>Tritrichomonas eberthi</i>	Geflügel	Blinddärme
-------------------------------	----------	------------

In seiner aktuellen Auflage empfiehlt MEHLHORN (2001) folgende Taxonomie

Reich	Animalia	
Unterreich	Protozoa	
Stamm	Sarcomastigophora	
Unterstamm	Mastigophora	
Klasse	Zoomastigophorea	
Ordnung	Trichomonadida	
Familie	Trichomonadina	
Gattungen	Trichomonas	
	- <i>Trichomonas gallinae</i>	Vorkommen im oberen Verdauungstrakt und in der Leber bei Huhn und Taube
	Tetratrichomonas	
	- <i>Tetratrichomonas ovis</i>	Vorkommen beim Schaf
	Tritrichomonas	
	- <i>Tritrichomonas foetus</i>	Vorkommen beim Rind
	Pentatrichomonas	
	- <i>Pentatrichomonas gallinarum</i>	Vorkommen im Zäkum von Huhn, Pute und Taube

2.1.2 Terminologie der Erkrankungen durch Trichomonaden

Man unterscheidet begrifflich die Trichomonose der Tiere und die Trichomoniasis des Menschen (KASSAI et al., 1988). Trichomonaden kommen zum einen im Urogenitaltrakt vor; das bekannteste Krankheitsbild ist das der Deckseuche beim Rind (*Tritrichomonas foetus*) (RIEDMÜLLER, 1928) bzw. einer Geschlechtskrankheit des Menschen (*Trichomonas vaginalis*) (DONNÉ, 1836). Zum anderen kommen sie im oberen (*Trichomonas gallinae*) (RIVOLTA, 1878) bzw. unteren (*Tetratrichomonas gallinarum*) (MARTIN und ROBERTSON, 1911) Verdauungstrakt bei Vögeln vor. Zudem findet man Trichomonaden bei vielen Tieren und beim Menschen als Kommensalen auf unterschiedlichen Schleimhäuten (LEVINE, 1961).

2.1.3 Vorkommen von Trichomonaden

2.1.3.1 Vorkommen beim Vogel

Trichomonas spp. kommen weltweit ubiquitär vor (VOGEL, 1992; BONDURANT and HONIGBERG, 1994). Bereits bei vielen Vogelarten konnten im Kropf parasitierende *Trichomonas gallinae* nachgewiesen werden.

Es findet sich in der Literatur immer wieder die Feststellung, die Haustaube (*Columba livia* f. domestica) und die verwilderte Haustaube (*Columba livia* f. urbana) dienen als Erregerreservoir und Primärwirt (BONDURANT and HONIGBERG, 1994). Beide stammen von der Felsentaube (*Columba livia*) ab.

Doch auch bei anderen Taubenarten wurde *Trichomonas gallinae* gefunden: bei der Bandtaube, *Columba fasciata* (STABLER, 1951), der Türkentaube, *Streptopelia decaocto*, der Carolinataube, *Zenaida macroura* (OSTRAND et al., 1995), der Weissflügeltaube, *Zenaida asiatica* (CONTI et al., 1985), der Lachtaube, *Streptopelia risoria* (KIETZMANN, 1993) und bei „Wildtauben“ (BOCH und SCHNEIDAWIND, 1988).

Eine der ersten Publikationen über Trichomonadenfunde beim Greifvogel ist die von STABLER (1941). Er beschreibt natürliche und alimentäre Infektionen mit *Trichomonas gallinae* bei einer Vielzahl von Greifvögeln (Rotschwanzbussard, *Buteo borealis*; Rotschulterbussard, *Buteo lineatus*; Merlin, *Falco columbarius*; Buntfalke, *Falco sparverius*; Wanderfalke, *Falco peregrinus*; Präriefalke, *Falco mexicanus* und andere) und Eulen (Ost-Kreischeule, *Otus asio*; Schleiereule, *Tyto alba*; Virginia-Uhu, *Bubo virginianus*; Schneeeule, *Nyctea nyctea*). Weitere Fallstudien gibt es vom Graubussard, *Buteo nitidus* (STENSRUDE, 1965), vom Steinadler, *Aquila chrysaetos* (BEECHAM and KOCHERT, 1975), vom Weißkopfschneepfaffen, *Haliaeetus leucocephalus* (STONE and NYE, 1981), vom Habicht, *Accipiter gentilis* (COOPER and PETTY, 1988), vom Rundschwanzsperber, *Accipiter cooperii* (BOAL et al., 1998), vom Habichtsadler, *Hieraaetus fasciatus* (REAL et al., 2000), vom Sakerfalken, *Falco cherrug* (SAMOUR and NALDO, 2005) und von anderen Greifvögeln.

FRIEDHOFF (1982) beschreibt das Wirtsspektrum von *Trichomonas gallinae* als bemerkenswert breit. Es umfasst Taubenvögel, Hühnervögel, Greifvögel, Sperlinge, Finken, Papageienvögel (Ara, Graupapagei, Amazone, Kakadu) und Möwen. Auch NARCISI et al. (1991) nennen ein weites Wirtsspektrum: Taube, Huhn, Wellensittich, Pute, Wachtel, Kanarienvogel, Sperling und Greifvogel. GARNER (1992) berichtet über die Trichomonadeninfektion einer Blaustirnamazone (*Amazona aestiva*) und BAKER (1986) beschreibt die Erkrankung von Wellensittichen (*Melopsittacus undulatus*) durch *Trichomonas gallinae*. Auch beim Reisfinken (*Padda oryzivora*) konnten Trichomonaden nachgewiesen werden (CALLENDER and SIMMONS, 1937).

In Blinddärmen von Hühnern parasitierende *Tetratrichomonas gallinarum* wurden zuerst von MARTIN und ROBERTSON (1911) beschrieben. Sie nannten die Protozoen *Tetratrichomonas gallinarum* und *Tritrichomonas*

eberthi. Beide Arten kommen bei galliformen Vögeln, vor allem bei Huhn (*Gallus gallus*) und Pute (*Meleagris gallopavo*), aber auch bei Perlhuhn (*Numida meleagris*), Wachtel (*Coturnix coturnix*) und Rebhuhn (*Perdix perdix*) vor (LEVINE, 1985; BONDURANT and HONIGBERG, 1994). Auch das Vorkommen bei der Gans, *Anser anser* f. *domestica* (HEGNER, 1929), der Ente, *Anas platyrhynchos* f. *domestica* (KOTLÁN, 1923) und dem Fasan, *Phasianus colchicus* (HIGGINS, 1980; BOCH und SCHNEIDAWIND, 1988) wurde dokumentiert.

Zudem wurden bei Huhn und Pute *Trichomonas gallinae* beschrieben. Wie bei der Taube wurden sie im Ösophagus und im Kropf gefunden und hatten keine über das Körperende hinausragende Flagelle (HAWN, 1937; STABLER, 1954).

2.1.3.2 Vorkommen beim Säugetier

Weiterhin kommen *Trichomonas* spp. auch bei anderen Tierarten vor.

Beim Rind wird die wirtschaftlich bedeutende Deckseuche von *Tritrichomonas foetus* (RIEDMÜLLER, 1928) verursacht. Als apathogen gelten *Tetratrichomonas ovis* (ROBERTSON, 1932) beim Schaf, *Pentatrichomonas bovis*, *Tetratrichomonas pavlovi* (LEVINE, 1961) und *Tritrichomonas enteris* (CHRISTL, 1954).

Beim Pferd: *Trichomonas equibuccalis* (SIMITCH, 1939) und *Tritrichomonas equi* (FANTHAM et al., 1921).

Beim Schwein die apathogenen Spezies *Tritrichomonas suis* (GRUBY et DELAFOND, 1843), *Trichomitus rotunda* (HIBLER et al., 1960) und *Tetratrichomonas buttreyi* (HIBLER et al., 1960).

Bei der Katze die Mundhöhlen-assoziierten *Trichomonas felistomae* (HEGNER and RATCLIFFE, 1927 a; GOTHE et al., 1992).

Beim Hund die Mundhöhlen-assoziierten *Trichomonas canistomae* (HEGENER and RATCLIFFE, 1927 b; BREUKER, 1995).

2.1.3.3 Vorkommen beim Mensch

Beim Menschen kommen *Trichomonas vaginalis* (DONNÉ, 1836), *Trichomonas tenax* (MÜLLER, 1773; DOBELL, 1939), *Pentatrichomonas hominis* (DAVAINE, 1860) und *Trichomitus fecalis* (CLEVELAND, 1928) vor.

2.1.4 Morphologie der Trichomonaden

Alle Trichomonaden sind begeißelte und formveränderliche Protozoen. Ihr Körper ist birnen- bis lanzettförmig. Die Länge von *Trichomonas gallinae* liegt im Mittel bei 16,7 µm (BONDURANT and HONIGBERG, 1994). *Trichomonas vaginalis* des Menschen wurde in der Vergangenheit am intensivsten erforscht. Die gewonnenen Erkenntnisse können zum großen Teil auf andere pathogene *Trichomonas*-Arten wie *Trichomonas gallinae* übertragen werden, da sie sich in vielen Eigenschaften entsprechen (KIETZMANN, 1993). *Trichomonas vaginalis* können als Schwimmform oder als amöboide Kriechform in Erscheinung treten (PFAFF, 1964). Zudem wurden auch übergroße Rundformen beschrieben (PFAFF, 1964, HONIGBERG and BRUGEROLLE, 1990, ABONYI, 1992). Laut ABONYI (1992) sind sie 26 bis 56 µm groß, vielkernig und vielbegeißelt. Die Art ihrer Entstehung und ihrer Bedeutung sind unbekannt (siehe Kapitel 2.1.6).

Die Unterscheidung zwischen *Trichomonas gallinae* und *Tetratrichomonas gallinarum* erfolgt über das Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein der über das Körperende hinausragende Flagelle.

2.1.5 Aufbau der Trichomonaden

KOPRLA (1978) beschreibt den Aufbau von *Trichomonas vaginalis* sehr ausführlich.

Der Kern liegt am vorderen Ende der Einzeller. Ihn umgibt der Achsenstab (Axostyl) einseitig und löffelartig. Er verläuft durch den Zellkörper und ragt hinten heraus. Seine apikale Fortsetzung nennt sich Pelta.

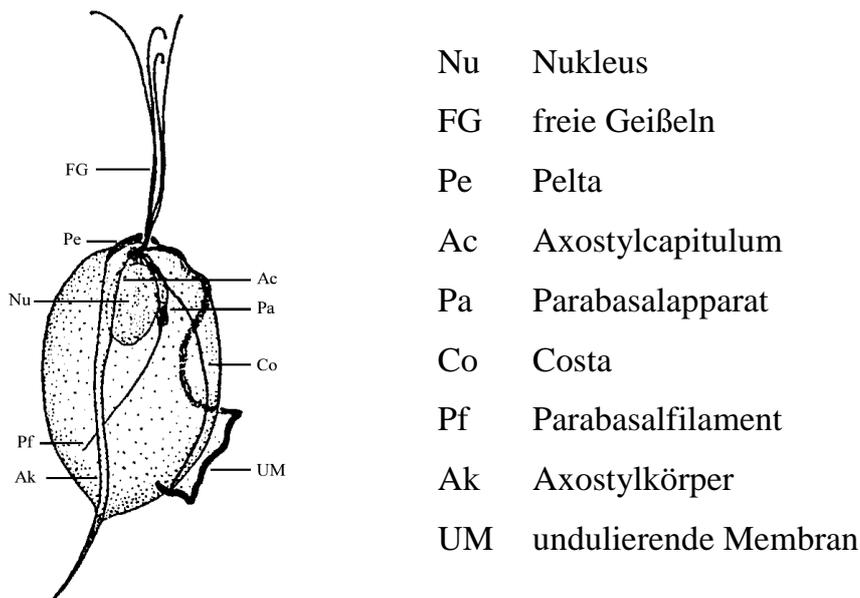
Der Achsenstab dient als permanentes Zytoskelett und ist an der Bildung und Erhaltung der Gestalt maßgeblich beteiligt. Auf der dem Achsenstab abgewandten rechten Seite des Kerns liegt der Parabasalapparat (System aus Golgi-Lamellen). Am vorderen Zellpol liegt auch der Basalkörperkomplex aus dem die Geißeln, der Achsenstab und die Costa entspringen. Er besteht bei *Trichomonas*-Arten aus fünf Basalkörpern, die bei der Mitose die Teilungsebene bestimmen.

Der vordere Zellpol zeigt eine außerordentliche Beweglichkeit. Vermutlich ist der Basalkörperkomplex das Zentrum zur Koordination der Zellbewegung und des Geißelschlags. Das Parabasalfilament verbindet die Basalkörper mit dem Parabasalkörper.

Es gibt drei bis fünf freie Geißeln und eine rückschlagende Geißel, die zusammen mit einer Zytoplasmafalte die undulierende Membran bildet. Innerhalb der Zytoplasmafalte liegt die Marginallamelle.

Die Costa verläuft innerhalb der Zelle bogenförmig unterhalb der undulierenden Membran. Sie ist nur im Elektronenmikroskop sichtbar. Auf der dem Kern abgewandten Seite des Achsenstabes liegen die paraaxostylare Granula. Dabei handelt es sich um Promitochondrien, der Vorstufe von Mitochondrien.

KOPRLA (1978) fand heraus, dass sich bei aeroben Kulturbedingungen aus den Granula Mitochondrien bilden, bei anaeroben Bedingungen bilden sie sich wieder zurück. Oft liegen im Zytoplasma mit Bakterien gefüllte Nahrungsvakuolen (BONDURANT and HONIGBERG, 1994).



Figur 1: *Trichomonas gallinae*-Zeichnung. Aus: Trichomonads of Veterinary Importance von BONDURANT und HONIGBERG (1994) modifiziert.

2.1.6 Vermehrung der Trichomonaden

KOPRLA (1978) beschreibt die Vermehrung als Mitose. Es handelt sich um eine vom Basalkörper ausgehende Längsteilung. Dabei fungiert der Basalkörper als Kinetozentrum. Die Teilung beginnt mit der Verdopplung des Vorderpols und es entstehen zwei gleich große Tochterzellen. Es werden Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase unterschieden. Sie schreibt weiter, dass eine Meiose nicht stattfindet.

ABONYI (1992) führte kontinuierliche Lebendbeobachtungen der Rundformen in einer Mikrokammer durch. Es wurden dabei die Mehrfachteilung der vielkernigen, vielbegeißelten Rundformen beobachtet. Die Ausknospung erfolgt nacheinander im amöboiden Zustand. HONIGBERG und BRUGEROLLE (1990) halten die Rundform jedoch für ein degeneratives Stadium, das unter ungünstigen Bedingungen entsteht.

PFAFF (1964) interpretiert sie ganz anders, nämlich als Zystenform, die eine widerstandsfähige Dauerform darstellt und bei ungeeigneten Umweltbedin-

gungen gebildet wird. BONDURANT und HONIGBERG (1994) bestreiten entschieden die Existenz von Zystenformen.

2.2 Trichomonosis der Vögel

Die meisten *Trichomonas* spp. kommen anscheinend als Kommensalen im Dickdarm vor. Nur zwei Arten haben ein unstrittig bewiesenes pathogenes Potenzial: *Trichomonas gallinae* und *Tritrichomonas foetus* (BONDURANT and HONIGBERG, 1994).

2.2.1 Epidemiologie der Trichomonosis

Die Trichomonosis der Tauben ist vor allem eine Jungvogelerkrankung. Die Erstinfektion erfolgt vor allem in direkter horizontaler Übertragung von den inapparent infizierten Elterntieren durch die Kropfmilch und das gekröpfte Futter auf die Nestlinge (LEVINE, 1985). Die Infektionspforte ist somit der vordere Digestionstrakt. Auch über den Nabel der frischgeschlüpften Küken kann die Infektion erfolgen, eine vertikale Übertragung über das Ei erfolgt jedoch nicht (SCHAAF, 1937; KOCAN and HERMAN, 1971). Bei experimentell infizierten Eiern stirbt der Embryo immer ab (MÜLLER, 1967).

Infektionsversuche sind fast nur bei Jungvögeln erfolgreich. Als prädisponierende Faktoren werden Begleitflora, Haltungsbedingungen, Fütterung, Konstitution und vorhergehende Erkrankung genannt (SCHAAF, 1937). Eine indirekte alimentäre Übertragung wird ebenfalls beschrieben (VOGEL, 1992). Erkrankte Tiere lassen größere Futterstücke, welche sie aufgrund der Rachenläsionen nicht schlucken können wieder fallen. Dieses kontaminierte Futter kann dann von gesunden Tieren gefressen werden, die sich so infizieren können (KOCAN and HERMAN, 1971).

Die Taube wird in der Literatur als Primärwirt und als Infektionsquelle für andere Vogelarten genannt. Als Ausgangspforte dienen Nase, Augen und

Schnabel (STABLER, 1954). BONDURANT und HONIGBERG (1994) schreiben, dass die Übertragung auf andere Vögel über das Trinkwasser erfolgt, jedoch nicht über den Kot. MÜLLER und GOTTSCHALK (1970) beschreiben als einzige auch eine mögliche Übertragung über eine Schmierinfektion mit Kot. Eine Übertragung kann indirekt nur über ein feuchtes Medium erfolgen, da *Trichomonas* spp. sehr empfindlich gegenüber Austrocknung sind (LEVINE, 1985). KALETA et al. (1990) untersuchten die Überlebenszeit von *Trichomonas* sp. in verschiedenen Medien bei Zimmertemperatur. In Leitungswasser begann die Überlebensrate der Trichomonaden bereits nach zwei Stunden rapide abzusinken.

BOOS (zitiert nach HAUSER, 1956) stellte in Reihenuntersuchungen einen Verseuchungsgrad von 73–82 % in Taubenbeständen fest.

HARMON et al. (1987) schreiben, dass nur die Bestände der endemischen Galapagostaube, *Zenaida galapagensis*, die keinen Kontakt zu infizierten Haustauben haben, trichomonadenfrei sind. Diese Beobachtung legt nahe, dass für endemische Taubenpopulationen die Haustaube als Infektionsquelle dient.

Die Unterschiede in der Empfänglichkeit der verschiedenen Vogelarten sind sehr stark ausgeprägt. CONTI et al. (1985) dokumentieren unterschiedliche Prävalenzen von Trichomonaden bei verschiedenen Taubenarten (Weissflügeltaube, *Zenaida asiatica* und Carolinataube, *Zenaida macroura*). Aber auch innerhalb einer Population gibt es mehr oder weniger empfängliche Tiere. Es sind immer wieder die Nachzuchten einzelner Zuchtpaare besonders betroffen (SCHAAF, 1937, KALETA et al., 1990).

Die Infektion von Greifvögeln erfolgt über infizierte Futtertauben (LEVINE, 1985). Lebende Trichomonaden können viele Stunden post mortem in einem Taubenkadaver gefunden werden (ERWIN et al., 2000). STABLER (1941) infizierte erfolgreich verschiedene Greifvogelarten mit Trichomonaden von Tauben.

Die Rolle der Taube als Infektionsherd verdeutlichen auch die beiden folgenden Untersuchungen:

BOAL et al. (1998) beobachteten bei urbanen Populationen des Rundschwanzsperbers, *Accipiter cooperii* eine signifikant höhere Jungvogelsterblichkeit. Elterntiere mit urbanem Jagdrevier brachten ihren Jungen in Stadtnähe deutlich mehr Tauben als Futtertiere im Vergleich zu den Vögeln mit ländlichem Jagdrevier. Die Jungvogel-Morbidität bei urbanen Populationen lag bei 85 %, bei ländlichen Populationen lag sie bei 9 %. Aber *Trichomonas gallinae* scheint nur bei den Küken persistieren zu können.

REAL et al. (2000) stellten einen deutlichen Populationsrückgang bei den Habichtsadlern, *Hieraaetus fasciatus* fest, nachdem diese ihre Futtergewohnheiten geändert hatten und sich vermehrt von Tauben ernährten. Auf diese Problematik aufmerksam geworden wurden auch Trichomonadenfunde bei anderen Adlern bekannt. Ähnliche Befunde erhoben HÖFLE et al. (Manuskript in Vorbereitung) beim Habichtsadler, *Hieraaetus fasciatus*.

Nach BONDURANT und HONIGBERG (1994) sowie LEVINE (1985) erfolgt die Infektion von Puten und Hühnern vor allem über Trinkwasser, das infizierte Tauben kontaminierten. HAWN (1937) gelang die experimentelle Infizierung von Tauben mit *Trichomonas gallinae* von Puten. Er beobachtete weiterhin Verluste von bis zu 73 % bei adulten und bis zu 87 % bei jungen Puten durch *Trichomonas gallinae*. Nach LEIBOVITZ (1973) ist die nekrotische Enteritis der Enten, an der Trichomonaden zumindest beteiligt sind, vor allem eine Alttiererkrankung. Jungtiere seien selten betroffen.

2.2.2 Pathogenese der Trichomonosis

Trichomonas gallinae sind zunächst nur im vorderen Verdauungstrakt zu finden (BONDURANT and HONIGBERG, 1994). Pathogene Stämme können je nach bevorzugten Prädilektionsstellen von dort über die Blutzirkulation in Richtung

Leber (beim Jones' Barn- oder Eiberg-Stamm) oder in Richtung Kopf (Sinus, Auge, Gehirn; beim Mirza-Stamm) gelangen.

SCHAAF (1937) schreibt, dass es bei Taubennestlingen durch die Schnabelspitze der Elterntiere zu Verletzungen am Gaumendach hinter der letzten Querfalte und an der Rachenhöhle kommen kann. Dadurch kann die Infektion von der Prädilektionsstelle Rachenschleimhaut im Bereich der Rachenpapille über das Blut weiterverbreitet werden. Er isolierte *Trichomonas gallinae* aus der Leber und der Lunge. Später fand man heraus, dass pathogene *Trichomonas gallinae*-Stämme sich an die Epithelzellen von Rachen und Ösophagus anheften können und dort eine amöboide Struktur entwickeln (KIETZMANN, 1993). Dies steht im direkten Zusammenhang zur Pathogenität, da sie keine Verletzung als Eintrittspforte brauchen (HEATH, 1981).

VOGEL (1992) unterscheidet eine subklinisch-latente *Trichomonas gallinae*-Infektion bei Dauerausscheidern und eine manifeste Erkrankung vor allem bei Jungtieren. Aber auch bei erwachsenen Tieren kann es im Rahmen einer Immunsuppression durch Stressoren oder bei genetischer Disposition zu einer manifesten Erkrankung kommen. Hochpathogene *Trichomonas gallinae*-Stämme, wie zum Beispiel der Jones' Barn-Stamm, führen bei nicht immunkompetenten Tieren immer zu einer manifesten Krankheit. Die Jungvogelerkrankung wird durch die mechanische Irritation im Rachen durch spezifisch strukturiertes Futter (grannenhaltiges Getreide, Bruchkörner, Steinchengrit) begünstigt.

Der *Trichomonas*-Stamm und die Vogelart bestimmen die klinische Manifestation. So kommt es laut NARCISI et al. (1991) nur bei der Taube zu einer Organinvasion, wie zum Beispiel beim Eiberg-Stamm, der „lebergängig“ ist.

GEHRLEIN (zitiert nach FRITZSCHE, 1955) beobachtet hinsichtlich der Häufigkeit diagnostizierter Erkrankungen der Taubennestlinge ausgeprägte jahreszeitliche Schwankungen. Die Zahl der Tiere mit Symptomen steigt im April an und bleibt bis August auf einem hohen Niveau. Das Eindringen in die

inneren Organe wird durch Stress-Situationen, Vitaminunterbilanz, Krankheitsdisposition und eine ungünstige Jahreszeit begünstigt.

Die Virulenz der einzelnen Stämme ist sehr verschieden (BONDURANT and HONIGBERG, 1994). Die Art und Menge der Begleit-Bakterienflora kann sie beeinflussen, sowie kleinste Schleimhautverletzungen, die sich der Jungvogel bei der Kröpfung der ersten gröberen Nahrungsbestandteile ab der 2. bis zur 3. Lebenswoche zuzieht. Auch scheint die Größe der Trichomonaden mit der Pathogenität zu korrelieren. MEHTA und VERMA (1981) fanden bei Kulturen von kleinen *Trichomonas vaginalis* Individuen eine stärkere Entzündungsreaktion, als bei Kulturen von großen Individuen.

Tetratrichomonas gallinarum parasitiert im Darm. WEINZIRL (1917) beobachtet eine höhere Prävalenz der Erkrankung zur wärmeren Jahreszeit. LEE (1972) infiziert 3 bis 6 Wochen alte Hühnerküken erfolgreich intrakloakal. Er bewies die pathogene Wirkung von *Trichomonas gallinarum* für Hühner. LEIBOVITZ (1973) fand bei Zuchtenten eine ausgeprägte jahreszeitliche Schwankung. Die Inzidenz steigt im Herbst zur Brutsaison und fällt erst im Frühling wieder ab. Eine vergleichbare jahreszeitliche Schwankung beobachtete HAWN (1937) bei Puten.

2.2.3 Immunologie der Trichomonosis

Nach FRIEDHOFF (1982) kommt es zu keiner sterilen Immunität. Trichomonadenfreie Tauben besitzen also weder eine Immunität noch eine Altersresistenz. Bei latent infizierten Tauben liegt hingegen eine Infektionsimmunität (Prämunität) vor (VOGEL, 1992). Eine Infektion mit einem weniger pathogenen Stamm verursacht somit eine Immunität gegen einen hochpathogenen Stamm (LEVINE, 1985). BONDURANT und HONIGBERG (1994) vermuten, dass humorale Antikörper vor einer Trichomonadeninfektion schützen können. Es besteht eine Kreuzimmunität gegen Trichomonadenstämme verschiedener

Herkunft. Unterschiede gibt es in der Kapazität eine Immunantwort zu stimulieren; sie ist höher bei apathogenen Stämmen. Wenn Tauben das Plasma von infizierten Tauben injiziert bekommen haben, sind sie durch eine passive Immunität vor einer Erkrankung, jedoch nicht vor der Infektion geschützt (KOCAN, 1970). Ein pathogener Stamm büßt bei der Passage durch immunkompetente Tiere nichts seines pathogenen Potenzials ein (STABLER, 1954).

2.2.4 Klinisch-manifeste Erkrankung Trichomonosis

2.2.4.1 Trichomonosis der Taube

Das klinische Bild der Trichomonose ist sehr vielschichtig. Manifeste klinische Bilder findet man vorwiegend bei Jungvögeln (LEVINE, 1961). Man unterscheidet die Rachen-Schlund-Trichomonose, die Trichomonose der inneren Organe, die Nabel-Trichomonose und Mischformen (VOGEL, 1992).

Nach einer Inkubationszeit von 2 bis 8 Tagen kommt es zuerst zu der Rachen-Schlundform, die mit örtlich begrenzten Belägen in der Schnabelhöhle einhergeht. Bei Brieftauben beklagen die Besitzer vor allem eine verminderte Flugleistung und auch das glanzlose Gefieder.

Wenn die Erkrankung nicht fortschreitet und es bei den Belägen auf den Rachenblättern bleibt, ist eine spontane Genesung möglich. Als Residuen bleiben fehlende oder deformierte Papillenzacken an den Gaumenblättern zurück. Beim protrahierten Verlauf der Rachen-Schlundform können die Beläge infolge blockierter Nahrungsaufnahme oder Atmung zum Tod führen (VOGEL, 1992). Die gelblich-käsigen Beläge können bis bohngroß werden (ROMMEL, 1992). Aus der Rachen-Schlund-Trichomonose kann bei pathogenen Trichomonadenstämmen die Trichomonose der inneren Organe hervorgehen. Die Symptome sind unspezifisch. Die Tiere sind apathisch, das Gefieder ist aufgeplustert. Es kommt zu Verdauungsstörungen, fortschreitender Abmagerung und Entkräftung. Hier ist die Letalität selbst nach Behandlung sehr hoch (VOGEL, 1992).

Bei der Nabel-Trichomonose handelt es sich um die Folge einer Nabelinfektion. Das Allgemeinbefinden ist häufig nur gering gestört. Kommt es zu einer Infiltration des Nabelgewebes innerhalb der ersten Lebenswochen, folgt die innere Form der Trichomonose. Sie kann dann seuchenartig mit beträchtlichen Verlusten auftreten (SCHAAF, 1937).

2.2.4.2 Trichomonosis des Greifvogels

Die Trichomonose ist bei Greifvögeln vor allem eine Jungtiererkrankung. Nach HEIDENREICH (1995) scheinen Habichte, Sperber und Falken empfänglicher zu sein als andere Greifvögel. Bei ihnen kommt, wie bei der Taube, eine Rachen-Schlundform vor, die in eine Trichomonose der inneren Organe übergehen kann. Die ersten Symptome sind eine Stomatitis mit Läsionen und üblen Geruch der Atemluft. Zum Teil kommt es bei der generalisierten Form zu beträchtlichen Verlusten (COOPER and PETTY, 1988). Der Tod erfolgt im Nest durch Ersticken oder Unterernährung. Aber auch wenn die Nestlinge die Erkrankung überstehen, kann das Gefieder durch Mangelerscheinungen so geschädigt sein, dass nach Verlassen des Nests eine erfolgreiche Jagd nicht möglich ist und die Tiere verhungern müssen.

2.2.4.3 Trichomonosis des Wellensittichs

Die Trichomonose der Wellensittiche kommt im Gegensatz zu Taube und Greifvogel vor allem bei adulten Vögeln vor. Die Hauptsymptome sind Erbrechen und gähnende Bewegungen. Typisch sind dabei die verklebten Federn am Kopf und unter dem Schnabel. Infizierte Vögel können eine gewisse Unlust zeigen, Futterkörner abzuschlucken. Dies führt dann zu einer Abmagerung und grünem Durchfall (BAKER, 1986).

2.2.4.4 Trichomonosis des Huhns, der Pute und der Ente

Die Pathogenität von *Tetratrichomonas gallinarum* gilt als für das Huhn relativ gering. Die Erkrankung kann mit blassgelbem, dünnflüssigem Blinddarmkot einhergehen. Die Tiere magern dabei ab (ROMMEL, 1992). WEINZIRL (1917) untersuchte eine sehr verlustreiche Trichomonadenerkrankung bei Hühnerküken. Er fand in den Blinddärmen Trichomonaden als Monoinfektion. Nach LEE (1972) erscheinen befallene Hühner gesund. NORTON (1997) machte Infektionsversuche an Puten und Hühnern. Er infizierte Hühnerküken via Kloake mit *Tetratrichomonas gallinarum* von erkrankten Puten. Es gelang ihm dabei jedoch nicht die Trichomonadenkultur von Bakterien zu befreien. Die von den Hühnerküken gezeigten Symptome stimmten mit denen der Puten überein.

LEIBOVITZ (1973) untersuchte die nekrotische Enteritis von Zuchtenten. Trichomonaden sind zusammen mit Bakterien und anderen Erregern am Krankheitsbild beteiligt. Die nekrotische Enteritis geht mit schwerwiegenden Veränderungen am Darm einher, die in schweren Fällen zum Tod der Tiere führen. In einem Zuchtbetrieb für Peking-Enten wurde ein Rückgang der Eierproduktion bei gleichzeitigem Anstieg der Mortalität der weiblichen Enten beobachtet. Die männlichen Tiere blieben klinisch unauffällig (CRESPO et al., 2001).

2.2.4.5 Trichomonosis des Fasans und der Wildente

BOCH und SCHNEIDAWIND (1988) beschreiben die Trichomonose bei Fasanen als eine Jungtiererkrankung, die im Alter von 3–12 Wochen auftritt. Sie geht mit Appetitmangel, Apathie und Diarrhö einher und kann zu erheblichen Verlusten führen.

Bei Wildenten treten *Trichomonas* spp. vereinzelt in Dünn- und Blinddärmen auf. Es kommt aber nur bei ungünstigen Bedingungen oder zusätzlichen Infektionen zu Problemen.

2.2.5 Pathologie der Trichomonosis

2.2.5.1 Pathologie bei Taube, Greifvogel und Wellensittich

Die durch *Trichomonas gallinae* verursachten Veränderungen bei Tauben hängen sowohl von der Pathogenität als auch von dem bevorzugten Zielort (Prädilektionsstelle) pathogener Trichomonaden ab (BONDURANT and HONIGBERG, 1994). Bei apathogenen Stämmen findet man weder makroskopische noch mikroskopische Veränderungen. Bei schwach virulenten Stämmen treten meistens nur 2-4 Tage p.i. manifeste Rachen-Schlund-Schleimhautherde auf. Die Wirtsmorbidität ist gering. Bei mäßig virulenten Stämmen findet man bis etwa 10 Tage p.i. apparente Rachen-Schlund-Schleimhautbeläge. Die Wirtsmorbidität ist mäßig, die Wirtsmortalität gering. Bei stark virulenten Stämmen sind die Läsionen im vorderen Digestionstrakt mittel- bis hochgradig. Bei infiltrierenden Prozessen sind auch die Kopfhöhlen, der Respirationstrakt, die benachbarte Muskulatur und die Knochen betroffen. Wirtsmorbidität und Wirtsmortalität sind hoch.

Bei hochvirulenten Stämmen sind die Rachen-Schlundveränderungen meist nur geringgradig. Man findet jedoch hochgradige Leberveränderungen und Kontaktmetastasen in den Viszera, den Organen, den Gefäßen, den Knochen und der Muskulatur. Die Wirtsmorbidität und Wirtsmortalität sind sehr hoch (VOGEL, 1992).

NARCISI et al. (1991) geben einen detaillierten Bericht über die pathologischen Veränderungen bei experimentell infizierten Tauben. Sie infizierten mehrere Tauben mit dem Eiberg-Stamm, einem hochpathogenen lebergängigen Trichomonadenstamm und seziierten sie an aufeinander folgenden Tagen. An den ersten drei Tagen p.i. wurden keine Veränderungen gefunden. Am vierten Tag p.i. sind die Leber und die Milz vergrößert. Dieser Zustand blieb am fünften und sechsten Tag unverändert. Am siebten Tag p.i. finden sie eine deutlich Hepatosplenomegalie und eine Reduktion des abdominalen Fetts. Bei einem Tier befindet sich

eine kleine gelbe Läsion auf der Leber. Am achten Tag p.i. sind die Tiere abgemagert und dehydriert, das Gefieder erscheint zerrupft. An der Nase und dem Schnabel befindet sich ein stinkender Ausfluss und der Kot ist flüssig und grün. Die Federn um die Kloake sind kotverschmiert. Auf der Zunge, dem Larynx und der Trachea befindet sich Exsudat und im Kropf käsige Läsionen. Die Abmagerung hat sich weiter verdeutlicht und auf der geschwollenen Leber befinden sich gelbe Läsionen. Ab dem neunten Tag p.i. sind die Tiere kachektisch und die Läsionen auf der Leber vergrößern sich auf bis zu 8 mm Durchmesser. Leber und Herz sind von einer dünnen, fibrinösen Schicht überzogen. Der Tod tritt zwischen dem elften und siebzehnten Tag p.i. ein.

Ein anderer hochpathogener Trichomonadenstamm ist der Mirza-Stamm. Seine Prädilektionsstellen sind der Kopf (Sinus, Auge, Gehirn) und die Mukosa des vorderen Verdauungstrakts (BONDURANT and HONIGBERG, 1994).

Bei der Nabel-Trichomonose handelt es sich um eine mit Nekrobiose einhergehende Entzündung (SCHAAF, 1937). Der Nabel kann auf Erbsen- bis Taubeneigröße anschwellen und ist mit einer bröcklig-schmierigen Masse gefüllt (ROMMEL, 1992).

COOPER und PETTY (1988) finden bei an Trichomonaden verendeten Habichtküken Stomatitis mit Läsionen und käsiges Material in der Schnabelhöhle. In schweren Fällen kann es auch beim Greifvogel zu einer generalisierten Form der Trichomonosis kommen, die dann auf die inneren Organe übergreift (HEIDENREICH, 1995). SAMOUR und NALDO (2005) beschreiben die Trichomonosis eines Sakerfalken (*Falco cherrug*), bei dem das Mittelohr befallen war.

Beim Wellensittich sind nur Ösophagus und Kropf verändert. Die Mukosa des Ösophagus ist verdickt und stark gefaltet, ihre Gefäße treten stark hervor. Im Ösophagus-Lumen befindet sich klarer bis leicht getrübler Schleim. Die Veränderungen sind meist proliferativer und entzündlicher Natur, nur bei einigen

Tieren sind kleine gelbe käsige Beläge zu finden, die wie bei der Taube diphtheroider Natur sind (BAKER, 1986).

2.2.5.2 Pathologie bei Huhn, Pute und Ente

WEINZIRL (1917) findet bei 10 Tage alten Hühnern Trichomonaden in den leicht vergrößerten Blinddärmen. Bis auf eine leichte generalisierte Anämie sind die Tierkörper makroskopisch unauffällig. Eine Diarrhö tritt nur bei chronischen Fällen auf. GRÄFNER et al. (1968) finden in der Sektion eine Enteritis catarrhalis des Enddarms und der Blinddärme. ROMMEL (1992) beschreibt die Infektion mit *Tetratrichomonas gallinarum* beim Huhn als chronisch-diphtheroide bis nekrotisierende Entzündung der Blinddärme. Dabei bleibt jedoch unklar, ob das massenhafte Auftreten von *Tetratrichomonas gallinarum* die Ursache oder die Folge der Diarrhö ist. LEE (1972) infizierte Junghühner mit *Tetratrichomonas gallinarum* und konnte so beweisen, dass sie ein eigenes pathologisches Potenzial besitzen. Veränderungen waren jedoch nur histologisch zu erkennen. Makroskopisch erschienen die Blinddärme unauffällig.

NORTON (1997) beschreibt die *Tetratrichomonas gallinarum*-Infektion bei der Pute als eine osmotische Diarrhö mit Bakterienbeteiligung. In der Sektion fand er eine schwere nekrotische Enteritis vom Duodenum bis zum Jejunum. Die Erkrankung der Pute nach Infektion mit *Trichomonas gallinae* geht nach HAWN (1937) mit umschriebenen nekrotischen Läsionen auf der Mukosa von Ösophagus und Kropf einher.

Bei der Ente ist die Klärung der Krankheitsursache ähnlich unklar. LEIBOVITZ (1973) untersuchte die nekrotische Enteritis von Zuchtenten und fand im Jejunum und dem vorderen Ileum verschiedene Trichomonaden (*Tritrichomonas eberthi*, *Trichomonas anatis* und unidentifizierte Trichomonaden), Bakterien (*E. coli* und Pasteurella-artige Mikroorganismen) und andere Erreger (*Hexamita*

sp.), die alle am Krankheitsbild beteiligt scheinen. Er berichtet, dass Trichomonaden auch bei gesunden Enten zu finden seien, jedoch ausschließlich im Rektum, den Blinddärmen und dem hinteren Ileum. CRESPO et al. (2001) fanden bei letal verlaufenden Salpingitiden von Peking-Enten *Tetratrichomonas* sp. zusammen mit *E. coli*. Auch hier konnte nicht abschließend geklärt werden, welcher der beiden der primäre Krankheitsverursacher ist. Dass *Tetratrichomonas gallinarum* am Symptomkomplex zumindest mitbeteiligt ist, beweist jedoch die Tatsache, dass eine trichomonasspezifische Behandlung mit Dimetridazol zu einer Verbesserung des Gesundheitszustandes der Vögel führte (TSAI et al., 1997).

2.2.6 Histopathologie der Trichomonosis

Im Frühstadium befinden sich palisadenartig angeordnete Trichomonadennester auf dem Rachenepithel. Die Schleimhäute des Rachens sind hyperämisch, ödematisiert, verdickt und entzündlich infiltriert. Später werden die entzündeten Gewebepartien purulent und sind von Leukozyten infiltriert. Es bilden sich demarkierende Wälle aus Histiozyten, Leukozyten und Lymphozyten. In den Innenzonen der Läsionen befinden sich palisadenartig gruppierte Riesenzellen. Mit fortschreitender Leukozyteninvasion sterben die betroffenen Mukosaschichten ab, es kommt zu herdförmigen Nekrosen, fibrinöser Exsudation und zu Ulzera (VOGEL, 1992).

NARCISI et al. (1991) beschreiben detailliert die histopathologischen Veränderungen nach experimenteller Infektion von Tauben mit dem Eiberg-Stamm. An den ersten drei Tagen wurden keine histopathologischen Veränderungen gefunden. Am vierten Tag p.i. fiel eine generalisierte Stauung der Gefäße, vor allem der Zunge, des Kropfs, der Lunge und der Leber auf. Das Absterben von Epithelzellen und Submukosa war an einem oropharyngealen Ulcus zu sehen. *Trichomonas gallinae* wurden nur auf dem Epithel gefunden. Dieser Befund wurde auch am fünften und sechsten Tag vorgefunden. Am siebten Tag p.i. war

die Stauung der Gefäße generalisiert im ganzen Körper und in allen Organen zu finden. Im Oropharynx, im Kropf und in der Lunge befand sich ein purulentes Exsudat mit überwiegend heterophilen Zellen. Kleine Leberläsionen stellten sich als fettige Degeneration der Hepatozyten heraus. Der Genitalapparat fing an, sich zurückzubilden. Am achten Tag p.i. wurde das Exsudat im Oropharynx, Kropf und Sinus fibrinös. Die Hepatozyten der Leberläsionen zeigten Anzeichen beginnender Nekrose. Hier waren auch *Trichomonas gallinae* zu finden. Während der acht Tage nach der Infektion veränderte sich der Hämatokritwert nicht.

KIETZMANN (1993) infizierte Jungtauben experimentell und untersuchte die Zellen des oberen Verdauungstrakts mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops. Dabei fand er heraus, dass *Trichomonas gallinae* die Epithelzellen physikalisch an der Zell-zu-Zell-Verbindung trennen, um sich dann unter die beschädigte Zelle zu begeben. Er verglich *Trichomonas vaginalis* und *Trichomonas gallinae* und fand bei beiden Spezies die Fähigkeit zur Anhaftung an Zellen und zur amöboiden Bewegung. Die weitere Zellschädigung erfolgte bei *Trichomonas vaginalis* durch die Sekretion von hydrolytischen Enzymen, während die Schädigung bei *Trichomonas gallinae* durch einen enzymatischen Schaden der Zellgrenzen verursacht wurde. Er konnte jedoch nicht abschließend bestimmen, ob die komplette Entfernung von Zellen eher durch die Bewegung der *Trichomonas* spp. oder eher durch die Enzyme verursacht wird.

Auch HEATH (1981) ist der Meinung, dass mechanische und chemische Faktoren bei der Pathogenese einer Infektion zusammenspielen.

ALDERETE und PEARLMAN (1984) schreiben, dass es sich bei *Trichomonas vaginalis* um einen kontaktabhängigen Mechanismus handelt, da die Zugabe von Kulturfiltrat oder fixierten Trichomonaden zu keinen Zellschäden führten. Jedoch war anscheinend auch nicht die mechanische Zerstörung verantwortlich für die gefundene Zytotoxizität.

WEINZIRL (1917) fand Trichomonadennester in den Lieberkühn'schen Drüsen der Blinddärme. LEE (1972) untersuchte detailliert die histopathologischen Veränderungen nach der Infektion von Junghühnern mit *Tetratrichomonas gallinarum*. Auch er fand sie im Zäkum in unmittelbarer Nähe zur Mukosa, vor allem in den Lieberkühn'schen Drüsen. Ein Verlust von Mikrovilli und der Glykokalix war auffällig. *Tetratrichomonas gallinarum* wurden zwischen den Epithelzellen und in der Mukosa gefunden. Auch an Kapillaren angehaftet wurden sie nachgewiesen. In einigen Fällen verursachten *Tetratrichomonas gallinarum* keinen, in anderen Fällen großen Schaden. Sie schienen außerdem keine Zellabwehr des Wirts auszulösen. Durch die beschriebenen Veränderungen auf der Darmschleimhaut kommt es zu einem Verlust der Absorptionsfähigkeit und einer Schwächung der Zellabwehr der Darmschleimhaut. Damit sind die Tiere für Sekundärinfektionen prädisponiert.

Ähnlich beschreibt LEIBOVITZ (1973) die Veränderungen am Jejunum und dem vorderen Ileum bei Enten.

Bei Puten berichtet NORTON (1997) von Papulae in der Lamina Propria von Duodenum und Jejunum, die über die Mukosaoberfläche erhaben sind.

2.3 Nachweis- und Differenzierungsmöglichkeiten

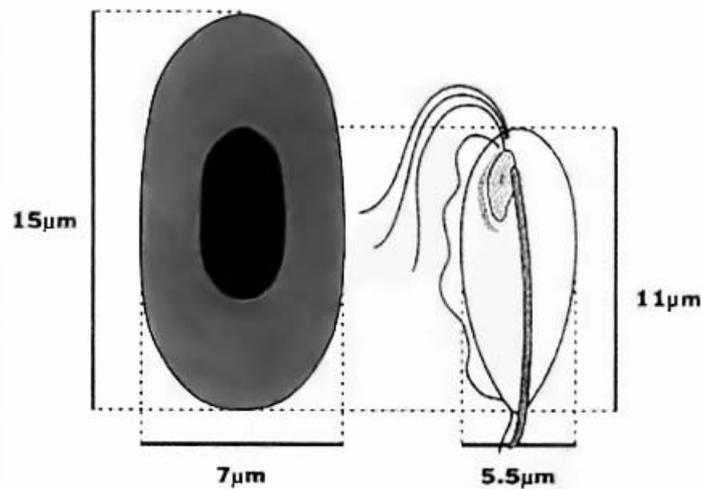
2.3.1 Diagnostik der Trichomonosis

Die Verdachtsdiagnose erfolgt am lebenden Tier anhand des Krankheitsbildes. Pathognostisch sind bei der Rachen-Schlundform die typischen Läsionen in der Schnabelhöhle. Diese gelblich-käsigen Beläge werden auch „gelber Knopf“ genannt. Zur weiteren Abklärung dient ein Abstrich des Rachens und des Kropfs. Man betrachtet ihn direkt unter einem Mikroskop als Nativpräparat oder kultiviert die Erreger zur weiteren Bestimmung (VOGEL, 1992). Da bei *Tetratrichomonas gallinarum* die Symptome unspezifisch sind, führt hier nur ein

Darmabstrich im Rahmen einer Sektion zu einer gesicherten ätiologischen Diagnose. Ein Abstrich aus der Kloake kann falsch negativ sein.

Im Nativpräparat erscheinen Trichomonaden als länglich-ovale Gebilde, die sich lebhaft bewegen. Die am Kopfende sitzenden Geißeln führen rudierende Bewegungen aus und die undulierende Membran bewegt sich lebhaft. Abgestorbene Trichomonaden sind jedoch nur schwer von Leukozyten und anderen oval bis rundlichen Gebilden etwa gleicher Größe zu unterscheiden. Für den Nachweis von *Trichomonas* spp. ist das Nativpräparat im Hellfeld bei 100- bis 200-facher Vergrößerung am besten geeignet (MAASSEN, 1938).

CLARK et al. (2003) stellten fest, dass *Tetratrichomonas gallinarum* in etwa die gleiche Größe wie rote Blutkörperchen haben. Die durchschnittliche Größe von *Tetratrichomonas gallinarum* liegt bei 11 x 5,5 µm und von Erythrozyten bei 15 x 7 µm. Anhand ihrer Größe sind sie leicht von beweglichen Bakterien zu unterscheiden.



Figur 2: Relative Größe von *Tetratrichomonas* verglichen mit einem Vogelerythrozyten. Aus: Flagellated protozoan infections in turkeys von CLARK, DE GUSSEM und BARNES (2003).

Um die *Trichomonas*-Arten weiter differenzieren zu können, färbt man sie an. Dabei ist zu beachten, dass dies Einfluss auf die Größe und die Form hat (HONIGBERG and BURGESS, 1994). MAASSEN (1938) vergleicht verschiedene Färbemethoden sehr detailliert. Bei Kontrastfärbungen wird der Hintergrund mit Eosin, Neutralrot, Brillantkresylblau, Orange G, Malachitgrün oder Methylblau gefärbt. Lebende Trichomonaden färben sich nicht mit an, so dass sie sich als helles, lichtbrechendes Gebilde abheben. Bei der Vitalfärbung werden die lebenden Trichomonaden angefärbt, zum Beispiel mit dem Riegel-schen Chloroform-Azur (OEHLER, 1922) oder mit Malachitgrün (STREIT, 1936). Jedoch lassen weder die Kontrastfärbung noch die Vitalfärbung eine befriedigende Diagnosestellung zu.

Dauerpräparate gibt es mit oder ohne vorheriger Fixation. Dauerpräparate ohne vorheriger Fixation wie zum Beispiel nach GIEMSA (1902 und 1904) oder nach DAUST (1934) zeichnen sich durch eine schnelle Durchführbarkeit aus, jedoch treten viele Degenerationserscheinungen auf, was sich bei morphologischen Untersuchungen als störend auswirkt. Bei Dauerpräparaten mit vorheriger Fixation werden Degenerationsformen kaum gebildet, da die Fixierung durch eine schnelle Gerinnung des Eiweißes die Protozoen sofort abtötet. Gelegentlich kommen leichte Schrumpfformen vor. Die am geeignetesten Färbemethoden sind hier die Methode nach GALLI-VALERIO (1900), die Budapester Färbemethode, modifiziert nach HEES (zitiert nach MAASSEN, 1938) und die Färbemethode nach NÖLLER (1924). Sie liefern die besten Präparate für morphologische Studien, da bei ihnen Geißeln, Kern, Organellenapparat, Basalkörper, Rippe und Achstenstab zu sehen sind. Die Methoden sind jedoch sehr zeitaufwendig und verdünnen das Ausgangsmaterial, was bei Direktabstrichen von schwach infizierten Vögeln zu falsch negativen Ergebnissen führen kann.

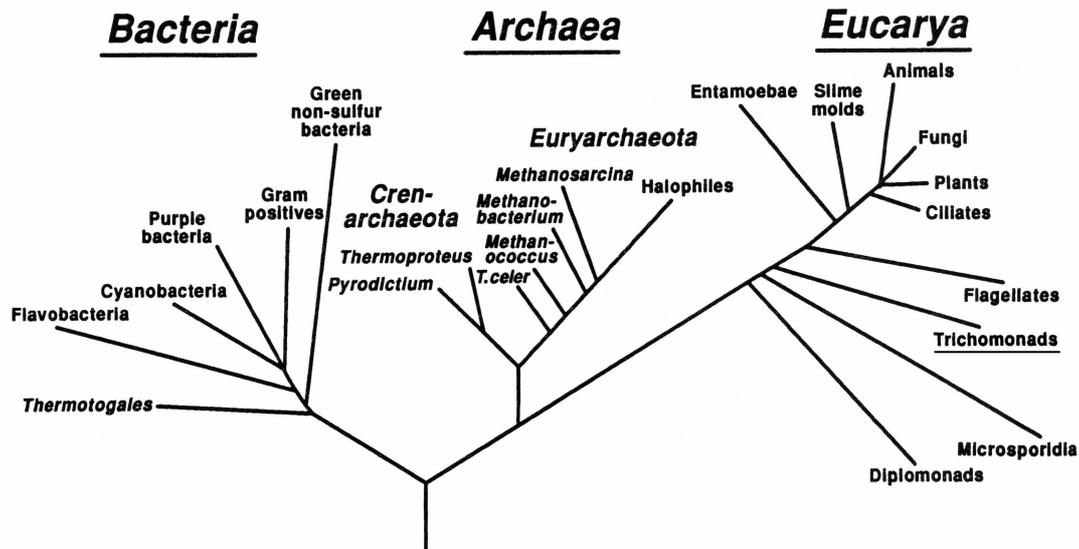
2.3.2 Differentialdiagnosen der Trichomonosis

Als mögliche Differentialdiagnosen kommen bei der Rachenform eine Infektion mit Taubenpockenvirus, Herpesvirus-1, *Monilia candidans*, Sialolithen (Speichelsteine) oder eine unspezifische Pharyngo-Ösophagitis in Frage (VOGEL, 1992). Bei der Trichomonose der inneren Organe können vor allem Infektionen mit Herpesvirus-1, Paramyxovirus-1 oder dem aviären Adenovirus zu Verwechslungen führen (VOGEL, 1992). *Spironucleus columbae*- und *S. meleagridis*-Infektionen wurden irrtümlich als Darm-Trichomonose beschrieben (VOGEL, 1992). Die Nabelinfektion kann auch durch bakterielle Sekundärerreger verursacht sein (VOGEL, 1992). Als weitere Differentialdiagnosen nennt FRIEDHOFF (1982) Rhinitis, Ornithose, Mykoplasmosen, Salmonellose, Tuberkulose und Koligranulome und LEVINE (1985) Vitamin A-Mangel, Moniliosis und Kapillarien.

2.3.3 Molekularbiologische Methoden

In der Vergangenheit wurden die phylogenetischen Entwicklungsbäume ausschließlich anhand der Morphologie erstellt. Die An- bzw. Abwesenheit von morphologischen Gegebenheiten, wie zum Beispiel das Vorhandensein von Organellen, wurden als Hinweise für die Evolution gewertet. Dabei ging man nach dem Schema vor, dass sich komplexe Organismen aus einfacheren Vorstufen entwickeln. Der sekundäre Verlust von Merkmalen konnte so jedoch nicht berücksichtigt werden (VISCOGLIOSI et al., 1999). Auch die Interpretation von verhältnismäßig einfachen Lebensformen wie zum Beispiel den Mikroorganismen ist sehr schwierig, da hier die Morphologie und Physiologie nur wenige eindeutige phylogenetische Hinweise geben (OLSEN and WOESE, 1993). Die Vergleiche von makromolekularen Sequenzen lassen hingegen eine gradlinige, quantitative Interpretation zu (ZUCKERKANDL and PAULING, 1965; PACE et al., 1986). WOESE et al. (1990) revolutionierten die bisherige

Einteilung in die fünf Reiche (Tiere, Pflanzen, Pilze, Protisten und Monera) und unterteilten die lebendige Welt in drei Domänen (Figur 3). Dies geschah aufgrund ihrer Ergebnisse bei den Untersuchungen von 16S rRNA.



Figur 3: Universeller phylogenetischer Baum. Aus: Ribosomal RNA: a key to phylogeny von OLSEN und WOESE (1993)

VISCOGLIOSI et al. (1999) untersuchten die rRNA von Parabasaliden, zu denen auch Trichomonaden gehören und fanden große Diskrepanzen zwischen der ultrastrukturellen Morphologie und den molekularen Daten. Dabei kommen sie zu verschiedenen neuen Annahmen. Bisher ging man davon aus, dass sich die Familie Trichomonadidae aus Monocercomonas entwickelten, da die Monocercomonadidae keine Costa besitzen. VISCOGLIOSI et al. (1999) vermuten jedoch, dass sie sekundär die Costa verloren haben und somit diese als phylogenetischer Hinweis irreführend ist. Weiterhin vermuten sie, dass während der Evolution ein häufiger Wirts- und Umgebungswechsel stattgefunden hat, dass sich sogar freilebende Monocercomonaden aus zuvor parasitären Formen entwickelt haben. Dies würde bedeuten, dass Parasitismus nicht irreversibel sei. VISCOGLIOSI et al. (1999) plädieren dafür, dass in Zukunft die Morphologie

verstärkt im Zusammenhang mit molekularbiologischen Erkenntnissen betrachtet werden sollte und so ein komplexeres Bild der phylogenetischen Entwicklungsbäume entstehen kann. Eine alleinige genetische Betrachtung wäre rein akademischer Natur, da genotypische Unterschiede ohne Veränderung der phänotypischen Eigenschaften bedeutungslos sind. Zudem sollte die Evolution in Raum und Zeit betrachtet werden, da das genetische Material einem ständigen Fluss der Veränderung unterworfen ist. Einige Änderungen zeigen Wirkung, andere bleiben wirkungslos (VAN REGENMORTEL, 2000). Als Beispiele dafür sollen hier MKS und Parvovirose genannt werden. Das MKS-Virus zeigt große genotypische Unterschiede, ohne dass dies Auswirkungen auf das Krankheitsbild hat (BECK and STROHMAIER, 1987; ARAÚJO et al., 2002), wohingegen beim Parvovirus minimale Unterschiede im Genotyp eine Verschiebung des Wirtsspektrums von Katzen auf Hunde (TRUYEN et al., 1995; IKEDA et al., 2000) und eine verlustreiche Pandemie nach sich zog.

2.3.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Nach Einführung der PCR durch SAIKI et al. (1985) und MULLIS et al. (1986) fand diese Technik auch ihren Weg in die Trichomonadendifferenzierung (RILEY et al., 1991, FELLEISEN, 1997). Das Prinzip der PCR basiert darauf, dass sich zwei Primer (Oligonukleotide) an die komplementär homologen 3'- und 5'-Enden der Ziel-DNA-Region anlagern. Die durch die Primer definierte Sequenz kann so amplifiziert und im Gel dargestellt werden.

2.3.3.1.1 rRNA

Bei der 5,8S rRNA handelt es sich um ribosomale DNA. Eine Replikationseinheit der nuklearen rDNA besteht aus dem nicht-transkribierten Spacer (NTS), dem externen transkribierten Spacer (ETS), der kleinen Ribonukleinsäure 18S (S für Svedberg-Einheit), dem internen transkribierten Spacer (ITS-1), der

kleinen Ribonukleinsäure 5,8S, dem zweiten internen transkribierten Spacer (ITS-2) und der großen Ribonukleinsäure 28S.



Figur 4: Der rDNA-Aufbau eines Eukaryonten. Aus: Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference von HILLIS und DIXON (1991).

NTS: nicht-transkribierter Spacer

ETS: extern transkribierter Spacer

ITS: intern transkribierter Spacer

18S, 5,8S und 28S: Ribonukleinsäuren

Man findet rRNA in den Zellen der gesamten belebten Welt, sogar in Mitochondrien. Die verschiedenen Regionen sind unterschiedlich konserviert und so eine ideale Informationsquelle für phylogenetische Analysen (VISCOGLIOSI et al., 1999).

Die in dieser Arbeit amplifizierte Region 5,8S rRNA ist hochkonserviert und kann genutzt werden, um Rückschlüsse zu ziehen, die bis in die Zeit des Kambrium zurück gehen. Ordnungen, die sich seit dem Paläozoikum getrennt haben, zeigen kaum Veränderungen. So zeigt zum Beispiel die 5,8S rRNA Region der Hausmaus, *Mus musculus* nahezu 100%ige Übereinstimmung mit der der Wanderratte, *Rattus norvegicus* (HILLIS and DIXON, 1991). Untersuchungen der 5,8S rRNA Region von *Tritrichomonas foetus* ergaben eine 100%ige Übereinstimmung untereinander (FELLEISEN et al., 1998, WALKER et al.,

2003). Jedoch ist die Region recht kurz und somit die vorhandene Information limitiert (HILLIS and DIXON, 1991).

2.3.3.2 Restriktionsenzymanalyse (REA)

Zur weiteren Differenzierung kann eine Restriktionsenzymanalyse eines PCR-Produkts erfolgen. Mit Hilfe einer Datenbank für Enzymschnittstellen kann man für bekannte Sequenzen die passenden Enzyme bereits im Vorfeld auswählen.

2.3.3.3 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Die Technik der Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) wurde von WILLIAMS et al. (1990) erstmals beschrieben. Es handelt sich um eine Polymerasekettenreaktion, jedoch kommt hier ein relativ kurzer Primer zum Einsatz, der unbekannte Bereiche der DNA amplifiziert. Man erhält ein spezifisches Bandenmuster, das als DNA-Fingerprint dient. FELLEISEN (1998) etablierte die Methode für verschiedene *Trichomonas* spp. und probierte dabei 20 verschiedene Primer aus. Er konnte den Verdacht erhärten, dass es sich bei *Tritrichomonas foetus* und *Tritrichomonas suis* um dieselbe Art handelt, wohingegen *Tritrichomonas mobilensis* einer eigenen Art angehört.

2.3.3.4 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Die Pulsfeldgelelektrophorese wurde von SCHWARTZ und CANTOR (1984) erstmals beschrieben. Diese Technik erlaubt es intakte Chromosomen aufzutrennen. Indem man die Richtung des elektrischen Felds bei der Gelelektrophorese regelmäßig ändert, müssen sich die Fragmente immer wieder neu ausrichten. Die DNA wird zu Beginn der Präparation in Gelblöckchen eingebettet, um die langen Chromosomen vor Bruchschaden zu schützen.

Die Präparation der *Trichomonas* spp.-DNA gestaltete sich schwierig, da sie sehr reich an Nukleasen sind. RILEY und KRIEGER (1992) fanden mit der Diethylpyrocarbonat-Triton X-100 Methode eine Möglichkeit, dieses Problem zu beheben. LEHKER und ALDERETE (1999) setzten diese Methode erstmalig für die PFGE ein.

2.4 Therapie

2.4.1 Chemotherapeutika gegen Trichomonosis

Das älteste Mittel gegen *Trichomonas* spp. ist Kupfersulfat (CuSO_4), welches jedoch lebertoxisch ist (JAQUETTE, 1948). Für die Behandlung von Menschen und Tieren wurden mehrere Nitroimidazole entwickelt. Das erste trichomonadenspezifische Mittel war Enheptin[®] ein Aminonitrothiazol (ANT) (STABLER and MELLENTIN, 1953; FRITZSCHE, 1955), welches eine geringe therapeutische Breite hat und deshalb nicht mehr verwendet wird.

Ein übliches Chemotherapeutikum bei nicht-lebensmittelliefernden Tieren ist zur Zeit Spartrix[®], ein Nitroimidazol (Carnidazol, von Janssen-Cilag, Neuss) in Tablettenform für die Einzeltiertherapie. Für die Behandlung von größeren Gruppen gibt es Chevicol[®] (Dimetridazol, (GRAVENDYCK et al., 1997) von Chevita GmbH, Pfaffenhofen) oder Clont[®] (Metronidazol, (LÜTHGEN und BERNAU, 1967) von Bayer, Leverkusen), welche über das Trinkwasser zugeführt werden. Diese Therapeutika sind alle gut wirksam, aber einzelne Trichomonadenstämme zeichnen sich durch eine erhöhte Resistenz gegen sie aus, die zu Rezidiven führen können (LÜTHGEN und BERNAU, 1967).

Im Rahmen eines Antrags auf Wiederzulassung wurde jüngst die Verträglichkeit von Ridzol[®] R-10 % Bt (Ronidazol) bei Brieftauben in einer kontrollierten klinischen Studie überprüft (KRAUTWALD-JUNGHANNS et al., 2004). Schon bei einer doppelten therapeutischen Dosis traten erste Nebenwirkungen auf. Die

Entwicklung der Körpermasse verringerte sich, Polyurie und Diarrhö traten auf und Organveränderungen wurden gefunden. Inwieweit ein direkter kausaler Zusammenhang mit dem Medikament besteht, müsste jedoch in weiterführenden Langzeitstudien abgeklärt werden.

Bei den lebensmittelliefernden Tieren – dies sind bei den Tauben alle Rasse- und Fleischtauben, die nicht zu den Brieftauben gehören – stehen zur Zeit keine wirksamen Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung (Anhang IV der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90) (JODAS et al., 2005). Zur Therapie von *Trichomonas vaginalis* beim Menschen sind weiterhin unter anderem Clont[®] von Bayer und Flagyl[®] von Aventis zugelassen. Auch bei der Therapie des Menschen ist man sich über das mutagene Potenzial der Medikamente bewusst, und es sollten effektive Alternativen gesucht werden (HONIGBERG and BURGESS, 1994).

2.4.2 Chemoprophylaxe gegen Trichomonosis

Die übliche Vorgehensweise von Taubenhaltern ist, die Tiere regelmäßigen „Trichomonadenkuren“ zu unterziehen. Vor allem vor Brieftaubenflügen werden die Tiere prophylaktisch behandelt. Dies ist damit zu erklären, dass die Tauben auch nach erfolgter Behandlung nicht immer erregerefrei sind oder nicht lange erregerefrei bleiben (KALETA et al., 1990). Diese Vorgehensweise ist aber nicht unumstritten. Nitroimidazole besitzen nach KROKER (1999) ein hohes toxisches Potential. WISLOCKI und LU (1990) beschreiben Ronidazol als mutagen und kanzerogen. Auch kann es leicht zu Überdosierungen kommen, wenn der Trinkwasserverbrauch zum Beispiel durch Krankheit erhöht ist.

FRANSSEN und LUMEIJ (1992) untersuchten Resistenzen der Trichomonaden gegen mehrere Nitroimidazole. Resistenzen wurden *in vivo* und *in vitro* gefunden. Sie sind vermutlich durch prophylaktische subtherapeutische Medikamentengabe erworben (LUMEIJ and ZWIJNENBERG, 1990). Sie schlagen deshalb vor, nur Tauben mit manifester klinischer Trichomonose zu behandeln. Nur so kann sich eine Präunität bei den latent infizierten Tauben entwickeln.

Sie schreiben weiter, dass eine prophylaktische Behandlung der Alttiere nur während der Brutzeit sinnvoll sei, um die Jungvögel zu schützen.

Bei lebensmittelliefernden Tieren stehen zur Zeit keine chemotherapeutischen Prophylaxemöglichkeiten zur Verfügung (Verordnung (EWG) Nr. 1756/2002) (JODAS et al., 2005).

2.5 Fragestellungen der eigenen Untersuchungen

Seit mehr als 60 Jahren (STABLER and MELLENTIN, 1953) gibt es wirksame und relativ gut verträgliche Pharmazeutika gegen die Trichomonose. Dadurch wurde die Trichomonadenforschung in den letzten Jahren und Jahrzehnten stark vernachlässigt. Speziell über die Trichomonaden des Vogels wurden nur wenige Forschungsberichte veröffentlicht. Seit dem Verbot der Anwendung von Nitroimidazolen bei lebensmittelliefernden Tieren stehen für diese keine wirksamen Therapeutika zur Verfügung. Der sich daraus ergebende Therapienotstand beim Wirtschaftsgeflügel und der damit verbundene wirtschaftliche Schaden wird in Zukunft wieder vermehrtes wissenschaftliches Interesse an Trichomonaden hervorrufen.

Die bisher isolierten und beschriebenen Trichomonaden wurden nur anhand ihrer Morphologie, des Vogelwirts und der Lokalisation in die Arten *Trichomonas gallinae* und *Tetratrichomonas gallinarum* unterteilt. Auch die Einführung von molekularbiologischen Methoden hat daran kaum etwas geändert. Weiterführende vergleichende Studien wurden, soweit bekannt, bisher bei aus Vögeln isolierten Trichomonaden noch nicht durchgeführt.

Ziele der vorliegenden Arbeit sind Isolierungsversuche von Trichomonaden aus Vögeln verschiedener Arten, Charakterisierung ihrer Mikromorphologie sowie vergleichende molekularbiologische Studien der DNA. Es wird versucht, damit einen Anteil an den nach wie vor offenen Fragestellungen der Taxonomie und

der Epidemiologie, vor allem in Hinblick auf die Frage nach der Möglichkeit von artübergreifenden Übertragungen der Erreger, zu leisten.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Der Großteil der Flagellaten-Isolate stammt von Vogelpatienten der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische. Die Proben wurden im Rahmen der diagnostischen Untersuchungen in der Poliklinik für Vögel und Reptilien entnommen. Dabei unterlagen die beprobten Tiere keinen besonderen Auswahlkriterien. Einige weitere Isolate stammen aus der klinikeigenen Brieftaubenzucht.

Als Referenzstamm diente *Tritrichomonas foetus* ATCC 30924 der freundlicherweise von dem Institut für Parasitologie der Universität Bern, Schweiz zur Verfügung gestellt wurde.

Tabelle 1: Überblick zu allen Isolaten

Wirtsspezies	Anzahl der Isolate	%	Zeitraum der Probennahme
Taube	75	62	2000 - 2002
Kanarienvogel	14	12	2000 - 2001
Greifvogel	14	12	1998 - 2004
Wellensittich	8	7	1999 - 2002
Huhn	4	3	2002 - 2003
Ente	3	2	2003
Pute	2	2	2003
Ringfasan	1	1	2003

3.1.1 Herkunft der Isolate

Es wurden bei Patienten der Poliklinik (n = 62), bei frischtoten Sektionstieren (n = 13) der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische, sowie bei Tieren aus Zuchtbeständen (n = 46) Tupferproben entnommen. Die Kropf-abstriche von Stadt-, Brief-, Rasse-, Ringel- und Türkentauben, von Kanarienvögeln, von Habichts- und Zwergadlern, Wander- und Rötelfalken, Mäusebussard, Rohrweihe, Schleiereule und Uhu und von Wellensittichen sowie Abstriche des Darms (vor allem Ileum und Zäkum) von Hühnern, Enten, Puten und Ringfasan wurden mikroskopisch auf Flagellaten untersucht und diese dann auf HEF-Kulturen, auf HELZ-Kulturen und in Diamond-Medium (DIAMOND, 1968) angezüchtet.

Nachfolgend werden die Bezeichnungen der Isolate sowie die beobachteten klinischen Symptome der beprobten Vögel mitgeteilt.

Tabelle 2: Isolate von lebenden Tauben

Isolatbezeichnung	Vogelspezies	Bemerkungen
BT 1, 2, 4, 6, 7	Brieftaube, <i>Columba livia</i> f. domestica	verminderte Flugleistung
T III	Brieftaube, <i>Columba livia</i> f. domestica	keine
T IV	Rassetaube, <i>Columba livia</i> f. domestica	hgr. Befall, Begleitflora: <i>Staph. aureus</i>
T V	Brieftaube, <i>Columba livia</i> f. domestica	ggr. Befall, Begleitflora: <i>Staph. intermed.</i> , <i>E. coli</i> , Hefen
T VI	Brieftaube, <i>Columba livia</i> f. domestica	keine
T VII	Türkentaube <i>Streptopelia decaocto</i>	keine
T VIII	Brieftaube, <i>Columba livia</i> f. domestica	keine

Fortsetzung Tabelle 2: Isolate von lebenden Tauben

Isolatbezeichnung	Spezies	Bemerkungen
T IX	Rassetaube, <i>Columba livia</i> f. domestica	keine
T X	Stadttaube, <i>Columba livia</i> f. urbana	ggr. Befall, mager, Flügelfraktur
T XI	Stadttaube, <i>Columba livia</i> f. urbana	hgr. Befall, sehr mager
T XII	Brieftaube, <i>Columba livia</i> f. domestica	Altier: ggr. Befall, Begleitflora: <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Staph.</i>
T XIII		Jungtier: hgr. Befall, massive Beläge Begleitflora: <i>E. coli</i> , <i>Staph.</i> , <i>Past. häm.</i>
T XIV	Haustaube, <i>Columba livia</i> f. domestica	mgr. Befall
T XV	Brieftaube, <i>Columba livia</i> f. domestica	hgr. Befall
T XVI	Brieftaube, <i>Columba livia</i> f. domestica	hgr. Befall
T XVII	Brieftaube, <i>Columba livia</i> f. domestica	keine
T XVIII ₁₋₄	Brieftaube, <i>Columba livia</i> f. domestica	1: mgr. Befall, 2: mgr. Befall 3: hgr. Befall, 4: ggr. Befall
T XIX _{1,2}	Brieftaube, <i>Columba livia</i> f. domestica	1: ggr. Befall 2: hgr. Befall
T XX	Stadttaube, <i>Columba livia</i> f. urbana	allg. Schwäche
T XXI	Rassetaube, <i>Columba livia</i> f. domestica	hgr. Befall
T XXII	Stadttaube, <i>Columba livia</i> f. urbana	gestorben

Fortsetzung Tabelle 2: Isolate von lebenden Tauben

Isolatbezeichnung	Spezies	Bemerkungen
T XXIII	Ringeltaube <i>Columba palumbus</i>	hgr. Befall, Wunde an Brust und Flügel, Euthanasie
T VI 1	Brieftaube, <i>Columba livia</i> f. domestica	unauffällig
JT 4, 5, 13, 20	Brieftaube, <i>Columba livia</i> f. domestica	unauffällig
AH 4, 5, 6, 10, 11, 21	Brieftaube, <i>Columba livia</i> f. domestica	unauffällig
AH III 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 22, 23	Brieftaube, <i>Columba livia</i> f. domestica	unauffällig
AH IV 1, 2, 3, 4	Brieftaube, <i>Columba livia</i> f. domestica	unauffällig
Inst.Ta.-4 ₁ , 6 ₁ , 7 ₁ , 8 ₁ , 9 ₁ , 10 ₁	Brieftaube, <i>Columba livia</i> f. domestica	unauffällig
Inst.Ta.-2 ₂ , 7 ₂ , 8 ₂ , 9 ₂ , 10 ₂	Brieftaube, <i>Columba livia</i> f. domestica	unauffällig
1164, 1165	Ringeltaube <i>Columba palumbus</i>	verendet, schwere fibronekrotische Läsionen im Gaumen mit Invasion der Schädelhöhle und Obstruktion des Ösophaguseingangs, Septikämie

Die Isolate JT 4, 5, 13 und 20; AH 4, 5, 6, 10, 11 und 21; AH III 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 22 und 23; AH IV 1, 2, 3 und 4 wurden im Rahmen des Avian Handling-Kurses in den Jahren 2000 bis 2001 aus Tauben (Orientalischer Tümmeler) eines Taubenzüchters entnommen. Der diagnostizierte Trichomonadenbefall war gering- bis hochgradig. Bei ca. $\frac{2}{3}$ aller beprobten Tauben konnten Trichomonaden nachgewiesen werden.

Die Isolate Inst.Ta.-4₁, 6₁, 7₁, 8₁, 9₁, 10₁ und Inst.Ta.-2₂, 7₂, 8₂, 9₂, 10₂ stammen von 15 Brieftauben, die in einem Versuchsrahmen von Herrn S. Schütz beprobt wurden.

Die Gruppe Inst.Ta-X₁ wurde zu Versuchsbeginn beprobt. Bei der Gruppe Inst.Ta-X₂ handelt es sich um dieselben Tauben. Sie wurden nach einem Abstand von 10 Tagen erneut beprobt. In der Zwischenzeit wurden die Tauben mit dem Antibiotikum Meronem[®] (Meropenem, Astra Zeneca, Wedel) behandelt (S. SCHÜTZ Dissertation in Vorbereitung).

Die Isolate 1164 und 1165 stammen von Ringeltauben (*Columba palumbus*) aus Südspanien (Cádiz). Dort haben sie zu beträchtlichen Schäden in der Wildpopulation geführt (HÖFLE et al., 2004). Sie wurden freundlicherweise zu Vergleichszwecken von Frau Dr. U. Höfle zur Verfügung gestellt.

Bei den restlichen Tauben handelte es sich um Patienten, die in der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische vorgestellt wurden.

Tabelle 3: Isolate von lebenden Kanarienvögeln

Isolatbezeichnung	Spezies	Bemerkungen
KV 1, 2, 3	Kanarienvogel <i>Serinus canaria</i>	unauffällig
KV 4, 5		mgr. Befall, Begleitflora: <i>Staph.</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Klebsiella</i>
KV 6		hgr. Befall, verendet
KV 7		unbekannt
KV 8		ggr. Befall, Symptome: singt nicht, schläft viel, atmet schwer
KV 9, 10, 11		mgr. Befall, Begleitflora: <i>E. coli</i> , letztes Jahr massenhaftes Sterben im Bestand, Symptome: abgemagert, aufgeplustert (waren auf Ausstellung)
KV 12, 13		gleicher Bestand wie KV 9, 10 und 11 (waren nicht auf Ausstellung)
KV 14		unauffällig

Die Kanarienvögel der Isolate KV 1, 2, 3 stammen aus einem Zoofachhandel.

Bei dem Kanarienvogel des Isolats KV 6 handelt es sich um ein zur Sektion eingeliefertes totes Tier.

Der Kanarienvogel des Isolats KV 14 stammt aus einem Zuchtbestand.

Bei den restlichen Kanarienvögeln handelte es sich um Patienten der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische.

Tabelle 4: Isolate von lebenden Greifvögeln

Isolatbezeichnung	Spezies	Bemerkungen
7-99	Habichtsadler <i>Hieraaetus fasciatus</i>	Nestling symptomlos
8-99		
9-99		
22v		Nestling; sehr kleine Läsionen nahe Choane
22w		Nestling, symptomlos
22x		Nestling 5 mm Ø Läsion am Gaumen
Fitos		Nestling; multiple nekrotische Läsionen, Geschwister an Trichomonose gestorben
HP-MEM	Wanderfalke <i>Falco peregrinus</i>	Nestling fibronekrotische Läsionen an Gaumen und Ösophagus
1371	Rötelfalke <i>Falco naumanni</i>	Jungvogel; schwere fibronekrotische Läsionen an Gaumen und Unterschnabel, gestorben an Unterernährung
CR122	Zwergadler <i>Hieraaetus pennatus</i>	Adult; schwere fibronekrotische Läsionen in Schnabelraum und Ösophagus, gestorben an Unterernährung

Fortsetzung Tabelle 4: Isolate von lebenden Greifvögeln

Isolatbezeichnung	Spezies	Bemerkungen
1177	Schleiereule <i>Tyto alba</i>	Adult; schwere fibronekrotische Läsionen an Gaumen und Ösophaguseingang mit fast völliger Ausfüllung des Lumens, verstorben an Unterernährung
RW	Rohrweihe <i>Circus aeruginosus</i>	unterentwickelter Jungvogel beidseitige Sinusitis des Infraorbitalsinus, keine Läsionen des Schnabelraums oder des Ösophagus
MB 1	Mäusebussard <i>Buteo buteo</i>	allg. Schwäche
Uhu 1	Uhu <i>Bubo bubo</i>	apatisch verstirbt kurz nach Untersuchung

Bei dem Mäusebussard-Isolat MB 1 und dem Uhu-Isolat Uhu 1 handelt es sich um Fundtiere, die der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische eingeliefert wurden.

Die Isolate Fitos, 22v, 22w und 22x stammen aus Portugal (Algarve) und die Isolate 7-99, 8-99 und 9-99 stammen aus Zentralspanien (Ciudad Real). Die restlichen Isolate stammen von Patienten der Klinik des Centro de Estudios de Rapaces Ibéricas, Station der regionalen Regierung der autonomen Region Castilla – La Mancha. Die Isolate wurden freundlicherweise von Frau Dr. U. Höfle zur Verfügung gestellt.

Tabelle 5: Isolate von lebenden Wellensittichen

Isolatbezeichnung	Spezies	Bemerkungen
WS I	Wellensittich, <i>Melopsittacus undulatus</i>	hgr. abgemagert, hgr. gestörtes Allg.befinden, hgr. Megabakterien im Magen, gestorben
WS II		unbekannt
WS III		hgr. Befall; Begleitflora: <i>Staph</i> , <i>α-Strept</i> , Symptome: würgen, keine Futteraufnahme
WS IV		ggr. Befall, unauffällig
WS V		ggr. Befall, Symptome: keine Futteraufnahme, Flugunlust, Schwanz wippen
WS VI		mgr. Befall, Symptome: würgen
WS VII		unbekannt
WS VIII		hgr. Befall, Symptome: würgt Futter hoch

Bei allen Wellensittichen handelte es sich um Patienten der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische.

Tabelle 6: Isolate von seziierten Wirtschaftsgeflügel

Isolatbezeichnung	Spezies	Bemerkungen
H 1	Huhn <i>Gallus gallus</i>	Endoparasitose
H 2		Parasiten, Mareksche Krankheit
H 3		Kokzidien, Heterakis, Askariden
H 4		Askariden, Heterakis
E 1, E 2, E 3	Ente <i>Anas platyrhynchos f. domestica</i>	Generalisierte Entzündungen, Mastprobleme

Fortsetzung Tabelle 6: Isolate von seziierten Wirtschaftsgeflügel

Isolatbezeichnung	Spezies	Bemerkungen
P 1	Pute <i>Meleagris gallopavo</i>	Kokzidien, <i>Mycoplasma gallisepticum</i> -Infektion
P 2		alte, offene Flügelfraktur, <i>Mycoplasma meleagridis</i> -Infektion
F 1	Ringfasan <i>Phasianus colchicus</i>	Capillaria, Heterakis

Bei diesen Isolaten handelte es sich um Sektionstiere der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische. Die Hühner, Puten und der Ringfasan stammen aus extensiven Haltungsformen. Die Enten stammen aus gewerblicher Haltung.

Trichomonaden konnten auch bei verschiedenen Lori-Arten gefunden werden.

Tabelle 7: Beprobte lebende Loris

Gattung	Art
Glanzlorig <i>Chalcopsitta</i>	Braunlori, <i>Chalcopsitta duivenbodei duivenbodei</i>
	Kardinallori, <i>Chalcopsitta cardinalis</i>
Rotlori <i>Eos</i>	Kapuzenlori, <i>Eos squamata squamata</i>
	Obi Kapuzenlori, <i>Eos squamata obiensis</i>
	Diademlori, <i>Eos histrio histrio</i>
Weißbürzellorig, <i>Pseudeos</i>	Weißbürzellorig, <i>Pseudeos fuscata fuscata</i>
Keilschwanzsittiche <i>Trichoglossus</i>	Schmucklori, <i>Trichoglossus ornatus</i>
	Breitbinden Allfarblorig, <i>Trichoglossus h. haematodus</i>
	Blauwangen Allfarblorig, <i>Trichoglossus h. capistratus</i>

Fortsetzung Tabelle 7: Beprobte lebende Loris

Gattung	Art
Keilschwanzsittiche <i>Trichoglossus</i>	Gebirgs Allfarblori, <i>Trichoglossus h. moluccans</i>
	Mitchell Allfarblori, <i>Trichoglossus haematodus mitchellii</i>
	Neukaledonien Allfarblori, <i>Trichoglossus h. deplanchii</i>
	Rosenberg Allfarblori, <i>Trichoglossus h. rosenbergii</i>
	Rotnacken Allfarblori, <i>Trichoglossus h. rubritorquis</i>
	Sumba Allfarblori, <i>Trichoglossus haematodus fortis</i>
	Weber's Allfarblori, <i>Trichoglossus haematodus weberi</i>
	Apolori, <i>Trichoglossus johnstoniae johnstoniae</i>
	Schuppenlori, <i>Trichoglossus chlorolepidotus</i>
	Gelbkopflori, <i>Trichoglossus euteles</i>
	Irislori, <i>Trichoglossus iris iris</i>
Breitschwanzlori <i>Lorius</i>	Prachtgelbmantellori, <i>Lorius garrulus flavopalliatus</i>
	Erzlori, <i>Lorius domicella</i>
	Frauenlori, <i>Lorius lory lory</i>
Zierlori <i>Charmosyna</i>	Josephinenlori, <i>Charmosyna josefinae</i>
	Papualori, <i>Charmosyna papou papou</i>
	Stella Papualori, <i>Charmosyna papou stellae</i>
Prachtzierlori <i>Hypocharmosyna</i>	Grünbürzeliger Schönlori, <i>Hypocharmosyna placentis subplacens</i>
Berglori <i>Neopsittacus</i>	Gualori, <i>Neopsittacus musschenbroekii</i>
	Smaragd-Gualori, <i>Neopsittacus pullicauda pullicauda</i>
Moschuslori, <i>Glossopsitta</i>	Moschuslori, <i>Glossopsitta concinna</i>

Systematische Einteilung nach PAGEL (1985)

Tabelle 8: Isolate sonstiger Spezies

Isolatbezeichnung	Spezies	Bemerkungen
T. f.	Rind <i>Bos taurus</i>	ATCC 30924
WF	Waran <i>Varanus spez.</i>	keine

Das Isolat *Tritrichomonas foetus* wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Klaus Henning, Institut für Tiergesundheit, Wusterhausen des Friedrich Loeffler Instituts (vormals Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere) zur Verfügung gestellt; das Einverständnis zur Weitergabe von Dr. Heinz Sager, Institut für Parasitologie, Universität Bern, Schweiz liegt vor. Die dortige Bezeichnung lautet ATCC 30924.

Der Waran war ein Patient der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische. Es handelt sich um eine nicht weiter bestimmte Flagellatenart, jedoch nicht um Trichomonaden.

3.1.2 Medien, Lösungen und Reagenzien

Basal Medium Eagle (BME) mit Earle'schen Salzen

- 100,0 ml/l BME EARLE Instamed 9,34 g/l mit L-Glutamin
(Seromed, Biochrom, Berlin)
- 100,0 ml/l Tryptose-Phosphat-Brühe (TPB)
Stammlösung: 29,5 g/l TPB-Pulver
(Difco, Michigan, USA) in Aqua bidest. gelöst und autoklaviert
- 1,0 ml/l Gentamycin
Lösung: 1 g Gentamycinsulfat (663 U/mg)
(Seromed, Biochrom, Berlin) in 20 ml Aqua dest. gelöst

0,5 ml/l Moronal-Suspension (500.000 I.E. auf 40 ml H₂O)
(Heyden, München)

15,0 ml/l Hydroxyethyl-piperazinyl-ethansulfonsäure (Hepes 1 M)
(Serva, Heidelberg)

gelöst in Aqua dest. und mit 1 N NaOH (Merck, Darmstadt) auf pH 7,5
eingestellt

Dulbecco's Phosphate Buffer (DPB)

8,00 g/l (137 mM) NaCl (Merck, Darmstadt)

0,40 g/l (5,4 mM) KCl (Merck, Darmstadt)

1,15 g/l (8,1 mM) Na₂HPO₄ (Merck, Darmstadt)

0,20 g/l (1,5 mM) KH₂PO₄ (Merck, Darmstadt)

gelöst in 1000 ml Aqua dest., autoklaviert und bei Raumtemperatur aufbewahrt

Trypsin-Stammlösung

4,0 g/l Trypsin (1:250) (Difco, Michigan, USA)

10,0 g/l (0,505 M) D(+)-Glucose-Monohydrat

gelöst in zehnfach konzentriertem DPB

Gebrauchslösung: Stammlösung 1:10 mit Aqua dest. verdünnen

Antibiotika und Antimykotika

Fortum[®] 1,0 g Ceftazidim (Glaxo Smith Kline, München)

Augmentan[®] 1,2 g Amoxicillin (Glaxo Smith Kline, München)

Baytril[®] 2,5 % Inj. Lsg. Enrofloxacin (Bayer, Leverkusen)

Diflucan[®] I.V. Fluconazol (Pfizer GmbH, Karlsruhe)

Candio-Hermal[®] Nystatin (Hermal, Heidelberg)

TE-Puffer

0,97 g/l (10mM) Tris-HCl (Roth, Karlsruhe)

0,37 mg/l (1mM) EDTA-Na₂ (Roth, Karlsruhe)

gelöst in Aqua dest. und mit 5 N HCl auf pH 7,4 eingestellt

Taq DNA Polymerase

(MBI Fermentas, St. Leon-Roth)

Konzentration: 5 U/μl

dazugehörig: 10x PCR Buffer mit (NH₄)₂SO₄

25 mM MgCl₂

Nukleotidmischung

(Epicentre, USA)

6,25 mM dNTP Solution

10 μM dATP

10 μM dCTP

10 μM dGTP

10 μM dTTP

Größenstandards

(MBI Fermentas, St. Leon-Roth)

Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder, 0,5 mg DNA/ml

Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder, 0,5 mg DNA/ml

MassRuler™ DNA Ladder

Loading Dye Solution 6x

(MBI Fermentas, St. Leon-Roth)

0,09 % bromophenol blue

0,09 % xylene cyanol FF

60 % glycerol

60 mM EDTA

Agarose

1,125 g	Agarose NEEO Ultra-Qualität	(Roth, Karlsruhe)
2,0 g	MetaPhor [®] Agarose	(Biozym, Hess. Oldendorf)
	LMP-Agarose	(Roth, Karlsruhe)

Laufpuffer (5x TBE) für PCR

250,0 g	0,9 M	Tris	(Roth, Karlsruhe)
137,5 g	0,9 M	Borsäure	(Merck, Darmstadt)
18,61 g	0,5 M	EDTA	(Roth, Karlsruhe)

in Aqua dest. lösen, auf 5 Liter auffüllen und mit 4 M NaOH auf pH 8,0 einstellen

Gebrauchslösung: 0,5x TBE

Ethidiumbromidlösung

Ethidiumbromidlösung 1 % (10 g/l) (Roth, Karlsruhe)
gelöst in Aqua dest. als Stammlösung
zum Gebrauch auf 2 mg/l verdünnt

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

8,00 g	137 mM	NaCl	(Merck, Darmstadt)
0,20 g	2,7 mM	KCl	(Merck, Darmstadt)
1,15 g	8,1 mM	Na ₂ HPO ₄	(Merck, Darmstadt)
0,20 g	1,5 mM	KH ₂ PO ₄	(Merck, Darmstadt)

Nukleasen-Neutralisationslösung

1,21 g	10 mM	Tris-HCl	(Roth, Karlsruhe)
1,17 g	20 mM	NaCl	(Merck, Darmstadt)
37,22 g	100 mM	EDTA	(Roth, Karlsruhe)
0,42 g	1 mM	Aurintricarboxyl	(Sigma, Osterode am Harz)

gelöst in 1 Liter Aqua dest.

Verdauungspuffer

9,3 g	100 mM	EDTA	(Roth, Karlsruhe)
9,0 ml	1 %	N-lauryl-sarcosine	(Merck, Darmstadt)
0,5 ml	0,2 %	Sodiumdeoxycholat	(Merck, Darmstadt)

gelöst in 250 ml Aqua dest.

2 mg/ml	Proteinase K (15,1 mg/ml)	(Roche, Mannheim)
---------	---------------------------	-------------------

Waschpuffer (TE-1)

1,21 g	20 mM	Tris	(Roth, Karlsruhe)
9,31 g	50 mM	EDTA	(Roth, Karlsruhe)

gelöst in 500 ml Aqua dest.

Aufbewahrungspuffer (TE-2)

0,61 g	10 mM	Tris	(Roth, Karlsruhe)
0,01 g	0,05 mM	EDTA	(Roth, Karlsruhe)

gelöst in 500 ml Aqua dest.

Laufpuffer (10x TBE) für PFGE

53,9 g	445 mM	Tris	(Roth, Karlsruhe)
27,5 g	445 mM	Borsäure	(Merck, Darmstadt)
3,72 g	10 mM	EDTA	(Roth, Karlsruhe)

gelöst in 1 Liter Aqua dest.

Sonstiges

DMSO (Dimethylsulfoxid)	(Serva, Heidelberg)
Formalin, min. 37 %	(Merck, Darmstadt)
Giemsa	(Merck, Darmstadt)
Karbolfuchsin	(Merck, Darmstadt)
Methanol	(Schmidt Alkohol, Dillenburg)

Ethanol	(Roth, Karlsruhe)
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	(Sigma, Osterode am Harz)

3.1.3 Anzuchtmedien für Trichomonaden

3.1.3.1 Diamond-TYM-Medium

Die Herstellung erfolgte nach der Beschreibung von DIAMOND (1957), mit der Ergänzung von DIAMOND (1968) und eigener Modifikation.

20,0 g	Trypticase (BBL)	(Becton, Dickinson & Co., USA)
10,0 g	Hefeextrakt	(Merck, Darmstadt)
5,0 g	Maltose	(Merck, Darmstadt)
1,0 g	L-Cysteinhydrochlorid	(Merck, Darmstadt)
0,8 g	K ₂ HPO ₄	(Merck, Darmstadt)
0,8 g	KH ₂ PO ₄	(Merck, Darmstadt)
0,2 g	L-Ascorbinsäure	(Merck, Darmstadt)
ad 900 ml	Aqua dest.	
0,5 g	Agar-Agar	(Merck, Darmstadt)
100 ml	FKS	(Seromed, Biochrom, Berlin)
0,126 g	Penicillin G, 1 Mega	(Grünenthal, Aachen)
1,0 g	Streptomycinsulfat, 1,0 g	(Grünenthal, Aachen)
10 ml	Amphotericin B 250 µg/ml	(Seromed, Biochrom, Berlin)

Die ersten sieben Komponenten wurden abgewogen und mit Aqua dest. auf 900 ml aufgefüllt und in Lösung gebracht. Der pH-Wert der Lösung wurde mit NaOH bzw. HCl auf 6,0 eingestellt.

Anschließend wurde Agar zugegeben und die Lösung 20 Minuten bei 1 bar autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf 48 °C wurden Serum, Antibiotika und Antimykotikum zugegeben, die Lösung in 100 ml Flaschen portioniert und bei -20 °C eingefroren.

3.1.3.2 Hühner-Embryo-Fibroblasten

(SCHAF and PURCHASE, 1998)

Zur Herstellung der Hühner-Embryo-Fibroblastenkulturen (HEF-Kulturen) wurden zehntägig bebrütete SPF-Hühnerembryonen (VALO, Lohmann, Cuxhaven) verwendet. Nach Abflammen der Eischale am stumpfen Pol erfolgte die sterile Entnahme des Embryos. Kopf und innere Organe wurden entfernt und der Körper mechanisch homogenisiert. Die so erhaltene Gewebemasse wurde mit einem Rührmagneten in einen Erlenmeyerkolben überführt und mit DPB-Lösung zweimal gewaschen. Danach wurde Trypsin-Gebrauchslösung zugesetzt, 30 Sekunden gerührt und 10 Minuten zum Sedimentieren schräggestellt. Der Überstand wurde verworfen, anschließend wieder Trypsin-Lösung zugesetzt, 10 Minuten gerührt und 10 Minuten schräggestellt. Diesmal wurde der zellhaltige Überstand mit je 1 ml fetalem Kälberserum (FKS) (Seromed, Biochrom, Berlin) in Zentrifugengläser überführt. Die Trypsinierung erfolgte noch dreimal. Danach wurde der Überstand 10 Sekunden bei 3000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die pelletierten Zellen in BME mit einem Zusatz von 5 % FKS resuspendiert. Die Suspension wurde auf eine Zelldichte von 10⁶/ml eingestellt und in Zellkulturflaschen und -schälchen gegeben. Aus einem Embryo ließen sich 80 bis 100 ml Zellsuspension gewinnen. Nach eintägiger Inkubation bei 37 °C waren die Zellen zu einem dichten Zellrasen ausgewachsen. Als Erhaltungsmedium diente BME mit 2 % FKS.

3.1.3.3 Hühner-Embryo-Leber-Zellen

(SCHAF and PURCHASE, 1998)

Zur Herstellung der Hühner-Embryo-Leber-Zellkulturen (HELZ-Kulturen) wurden vorzugsweise 10-11 Tage bebrütete Embryonen verwendet. Die Entnahmetechnik erfolgte wie bei der HEF-Herstellung. Die Lebern der Embryonen wurden vorsichtig entfernt und in einer Petrischale mit DPB-Lösung gewaschen. Nach der Homogenisierung und Zugabe von DPB-Lösung wurde

das Gemisch in einem Erlenmeyerkolben kurz aufgeschüttelt. Durch Schrägstellen sedimentieren die Leberzellstücke, der Überstand wurde verworfen. Nach der Zugabe von Trypsin-Lösung wurde der Kolben für fünf bis zehn Minuten in ein 37 °C warmes Wasserbad gestellt. Das Sediment wurde nochmals aufgeschüttelt und erneut für fünf Minuten schräg stehen lassen. Der Überstand wurde in Zentrifugengläser überführt und der Trypsinierungsvorgang durch die Zugabe von 1 ml FKS gestoppt. Die Trypsinierung wurde zwei bis dreimal wiederholt. Nach der letzten Trypsinierung wurde der komplette Inhalt des Erlenmeyerkolbens durch eine sterile Gaze in ein Zentrifugenglas filtriert. Die Zentrifugation erfolgte bei ca. 1000 g für 10 Sekunden. Der Überstand wurde verworfen, die pelletierten Zellen in BME mit einem Zusatz von 15 % FKS resuspendiert und in Zellkulturgefäße verbracht. Aus einer Embryoleber ließen sich ungefähr 5 ml Zellsuspension gewinnen. Nach eintägiger Inkubation bei 37 °C waren die Zellen zu einem dichten Zellrasen ausgewachsen. Als Erhaltungsmedium diente BME mit 2 % FKS.

3.1.4 DNA-Präparations Kit

Die DNA-Extraktion erfolgte mit Hilfe des DNeasy™ Tissue-Kits (Qiagen, Hilden).

3.1.5 Oligonukleotidprimer und Thermocycler Temperaturprogramm

PCR-Primer (MWG-Biotech AG, München)

Für die PCR wurden folgende Oligonukleotidprimer verwendet (FELLEISEN, 1997)

TFR1	5'-TGC TTC AGT TCA GCG GGT CTT CC-3'
TFR2	5'-CGG TAG GTG AAC CTG CCG TTG G-3'

Für die RAPD wurden folgende Oligonukleotidprimer verwendet
(FELLEISEN, 1998)

OPB 07 5'-GGT GAC GCA G-3'
OPB 17 5'-AGG GAA CGA G-3'
OPB 18 5'-CCA CAG CAG T-3'

Für die speziesspezifische PCR wurde folgendes Thermocycler Temperaturprogramm verwendet (FELLEISEN, 1997)

5,8S rRNA

1	94,0 °C	3 Minuten
2	94,0 °C	30 Sekunden
3	66,0 °C	30 Sekunden
4	72,0 °C	90 Sekunden
5	die Schritte 2 bis 4 wurden insgesamt 40 mal wiederholt	
6	72,0 °C	15 Minuten
7	4,0 °C	15 Minuten

Für die RAPD wurde folgendes Thermocycler Temperaturprogramm verwendet
(FELLEISEN, 1998)

RAPD

1	94,0 °C	3 Minuten
2	94,0 °C	1 Minute
3	36,0 °C	1 Minute
4	72,0 °C	2 Minuten
5	die Schritte 2 bis 4 wurden insgesamt 40 mal wiederholt	
6	72,0 °C	10 Minuten
7	4,0 °C	15 Minuten

3.1.6 Restriktionsenzyme

(MBI Fermentas Molecular Biology, St. Leon-Roth)

*Bse*LI (*Bsi*YI)

5'...CCNNNNN↓NNGG...3' aus *Bacillus stearothermophilus*

55 °C

Buffer Y⁺/TangoTM

*Mse*I (*Tru*II)

5'...T↓TAA...3' aus *Thermus ruber* RFL1

65 °C

Buffer R⁺

*Taq*I

5'...T↓CGA...3' aus *Thermus aquaticus* YT-1

65 °C

Buffer TaqI⁺

*Tas*I (*Tsp*EI)

5'...↓AATT...3' aus *Thermus aquaticus* Vn4-211

65 °C

Buffer B⁺

*Vsp*I

5'...AT↓TAAT...3' aus *Vibrio species*

37 °C

Buffer O⁺

SmaI

5'...CCC↓GGG...3'

aus *Serratia marcescens*

30 °C

Puffer Y⁺/Tango™

3.1.7 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Brutschrank	(Heraeus, Frankfurt am Main)
Autoklav	(Systec GmbH, Wettenberg)
Werkbank	Mikroflow (Nunc, Wiesbaden)
	Safeflow 1,2 (Nunc, Wiesbaden)
PCR Werkbank	P.C.R. Omni, Microflow (Nunc Astec, Wiesbaden)
Mikroskop	Diavert (Leitz, Wetzlar)
	Axioskop (Zeiss, Oberkochen)
Zellkulturgefäße	TC 25 cm ² Flaschen (Greiner, Frickenhausen)
	Gewbekulturschälchen 35 mm (Greiner, Frickenhausen)
Handschuhe	NoPowder latex examination gloves (Ansell GmbH, München)
	Nitra Touch (Ansell GmbH, München)
Zentrifugen	Universal 32 R (Hettich, Tutlingen)
	Rotanta/T (Hettich, Tutlingen)
	Mikro 20 (Hettich, Tutlingen)
Thermoblock	(Falc, Opto-Lab, Concordia, Italien)
Magnetrührer	(Kretschmer, Gießen)
Vortex-Schüttler	(Heidolph, Kelheim)
Gilson-Pipetten	(Abimed, Langenfeld)
Wasserbad	(Köttermann, Uetze-Hänigsen)
Feinwaage	P 160 N (Mettler, Gießen)
pH-Meter	(Knick, Berlin)

-85 °C Gefrierschrank	(Nunc, Wiesbaden)
Kamera	Nikon Coolpix 4500 Canon EOS 10 Spiegelreflexkamera
Objektiv	Canon 100 mm Macro EF 1:2,8; Orange-Rot Filter Blende 5,6
Gestopfte Pipettenspitzen	10 µl, 100 µl, 1000 µl (Biozym, Hess. Oldendorf)
PCR Tubes 0,5 ml	dünnwandig (Biozym, Hess. Oldendorf)
Nesco-Film	(Nippon Shoji Kaisha LTD, Japan)
Thermocycler	PTC-200 (Biozym, Hess. Oldendorf)
Stromquelle	EPS 600 (Pharmacia, Schweden) Unipack 250, (UniEquip)
Elektrophoresekammer	(von Keutz, Reiskirchen)
Mikrowellenherd	Home Electronics 700 W (Alaska)
Film	APX 100 (AGFA, Leverkusen)
UV-Illuminator	254 nm Wellenlänge (Novodirekt)
Software	Clone Manager 4,0 (Scientific & Educational Software, USA)
Zentrifuge	Biofuge 22R (Heraeus, Ffm)
Reaktionsgefäße	2 ml (Biozym, Hess. Oldendorf)
Waage	PM480, Delta Range [®] (Mettler, Gießen)
Vortex-Schüttler	Vortex Genie 2 (Scientific Industries, NY, USA)
Wasserbad	GFL 1002 (MAGV GmbH, Rabenau Londorf) GFL 1003 (MAGV GmbH, Rabenau Londorf)
Zentrifuge	202 MK (Sigma, Osterode am Harz)
PFGE Kammer	CHEF-DR II (Bio-Rad, München)
Geldokumentationsgerät	Gel-Doc 2000 (Bio-Rad, München)
Video Printer	(Sony, Tokyo, Japan)
Video Printer Papier	(Sony, Tokyo, Japan)
Mikroskop	DMR Stereomikroskop (Leika, Wetzlar)

Kamera	SVHS CCD-Kamera (EHD [®] KamPro, Damme)
Software	Motic Images Plus 2,0 (Motic Deutschland GmbH, Wetzlar)

3.2 Methoden

3.2.1 Probenentnahme

Die Probenentnahme erfolgte bei Taube, Greifvogel, Wellensittich und Kanarienvogel in Form eines Kropftupfers. Dazu brachte ein Helfer den lebenden Vogel in eine gestreckte Haltung und fixierte ihn gut. Der angefeuchtete Tupfer wurde von der linken Schnabelseite zur rechtsliegenden Ösophagusöffnung geführt und bis zum Kropf unter Palpationskontrolle vorsichtig in die Tiefe geschoben. Um oberflächliches Epithel abzulösen, wurde die Kropfwand von außen massiert. Der Tupfer wurde wieder herausgezogen und sofort in ein geeignetes Medium verbracht und bei 37 °C inkubiert.

Bei der Sektion wurde die Tupferprobe vom eröffneten Kropf genommen und sofort in ein geeignetes Medium verbracht und bei 37 °C inkubiert. Bei Huhn, Pute und Ringfasan erfolgte die Probeentnahme während der Sektion der frischtoten Tiere. Die Tupferprobe wurde dem Darm (vor allem Ileum und Zäkum) entnommen und sofort in ein geeignetes Medium verbracht, vorzugsweise zur Erstkultivierung auf HEF-Kultur, und bei 37 °C inkubiert.

3.2.2 Anzucht und Konservierung der Isolate

Die Anzucht der Flagellaten erfolgte parallel in Diamond-Medium und auf HEF-Kultur. Bei schwer anzüchtbaren Isolaten wurden auch HELZ als Kulturmedium verwendet.

Aufbereitung zur Aufbewahrung

Es wurden nur Proben eingefroren, die sich in der exponentiellen Vermehrungsphase befanden. Dabei muss darauf geachtet werden, dass das Medium möglichst frei von toxischen Stoffwechselprodukten und keimfrei ist. Das Einfrieren erfolgte unverzüglich bei -85 °C in kleinen Portionen von 0,7 ml, nachdem 49 µl DMSO (entspricht 7 %) den Proben hinzugefügt wurde. Bei dieser Temperatur erfolgte auch die Aufbewahrung.

Um eine gute Wiederanzuchtrate zu erzielen, mussten die Proben nach spätestens 9 Monaten wieder aufgetaut und mehrmals passagiert werden. Anschließend konnten sie wieder eingefroren werden.

3.2.3 Überprüfung der Beweglichkeit

Die Proben wurden unter einem Invert-Mikroskop betrachtet und die trichomonadentypische Beweglichkeit beurteilt.

3.2.4 Färberische Darstellung der Trichomonaden

3.2.4.1 Dauerpräparat ohne vorherige Fixierung

Nach GIEMSA (1902/04)

Ein Tropfen der nach Kapitel 3.2.2 angezüchteten Kulturen wurde auf einem Objektträger ausgestrichen und luftgetrocknet. Das getrocknete Präparat wurde mit Methanol bedeckt und nach fünf Minuten schräggestellt, damit das Methanol abfließen konnte. Anschließend wurde das Präparat 20 Minuten mit Giemsa-Gebrauchslösung (mit Puffer Tritisol pH 7,2; 1:20 verdünnt) gefärbt. Zuletzt wurde es abgespült und zum Trocknen wieder schräggestellt.

Nach DAUST (1934)

Ein Tropfen der nach Kapitel 3.2.2 angezüchteten Kulturen wurde auf einem Objektträger ausgestrichen und luftgetrocknet. Das getrocknete Präparat wurde mit konzentrierter Karbolfuchsinlösung bedeckt und nach drei bis fünf Minuten abgespült.

3.2.4.2 Dauerpräparat mit vorheriger Fixierung

Nach GALLI-VALERIO (1900)

Ein Tropfen der nach Kapitel 3.2.2 angezüchteten Kulturen wurde mit 4%igem Formalin in einem Reagenzröhrchen für ca. 10 Minuten feucht fixiert. Davon wurde ein Tropfen auf einem Objektträger ausgestrichen und luftgetrocknet. Das Präparat wurde in stark verdünnter Giemsa-Gebrauchslösung (1 Tropfen auf 5 ml Wasser) 24 Stunden gefärbt.

3.2.5 PCR-vermittelte Speziesidentifizierung

3.2.5.1 Polymerasekettenreaktion

Die PCR ist eine etablierte Methode zur Untersuchung der DNA. Für die vorliegende Arbeit spielt sie eine zentrale Rolle und soll daher erläutert dargestellt werden.

Die PCR besteht aus sich wiederholenden Zyklen von jeweils drei Teilschritten

- 1) Denaturierung
- 2) Annealing
- 3) Extension

Bei der Denaturierung wird die DNA-Doppelhelix durch Erhitzung auf 94 °C in zwei Einzelstränge getrennt. Dabei brechen die vergleichsweise schwachen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen auf.

Beim Annealing lagern sich die spezifischen Oligonukleotid-Primer an die komplementären Sequenzen an. Auch dies ist temperaturabhängig. Die richtige Temperatur muss für jede neu zu etablierende PCR ermittelt werden.

Bei der Extension baut die Polymerase am 3'-Ende beginnend die zur einzelsträngigen DNA komplementären Nukleotide an, so dass am Ende des ersten Zyklus zwei identische DNA-Doppelstränge entstanden sind. Hier erfolgt die eigentliche Amplifizierung. Die optimale Arbeitstemperatur liegt bei 72 °C.

Am Ende des letzten Zyklus kommt ein zusätzlicher Extensionsschritt, und zuletzt wird der Vorgang bei einer Temperatur von 4 °C gestoppt.

Bei der Polymerase-Chain-Reaction (PCR) handelt es sich um eine sehr spezifische aber empfindliche Methode der DNA-Analyse, bei der ein durch die Primer definiertes DNA-Fragment in kürzester Zeit vervielfältigt wird. Während aller Arbeitsschritte muss sehr sorgfältig und sauber gearbeitet werden, um Kontaminationen mit DNasen zu vermeiden und um die Reagenzien frei von DNA-Verunreinigungen zu halten, die zu falsch-positiven Ergebnissen führen können.

Die Durchführung erfolgt an einer Werkbank in einem speziellen PCR-Labor. Dort finden sich Pipetten und Zubehör ausschließlich für den PCR Gebrauch.

3.2.5.2 Präparation der Protozoen-DNA

Vermehrung und Vorbereitung

Die Trichomonaden wurden in ca. 10 ml Diamond-Medium vermehrt. Die Präparation erfolgte auf dem Höhepunkt der exponentiellen Vermehrungsphase. Dafür wurden die Proben täglich auf ihre Dichte hin kontrolliert. Bei genügend hoher Trichomonadendichte (optimal: ca. 1×10^8) wurden die Röhrchen mit 1800 U/min für 10 Minuten zentrifugiert und in den Brutschrank verbracht. Über Nacht können sich dann die vitalen Trichomonaden aus dem Pellet befreien und in den Überstand gelangen.

Waschen der Trichomonaden

Am nächsten Tag wurde der Überstand in ein spitz zulaufendes Zentrifugenröhrchen pipettiert und bei 2500 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 0,7 ml TE- Puffer resuspendiert. Die Resuspension wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und erneut bei 2500 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

DNA-Präparation mit DNeasy-Kit

Zum Lysieren der Trichomonadenzellen wurde das Pellet mit 180 µl ATL-Puffer resuspendiert, es wurden 20 µl Proteinase K hinzugefügt und für 30 Minuten bei 55 °C inkubiert. Danach wurden 200 µl AL-Puffer zugesetzt und für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurde das Gefäß bei Raumtemperatur zum Abkühlen stehen gelassen, bevor 300 µl Ethanol zugemischt wurden, um die DNA zu fällen. Die Lösung wurde in ein Membrangefäß überführt und bei 6.000 U/min für eine Minute zentrifugiert, damit sich die DNA an die Membran bindet. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde entfernt und 500 µl des ersten Waschpuffers AW1 auf die Membran pipettiert. Wieder wurde für eine Minute bei 6.000 U/min Flüssigkeit abzentrifugiert und entfernt. 500 µl des zweiten Waschpuffers AW2 wurde auf die Membran pipettiert und bei 13.000 U/min für zwei Minuten zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde entfernt und das Membrangefäß nochmals bei 13.000 U/min für zwei Minuten zentrifugiert, um die Membran von Ethanolresten zu befreien. Unter das Membrangefäß kam nun ein neues Röhrchen, es wurden 200 µl AE-Puffer auf die Membran gegeben und das Ganze für zwei Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, um die DNA zu eluieren. Anschließend wurde bei 6.000 U/min für eine Minute zentrifugiert. Unter das Membrangefäß kam wieder ein neues Röhrchen, es wurden 200 µl AE-Puffer auf die Membran gegeben und für zwei Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde bei 6.000 U/min für eine Minute zentrifugiert. Beide gefüllten Röhrchen wurden beschriftet und konnten nun bei -20 °C gelagert werden.

3.2.5.3 Durchführung der PCR

Alle Proben und Reagenzien wurden bei -20 °C gelagert. Kurz vor Beginn wurden sie bei Zimmertemperatur aufgetaut, aufgeschüttelt, abzentrifugiert und auf Eis zwischengelagert.

Mastermix

54,2 µl	Aqua bidest.
8,0 µl	10x Puffer
4,8 µl	MgCl ₂ (25 mM)
2,7 µl	Primer TFR1
2,7 µl	Primer TFR2
1,6 µl	dNTP (6,25 mM)
0,6 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)

Der Mastermix für alle Proben des PCR-Durchgangs inklusive des Leerwerts wurde zusammenpipettiert und gemischt. Ein Volumen von 74,6 µl wurde auf die einzelnen PCR-Tubes verteilt und, außer bei dem Leerwert, 5,4 µl (entspricht ca. 100-300 ng DNA) der jeweiligen DNA-Probe hinzugefügt.

Nach sorgfältigem Verschließen der Gefäße wurden die Proben in den vorgewärmten Thermocycler verbracht und das Programm 5,8S rRNA gestartet.

Sofern die Amplifikate nach dem Ende des Programms nicht sofort weiterverwendet werden konnten, wurden sie bei -20 °C gelagert.

Verwendeter Größenstandard

Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder

3.2.5.4 Restriktionsverdau

Mastermix

4 μ l Aqua bidest.

3 μ l 10x Puffer

1 μ l Enzym

Der Mastermix wurde für alle Proben des Verdau zusammenpipettiert und gemischt. Ein Volumen von 8 μ l wurde auf die einzelnen Eppendorfgefäße verteilt und 22 μ l des jeweiligen PCR-Produkts hinzugefügt. Es kamen nur PCR-Produkte zum Einsatz die eine deutliche Bande zeigten. Dies entspricht einem DNA/Enzymverhältnis von 1-5 U pro μ g DNA.

Anschließend wurde die DNA bei der für das jeweilige Enzym vorgeschriebenen Temperatur verdaut.

Verwendeter Größenstandard

Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder

3.2.5.5 Agarosegelelektrophorese

Herstellung eines 1,5%igen Agarosegels

In einen 500 ml Erlenmeyerkolben wurden 75 ml TBE-Puffer und 1,125 g Agarosepulver gefüllt. Das Gemisch wurde mit Hilfe eines Magnetrührers verrührt und in der Mikrowelle bis zum Kochen erhitzt. Unter Rühren kühlte das Gemisch auf 50 bis 60 °C ab und konnte dann gegossen werden. Vor dem Gießen wurde der Plexiglasgelträger seitlich mit Tesa-Film an den Rändern abgedichtet. Unmittelbar nach dem Gießen wurde der Kamm in die hierfür vorgesehene Aussparung gesetzt. Nach ca. 20 Minuten war das Gel erstarrt, wurde in die mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer verbracht und konnte dort beladen werden.

Herstellung eines MetaPhor[®] Agarosegels

In einen 500 ml Erlenmeyerkolben wurden 50 ml gekühlter TBE Laufpuffer gefüllt. Unter kräftigem Rühren wurde 2 g Agarosepulver hinzugefügt und das Gemisch für 15 Minuten stehen gelassen. Der Kolben wurde mit seinem Inhalt gewogen und die Öffnung mit Frischhaltefolie verschlossen, in die kleine Löcher gestochen wurden. Der Kolben wurde in der Mikrowelle für eine Minute bei mittlerer Hitze erhitzt und wieder für 15 Minuten stehen gelassen. Danach wurde der Kolben für zwei Minuten bei mittlerer Hitze erhitzt und anschließend sanft geschwenkt. Jetzt wurde das Gemisch zum Kochen gebracht und für eine Minute kochen gelassen. Zuletzt wurde der Kolben wieder gewogen und der Flüssigkeitsverlust durch heißes Aqua bidest. ersetzt und verrührt. Bei einer Temperatur von 50 bis 60 °C wurde das Gel in einen Plexiglasgelträger der seitlich mit Tesa-Film an den Rändern abgedichtet wurde gegossen. Nach dem Erstarren wurde es für 20 Minuten bei 4 °C gekühlt.

Beladung des Gels

Auf einem Streifen Nesco-Film wurden Tröpfchen von jeweils 1 µl Loading Dye Solution verbracht. 10 µl jedes Amplifikats wurden auf dem Film-Streifen vorsichtig mit der Loading Dye Solution vermischt und sofort in die Gelslots einpipettiert. Dabei wurde immer nach dem gleichen Schema vorgegangen: zuerst die Proben (Slot 3-11), dann rechts davon die Leerprobe (Slot 12) und zuletzt der Größenstandard (Slot 2).

Die Elektrophoresekammer wurde geschlossen und an die Stromquelle angeschlossen.

Geräteeinstellung

Das verwendete Programm war: 100 Volt für ca. 2 Stunden

3.2.5.6 Ethidiumbromidfärbung und Dokumentation

Zur Sichtbarmachung der Banden wird Ethidiumbromid verwendet. Ethidiumbromid ist ein durch UV-Licht fluoreszierender Farbstoff, der sich an die DNA bindet. Er ist hochtoxisch, kanzerogen und mutagen. Das macht einen sehr vorsichtigen und sorgsamem Umgang mit ihm nötig. Ein direkter Hautkontakt sollte unter allen Umständen vermieden werden.

Nach Ende der Elektrophorese wurde das Gel aus der Kammer genommen und auf eine speziell angefertigte Plexiglasscheibe mit Griffen verbracht, die zusammen mit dem Gel in die Färbelösung kam. Nach 20 Minuten wurde das Gel mit Hilfe der Plexiglasscheibe dem Färbebad entnommen und für 10 Minuten in ein Entfärbebad gelegt.

Danach wurde das Gel auf die dafür vorgesehene Fläche des UV-Illuminators gelegt und darunter befindliche Luftblasen weggestrichen. Durch die UV-Bestrahlung wurden die DNA-Banden sichtbar gemacht. Dabei ist zu beachten, dass vor allem die Augen vor dem UV-Licht mit einem Schutzschirm geschützt werden müssen.

Zur Dokumentation wurden Fotografien angefertigt. Der Fotoapparat ist direkt über dem UV-Illuminator fest angebracht. Die Belichtungszeit betrug zwei Sekunden. Um keine Unschärfe durch die Erschütterung beim Auslösen zu provozieren, wurde ein Selbstauslöser verwendet.

3.2.6 Typisierungsverfahren

3.2.6.1 RAPD

(Random-Amplified-Polymorphic-DNA)

3.2.6.1.1 DNA-Präparation und Durchführung der PCR

Die Präparation der DNA erfolgte mit dem DNeasy-Kit analog zu Kapitel 3.2.5.2.

Mastermix

26,8 µl	Aqua bidest.
8,0 µl	Primer
5,0 µl	10x Puffer
3,6 µl	MgCl ₂ (25 mM)
1,2 µl	dNTP (6,25 mM)
0,4 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)

Ein Volumen von 45 µl wurde auf die einzelnen PCR-Tubes verteilt und, außer bei dem Leerwert, 5 µl (entspricht ca. 100-300 ng DNA) der jeweiligen DNA-Probe hinzugefügt.

Nach sorgfältigem Verschließen der Gefäße wurden die Proben in den vorgewärmten Thermocycler verbracht und das Programm RAPD gestartet.

3.2.6.1.2 Agarosegelelektrophorese, Färbung und Dokumentation

Verwendeter Längenstandard

MassRuler™ DNA Ladder

Geräteeinstellung

Das verwendete Programm war: 100 Volt, ca. 2 Stunden

Ansonsten erfolgte alles analog zu Kapitel 3.2.5.5.

3.2.6.2 Pulsfeldgelelektrophorese

(PFGE)

3.2.6.2.1 DNA-Präparation

modifiziert nach RILEY und KRIEGER (1992)

Die Vermehrung der Trichomonaden erfolgte in Diamond-Medium für mehrere Tage. Die Trichomonaden wurden zweimal mit je 10 ml PBS gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte bei 10.000 RPM für je 10 Minuten. Das Pellet wurde in 1 ml Nukleasen-Neutralisationslösung resuspendiert und für 30 Sekunden in einem 42 °C heißem Wasserbad inkubiert. 10 µl DEPC wurden hinzugefügt und das Gemisch mit vorbereiteter 1%iger warmen LMP-Agarose (1:1 mit Nukleasen-Neutralisationslösung) vermischt und in Blöckchen gegossen. Nach 30 Minuten bei 4 °C waren die Blöckchen erstarrt und konnten in den Verdauungspuffer überführt werden. Auf 3 ml Verdauungspuffer wurden 0,4 ml Proteinase K hinzugefügt. Der Verdau fand für 24 Stunden bei 42 °C statt. In dieser Zeit wurde noch einmal Proteinase K hinzugefügt. Danach erfolgten 10 Waschschrte mit dem Waschpuffer bei 4 °C. Im Anschluss wurden die Blöckchen in den Aufbewahrungspuffer verbracht.

3.2.6.2.2 Restriktionsverdau

Mastermix

178 µl	Aqua bidest.
20 µl	10x Puffer
2 µl	Enzym

Der Mastermix wurde zusammenpipettiert und gemischt. Je ein Blöckchen wurde in ein Volumen von 200 µl gegeben.

Anschließend wurde die DNA in den Blöckchen bei einer Temperatur von 30 °C für 17 Stunden mit dem Enzym *SmaI* verdaut.

3.2.6.2.3 Pulsfeldgelelektrophorese

Pumpgeschwindigkeit	70
Temperatur	11 °C
Volt/cm	6
Volt	200
Switchtime	I:60 Sekunden II:200 Sekunden
Zeit	28 Stunden

3.2.6.2.4 Färbung und Dokumentation

Nach Beendigung des Pulsfeld-Programms wurde das Gel für 20 Minuten in einem Ethidiumbromid-Färbebad gefärbt und anschließend für 10 Minuten in einem Entfärbebad entfärbt. Danach wurde das Gel auf die dafür vorgesehene Fläche des Geldokumentationsgerät gelegt und darunter befindliche Luftblasen weggestrichen. Zur Dokumentation wurden Bilder ausgedruckt.

4 Ergebnisse

4.1 Klinische Befunde

Die beprobten Vögel unterlagen keinen besonderen Auswahlkriterien. Alle vorgestellten Patienten kamen entweder wegen einer Erkrankung, zu einer Routinekontrolle oder als Fundvogel. Die Fundvögel waren entweder aufgelesene Jungtiere oder aber verletzte oder geschwächte Alttiere. Und so zeigten die Trichomonaden-positiven Vögel Symptome in einer Spannbreite von klinisch unauffällig bis hin zu akut gestorben. Trichomonaden wurden sowohl bei Jung-, als auch bei Alttieren gefunden. Auch bei Alttieren konnten klinisch-manifeste Trichomonosen diagnostiziert werden, die zum Tode führten (z.B. die Isolate 1164, KV 6, Uhu 1). Häufiger aber waren geringgradige Trichomonadenfunde als Zufallsbefund (z.B. die Isolate T XII, T VI, KV 1, WS IV). Klinisch-manifeste Trichomonosen äußerten sich vor allem durch allgemeine Schwäche, die mit chronischer Abmagerung einhergingen. Läsionen im Rachen konnten nicht immer bei Trichomonaden-positiven Vögeln gefunden werden, jedoch hatten gelegentlich trichomonadenfreie Tauben Läsionen, die von einer früheren Trichomonose herrühren könnten.

Insgesamt konnten 121 Flagellaten-Isolate gewonnen werden. Die Gesamtzahl aller beprobten Vögel konnte leider nicht ermittelt werden.

In den Tabellen 2–5 sind die Symptome und zum Teil die parasitologischen und mikrobiologischen Befunde einzeln aufgeführt.



Abbildung 1: Gelber Knopf
Ringeltaube (*Columba palumbus*)



Abbildung 2: gesunder Rachen
Brieftaube (*Columba livia* f. domestica)

In Abbildung 1 ist eine adulte Ringeltaube mit für den Gelben Knopf typischen Belägen zu sehen. Die gelblich-käsigen Beläge liegen abgegrenzt auf der Schleimhaut des Larynx, rechts und links der Glottis.

In Abbildung 2 ist zum Vergleich der Rachen einer gesunden Brieftaube abgebildet.

4.2 Pathologische Befunde

Trichomonaden im Darm können nur bei frischtoten Sektionstieren nachgewiesen werden. Dies erklärt die im Verhältnis zu lebend untersuchten Vögeln geringe Probenanzahl. Bei allen Trichomonaden-positiven Tieren konnten auch andere Krankheitsverursacher festgestellt werden, wie Endoparasiten (Kokzidien, Heterakis, Askariden, Capillaria), Ektoparasiten, *Mycoplasma* sp.-Infektionen und die Mareksche Krankheit. Die Enten stammen aus einem Mastbetrieb

mit Trichomonaden als Bestandsproblem. Hier wurde neben den Trichomonaden auch eine generalisierte Entzündung der serösen Häute gefunden.

In Tabelle 6 sind die pathologischen, parasitologischen und mikrobiologischen Befunde einzeln aufgeführt.

4.3 Befunde beim Nativpräparat

Im Direktabstrich kann man Trichomonaden sehr einfach anhand ihrer Größe (Figur 2) und ihren typischen Bewegungen erkennen. Der Flagellenschlag und die undulierende Membran sind mikroskopisch auszumachen. Sie sind deutlich größer als Bakterien und ihre Bewegungen werden von den Geißeln bestimmt. So lassen sie sich deutlich von Bakterien abgrenzen. Bei näherer Betrachtung zeigen die Trichomonaden eine relativ heterogene Morphologie und Größe. Sie zeigen runde und schmale Formen und die kleinsten Individuen sind nur halb so groß im Vergleich zu den Größten. Dies ist im angefärbten Zustand jedoch deutlicher erkennbar. Die Anzahl der freien Geißeln kann im Nativpräparat nicht beurteilt werden.

4.4 Befunde beim fixierten und gefärbten Präparat

Die Färbung mit vorheriger Fixierung in 4%igem Formalin nach GALLI-VALERIO (1900) erwies sich zur Beurteilung der Morphologie als geeignet. Bei den fixierten und gefärbten Trichomonaden stellten sich der Kern und die freien Geißeln deutlich dar.

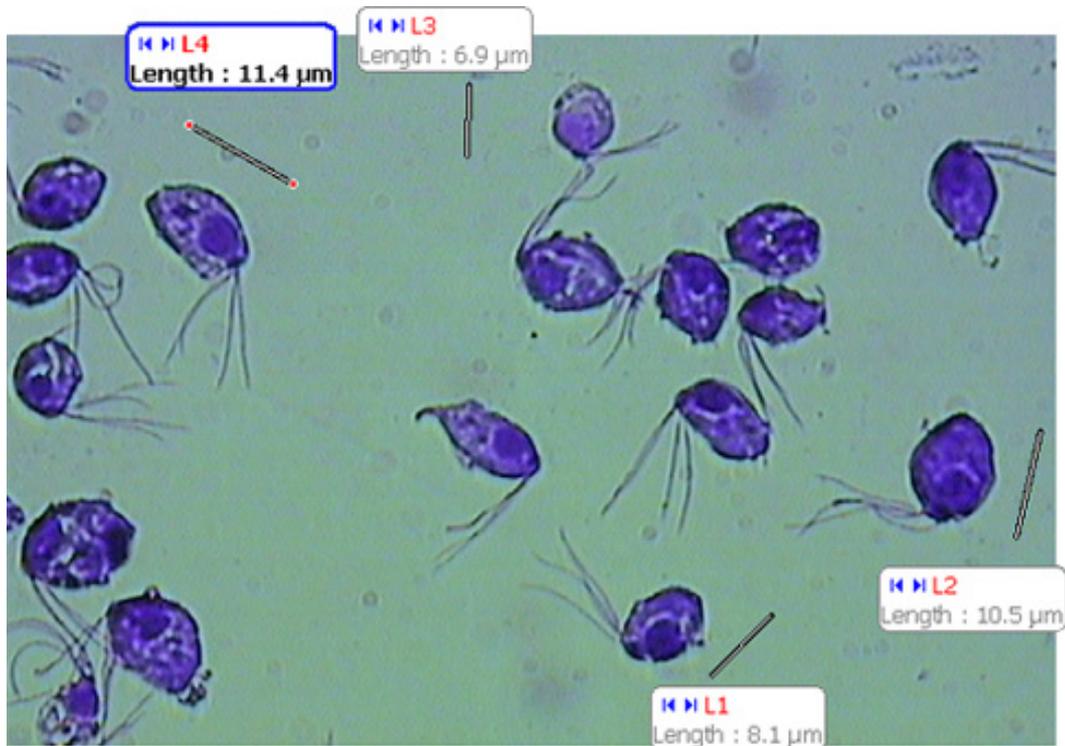
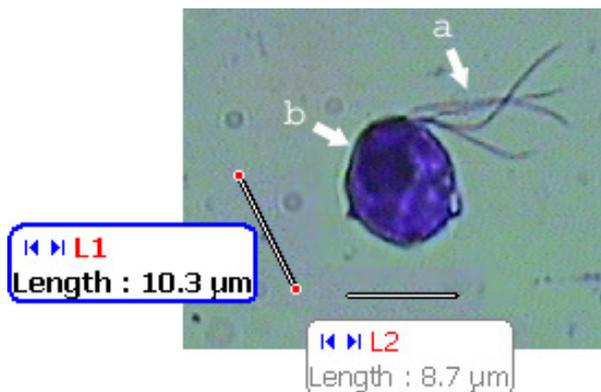


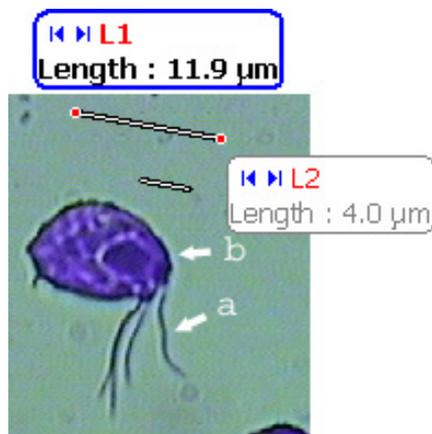
Abbildung 3: Heterogene Morphologie der Trichomonaden eines Kanarienvogels, Ausstrich aus einer HEF-Kultur von Isolat KV 1, Färbung nach GALLI-VALERIO (1900)

In Abbildung 3 ist der Ausstrich einer heterogen-morphologischen Trichomonadenkultur aus einer HEF-Kultur vom Kanarienvogel zu sehen. Bei vier verschiedenen *Trichomonas gallinae*-Individuen ist die gemessene Größe mit angegeben, die zwischen 6,9 und 11,4 µm liegt. Gut zu sehen ist der zum Teil beträchtliche Unterschied in Größe und Form der Trichomonadenkörper. Deutlich zu sehen sind der blau angefärbte Zellkern, die helleren Vakuolen im Zellinneren und die dunklen Flagellen am vorderen Zellpol. Die Anzahl der Flagellen beträgt vier, jedoch kann man dies nicht bei allen Individuen sicher ausmachen. Die undulierende Membran kann man nur am Körperend erahnen. Sie ragt nicht über das Körperende hinaus, ebenso wenig das Axostyl.



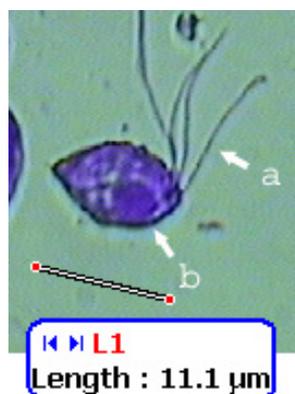
- a vier Vorderflagellen
- b Zellkern
- L1 Länge des Körpers
- L2 Breite des Körpers

Abbildung 4: *Trichomonas gallinae* einer Taube
Ausstrich von Isolat T 9



- a vier Vorderflagellen
- b Zellkern
- L1 Länge des Körpers
- L2 Länge des Zellkerns

Abbildung 5: *Trichomonas gallinae* eines Mäusebussards
Ausstrich von Isolat MB 1



- a vier Vorderflagellen
- b Zellkern
- L1 Länge des Körpers

Abbildung 6: *Trichomonas gallinae* eines Kanarienvogels
Ausstrich von Isolat KV 1

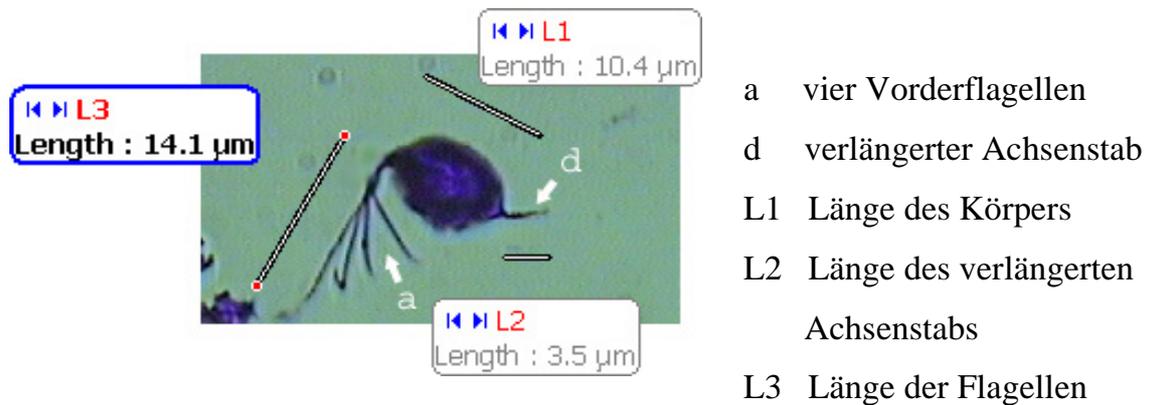


Abbildung 7: *Trichomonas gallinae* eines Wellensittichs

Ausstrich von Isolat WS VIII

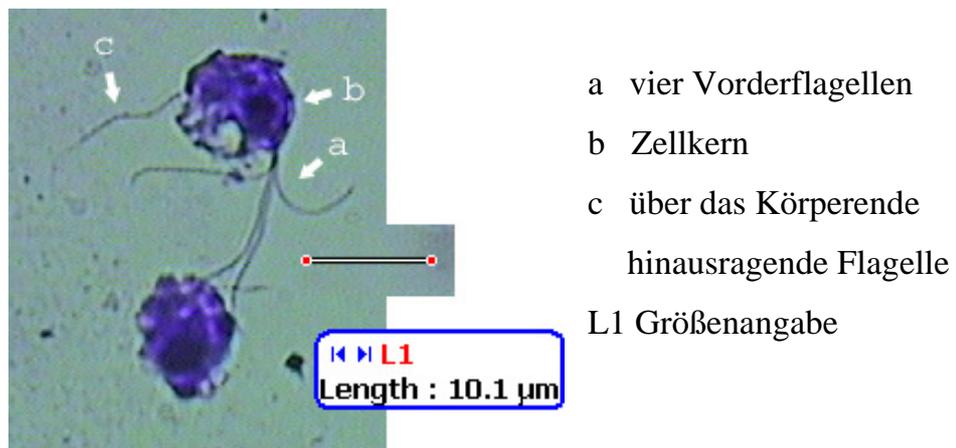


Abbildung 8: *Tetratrichomonas gallinarum* einer Ente

Ausstrich von Isolat E 2

In den Abbildungen 4-8 werden Isolate aus verschiedenen Vogelarten dargestellt. Sie stammen alle aus HEF-Kulturen und wurden nach GALLI-VALERIO (1900) gefärbt. Die Isolate von *Trichomonas gallinae* (Abbildung 4-7) unterscheiden sich von *Tetratrichomonas gallinarum* (Abbildung 8), da nur bei *Tetratrichomonas gallinarum* die rückschlagende Flagelle über das Körperende hinaus ragt. Jedoch auch innerhalb von *Trichomonas gallinae* gibt es Unterschiede. Auffällig ist bei dem Wellensittich-Isolat (Abbildung 7) der deutlich

über das Körperende hinausragende Achsenstab. Auch die Formen der Zellkörper unterscheiden sich leicht. Die Körper wirken mal runder, mal zitronenförmiger. Da jedoch innerhalb eines Abstrichs ähnlich verschiedene Formen vorkommen können (Abbildung 3) kann man hier keine gesicherte Aussage treffen.

4.5 Folgerungen aus der Morphologie für die Systematik

Anhand der Anzahl der Vorderflagellen und ob eine rückschlagende Flagelle vorhanden ist, wurden bisher die verschiedenen Trichomonadenarten unterschieden. Die Größe und die Form sind variabel, da sie zum Teil von äußeren Einflüssen (HEGNER and RATCLIFFE, 1927) und der Präparationsmethode (HONIGBERG and BURGESS, 1994) beeinflusst werden.

Tabelle 9: Morphologische Einteilung von *Trichomonas gallinae* und *Tetratrichomonas gallinarum*

morphologische Eigenschaften zur Art-Diagnose	<i>Trichomonas gallinae</i>	<i>Tetratrichomonas gallinarum</i>
Anzahl der freien Vorderflagellen	vier	vier
Rückschlagende Flagelle	nicht vorhanden	vorhanden

Die in dieser Arbeit gefundene Morphologie bei den verschiedenen Vogelarten stimmt mit der in der Literatur (BONDURANT and HONIGBERG, 1994; MEHLHORN, 2001) vorgegebenen morphologischen Einteilung überein.

4.6 Anzucht von Trichomonaden

Alle Trichomonaden-Isolate zeigten in frischen Abstrichen sowie bei geeigneten Bedingungen (37 °C, pH 7,5) in den drei Kulturmedien rege Bewegung. Die Erstkultivierung erfolgte auf HEF-Kulturen. Trichomonadenkulturen mit stabiler Vermehrungsrate wurden in Diamond-Medium überführt. HELZ-Kulturen wurden bei schwierig anzüchtbaren Trichomonadenkulturen verwendet. Während der Anzucht wurden die Trichomonadenkulturen durch den Zusatz von verschiedenen Antibiotika und Antimykotika (Kapitel 3.1.2) von Bakterien, Hefen und Schimmelpilzen befreit.

Während der Kultivierung in Diamond-Medium, HEF- oder HELZ-Kultur wurden Morphologie und Größe der Isolate bei allen drei Kulturmedien uniformer. Bei überalterten Kulturen und bei Verschiebung des pH-Wertes des Mediums in den sauren Bereich nach mehr als vier Tagen wurden Rundformen beobachtet. Es wurden aber auch in vitalen Kulturen runde Gebilde beobachtet, die mit den Trichomonaden in Zusammenhang zu stehen scheinen.

Bei den Trichomonaden aus den Loris gelang leicht die Diagnose Trichomonose im Nativpräparat, jedoch war die Anzucht auf allen drei Kulturmedien wiederholt nicht möglich.

4.7 Konservierung angezüchteter Trichomonaden

Die Konservierung angezüchteter Trichomonaden erfolgte wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben. In Kultur befindliche Trichomonaden ließen sich so problemlos konservieren und wieder anzüchten. Je länger jedoch die Probe bei -85 °C eingefroren ist, um so schwieriger ist die Wiederanzüchtung. Angetaute Proben (z.B. nach Ausfall des Gefrierschranks) müssen umgehend subkultiviert werden, da sie sonst absterben.

4.8 Speziesidentifizierung

4.8.1 Amplifizierung des 5,8S rRNA-Abschnitts

Für die PCR wurden Oligonukleotidprimer und das Thermocycler-Temperaturprogramm nach FELLEISEN (1997) verwendet. Bei allen *Trichomonas* spp.-Isolaten aus Taube, Greifvogel, Wellensittich, Kanarienvogel, Huhn, Ente, Pute und Ringfasan konnte der 5,8S rRNA-Abschnitt amplifiziert werden (Kapitel 3.2.5). Das Amplicon wies bei allen Isolaten der Gattung *Trichomonas* eine Länge zwischen 350 und 400 bp auf (Abbildung 9). Das Waranisolat WF lieferte kein Amplifikat.

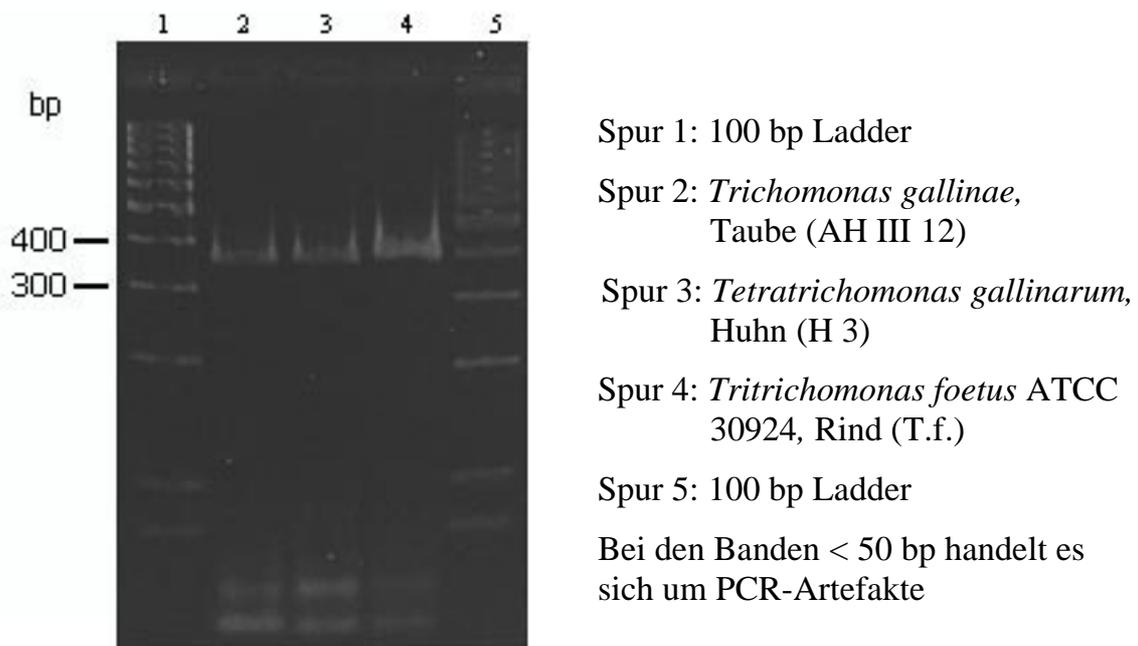


Abbildung 9: Nachweis von *Trichomonas* spp. mittels PCR (Kapitel 3.2.5.3)

4.8.2 Nachweis von Genpolymorphismen mittels Enzymverdau

Nach der PCR-Amplifizierung des 5,8S rRNA-Gens erfolgte eine weitergehende Untersuchung durch einen Restriktionsverdau. Dabei wurden fünf verschiedene

Restriktionsenzyme verwendet, die mit Hilfe des Clone Managers ausgewählt wurden. Als Berechnungsgrundlage dienten bekannte 5,8S rRNA-Sequenzen von Tauben aus der Gen Daten Bank. Fragmente kleiner als 50 bp wurden nur berechnet, da diese Banden häufig von PCR-Artefakten überlagert werden und so mit der Gelelektrophorese nicht sicher zuzuordnen sind. Fragmente kleiner als 50 bp kamen bei den Restriktionsenzymen *Bse*LI, *Mse*I und *Tas*I vor.

In den folgenden Darstellungen werden für jedes Restriktionsenzym in der jeweils ersten Tabelle die errechneten und nachgewiesenen Restriktionsenzymmuster aufgeführt. Die verschiedenen Muster werden mit einer römischen Zahl (REM I, REM II, usw.) bezeichnet und die Restriktionsfragmente in der Größeneinheit Basenpaare (bp) angegeben. Auch nicht-geschnittene DNA wird als Restriktionsenzymmuster REM bezeichnet. Dann erfolgt in der nächsten Tabelle eine Aufschlüsselung nach den Wirtsarten und den zuvor mit den römischen Zahlen bezeichneten Restriktionsenzymmustern. In einer eigenen Tabelle folgt das errechnete und nachgewiesene Restriktionsenzymmuster für *Tritrichomonas foetus* ATCC 30924. Zuletzt ist ein Gel abgebildet, welches die zuvor genannten Muster zeigt.

4.8.2.1 *Bse*LI

Tabelle 10: Errechnete und elektrophoretisch nachgewiesene Größen der Restriktionsfragmente mit *Bse*LI bei *Trichomonas gallinae* und *Tetra-trichomonas gallinarum*

Restriktionsenzymmuster mit <i>Bse</i> LI		
Errechnet (bp)	Nachgewiesen (bp)	
	I	II
219	1 Bande: 200 – 250 1 Bande: 110 – 150	1 Bande: 350 – 400
133		
17		

Tabelle 11: Vorkommen der Fragmentmuster bei Trichomonaden verschiedener Wirte

Wirte	<i>BseLI</i>		Σ
	I	II	
Taube	74	1	75
Kanarienvogel	14	-	14
Greifvogel	14	-	14
Wellensittich	7	1	8
Huhn	-	4	4
Ente	-	3	3
Pute	-	2	2
Ringfasan	-	1	1

Das Restriktionsenzymmuster **II** wird gezeigt von dem Isolat T IX bei den Tauben, dem Isolat WS I bei den Wellensittichen sowie allen Hühner-, Enten-, Puten- und Fasanisolaten.

Tabelle 12: Errechnete und elektrophoretisch nachgewiesene Größen der Restriktionsfragmente mit *BseLI* bei *Tritrichomonas foetus* ATCC 30924

<i>Tritrichomonas foetus</i>	
Errechnet (bp)	Nachgewiesen (bp)
355	1 Bande: 350 - 400
17	

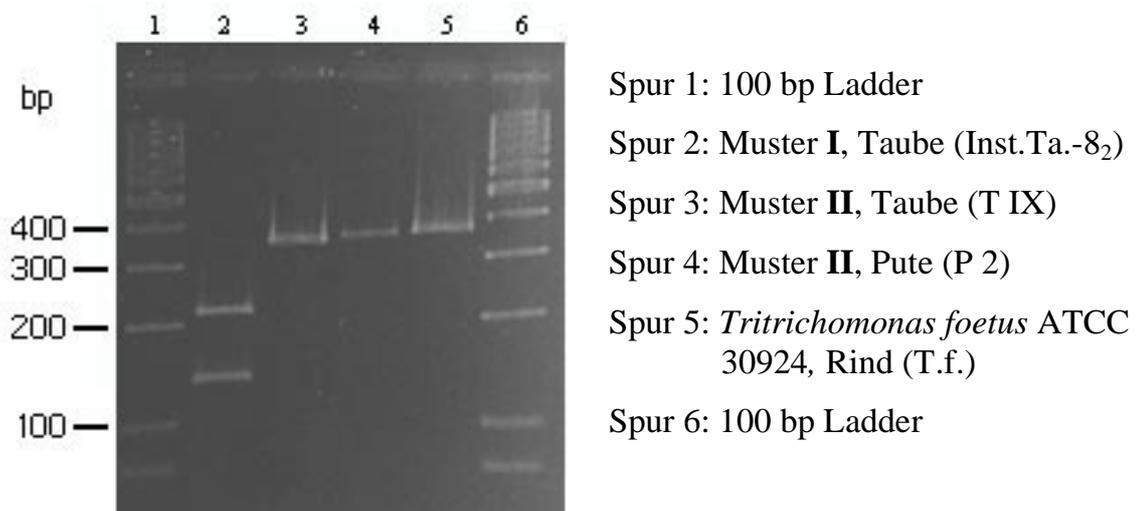


Abbildung 10: Differenzierung von *Trichomonas* spp. durch das Restriktionsenzym *Bse*LI

Gefunden wurden zwei Restriktionsenzymmuster: REM I ist geschnitten und REM II ist ungeschnitten (Tabelle 10). Alle Isolate von Kanarienvogel und Greifvogel sowie die meisten von Taube und Wellensittich zeigen REM I, die Isolate der Vogelarten Huhn, Ente, Pute und Ringfasan zeigen REM II (Tabelle 11).

Das REM von *Tritrichomonas foetus* erscheint ungeschnitten (Tabelle 12).

4.8.2.2 *MseI*

Tabelle 13: Errechnete und elektrophoretisch nachgewiesene Größen der Restriktionsfragmente mit *MseI* bei *Trichomonas gallinae* und *Tetra-trichomonas gallinarum*

Restriktionsenzymmuster mit <i>MseI</i>			
Errechnet (bp)	Nachgewiesen (bp)		
	I	II	III
166			
85	1 Bande: 150 - 200	1 Bande: 150 - 200	3 Banden: 100 - 150
39	1 Bande: 50 - 100	1 Bande: 100 - 150	1 Bande: 50 - 100
33	Banden <50	Banden <50	Banden <50
24			
22			

Tabelle 14: Vorkommen der Fragmentmuster bei Trichomonaden verschiedener Wirte

Wirte	<i>MseI</i>			Σ
	I	II	III	
Taube	74	1	-	75
Kanarienvogel	14	-	-	14
Greifvogel	14	-	-	14
Wellensittich	7	-	1	8
Huhn	-	-	4	4
Ente	-	-	3	3
Pute	-	-	2	2
Ringfasan	-	-	1	1

Das Restriktionsenzymmuster **II** wird gezeigt von dem Isolat T IX bei den Tauben. Das Restriktionsenzymmuster **III** wird gezeigt von dem Isolat WS I bei den Wellensittichen sowie allen Hühner-, Enten-, Puten- und Fasanenisolaten.

Tabelle 15: Errechnete und elektrophoretisch nachgewiesene Größen der Restriktionsfragmente mit MseI bei *Tritrichomonas foetus* ATCC 30924

<i>Tritrichomonas foetus</i>	
Errechnet (bp)	Nachgewiesen (bp)
187	
49	1 Bande: 150 - 200
32	1 Bande: ca. 50
30	Banden <50
27	
23	
19	
5	

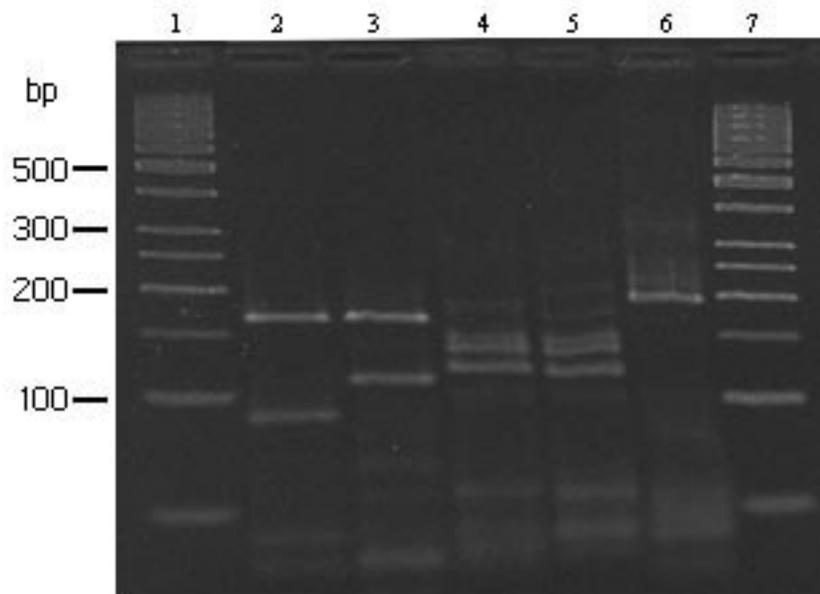


Abbildung 11: Differenzierung von *Trichomonas* spp. durch das Restriktionsenzym *MseI*

Spur 1: 50 bp Ladder

Spur 2: Muster **I**, Taube (Inst.Ta.-8₂)

Spur 3: Muster **II**, Taube (T IX)

Spur 4: Muster **III**, Huhn (H 1)

Spur 5: Muster **III**, Pute (P 1)

Spur 6: *Tritrichomonas foetus* ATCC 30924, Rind (T.f.)

Spur 7: 50 bp Ladder

Gefunden wurden drei Restriktionsenzymmuster (Tabelle 13): Die Isolate von Taube, Kanarienvogel, Greifvogel und Wellensittich zeigen REM **I**, die Isolate der Vogelarten Huhn, Ente, Pute und Ringfasan zeigen REM **III**. Nur ein Taubenisolat zeigt REM **II** (Tabelle 14). REM **I** und REM **II** unterscheiden sich nur an einer Schnittstelle. Das REM von *Tritrichomonas foetus* zeigt ein eigenes Muster (Tabelle 15).

4.8.2.3 *TaqI*

Tabelle 16: Errechnete und elektrophoretisch nachgewiesene Größen der Restriktionsfragmente mit *TaqI* bei *Trichomonas gallinae* und *Tetratrichomonas gallinarum*

Restriktionsenzymmuster mit <i>TaqI</i>		
Errechnet (bp)	Nachgewiesen (bp)	
	I	II
241	1 Bande: ca. 250	1 Bande: 350 - 400
128	1 Bande: 100 - 150	

Tabelle 17: Vorkommen der Fragmentmuster bei Trichomonaden verschiedener Wirte

Wirte	<i>TaqI</i>		Σ
	I	II	
Taube	70	5	75
Kanarienvogel	14	-	14
Greifvogel	3	11	14
Wellensittich	-	8	8
Huhn	-	4	4
Ente	-	3	3
Pute	-	2	2
Ringfasan	-	1	1

Das Restriktionsenzymmuster **II** wird gezeigt von den Isolaten T IV, T IX, AH 4, 1164 und 1165 bei den Tauben, den meisten Greifvogel- sowie allen Wellensittich-, Hühner-, Enten-, Puten- und Fasanenisolaten. Das Restriktionsenzymmuster **I** wird gezeigt von den meisten Taubenisolaten, allen Kanarienvogelisolaten sowie von den Isolaten 7-99, 8-99 und 9-99 bei den Greifvögeln.

Tabelle 18: Errechnete und elektrophoretisch nachgewiesene Größen der Restriktionsfragmente mit *TaqI* bei *Tritrichomonas foetus* ATCC 30924

<i>Tritrichomonas foetus</i>	
Errechnet (bp)	Nachgewiesen (bp)
198	2 Banden: 150 - 250
174	

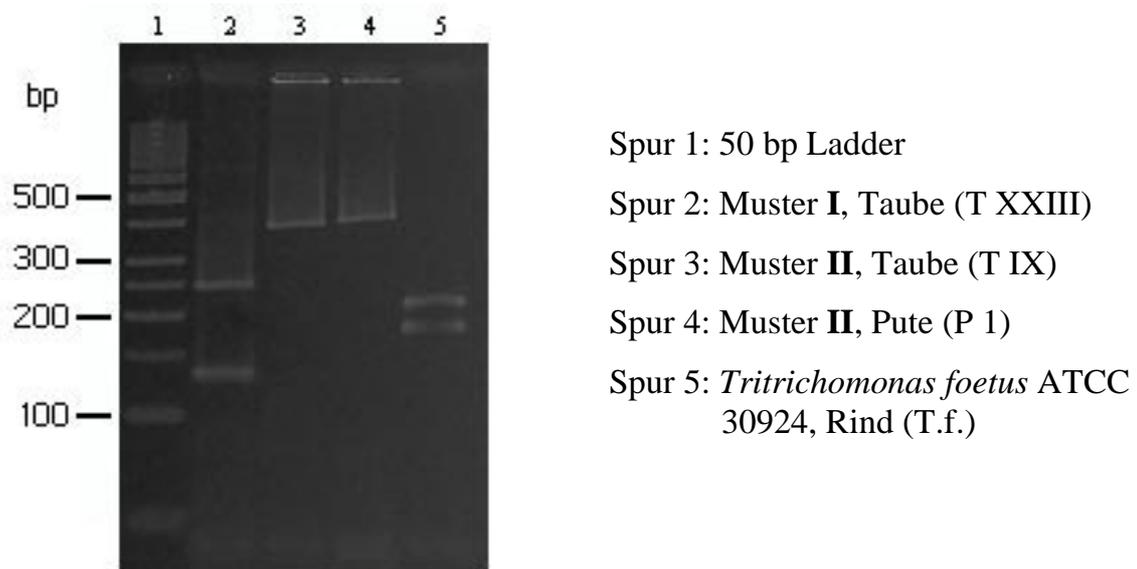


Abbildung 12: Differenzierung von *Trichomonas* spp. durch das Restriktionsenzym *TaqI*

Gefunden wurden zwei Restriktionsenzymmuster: REM I ist geschnitten und REM II ist ungeschnitten (Tabelle 16). REM I wird von den meisten Tauben- und allen Kanarienvogelisolaten gezeigt. Nur drei der 14 Greifvogelisolat zeigen ebenso REM I. REM II wird von allen Hühner-, Enten-, Puten- und dem Ringfasanenisolat gezeigt. Ebenso von allen Wellensittich-, den übrigen Greifvogel- und fünf Taubenisolaten (Tabelle 17).

Das REM von *Tritrichomonas foetus* zeigt ein eigenes Muster (Tabelle 18).

4.8.2.4 *TasI*

Tabelle 19: Errechnete und elektrophoretisch nachgewiesene Größen der Restriktionsfragmente mit *TasI* bei *Trichomonas gallinae* und *Tetratrichomonas gallinarum*

Restriktionsenzymmuster mit <i>TasI</i>					
Errechnet (bp)	Nachgewiesen (bp)				
	I	II	III	IV	V
182	1 Bande:	1 Bande:	2 Banden:	1 Bande:	1 Bande:
60	150 - 200	100 - 150	150 - 200	150 - 200	250 - 300
52	2 Banden:	3 Banden:	2 Banden:	2 Banden:	2 Banden:
36	50 - 100	50 - 100	50 - 100	50 - 100	50 - 100
29	Banden <50	Banden <50	Banden <50	Banden <50	Banden <50
10					

Tabelle 20: Vorkommen der Fragmentmuster bei Trichomonaden verschiedener Wirte

Wirte	<i>TasI</i>					Σ
	I	II	III	IV	V	
Taube	74	1	-	-	-	75
Kanarienvogel	14	-	-	-	-	14
Greifvogel	14	-	-	-	-	14
Wellensittich	7	-	1	-	-	8
Huhn	-	-	1	2	1	4
Ente	-	-	-	3	-	3
Pute	-	-	-	2	-	2
Ringfasan	-	-	-	1	-	1

Das Restriktionsenzymmuster **II** wird gezeigt von dem Isolat T IX bei den Tauben. Das Restriktionsenzymmuster **III** wird gezeigt von dem Isolat WS I bei den Wellensittichen und H 1 bei den Hühnern. Das Restriktionsenzymmuster **IV** wird gezeigt von den Isolaten H 2 und H 3 bei den Hühnern sowie allen Enten-, Puten- und Fasanenisolaten. Das Restriktionsenzymmuster **V** wird gezeigt von dem Isolat H 4 bei den Hühnern.

Tabelle 21: Errechnete und elektrophoretisch nachgewiesene Größen der Restriktionsfragmente mit *TasI* bei *Trichomonas foetus* ATCC 30924

<i>Trichomonas foetus</i>	
Errechnet (bp)	Nachgewiesen (bp)
170	
90	1 Bande: 150 - 200
43	1 Bande: 50 - 100
36	Banden <50
21	
12	

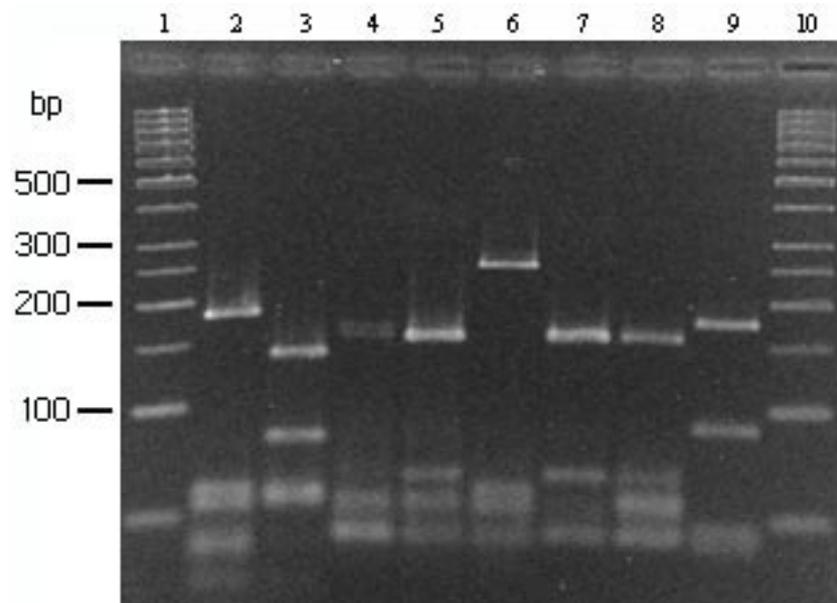


Abbildung 13: Differenzierung von *Trichomonas* spp. durch das Restriktionsenzym *TasI*

Spur 1: 50 bp Ladder

Spur 2: Muster **I**, Taube (AH 10)

Spur 3: Muster **II**, Taube (T IX)

Spur 4: Muster **III**, Wellensittich (WS I)

Spur 5: Muster **IV**, Huhn (H 3)

Spur 6: Muster **V**, Huhn (H 4)

Spur 7: Muster **IV**, Pute (P 1)

Spur 8: Muster **IV**, Pute (P 2)

Spur 9: *Tritrichomonas foetus* ATCC 30924, Rind (T.f.)

Spur 10: 50 bp Ladder

Gefunden wurden fünf Restriktionsenzymmuster (Tabelle 19). Die Isolate von Kanarienvogel und Greifvogel und der meisten Tauben und Wellensittiche zeigen REM **I**. Die Isolate der Vogelarten Ente, Pute und Ringfasan und zwei Hühnerisolate zeigen REM **IV**. Ein Tauben- (REM **II**) und ein Hühnerisolat

(REM V) zeigen je ein eigenes Muster. Die Isolate WS I und H 1 zeigen gemeinsam das Muster REM III (Tabelle 20).

Das REM von *Tritrichomonas foetus* zeigt ein eigenes Muster (Tabelle 21).

4.8.2.5 VspI

Tabelle 22: Errechnete und elektrophoretisch nachgewiesene Größen der Restriktionsfragmente mit VspI bei *Trichomonas gallinae* und *Tetra-trichomonas gallinarum*

Restriktionsenzymmuster mit VspI		
Errechnet (bp)	Nachgewiesen (bp)	
	I	II
306	1 Bande: ca. 300	1 Bande: 350 - 400
63	1 Bande: 50 - 100	

Tabelle 23: Vorkommen der Fragmentmuster bei Trichomonaden verschiedener Wirte

Wirte	VspI		Σ
	I	II	
Taube	71	4	75
Kanarienvogel	14	-	14
Greifvogel	3	11	14
Wellensittich	-	8	8
Huhn	2	2	4
Ente	3	-	3
Pute	1	1	2
Ringfasan	1	-	1

Das Restriktionsenzymmuster **I** wird gezeigt von den Isolaten 7-99, 8-99 und 9-99 bei den Greifvögeln; H 2 und H 3 bei den Hühnern; P 1 bei den Puten sowie den meisten Tauben- und allen Kanarienvogel-, Enten- und Fasanisolaten. Das Restriktionsenzymmuster **II** wird gezeigt von den Isolaten T IV, AH 4, 1164 und 1165 bei den Tauben; H 1 und H 4 bei den Hühnern; P 2 bei den Puten sowie den meisten Greifvogel- und allen Wellensittichisolaten.

Tabelle 24: Errechnete und elektrophoretisch nachgewiesene Größen der Restriktionsfragmente mit *VspI* bei *Tritrichomonas foetus* ATCC 30924

<i>Tritrichomonas foetus</i>	
Errechnet (bp)	Nachgewiesen (bp)
269	1 Bande: 250 - 300
103	1 Bande: 100 - 150

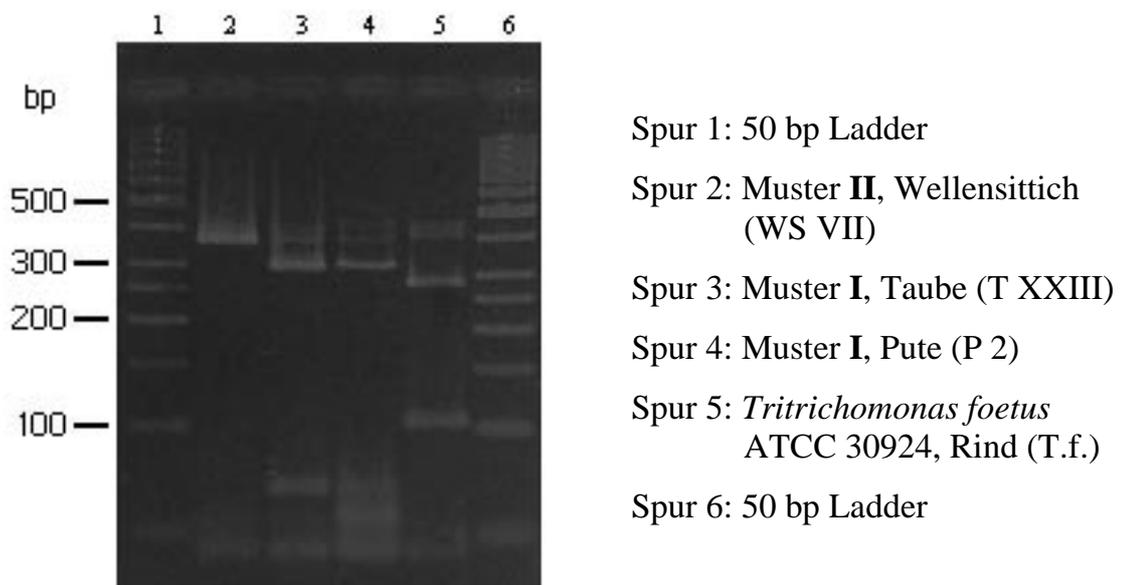


Abbildung 14: Differenzierung von *Trichomonas* spp. durch das Restriktionsenzym *VspI*

Gefunden wurden zwei Restriktionsenzymmuster: REM I ist geschnitten und REM II ist ungeschnitten (Tabelle 22). Bei *Trichomonas* spp. wird REM I von den meisten Tauben-, drei Greifvogel- und allen Kanarienvogelisolaten gezeigt. Bei allen Wellensittich-, den meisten Greifvogel- und vier Taubenisolaten wird REM II gezeigt. Die Gruppe von *Tetratrichomonas* spp. ist gespalten; zwei der Hühner- und eines der Putenisolate sowie alle Enten- und Ringfasanisolate zeigen REM I. REM II wird bei *Tetratrichomonas* spp. von zweien der Hühnerisolaten und einem Putenisolat gezeigt (Tabelle 23).

Das REM von *Tritrichomonas foetus* zeigt ein eigenes Muster (Tabelle 24).

4.9 Typisierung

4.9.1 Typisierung durch RAPD-PCR

Bei Random-Amplified-Polymorphic-DNA (RAPD) handelt es sich um eine unspezifische PCR. Ein kurzer unspezifischer Primer amplifiziert verschiedene Bereiche des gesamten Genoms. Das Ergebnis ist sehr individuell. Nur Klone zeigen ein gleiches Bandenmuster, und anhand des Bandenmusters kann man einen Verwandtschaftsgrad erstellen. Man erhält einen sogenannten „DNA-Fingerprint“. Jedoch ist die Methode schlecht reproduzierbar. Jede Veränderung der Versuchsbedingungen kann die Ergebnisse verfälschen, ebenso Verunreinigungen durch Fremd-DNA. Zudem erwiesen sich die Primer als höchst instabil. Nach ca. 3 Wochen im gelösten Zustand waren sie nicht mehr einsetzbar.

Eine Typisierung durch RAPD-PCR nach der in Kapitel 3.2.6.1 beschriebenen Methode war nicht reproduzierbar. Somit war keine Typisierung durch RAPD-PCR möglich.

4.9.2 Typisierung durch Pulsfeldgelelektrophorese

Die DNA-Präparation nach Kapitel 3.2.6.2.1 gelang, und es war möglich, die einzelnen Chromosomen aufzutrennen. Dafür wurde das Pulsfeldgelelektrophoreseprogramm nach LEHKER und ALDERETE (1999) verwendet. Ein weiterer Enzymverdau der präparierten DNA nach der in Kapitel 3.2.6.2.2 beschriebenen Methode gelang jedoch nicht. Somit war keine Typisierung durch Pulsfeldgelelektrophorese möglich.

5 Diskussion

Parasitosen stellen beim Vogel ein häufiges Problem dar. Trichomonosen wurden bereits bei vielen Vogelarten beschrieben. Sie können bei verschiedenen Vogelarten zum seuchenhaften Auftreten führen, das mit hohen Verlusten verbunden sein kann. Da es in der Vergangenheit potente Therapeutika gab, wurde die Trichomonaden-Forschung in den letzten Jahren vernachlässigt. Jedoch ist es nicht möglich, einen Bestand dauerhaft trichomonadenfrei zu halten. Zudem wurde in den letzten Jahren immer wieder von therapieresistenten *Trichomonas gallinae*-Stämmen berichtet (LÜTHGEN und BERNAU, 1967; LUMEIJ and ZWIJNENBERG, 1990; FRANSSSEN and LUMEIJ, 1992).

Bei lebensmittelliefernden Tieren hat sich die Situation verschärft, da für deren Behandlung keine Chemotherapeutika mehr zugelassen sind. Es wird also nötig sein, die Trichomonaden-Forschung in Zukunft wieder mehr in das Zentrum des Interesses zu rücken.

5.1 Klinik der Trichomonose

Das hier gefundene klinische Spektrum der Symptome der beprobten Vögel (Kapitel 4.1) deckt sich mit dem, was in der Literatur beschrieben worden ist. Die klinischen Bilder der Trichomonose der Vögel sind stark divergierend und reichen von subklinisch-latent bis hin zu klinisch-manifest (Gelber Knopf, Abbildung 1). Bei protrahiertem Verlauf können Trichomonaden als Monoinfektion zum Tode führen (VOGEL, 1992). Alle Krankheitsbilder kann man sowohl bei Jung- als auch bei Alttieren finden. Tendenziell erkranken Jungtiere aber stärker als Alttiere.

Laut NARCISI et al. (1991) soll es nur bei der Taube zu einer Invasion der inneren Organe und Körperhöhlen kommen. Dies stimmt so nicht, da zum Beispiel das Isolat RW aus dem Infraorbitalsinus einer Rohrweihe (*Circus aeruginosus*) gewonnen wurde. Bei diesem Tier konnten keine Läsionen des

Schnabelraums oder des Ösophagus gefunden werden. Diese Befunde erinnern deutlich an die beschriebenen Befunde bei Tauben, die mit dem hochpathogenen Mirza-Stamm infiziert wurden. Auch COOPER und PETTY (1988) berichten von einer generalisierten Form der Trichomonose beim Habicht, die zu beträchtlichen Verlusten führte.

Dass Trinkwasser zur Übertragung eine große Rolle spielt, erscheint unwahrscheinlich. Die Beobachtungen im Nativpräparat und in Zellkulturen zeigen, dass die Motilität von Trichomonaden bei Temperaturen unter 37 °C schnell nachlässt, und ohne Eigenbewegung sinken sie bei wässrigen Lösungen schnell ab. Auch ist der saugende Trink-Typus der Taube einem Auswandern der Trichomonaden vom Rachen über die Schnabelspitze ins Trinkwasser hinderlich (KALETA et al., 1990). Die Beobachtungen und Schlussfolgerungen von KOCAN und HERMAN (1971) erklären den Übertragungsmechanismus besser. Dass erkrankte Tiere größere Futterstücke nicht schlucken können und wieder fallen lassen, liegt in der Natur der Erkrankung. Wenn nun dieses Futterstück bald darauf von einem anderen Vogel aufgepickt wird, kann er sich so infizieren. BAKER (1986) beschrieb dieses Verhalten für den Wellensittich, zog aus seinen Beobachtungen aber keine Rückschlüsse für die Epidemiologie.

Die viele Jahre gehegte Meinung, dass für die Manifestation Verletzungen im Rachenbereich notwendig sind, wurde von HEATH (1981) und KIETZMANN (1993) widerlegt. Eventuell spielen Verletzungen bei Infektionen mit schwach pathogenen Trichomonadenstämmen eine Rolle.

Über das pathogene Potenzial von *Tetratrichomonas gallinarum* wurde viel diskutiert (Kapitel 2.2.4.4 und 2.2.5.2). Sicher erscheint, dass es zum einen unterschiedlich virulente Stämme gibt, die dann zu den unterschiedlich ausgeprägten Krankheitssymptomen führen. Zum anderen scheint es sicher, dass *Tetratrichomonas gallinarum* die Zellabwehr der Darmoberfläche schwächt.

Damit sind die Tiere für Sekundärinfektionen prädisponiert, die dann klinisch als Primärerkrankung in Erscheinung treten können.

5.2 Identifizierung der Trichomonaden

Die erste Identifizierung von Trichomonaden im Nativpräparat erfolgte mit Hilfe des invertierten Lichtmikroskopes. Sichtbar sind stets lebhafte Bewegungen der Einzeller, auch ihre Größe ist charakteristisch. Beides unterscheidet sie deutlich von Bakterien und Hefen. Auf diese Weise können die Trichomonaden aber nur als Flagellaten angesprochen werden; eine weitere Differenzierung ist im Nativpräparat nicht möglich.

5.3 Differenzierung von Trichomonaden

Eine erste und beste Differenzierung der Isolate erfolgte anhand Färbungen nach GALLI-VALERIO (1900). Die Färbungen nach GIEMSA (1902 und 1904) und nach DAUST (1934) stellten sich für Trichomonaden als ungeeigneter heraus, da die Zellkörper schrumpften und auch die Flagellen sich nicht so deutlich darstellten, wie bei der Färbung nach GALLI-VALERIO (1900).

Die rückschlagende Flagelle, die über das Körperende hinausragt, unterscheidet *Tetratrichomonas gallinarum* von *Trichomonas gallinae* (Abbildung 4-8). Die Unterschiede innerhalb der Spezies von *Trichomonas gallinae* sind weniger eindeutig. Die Trichomonaden der verschiedenen Vogelarten unterscheiden sich morphologisch leicht voneinander (Abbildung 4-8), aber zum Beispiel der über das Körperende hinausragende Achsenstab bei dem Wellensittich-Isolat (Abbildung 7) oder die unterschiedlichen Formen der Zellkörper (Abbildung 4-7) können auch in einem Isolat normalerweise vorkommende Unterschiede sein, wie in Abbildung 3 zu sehen ist. Allein anhand der Morphologie kann man keine gesicherte Aussage treffen, von welcher Vogelart eine Trichomonade stammt, und so kann die alleinige lichtmikroskopische Untersuchung zu keiner sicheren

Diagnose der jeweils vorliegenden Trichomonadenart oder -unterart führen. Zu dem gleichen Schluss kamen auch schon WALKER et al. (2003) bei der Untersuchung von bovinen Trichomonaden.

5.4 Anzucht und Konservierung von Trichomonaden

Die in den in Kapitel 3.1.3 beschriebenen drei Medien dienten der erfolgreichen Anzucht und Kultivierung der verschiedenen Trichomonadenstämme. Bei der Erstkultivierung aus Tupfern wurden mit HEF-Kulturen die besten Ergebnisse erzielt. Sobald die Trichomonaden eine stabile Vermehrungsrate zeigten, konnten sie auf Diamond-Medium überführt und darin weitervermehrt werden. Von der Handhabung her war Diamond-Medium am einfachsten zu gebrauchen. Durch die bereits vorhandenen Antibiotika-Zusätze ist dieses Medium auch bei stark verkeimten Kulturen sehr gut geeignet, um die Proben von Bakterien und Pilzen zu befreien. Auch hat man hier die Möglichkeit, die Kulturen in Reagenzgläsern zu zentrifugieren. Dabei werden die Bakterien und Pilze zusammen mit den Trichomonaden abzentrifugiert. Wenn das Reagenzglas ca. einen Tag erschütterungsfrei im Brutschrank steht, wandern nur die vitalen Trichomonaden in den Überstand, von wo man sie mit einer Pipette entnehmen kann. 100%ige Keimfreiheit ist so nicht zu erlangen, aber die Ausdünnung der Bakterien und Pilze hilft bei der weiteren Behandlung der Kulturen. Auch bei einer weiteren Verwendung der Trichomonaden zur DNA-Präparation ist ein zellfreies Medium vorzuziehen, da hier keine Fremd-DNA die Ergebnisse verfälschen kann. Die Virulenz der *Trichomonas*-Stämme wird jedoch durch *in vitro* -Passagen verringert (BONDURANT and HONIGBERG, 1994). Untersuchungen solcher Art sind dann nur noch bedingt möglich.

Bei sehr schwierig anzuzüchtenden Proben wurden HELZ-Kulturen verwendet. Auf ihnen war die Anzuchtrate am besten, jedoch verkeimen die HELZ-Kulturen sehr oft, wenn sie wenige Tage alt sind. Auch konnte sich die Vermehrungsrate der Trichomonaden so explosionsartig erhöhen, dass die Kultur innerhalb

weniger Stunden an den eigenen Stoffwechselprodukten zugrunde gehen konnte. Darum sind HELZ-Kulturen als Erhaltungsmedium ungeeignet.

Auf den HEF- oder HELZ-Kulturen kann man die Trichomonaden am besten beobachten. Dort zeigen die Individuen zwei verschiedene Verhaltensformen. Sie bleiben an einer Stelle am Zellrasen, es schien, als ob sie mit ihren Geißeln ihre Umgebung erkundeten. Dabei bewegen sie mit ihren freien Geißeln Mediumbestandteile an sich vorbei, wobei die undulierende Membran deutlich in ihrer Bewegung zu sehen ist. Oder sie schwimmen auf einer höheren Ebene zügig durch das mikroskopische Gesichtsfeld. Dabei bewegen sie sich immer in die Richtung ihrer freien Geißeln. Was genau der Motor der Bewegung ist, kann so aber nicht mit Sicherheit gesagt werden.

Bei geschädigten Zellkulturen konnten die meisten Trichomonaden am Rand der Schädigung gefunden werden. Hier schädigten sie die Zellkultur weiter, so dass mit der Zeit runde Löcher im Zellrasen entstanden. Auch zeigten Trichomonaden in Kulturen in exponentiellen Wachstumsphasen die Neigung, sich in Klumpen zusammenzulagern. Solche Zusammenlagerungen konnten sehr viele Individuen beinhalten. Wie viele sich maximal zusammenlagerten und was dort geschah, war jedoch nicht zu erkennen.

Die Anzüchtung gelang bei allen bereits lichtmikroskopisch im Nativpräparat erkannten Trichomonaden, mit Ausnahme von Trichomonaden bei Loris. Hier gelang nur der Nachweis von Flagellaten aus Tupferproben von Kropf und Schnabelhöhle der Loris anhand von Größe und Eigenbewegung, jedoch nicht die Anzüchtung in den drei beschriebenen Medien. Dies spricht dafür, dass Trichomonaden aus Loris Anforderungen an ihre Lebensbedingungen *in vitro* stellen, die sich grundlegend von den Anforderungen anderer Trichomonaden unterscheiden.

Die in Kapitel 4.6 beschriebene Vereinheitlichung der Morphologie und Größe während der Kultivierung konnte oft beobachtet werden. Sie kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen können genetisch verschiedene Individuen im

selben Tier vorkommen, von denen sich *in vitro* nur ein Klon durchsetzt oder aber die einheitlichen Bedingungen in der Kultur bevorzugen einen bestimmten morphologischen Typus eines Klons. Dabei erscheint die zweite Hypothese wahrscheinlicher, da Trichomonaden die Fähigkeit haben, ihre Morphologie den Lebensbedingungen anzupassen (Kapitel 2.1.4).

Die beobachteten Rundformen in überalterten Kulturen, waren vermutlich degenerativer Natur. Bei den runden Gebilden in vitalen Kulturen handelte es sich vermutlich um die von ABONYI (1992) beschriebenen vielkernigen, vielbeißelten Rundformen. Vorbeischwimmende Trichomonaden verfangen sich an ihnen mit dem hinteren Zellpol, man konnte rege Bewegung beobachten und kurze Zeit später schwammen sie weiter.

So hatten bei der Beurteilung der sogenannten Rundformen (Kapitel 2.1.4) vermutlich sowohl HONIGBERG und BRUGEROLLE (1990), als auch ABONYI (1992) recht, da sowohl degenerative Stadien, die unter ungünstigen Bedingungen entstehen, als auch große Gebilde beobachtet werden konnten, die bei sich rege vermehrenden Kulturen vorkamen. Die von PFAFF (1964) beschriebene Zystenform erscheint recht unwahrscheinlich, da Trichomonaden bei ungeeigneten Umweltbedingungen sehr schnell absterben und selbst bei optimalen Bedingungen nicht reaktiviert werden können.

In vitalen Kulturen konnten zudem Zusammenlagerungen sehr vieler Individuen zu „Trichomonadenklumpen“ beobachtet werden. Wie viele sich maximal zusammenlagerten und was dort geschah, war jedoch nicht zu erkennen. Denkbar wäre ein Austausch von Genmaterial zwischen Individuen, wie es bereits für andere Einzeller beschrieben wurde. Es wäre sehr interessant, dies weiter zu verfolgen.

5.5 Molekularbiologische Untersuchungen

Da Trichomonaden sich je nach Wachstumsphase und Mediumbedingungen innerhalb derselben Kultur morphologisch unterscheiden können, sind molekularbiologische Methoden für die Differenzierung verlässlicher als die Morphologie. Zudem wurden in der Literatur bisher zum Teil große Unterschiede zwischen Morphologie und molekularen Daten beschrieben (OLSEN and WOESE, 1993; VISCOGLIOSI et al., 1999). Eine sichere Aussage über die Verwandtschaftsverhältnisse der Trichomonaden untereinander ist aber weiterhin schwierig. Molekularbiologische Methoden können bei der Interpretation vorhandener Daten wichtige Zusatzinformationen liefern.

5.5.1 PCR

Die PCR ist eine geeignete Methode zum Nachweis von DNA-Sequenzen. Anhand dieser Sequenzen ist es möglich, Antworten zu den offenen Fragestellungen zu finden (ZUCKERKANDL and PAULING, 1965; PACE et al., 1986).

Die Ergebnisse der hier durchgeführten PCR entsprechen den bisher veröffentlichten Untersuchungen (FELLEISEN, 1997) (Abbildung 9).

5.5.1.1 REA

Bei den Restriktionsenzymen handelt es sich um bakterielle Enzyme aus der Gruppe der Endonukleasen. Sie haben die Fähigkeit, spezifische Sequenzabschnitte auf der DNA zu erkennen und sie dort durch Hydrolyse der Phosphor-esterbindung zu durchtrennen. Je nach Anzahl der erkannten Schnittstellen entstehen zwei oder mehr Restriktionsfragmente. Mit Hilfe der bereits aus der Gen Daten Bank bekannten 5,8S rRNA-Sequenzen von Tauben wurden fünf geeignete Enzyme ausgewählt und Restriktionsenzymanalysen mit diesen

Enzymen durchgeführt. Die vorherige Berechnung der Fragmente erfolgte mit dem Programm Clone Manager.

5.5.1.1.1 Beurteilung nach Enzymen

BseLI

Gefunden wurden zwei Restriktionsenzymmuster (Tabelle 10). Es konnten die Gattungen der aviären *Trichomonas* sp. und der aviären *Tetratrichomonas* sp. unterschieden werden. Nur die Isolate T IX und WS I fielen aus dem Muster und zeigten REM II (Tabelle 11).

Das REM von *Tritrichomonas foetus* (Tabelle 12) entsprach den Erwartungen, da Fragmente kleiner als 50 bp unter den verwendeten Bedingungen nicht sicher dargestellt werden konnten (siehe Kapitel 4.8.2).

MseI

Gefunden wurden drei Restriktionsenzymmuster (Tabelle 13). Auch hier wurden die Gattungen der aviären *Trichomonas* sp. und der aviären *Tetratrichomonas* sp. unterschieden. Nur die Isolate T IX und WS I fielen erneut aus dem Muster. Das Isolat T IX zeigte REM II und das Isolat WS I zeigte REM III (Tabelle 14). Das REM von *Tritrichomonas foetus* zeigte ein eigenes Muster (Tabelle 15), welches den Berechnungen entsprach.

TaqI

Gefunden wurden zwei Restriktionsenzymmuster (Tabelle 16). Mit *TaqI* konnten die Gattungen der aviären *Trichomonas* sp. und der aviären *Tetratrichomonas* sp. nicht unterschieden werden, da die Gruppe der Wellensittichisolate und die meisten Greifvogelisolate das gleiche REM wie *Tetratrichomonas* sp. zeigten. Unterscheiden konnte man den apathogenen Greifvogelstamm – Isolate 7-99, 8-99 und 9-99 (HÖFLE et al., unveröffentlicht) – von den restlichen Greifvogel-

isolaten und den hochpathogenen Taubenstamm – Isolate 1164 und 1165 (HÖFLE et al., 2004) – von den restlichen Taubenisolaten (Tabelle 17).

Das REM von *Tritrichomonas foetus* zeigte ein eigenes Muster (Tabelle 18), welches den Berechnungen entsprach.

TasI

Bei diesem Restriktionsenzym wurden die meisten unterschiedlichen Muster gefunden (Tabelle 19). Es wurden wiederum die Gattungen der aviären *Trichomonas* sp. und der aviären *Tetratrachomonas* sp. unterschieden. Nur das Isolat WS I fiel erneut in das Muster des Hühnerisolates H 1 (Tabelle 20).

Das REM von *Tritrichomonas foetus* zeigte ein eigenes Muster (Tabelle 21), welches den Berechnungen entsprach.

VspI

Gefunden wurden zwei Restriktionsenzymmuster (Tabelle 22). Mit *VspI* konnten die Gattungen der aviären *Trichomonas* sp. und der aviären *Tetratrachomonas* sp. nicht unterschieden werden, da die aviären *Tetratrachomonas* sp. sehr unterschiedliche Ergebnisse zeigten. Auch innerhalb von *Trichomonas* sp. kamen Unterschiede vor. Unterscheiden konnte man den apathogenen Greifvogelstamm – Isolate 7-99, 8-99 und 9-99 – von den restlichen Greifvogelisolaten und die Isolate T IV, AH 4, 1164 und 1165 von den restlichen Taubenisolaten (Tabelle 23).

Das REM von *Tritrichomonas foetus* zeigte ein eigenes Muster (Tabelle 24), welches den Berechnungen entsprach.

5.5.1.1.2 Beurteilung nach Vogelgruppen

Die Auswertung erfolgte erst für Vögel im Allgemeinen, dann getrennt nach den beiden Hauptgruppen und zuletzt nach Vogelarten.

Geflügel

Die Gattungen der aviären *Trichomonas* sp. und der aviären *Tetratrichomonas* sp. wurden von drei der fünf verwendeten Enzyme unterschieden. Anhand der Enzyme *Bse*LI, *Mse*I und *Tas*I war eine eindeutige Unterscheidung anhand des Restriktionsenzymmusters möglich. Bei den Enzymen *Taq*I und *Vsp*I war keine Unterscheidung möglich.

Ziergeflügel/Wirtschaftsgeflügel

Innerhalb der aviären *Trichomonas* sp. zeigten die Restriktionsenzymmuster der Wellensittich- und der Greifvogelisolatate der Enzyme *Taq*I und *Vsp*I Unterschiede zu dem REM der Tauben- und Kanarienisolaten auf.

Innerhalb der aviären *Tetratrichomonas* sp. zeigten sich Unterschiede im Restriktionsenzymmuster der Enzyme *Tas*I und *Vsp*I. Bei *Tas*I unterschieden sich nur die Hühnerisolatate untereinander, bei *Vsp*I unterscheiden sich Hühner- und Putenisolatate.

Vogelarten

Taube

Die Taubenisolatate machten mit 62 % den Hauptteil der Proben aus. Die Gruppe war nicht völlig homogen; 7 % der Taubenisolatate unterschieden sich von den übrigen 70 Taubenisolaten. T IX fiel bei vier von fünf Enzymen aus der Gruppe heraus. Bei den Enzymen *Mse*I und *Tas*I zeigte T IX ein eigenes Muster und unterschied sich somit von allen anderen Isolataten. Die Isolatate T IV, AH 4, 1164 und 1165 unterschieden sich bei zwei von fünf Enzymen, bei *Taq*I und *Vsp*I.

Kanarienvogel

Die Kanarienvogelisolatate stammten aus 7 verschiedenen Quellen und waren trotz allem eine komplett homogene Gruppe. Ihr REM war bei allen fünf Enzymen identisch mit dem der meisten Taubenisolatate.

Greifvogel

Die Zusammenfassung von verschiedenen Greifvogelarten in eine Gruppe war in dieser Übersicht nicht unbedingt schlüssig. Da jedoch die Ergebnisse überraschenderweise relativ homogen waren, obwohl sie zudem auch aus sehr entfernten Gegenden stammten, wurde diese Einteilung vorgenommen.

Nur die drei Isolate 7-99, 8-99 und 9-99 vom Habichtsadler, *Hieraaetus fasciatus* unterschieden sich bei den zwei Enzymen *TaqI* und *VspI* von den anderen Greifvogelisolaten.

Wellensittich

Bei den Wellensittichisolaten unterschied sich nur das Isolat WS I von den übrigen Isolaten. Es unterschied sich in drei von fünf Enzymen. Interessanterweise zeigte WS I bei allen fünf Enzymen das gleiche REM wie H 1. Eine Möglichkeit wäre, dass sich das Wirtstier des Isolats WS I bei einem Huhn infiziert hatte. Da Wellensittiche häufig in Außenvolieren und gelegentlich Hühner in der Wohnung gehalten werden, wäre dies möglich. Als zweite Möglichkeit kann eine Probenvermischung nicht ausgeschlossen werden. Leider war das Isolat WS I bei einem Ausfall des -85 °C Gefrierschranks verloren gegangen, so dass eine Überprüfung nicht mehr erfolgen konnte.

Huhn

Die vier Hühnerisolate stammten alle aus verschiedenen Hühnerbeständen. Bei drei von fünf Enzymen fand man keine Unterschiede. Bei dem Enzym *VspI* unterschieden sich die Isolate H 2 und H 3 von den Isolaten H 1 und H 4. Bei dem Enzym *TasI* gab es die gleiche Unterscheidung und die Isolate H 1 und H 4 unterschieden sich zusätzlich voneinander.

Ente

Alle drei Entenisolate stammten von dem gleichen Mastbetrieb und wurden zum selben Zeitpunkt entnommen. Somit war die Einheitlichkeit der Isolate nicht verwunderlich. Ihr REM entsprach bei allen fünf Enzymen dem der meisten Wirtschaftsgeflügelisolate.

Pute

Die Putenisolate unterschieden sich nur in einem Enzym, *VspI*. Ansonsten entsprach ihr REM bei allen fünf Enzymen dem der meisten Wirtschaftsgeflügelisolate.

Ringfasan

Das REM des Ringfasanenisolats entsprach bei allen fünf Enzymen dem der meisten Wirtschaftsgeflügelisolate.

5.5.1.1.3 Folgerung

Die Mehrzahl der Taubenisolate entsprechen mit ihren Schnittstellen den vorhandenen Angaben der Gendatenbank. T IX hat mit seinem eigenem REM eine Sonderstellung. T IV, AH 4, 1164 und 1165 haben als Gruppe eine Sonderstellung. Bei den Isolaten T IV und AH 4 ist leider der Grad an Pathogenität nicht mehr nachzuvollziehen, jedoch haben sich die Isolate 1164 und 1165 als hochpathogen erwiesen (HÖFLE et al., 2004). Die Sonderstellung der von Habichtsadlern, *Hieraaetus fasciatus* entnommenen Isolate 7-99, 8-99 und 9-99 zeigt sich auch wiederum in ihrem Grad an Pathogenität. Hier handelt es sich um den einzigen sicher apathogenen Greifvogelstamm (HÖFLE et al., unveröffentlicht). So erscheint es, als ob man mit den Enzymen *TaqI* und *VspI* bei Taube und Greifvogel einen Hinweis auf Pathogenität erhalten könnte. Um dies aber sicher zu bestätigen, braucht es noch weiterführende Untersuchungen.

Eine Unterscheidung zwischen aviären *Trichomonas* sp. und aviären *Tetratrichomonas* sp. ist mit ihnen jedoch nicht möglich.

Mit Hilfe der anderen drei Enzyme *Bse*LI, *Mse*I und *Tas*I ist eine Unterscheidung zwischen aviären *Trichomonas* sp. und aviären *Tetratrichomonas* sp. möglich. Soweit bekannt wurde diese Unterscheidung bisher nie auf molekularbiologischer Ebene gemacht.

Da in der Vergangenheit die Einteilung ziemlich willkürlich geschah, ist die PCR mit anschließender Restriktionsenzymanalyse eine sichere Methode, um eine vermutete Einteilung abzusichern.

Die Möglichkeit aviäre *Trichomonas* sp. und aviäre *Tetratrichomonas* sp. molekularbiologisch zu unterscheiden wurde belegt. Innerhalb von aviären *Trichomonas* sp. und aviären *Tetratrichomonas* sp. gibt es aber noch zusätzliche Unterschiede. Um sie zu beurteilen, muss die Natur des untersuchten DNA-Abschnittes (5,8S rRNA) in Betracht gezogen werden, welche hochkonserviert ist. So stellt sich nach Sichtung der in Kapitel 4.8.2 vorgestellten Ergebnisse die Frage, wie sie zu interpretieren sind. Handelt es sich bei aviären *Trichomonas* sp. und auch bei aviären *Tetratrichomonas* sp. um verschiedene Arten, Unterarten oder Typen? Eigentlich soll sich die 5,8S rRNA innerhalb einer Art 100%ig entsprechen. Bei eng verwandten Arten unterscheidet sie sich um nur wenige Prozentpunkte. Bei der Hausmaus, *Mus musculus* und der Wanderratte, *Rattus norvegicus* zum Beispiel sind die 5,8S rRNA-Regionen fast identisch, obwohl sie verschiedenen Gattungen angehören (HILLIS and DIXON, 1991). Untersuchungen der 5,8S rRNA Region von *Tritrichomonas foetus* ergeben eine 100%ige Übereinstimmung untereinander (FELLEISEN et al., 1998), jedoch zeigen sich deutliche Unterschiede zu anderen bovinen Trichomonaden im Präputium (WALKER et al., 2003). So ist es ausgesprochen erstaunlich, innerhalb von sowohl aviären *Trichomonas* sp. als auch von aviären *Tetratrichomonas* sp. so viele Unterschiede in der DNA-Sequenz anzutreffen.

Bei den Untersuchungen von OLSEN und WOESE (1993) der SSU rRNA – wie in Figur 3 zu sehen – ergibt sich eine sehr frühe Abspaltung der Trichomonaden von den anderen Eukarya. So haben die Trichomonaden in ihrer Evolution lange Zeit gehabt, sich zu verschiedenen Gattungen und Arten zu entwickeln.

Bei der hierarchischen Einteilung in Klasse, Ordnung, Familie, Gattung und Art handelt es sich um eine Abstraktion. Für diese Einteilung werden verschiedene Eigenschaften herangezogen, deren Auswahl aber zu einem gewissen Grad willkürlich ist (VAN REGENMORTEL, 2000). Seit Darwin vor 140 Jahren mit „The origin of species“ unser Evolutionsverständnis prägte, wurde noch keine allgemein akzeptierte Art-Definition gefunden. Die verschiedenen Konzepte werden nach wie vor alle sehr kontrovers diskutiert (KUNZ, 2002).

Die hier präsentierten Ergebnisse sprechen dafür, aviäre *Trichomonas* sp. und aviäre *Tetratrachomonas* sp. in die selbe Hierarchiestufe Gattung zu stellen, um sie dann untergeordnet jeweils aufzuteilen. Die bisherige Taxonomie hat alle aviären *Trichomonas* sp. zu der Art *Trichomonas gallinae* und alle aviären *Tetratrachomonas* sp. zu der Art *Tetratrachomonas gallinarum* zusammengefasst. Diese Nomenklatur ist irreführend, da *Trichomonas gallinae* vor allem bei Tauben vorkommt. Es existieren zwar Veröffentlichungen zu *Trichomonas gallinae* beim Huhn (RIVOLTA, 1878; HAWN, 1937; STABLER, 1954), jedoch keine mehr aus jüngerer Zeit. Falls diese Arteinteilung beibehalten werden soll, wären die Begriffe *Trichomonas avium* und *Tetratrachomonas avium* logischer.

Molekularbiologisch stimmen allein die Kanarienisolate mit den Taubenisolaten 100%ig überein, wohingegen Taubenisolate gegenüber Greifvogel- und Wellensittichisolaten Unterschiede bei der REA zeigen. Wenn Unterschiede sowohl im Phänotyp (Wirtsspektrum) als auch im Genotyp (5,8S rRNA) auftreten, macht eine taxonomische Unterscheidung Sinn. Es eröffnet sich jedoch die Frage, auf welcher Hierarchiestufe diese Unterscheidung vorgenommen werden sollte. Da

keine konkreten Richtlinien für diese Unterscheidung existieren, wäre eine Unterteilung sowohl in Art, Unterart oder auch Typus grundsätzlich möglich.

Die Frage nach artübergreifenden Infektionen kann nur hypothetisch beantwortet werden. VISCOGLIOSI et al. (1999) kamen zu dem Schluss, dass in der Entwicklung von Parasiten öfters Wirtswechsel stattgefunden haben. So können verschiedene Arten einer Parasitengattung zufällig in der gleichen Tiergruppe anzutreffen sein. Bei einer Immunschwäche oder einer Primärinfektion können sich Parasiten auch bei sogenannten Fehlwirten halten und vermehren. Jedoch unter Berücksichtigung der morphologischen und molekularbiologischen Ergebnisse scheint es für jede Vogelart eine eigene Trichomonadenart, -unterart oder -typ zu geben. Um diese Frage besser beantworten zu können, müssten weitere Genombereiche vergleichend untersucht werden. Hierfür stehen die eigenen Isolate zur Verfügung.

5.5.2 Sequenzierung

Einige ausgewählte Proben wurden sequenziert. Die bisherigen Ergebnisse der vergleichenden Sequenzanalyse führten zur gleichen Einteilung wie die eigenen Restriktionsenzymanalysen. Die Nukleinsäuresequenzierung und die vergleichende Sequenzanalyse wurden im Institut für Virologie (Leiter: Prof. Dr. H.-J. Thiel) von Frau S. Widauer und Herrn PD Dr. P. Becher durchgeführt. Die Ergebnisse werden in einer getrennten Veröffentlichung von BECHER, P. und KNISPEL, B. präsentiert werden.

5.6 Folgerungen aus den morphologischen und genetischen Befunden für die Systematik

Aufgrund der gefundenen Ergebnisse wird vorgeschlagen, die Einteilung in die Gattungen *Trichomonas* sp. und *Tetratrichomonas* sp. beizubehalten und als Artbezeichnung „*avium*“ anstelle von „*gallinae*“ bzw. „*gallinarum*“ zu wählen.

Tabelle 25: Unterscheidung von *Trichomonas avium* und *Tetratrichomonas avium*

Eigenschaften zur Art-Diagnose	<i>Trichomonas avium</i>	<i>Tetratrichomonas avium</i>
Wirte	Taube, Greifvogel, Kanarienvogel, Wellensittich, und andere	Huhn, Pute, Ente, Ring- fasan, und andere
Lokalisation	vorderer Verdauungstrakt ev. generalisiert in Organen	hinterer Verdauungstrakt
Morphologische Unterschiede	keine rückschlagende Flagelle	rückschlagende Flagelle
Restriktionsenzyme zur genetischen Unterscheidung	<i>Bse</i> LI, <i>Mse</i> I und <i>Tas</i> I	

Weiterhin wird vorgeschlagen, die aviären Trichomonaden anhand des Wirtsvogels in Unterarten zu unterteilen.

Zu dieser Einschätzung bin ich gekommen, da vor allem die Ergebnisse in der REA eindeutige Unterschiede aufzeigen, die sich ebenso im Wirtsspektrum zeigen. Somit erscheint eine Unterscheidung in Typen als zu geringfügig. Eine Unterteilung in Arten wird jedoch auch nicht vorgenommen. Mit Hilfe der REA können Isolate aus Tauben und Kanarienvögeln von den Isolaten aus Greifvögeln und Wellensittichen unterschieden werden. Einzelne Isolate entsprechen jedoch der REA der jeweils anderen Gruppe. Somit scheint es, dass

es bei natürlichen Infektionen zu Überschneidungen kommt. Zudem ist eine Unterscheidung von Isolaten aus Tauben und Kanarienvögeln sowie aus Greifvögeln und Wellensittichen mit der hier verwendeten Methode untereinander nicht möglich. Es widerstrebt jedoch, sie in eine Gruppe einzuteilen. Aus diesen Gründen wird die hier getroffene Unterteilung in Unterarten gewählt.

Um entscheiden zu können, ob die hier gewählte Unterteilung in Unterarten Bestand hat, sollten aber weitere DNA-Abschnitte der aviären Trichomonaden sowie die entsprechenden DNA-Abschnitte von Trichomonaden anderen Tierarten vergleichend untersucht werden.

Tabelle 26: Unterscheidung von *Trichomonas avium* in Unterarten

Eigenschaften zur Unterart-Diagnose	<i>T. a. columbae</i>	<i>T. a. serinae</i>	<i>T. a. falconiformae</i>	<i>T. a. melopsittacae</i>
Wirt	Taube	Kanarienvogel	Greifvogel	Wellensittich
Weitgehende genetische Übereinstimmung der 5,8S rRNA	Taube/Kanarienvogel		Greifvogel/Wellensittich	
Restriktionsenzyme zur genetischen Unterscheidung	<i>TaqI</i> und <i>VspI</i>			

Die Ergebnisse der REA der aviären *Tetratrachomonas* sp. sind nicht so deutlich wie die Ergebnisse der REA der aviären *Trichomonas* sp. Dies liegt mit Sicherheit auch an der deutlich geringeren Probenanzahl. Eine analoge Einteilung in Unterarten wird vorgenommen, da auch die wenigen Ergebnisse dies rechtfertigen zu scheinen und da diese Einteilung – jedoch auf der Artebene – in der Literatur häufig praktiziert wurde und wird (KOCAN and HERMAN, 1971; LEVINE, 1985; BOCH und SCHNEIDAWIND, 1988).

Tabelle 27: Unterscheidung von *Tetratrichomonas avium* in Unterarten

	<i>T. a. gallinae</i>	<i>T. a. anatis</i>	<i>T. a. meleagridis</i>	<i>T. a. phasiani</i>
Wirt	Huhn	Ente	Pute	Ringfasan

5.7 Abschlussbemerkungen

Bei den Untersuchungen wurde eine relativ große aber nicht 100%ige Wirtsspezifität gefunden. Bei Tauben und Greifvögeln parasitieren jeweils eigene *Trichomonas avium*-Unterarten. Aber sowohl bei Tauben als auch bei Greifvögeln wurden Trichomonaden isoliert, die genetisch der 5,8S rRNA der jeweils anderen Unterart entsprachen. Dies spricht für Kreuzinfektionen. Ob die beobachteten Unterschiede in der Virulenz Zufall oder Regel sind, lohnt sich auf jeden Fall weiterzuverfolgen. Denkbar wäre dann der Einsatz von für diese Vogelart apathogenen Trichomonaden von der eigenen oder von einer anderen Vogelart. Bei vorhandener Kreuzimmunität könnten diese Stämme unter Ausnutzung des Prinzips der Prämunität als Therapieersatz dienen.

Die PCR mit anschließender Restriktionsenzymanalyse ist eine sichere Methode, um die Einteilung in *Trichomonas avium* und *Tetratrichomonas avium* abzusichern. Dafür sind die Enzyme *Bse*LI, *Mse*I und *Tas*I geeignet.

6 Zusammenfassung

Es wurden Trichomonaden von folgenden verschiedenen Vogelarten untersucht: Taube (*Columba livia* f. *domestica*; *Columba livia* f. *urbana*; *Streptopelia decaocto*; *Columba palumbus*), Kanarienvogel (*Serinus canaria*), Wellensittich (*Melopsittacus undulatus*), Greifvogel (Habichtsadler, *Hieraaetus fasciatus*; Wanderfalke, *Falco peregrinus*; Rötelfalke, *Falco naumanni*; Zwergadler, *Hieraaetus pennatus*; Schleiereule, *Tyto alba*; Rohrweihe, *Circus aeruginosus*; Mäusebussard, *Buteo buteo*; Uhu, *Bubo bubo*), Huhn (*Gallus gallus*), Ente (*Anas platyrhynchos* f. *domestica*), Pute (*Meleagris gallopavo*) und Ringfasan (*Phasianus colchicus*). Zu Vergleichszwecken wurden auch Trichomonaden vom Rind (*Bos taurus*) und Flagellaten vom Waran (*Varanus* spp.) untersucht. Hierzu dienten Abstriche vom Pharynx bzw. vom Darm sowie fixierte und gefärbte Präparate.

Die Trichomonaden wurden auf verschiedenen Medien (Diamond-Medium, HEF- und HELZ-Kulturen) angezchtet, gefärbt und lichtmikroskopisch ihre Morphologie verglichen. Aus diesen Untersuchungen wurde geschlossen, dass eine rein morphologische Unterscheidung sehr unsicher ist.

Die DNAs von 121 verschiedenen Trichomonadenisolaten, isoliert aus den oben genannten Vogelarten, wurden präpariert und die 5,8S rRNA-Regionen mittels PCR amplifiziert.

Eine Typisierung durch RAPD-PCR oder Pulsfeldgelelektrophorese war nicht möglich.

Für vergleichende genotypische Studien wurden erstmals Restriktionsenzymanalysen mit den Enzymen *Bse*LI, *Mse*I, *Taq*I, *Tas*I und *Vsp*I durchgeführt. Mit Hilfe der Enzyme *Bse*LI, *Mse*I und *Tas*I ist eine Unterscheidung zwischen aviären *Trichomonas* sp. und aviären *Tetratrachomonas* sp. möglich. Die Enzyme *Taq*I und *Vsp*I zeigen Unterschiede innerhalb von aviären *Trichomonas*

sp. und aviären *Tetratrichomonas* sp. Hier unterscheiden sich Trichomonaden der verschiedenen Vogelarten und zum Teil auch innerhalb einer Vogelart.

7 Summary

The trichomonads of the following different species of birds have been investigated: pigeon (*Columba livia* f. *domestica*; *Columba livia* f. *urbana*; *Streptopelia decaocto*; *Columba palumbus*), canary (*Serinus canaria*), budgerigar (*Melopsittacus undulatus*), bird of prey (Bonelli's eagle, *Hieraaetus fasciatus*; peregrine falcon, *Falco peregrinus*; lesser kestrel, *Falco naumanni*; booted eagle, *Hieraaetus pennatus*; barn-owl, *Tyto alba*; marsh harrier, *Circus aeruginosus*; buzzard, *Buteo buteo*; eagle owl, *Bubo bubo*), fowl (*Gallus gallus*), duck (*Anas platyrhynchos* f. *domestica*), turkey (*Meleagris gallopavo*) and pheasant (*Phasianus colchicus*). For reason of comparison the trichomonads of cattle (*Bos taurus*) and of monitor lizard (*Varanus* spp.) have been investigated, too. For this purpose swabs of the pharynx respectively the intestine as well as fixed and stained microscopic preparations have been used.

The trichomonads were cultivated in different media (Diamondmedium, CEF- and CELC-cultures), they were stained and their morphology was compared microscopically. The conclusion from these investigations is that a morphological distinction is rather uncertain.

The DNA of 121 different Trichomonas isolates from the birds mentioned above were prepared and the 5,8S rRNA-regions were amplified by PCR.

A typing with RAPD-PCR or pulsed-field gel electrophoresis was not possible.

For comparative genotypical studies, restriction enzyme analyses were carried out for the first time with the enzymes *Bse*LI, *Mse*I, *Taq*I, *Tas*I and *Vsp*I. A distinction between avian *Trichomonas* sp. and avian *Tetratrachomonas* sp. is possible with the enzymes *Bse*LI, *Mse*I and *Tas*I. The enzymes *Taq*I and *Vsp*I show variations within avian *Trichomonas* sp. and avian *Tetratrachomonas* sp.. Here a distinction can be made between the trichomonads of different species of birds and in some cases within one species of birds.

8 Literaturverzeichnis

ABONYI, A. (1992):

Supravitalbeobachtungen über die Teilung der übergroßen Rundformen von *Trichomonas vaginalis* in der Kultur.
Angewandte Parasitologie **33**, 65-68.

ALDERETE, J. F. and PEARLMAN, E. (1984):

Pathogenic *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity to cell culture monolayers.
British Journal of Venereal Diseases **60**, 99-105.

ARAÚJO, J. P., MONTASSIER, H. J. and PINTO, A. A. (2002):

Extensive antigenic and genetic variation among foot-and-mouth disease type A viruses isolated from the 1994 and 1995 foci in São Paulo, Brazil.
Veterinary Microbiology **84**, 15-27.

BAKER, J. R. (1986):

Trichomoniasis, a major cause of vomiting in budgerigars.
Veterinary Record **118**, 447-449.

BECK, E. and STROHMAIER, K. (1987):

Subtyping of European foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination.
Journal of Virology **61**, 1621-1629.

BEECHAM, J. J. and KOCHERT, M. N. (1975):

Breeding biology of the Golden Eagle in southwestern Idaho.
Wilson Bulletin **87**, 506-513.

- BOAL, C. W., MANNAN, R. W. and HUDELSON, K. S. (1998):
Trichomoniasis in Cooper's Hawks from Arizona.
Journal of Wildlife Diseases **34**, 590-593.
- BOCH, J. und SCHNEIDAWIND, H. (1988):
Fasan (*Phasianus colchicus*, *-torquatus*, *-mongolicus*) und Rebhuhn (*Perdix perdix* L.); Wildenten; Wildtauben; Greifvögel und Falken.
In: Boch, J. und Schneidawind, H., Krankheiten des jagdbaren Wildes, Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg, S. 295-361.
- BONDURANT, R. H. and HONIGBERG, B. M. (1994):
Trichomonads of veterinary importance.
In: Kreier, J. P. (Ed.), Parasitic Protozoa, Volume 9, 2. Edition, Academic Press, New York, pp. 111-188.
- BREUKER, S. (1995):
Untersuchungen über Trichomonaden bei Rüden mit Prostataveränderungen.
Vet. Med. Diss., Gießen.
- CALLENDER, G. R. and SIMMONS, J. S. (1937):
Trichomoniasis (*T. columbae*) in the Java Sparrow, Tovi Parrakeet and Verraux's Dove.
American Journal of Tropical Medicine **17**, 579-585.
- CHRISTL, H. (1954):
Trichomonas enteris n. sp. eine Trichomonade aus dem Darm des Rindes.
Zeitschrift für Parasitenkunde **16**, 363-372.

CLARK, S., DE GUSSEM, K. and BARNES, J. (2003):

Flagellated protozoan infections in turkeys.

World Poultry, Spezial Turkey **5**, 20-23.

CLEVELAND, L. R. (1928):

Tritrichomonas fecalis nov. sp. of man; its ability to grow and multiply indefinitely in faeces dilutes with tap water and in frogs and tadpoles.

American Journal of Hygiene **8**, 232-255.

CONTI, J. A., FROHLICH, R. K. and FORRESTER, D. J. (1985):

Experimental transfer of *Trichomonas gallinae* (RIVOLTA, 1878) from White-Winged Doves to Mourning Doves.

Journal of Wildlife Diseases **21**, 229-232.

COOPER, J. E. and PETTY, S. J. (1988):

Trichomoniasis in free-living Goshawks (*Accipiter gentiles gentilis*) from Great Britain.

Journal of Wildlife Diseases **24**, 80-87.

CRESPO, R., WALKER, R. L., NORDHAUSEN, R., SAWYER, S. J. and MANALAC, R. B. (2001):

Salpingitis in Pekin ducks associated with concurrent infection with *Tetra-trichomonas* sp. and *Escherichia coli*.

Journal of Veterinary Diagnostic Investigation **13**, 240-245.

DAUST, E. (1934):

Beitrag zur Klinik und Behandlung des Trichomonadenabortes des Rindes.

Vet. Med. Diss., Gießen.

DAVAINE, C. J. (1860):

Traité des entozoaires et des maladies vermineuses de l'homme et des animaux domestiques.

J.-B. Baillière (Ed.), Paris.

zitiert nach HONIGBERG und BURGESS (1994)

DIAMOND, L. S. (1957):

The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures.

Journal of Parasitology **43**, 488-490.

DIAMOND, L. S. (1968):

Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* (SCHAUDINN, 1903) and *E. histolytica*-like amebae.

Journal of Parasitology **54**, 1047-1056.

DOBELL, C. (1939):

The common flagellate of the human mouth, *Trichomonas tenax* (O.F.M.): Its discovery and its nomenclature.

Parasitology **31**, 138-146.

DONNÉ, A. (1836):

Animalcules observés dans les matières purulentes et le produit des sécrétions des organes génitaux de l'homme et de la femme.

Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences **3**, 385-386.

ERWIN, K. G., KLOSS, C., LYLES, J., FELDERHOFF, J., FEDYNICH, A. M., HENKE, S. E. and ROBERTSON, J. A. (2000):

Survival of *Trichomonas gallinae* in White-winged Dove carcasses.
Journal of Wildlife Diseases **36**, 551-554.

FANTHAM, H. B., CANTAB. M. A. and LOND, D.S. (1921):

Some parasitic protozoa found in South Africa: IV.
South African Journal of Science **18**, 164-170.

FELLEISEN, R. S. J. (1997):

Comparative sequence analysis of 5.8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa.
Parasitology **115**, 111-119.

FELLEISEN, R. S. J. (1998):

Comparative genetic analysis of tritrichomonadid protozoa by the random amplified polymorphic DNA technique.
Parasitology Research **84**, 153-156.

FELLEISEN, R. S. J., LAMBELET, N., BACHMANN, P., NICOLET, J., MÜLLER, N. and GOTTSTEIN, B. (1998):

Detection of *Tritrichomonas foetus* by PCR and DNA enzyme immunoassay based on rRNA gene unit sequences.
Journal of Clinical Microbiology **36**, 513-519.

FRANSSEN, F. F. J. and LUMEIJ, J. T. (1992):

In vitro nitroimidazole resistance of *Trichomonas gallinae* and successful therapy with an increased dosage of ronidazole in racing pigeons (*Columba livia domestica*).
Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics **15**, 409-415.

FRIEDHOFF, K. T. (1982):

Pathogene, intestinale Flagellaten bei Tauben, Sittichen und Papageien.
Collegium Veterinarium **63**, 28-30.

FRITZSCHE, K. (1955):

Zur Therapie der Trichomoniasis der Tauben.
Zentralblatt für Veterinärmedizin **2**, 392-407.

GALLI-VALERIO, B. (1900):

Notes de parasitologie.
Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten
1. Abteilung, Originale **27**, 305-309.

GARNER, M. M. (1992):

Trichomoniasis in a Blue-fronted Amazon Parrot (*Amazona aestiva*).
Journal of the Association of Avian Veterinarians **6**, 17-20.

GIEMSA, G. (1902):

Färbemethoden für Malariaparasiten.
Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten
1. Abteilung, Originale **32**, 307-313.

GIEMSA, G. (1904):

Eine Vereinfachung und Vervollkommnung meiner Methylenazur-Methylenblau-Eosin-Färbemethode zur Erzielung der Romanowsky-Nochtschen Chromatinfärbung.
Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten
1. Abteilung, Originale **37**, 308-311.

- GOTHE, R., BEELITZ, P., SCHÖL, H. und BEER, B. (1992):
Trichomonaden-Infektionen der Mundhöhle bei Katzen in Süddeutschland.
Tierärztliche Praxis **20**, 195-198.
- GRÄFNER, G., GRAUBMANN, H.-D. und BETKE, P. (1968):
Untersuchungen über die Verbreitung und Pathogenität von Geflügeltrichomonaden im Raum Schwerin.
Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin **22**, 805-814.
- GRAVENDYCK, M., SCHRÖDER-GRAVENDYCK, A. S. und KALETA, E. F. (1997):
Zur oralen Verträglichkeit und Wirksamkeit von 1,2 Dimethyl-5-nitroimidazol (Dimetridazol) gegen die spontane Rachentrichomonose (Gelber Knopf) Herpesvirus-infizierter Brieftauben.
Tierärztliche Umschau **52**, 134-143.
- GRUBY, D. et DELAFOND, H. M. O. (1843):
Recherches sur des animalcules se développant en grand nombre dans l'estomac et dans les intestins, pendant la digestion des animaux herbivores et carnivores.
Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences **17**, 1304-1308.
- HARMON, W. M., CLARK, W. A., HAWBECKER, A. C. and STAFFORD, M. (1987):
Trichomonas gallinae in columbiform birds from the Galapagos Islands.
Journal of Wildlife Diseases **23**, 492-494.

HAUSER, K. W. (1956):

Trichomoniasis.

In: Hauser, K. W., Die kranke Taube im Bild, Verlag »Die Reisetäub«, Essen, S. 91-99.

HAWN, M. C. (1937):

Trichomoniasis of turkeys.

Journal of Infectious Diseases **61**, 184-197.

HEATH, J. P. (1981):

Behaviour and pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* in epithelial cell cultures.

British Journal of Venereal Diseases **57**, 106-117.

HEGNER, R. (1929):

The infection of parasite-free chicks with intestinale protozoa from birds and other animals.

American Journal of Hygiene **10**, 33-62.

HEGNER, R. and RATCLIFFE, H. (1927 a):

Trichomonads from the vagina of the monkey, from the mouth of the cat and man, and from the intestine of the monkey, opossum and prairie-dog.

Journal of Parasitology **14**, 27-35.

HEGNER, R. and RATCLIFFE, H. (1927 b):

Trichomonads from the mouth of the dog.

Journal of Parasitology **14**, 51-53.

HEIDENREICH, M. (1995):

Trichomonose.

In: Heidenreich, M., Greifvögel: Krankheiten, Haltung, Zucht, Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin und Wien, S. 131-132.

HIBLER, C. P., HAMMOND, D. M., CASKEY, F. H., JOHNSON, A. E. and FITZGERALD, P. R. (1960):

The morphology and incidence of the trichomonads of swine, *Tritrichomonas suis* (Gruby & Delafond), *Tritrichomonas rotunda*, n. sp. and *Trichomonas buttreysi*, n. sp.

Journal of Protozoology **7**, 159-171.

HIEPE, Th. (1992):

Protozoäre Infektionen.

In: Heider, G. und Monreal, G. (Hrsg.), Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels, Band II, Gustav Fischer Verlag, Jena und Stuttgart, S. 335-342.

HIGGINS, R. J. (1980):

Caecal trichomoniasis of game birds in North Yorkshire.

Veterinary Record **107**, 228.

HILLIS, D. M. and DIXON, M. T. (1991):

Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference.

Quarterly Review of Biology **66**, 411-453.

HÖFLE, U., GORTAZAR, C., ORTÍZ, J. A., KNISPEL, B. and KALETA, E. F. (2004):

Outbreak of trichomoniasis in a woodpigeon (*Columba palumbus*) wintering roost.

European Journal of Wildlife Research **50**, 73-77.

HÖFLE, U., BLANCO, J. M., PALMA, L., MELO, P., KNISPEL, B. and KALETA, E. F.:

Trichomoniasis and *Trichomonas* infestation in Bonelli's Eagle (*Hieraaetus fasciatus*) nestlings in southwest Portugal and central Spain.

Manuskript in Vorbereitung.

HONIGBERG, B. M. and BRUGEROLLE, G. (1990):

Structure.

In: Honigberg, B. M. (Ed.), *Trichomonads parasitic in humans*, Springer Verlag, New York, pp. 5-35.

HONIGBERG, B. M. and BURGESS, D. E. (1994):

Trichomonads of importance in human medicine including *Dientamoeba fragilis*.

In: Kreier, J. P. (Ed.), *Parasitic Protozoa*, Volume 9, 2. Edition, Academic Press, New York, pp. 1-109.

IKEDA, Y., MOCHIZUKI, M., NAITO, R., NAKAMURA, K., MIYAZAWA, T., MIKAMI, T. and TAKAHASHI, E. (2000):

Predominance of canine parvovirus (CPV) in unvaccinated cat populations and emergence of new antigenic types of CPVs in cats.

Virology **278**, 13-19.

JAQUETTE, D. S. (1948):

Copper sulfate as a treatment for subclinical trichomoniasis in pigeons.

American Journal of Veterinary Research **9**, 206-209.

JODAS, S., KORBEL, R. und HAFEZ, H. M. (2005):

Kann man seine Puten schützen?

Vet-MedReport Sonderausgabe **V1**, 4.

KALETA, E. F., TSCHIMMEL, S., KRAUS, S. und RULLOF, R. (1990):

Beobachtungen bei der spontanen (natürlichen) Infektion von Brieftauben mit *Trichomonas* sp.

Berichte der 7. Tagung über Vogelkrankheiten, München, S. 171-181.

KASSAI, T., CORDERO DEL CAMPILLO, M., EUZEBY, J., GAAFAR, S., HIEPE, Th. and HIMONAS, C. A. (1988):

Standardized nomenclature of animal parasitic diseases (SNOAPAD).

Veterinary Parasitology **29**, 299-326.

KIETZMANN, G. E. (1993):

Relationships of *Trichomonas gallinae* to the palatal-esophageal junction of Ring Doves (*Streptopelia risoria*) as revealed by scanning electron microscopy.

Journal of Parasitology **79**, 408-415.

KOCAN, R. M. (1970):

Passive immunization of pigeons against trichomoniasis.

Journal of Protozoology **17**, 551-553.

KOCAN, R. M. and HERMAN, C. M. (1971):

Trichomoniasis.

In: Davis, J. W., Anderson, R. C., Karstad, L. and Trainer, D. O. (Ed.), Infectious and parasitic diseases of wild birds, Iowa State University Press, Ames/Iowa, pp. 282-290.

KOPRLA, E. C. (1978):

Kernteilung und Microtubuli-Systeme bei *Trichomonas vaginalis*.

Diss., Math-Nat. Fak., Bonn.

KOTLÁN, A. (1923):

Zur Kenntnis der Darmflagellaten aus der Hausente und anderen Wasservögeln.

Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten, 1. Abteilung, Originale **90**, 24-28.

KRAUTWALD-JUNGHANNS, M.-E., STREUBEL, R., SCHMIDT, V., RICHTER, A., ZUMBUSCH, H.-J., LOHMANN, N. und DAUGSCHIES, A. (2004):

Verträglichkeit von Ronidazol bei Brieftauben im kontrollierten klinischen Test.

Deutsche Tierärztliche Wochenschrift **111**, 231-236.

KROKER, R. (1999):

Ronidazol.

In: Löscher, W., Ungemach, F. und Kroker, R. (Hrsg.), Pharmakotherapie bei Nutz- und Haustieren, 4. Auflage, Blackwell Verlag, Berlin, S. 244.

KROKER, R., SCHERKL, R. und UNGEMACH, F. R. (2002):

Nitroimidazole.

In: Frey, H.-H. und Löscher, W. (Hrsg.), Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin, 2. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart, S. 388-389.

KUNZ, W. (2002):

When is a parasite species a species?

Trends in Parasitology **18**, 121-124.

LEE, D. L. (1972):

Changes in the ultrastructure of the caecum of chickens caused by *Trichomonas gallinarum*.

Parasitology **65**, 71-76.

LEHKER, M. W. and ALDERETE, J. F. (1999):

Resolution of six chromosomes of *Trichomonas vaginalis* and conservation of size and number among isolates.

Journal of Parasitology **85**, 976-979.

LEIBOVITZ, L. (1973):

Necrotic enteritis of breeder ducks.

American Journal of Veterinary Research **34**, 1053-1061.

LEVINE, N. D. (1961):

The Trichomonads.

In: Levine, N. D., Protozoan parasites of domestic animals and of man, Burgess Publishing, Minneapolis, pp. 82-106.

LEVINE, N. D. (1985):

Flagellates: The Trichomonads.

In: Levine, N. D., Veterinary Protozoology, Blackwell Publishing, Berlin, pp. 59-79.

LUMEIJ, J. T. and ZWIJNENBERG, R. J. G. (1990):

Failure of Nitro-Imidazole drugs to control Trichomoniasis in the racing pigeon (*Columba livia domestica*).

Avian Pathology **19**, 165-166.

LÜTHGEN, W. und BERNAU, U. (1967):

Metronidazol zur Bekämpfung der Trichomoniasis der Tauben.

Deutsche Tierärztliche Wochenschrift **74**, 301-305.

MAASSEN, H. (1938):

Der mikroskopische Nachweis der Rinder-Genital-Trichomonaden (*Trichomonas genitalis bovis*) unter Berücksichtigung der gebräuchlichsten Färbemethoden.

Vet. Med. Diss., Gießen.

MARTIN, C. H. and ROBERTSON, M. (1911):

Further observations on the caecal parasites of fowls, with some reference to the rectal fauna of other vertebrates.

Quarterly Journal of Microscopical Science **57**, 53-81.

McDOWELL, S. (1953):

A morphological and taxonomic study of the caecal protozoa of the common fowl, *Gallus gallus* L.

Journal of Morphology **92**, 337-399.

MEHLHORN, H. (2001):

Biology, structure, function.

In: Mehlhorn, H., Encyclopedic reference of parasitology, 2. Edition, Springer Verlag, New York, S. 353, 540, 639-641, 651-652.

MEHTA, S. H. and VERMA, K. (1981):

Relationship between size of *Trichomonas vaginalis* and pathogenicity.

Indian Journal of Medical Research **74**, 231-235.

MÜLLER, O. F. (1773):

Vermium terrestrium et fluviatilium, seu animalium infusoriorum, helminthicorum et testaceorum, non marinorum, succinata historia.

Havniae et Lipsiae: apud Heineck et Faber (Ed.), Vol. 1, part 1, pp. 69-70.

zitiert nach DOBELL (1939)

MÜLLER, W. A. (1967):

Die Züchtung von Trichomonaden in bebrüteten Hühnereiern.

Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitologie **18**, 327-330.

MÜLLER, W. A. und GOTTSCHALK, C. (1970):

Standardisierung der parasitologischen Nachweisverfahren für Trichomonadeninfektionen.

Angewandte Parasitologie **11**, 170-176.

MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G. and ERLICH, H. (1986):

Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction.

Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology **51**, 263-273.

NARCISI, E. M., SEVOIAN, M. and HONIGBERG, B. M. (1991):

Pathologic changes in pigeons infected with a virulent *Trichomonas gallinae* strain (Eiberg).

Avian Diseases **35**, 55-61.

NÖLLER, W. (1924):

Eine halbtrockene Giemsa-Färbung für Darmflagellaten.

zitiert nach MAASSEN (1938).

NORTON, R. A. (1997):

Pathogenicity of a strain of *Trichomonas gallinarum* in turkeys and its possible interaction with cecal coccidia.

Avian Diseases **41**, 670-675.

OEHLER, R. (1922):

Schnellfärbung von Darmflagellaten.

zitiert nach MAASSEN (1938)

OLSEN, G. J. and WOESE, C. R. (1993):

Ribosomal RNA: a key to phylogeny.

FASEB Journal **7**, 113-123.

OSTRAND, W. D., BISSONETTE, J. A. and CONOVER, M. R. (1995):

Trichomoniasis as a factor in Mourning Dove population decline in Fillmore, Utah.

Journal of Wildlife Diseases **31**, 87-89.

PACE, N. R., OLSEN, G. J. and WOESE, C. R. (1986):

Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent.

Cell **45**, 325-326.

PAGEL, T. (1985):

Loris: Freileben, Haltung und Zucht der Pinselzungenloris.

In: Pagel, T., Ulmer Verlag, Stuttgart, S. 59-186.

PFAFF, H. (1964):

Über das Vorkommen von *Trichomonas vaginalis* in der Vagina Schwangerer, in Fruchtwasser, in Placenta und Eihaut sowie Abortmaterial.

Med. Diss., Gießen.

REAL, J., MAÑOSA, S. and MUÑOZ, E. (2000):

Trichomoniasis in a Bonelli's Eagle population in Spain.

Journal of Wildlife Diseases **36**, 64-70.

REDMANN, T., BÖNNER, B. und REICHEL, U. (2003):

Schwarzkopfkrankheit: Dem Sterben der Puten zusehen.

VETimpulse **15**, 6.

RIEDMÜLLER, L. (1928):

Über die Morphologie, Übertragungsversuche und klinische Bedeutung der beim sporadischen Abortus des Rindes vorkommenden Trichomonaden.

Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten
1. Abteilung, Originale **108**, 103-118.

RILEY, D. E., MANSOUR SAMADPOUR and KRIEGER, J. N. (1991):

Detection of variable DNA repeats in diverse eukaryotic microorganisms by a single set of polymerase chain reaction primers.

Journal of Clinical Microbiology **29**, 2746-2751.

RILEY, D. E. and KRIEGER, J. N. (1992):

Rapid and practical DNA isolation from *Trichomonas vaginalis* and other nuclease-rich protozoa.

Molecular and Biochemical Parasitology **51**, 161-164.

RIVOLTA, S. (1878):

Una forma di croup prodotta da un infusorio, nei polli.

Giornale di Anatomia, Fisiologia e Patologia degli Animalia **10**, 149-154.

RIVOLTA, S. e DELPRATO, P. (1880):

L'ornitopatologia o la medicina degli uccelli domestici e semidomestici. Pisa.
zitiert nach BONDURANT und HONIGBERG (1994)

ROBERTSON, A. (1932):

Note on a *Trichomonas* sp. cultivated from the gut of a sheep, *Ditrichomonas ovis* (nov. sp.).
Veterinary Journal **88**, 151-157.

ROMMEL, M. (1992):

Trichomonose.
In: Boch, J. und Supperer, R. (Hrsg.), Veterinärmedizinische Parasitologie, 4. Auflage, Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg, S. 667-669.

SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G. T.,
ERLICH, H. A. and ARNHEIM, N. (1985):

Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.
Science **230**, 1350-1354.

SAMOUR, J. H. and NALDO, J. L. (2005):

Intra-auricular trichomonosis in a Saker Falcon (*Falco cherrug*) in Saudi Arabia.
Veterinary Record **156**, 384-386.

SCHAAF, J. (1937):

Über Nabelinfektionen beim Junggeflügel, insbesondere im Zusammenhang mit dem „Gelben Knopf“ bei Jungtauben.
Zeitschrift für Infektionskrankheiten, parasitäre Krankheiten und Hygiene der Haustiere **51**, 57-66.

SCHAF, K. A. and PURCHASE, H. G. (1998):

Cell-culture methods.

In: Swayne, D. E., Glisson, J. R., Jackwood, M. W., Pearson, J. E. and Reed, W. M. (Ed.), A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 4. Edition, American Association of Avian Pathologists, Pennsylvania, pp. 223-234.

SCHWARTZ, D. C. and CANTOR, C. R. (1984):

Seperation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis.

Cell **37**, 67-75.

SIMITCH, T. (1939):

Trichomonas equibuccalis n. sp. parasite de la bouche du cheval et de l'âne.

Rivista di Parassitologia **3**, 23-26.

STABLER, R. M. (1938):

Trichomonas gallinae (RIVOLTA, 1878) the correct name for the flagellate in the mouth, crop and liver of the pigeon.

Journal of Parasitology **24**, 553-554.

STABLER, R. M. (1941):

Further studies on Trichomoniasis in birds.

Auk **58**, 558-562.

STABLER, R. M. (1951):

A survey of Colorado Band-Tailed Pigeons, Mourning Doves, and wild common pigeons for *Trichomonas gallinae*.

Journal of Parasitology **37**, 471-472.

STABLER, R. M. (1954):

Trichomonas gallinae: a review.

Experimental Parasitology **3**, 368-402.

STABLER, R. M. and MELLENTIN, R. W. (1953):

Effect of 2-Amino-5-Nitrothiazole (Enheptin) and other drugs on *Trichomonas gallinae* infection in the domestic pigeon.

Journal of Parasitology **39**, 637-642.

STENSRUDE, C. (1965):

Observations on a pair of Grey Hawks in southern Arizona.

Condor **67**, 319-321.

STONE, W. B. and NYE, P. E. (1981):

Trichomoniasis in Bald Eagles.

Wilson Bulletin **93**, 109.

STREIT, K. (1936):

Zur Diagnostik der *Trichomonas vaginalis*.

Schweizerische Medizinische Wochenschrift **2**, 54-56.

TRUYEN, U., GRUENBERG, A., CHANG, S.-F., OBERMAIER, B., VEIJALAINEN, P. and PARRISH, C. R. (1995):

Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host range *in vivo*.

Journal of Virology **69**, 4702-4710.

TSAI, S. S., CHANG, T. C., KUO, M. and ITAKURA, C. (1997):

Respiratory and intestinal trichomoniasis in mule ducks.

Avian Pathology **26**, 651-656.

VAN REGENMORTEL, M. H. V. (2000):

Introduction to the species concept in virus taxonomy.

In: Van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M. and Bishop, D. H. L. (Ed.),
Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses, Academic
Press, New York, pp. 3-16.

VISCOGLIOSI, E., EDGCOMB, V. P., GERBOD, D., NOËL, C. and
DELGADO-VISCOGLIOSI, P. (1999):

Molecular evolution inferred from small subunit rRNA sequences: what does
it tell us about phylogenetic relationships and taxonomy of the parabasalids?
Parasite **6**, 279-291.

VOGEL, K. (1992):

Trichomoniasis.

In: Heider, G. und Monreal, G. (Hrsg.), Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels,
Band II, Gustav Fischer Verlag, Jena und Stuttgart, S. 352-363.

WALKER, R. L., HAYES, D. C., SAWYER, S. J., NORDHAUSEN, R. W.,
VAN HOOSEAR, K. A. and BONDURANT, R. H. (2003):

Comparison of the 5,8S rRNA gene and internal transcribed spacer regions of
the trichomonadid protozoa recovered from the bovine preputial cavity.
Journal of Veterinary Diagnostic Investigation **15**, 14-20.

WEINZIRL, J. (1917):

Trichomoniasis of chicks: a new and highly fatal disease.

Journal of Bacteriology **2**, 441-445.

WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A. and TINGEY, S. V. (1990):

DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.

Nucleic Acids Research **18**, 6531-6535.

WISLOCKI, P. G. and LU, A. Y. H. (1990):

Formation and biological evaluation of Ronidazole bound residues.

Drug Metabolism Reviews **22**, 649-661.

WOESE, C. R., KANDLER, O. and WHEELIS, M. L. (1990):

Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **87**, 4576-4579.

ZUCKERKANDL, E. and PAULING, L. (1965):

Molecules as documents of evolutionary history.

Journal of Theoretical Biology **8**, 357-366.

Danksagung

Herrn Professor Dr. E. F. Kaleta möchte ich ganz herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, der wissenschaftlichen Betreuung sowie der Bereitstellung von Literatur danken. Mein besonderer Dank gilt seiner stets gewährten Unterstützung, nicht zuletzt bei der Korrektur des Manuskriptes.

Frau Dr. Cosima Annemüller danke ich für die Einführung in die Welt von PFGE, RAPD und PCR.

Den Mitarbeitern der Professur für Milchwissenschaften Herrn Dr. Abdul Wahed Hassan und Herrn Ömer Akineden danke ich für die sehr hilfreiche Unterstützung bei REA und PFGE.

Den Diplom-Chemikern Klaus Peppler und Ilia Valov danke ich für den Zugang zu den Mikroskopen des Instituts für Physikalische Chemie und für den Versuch der Elektronenmikroskopie und der Raster-Kraft-Mikroskopie.

Auch danken möchte ich Sara Melville aus Cambridge, England, Dr. W. M. Degrave aus Paris, Frankreich und David Lloyd aus England die auf meine e-mail-Hilferufe reagierten und mir bei der PFGE geholfen haben.

Frau Dr. Ursula Höfle danke ich für die Überlassung der Isolate aus Spanien und Herrn Dr. Klaus Henning danke ich für die Überlassung des *Tritrichomonas foetus*-Isolates. Den Vogelzüchtern, die mir ihre Tiere für Probenentnahmen zur Verfügung stellten, danke ich sehr herzlich.

Herrn PD Dr. Paul Becher danke ich für die Sequenzierung einiger Isolate und deren Auswertung, sowie für Ratschläge und Empfehlungen bei der molekularbiologischen Auswertung.

Auch danken will ich allen Mitarbeitern der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische für die fruchtbare Zusammenarbeit; den Mitarbeitern der Poliklinik für Vögel und Reptilien für das Mitsammeln von Probenmaterial, Frau Brigitte M. Bönner, Frau Sandra Saal und Herrn Klaus Schmitt für die Proben aus der Sektion; Frau Sabine Jäger für die Hilfe bei den Fotos und bei Computerproblemen, die meistens allein durch ihre Anwesenheit gelöst wurden.

Herrn Georg Hausner und Herrn Ralf Dörr danke ich für die Herstellung der Nährmedien.

Nicht zuletzt gebührt meiner Familie für ihre Unterstützung großen Dank, meinem Mann Nihat für seine tatkräftige Unterstützung, meinen Eltern für ihre finanzielle Unterstützung, das Korrekturlesen und ihre Geduld und meinem Onkel Wolfgang Knispel für die germanistische Hilfestellung bei dem Manuskript.