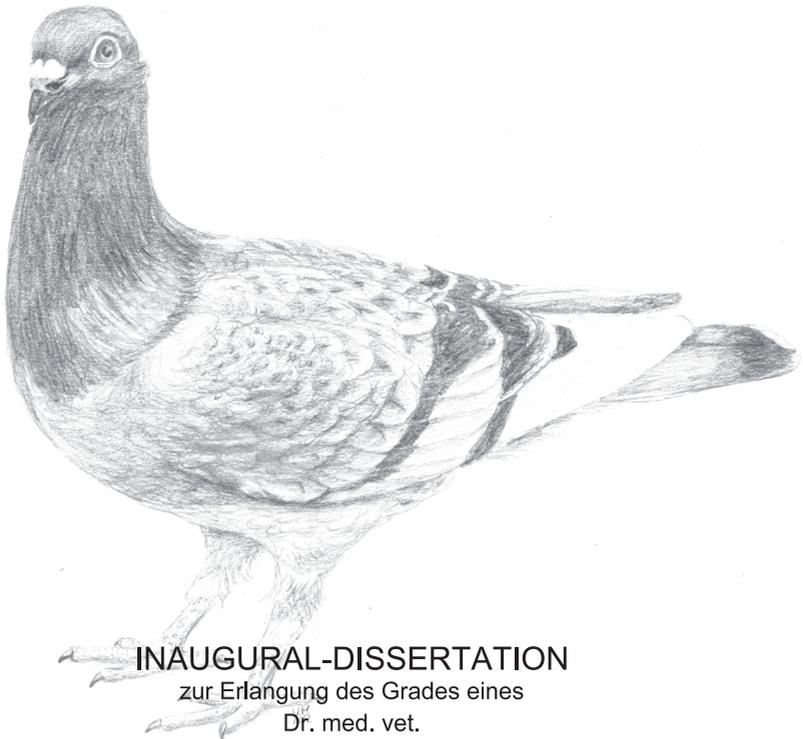


**UNTERSUCHUNGEN ZUR PATHOGENESE,  
DIAGNOSE UND THERAPIE DER VON  
SARCOCYSTIS CALCHASI AUSGELÖSTEN  
SARKOZYSTOSE BEI DER HAUSTAUBE  
(*COLUMBA LIVIA F. DOMESTICA*) UND DEM  
NYMPHENSITTICH (*NYMPHICUS HOLLANDICUS*)**



**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**KRISTINA MAIER**





## **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 2015

© 2015 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**,  
Gießen  
Printed in Germany

ISBN 978-3-86345-270-4

Verlag: DVG Service GmbH  
Friedrichstraße 17  
35392 Gießen  
0641/24466  
[info@dvf.de](mailto:info@dvf.de)  
[www.dvf.de](http://www.dvf.de)

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

Betreuer: Prof. Dr. Michael Lierz

**UNTERSUCHUNGEN ZUR PATHOGENESE,  
DIAGNOSE UND THERAPIE DER DURCH  
*SARCOCYSTIS CALCHASI* AUSGELÖSTEN  
SARKOZYSTOSE BEI DER HAUSTAUBE (*COLUMBA  
LIVIA F. DOMESTICA*) UND DEM NYMPHENSITTICH  
(*NYMPHICUS HOLLANDICUS*)**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**Kristina Maier**

Tierärztin aus Hannover

Gießen, 2015



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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. M. Lierz

Prof. Dr. Dr. habil. C. Hermosilla

Tag der Disputation: 11. Juni 2015

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Fachzeitschriften bzw. Tagungsbänden von Fachkongressen veröffentlicht und als Vortrag/Poster präsentiert:

OLIAS, P.\*, **MAIER, K.\***, WÜNSCHMANN, A., REED, L., ARMÍÉN, A., SHAW, D. P., GRUBER, A. D., LIERZ, M. (2014): *Sarcocystis calchasi* has an expanded host range and induces neurological disease in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) and North American rock pigeons (*Columba livia f. dom.*). *Veterinary Parasitology* **200 (1-2)**, 59-65.

\*Beide Autoren haben gleichwertig beigetragen.

**MAIER, K.**, OLIAS, P., ENDERLEIN, D., KLOPFLEISCH, R., MAYR, S. L., GRUBER, A. D., LIERZ, M. (2015): Parasite distribution and early stage encephalitis in *Sarcocystis calchasi* infections in domestic pigeons (*Columba livia f. domestica*). *Avian Pathology* **44(1)**, 5-12.

**MAIER, K.**, OLIAS, P., GRUBER, A. D., LIERZ, M. (2015): Toltrazuril does not show an effect against pigeon protozoal encephalitis. *Parasitology Research* **114(4)**, 1603-1606.

**MAIER, K.**, OLIAS P., GRUBER, A. D., LIERZ, M. (2012): Die Sarkosporidiose der Taube – Therapeutische Ansätze. Tagungsband der 17. DVG-Tagung über Vogelkrankheiten (ISBN: 978-3-86345-062-5), München, S. 63-66.

LIERZ, M., **MAIER, K.**, OLIAS P., GRUBER, A. D. (2012): Sarkosporidiosis in Pigeons – a Novel Emerging Disease Worldwide. Tagungsband der 33th Annual Association of Avian Veterinarians Conference & Expo (ISBN: 978-1-62993-183-8), Louisville, KY, USA, S. 81-82.

**MAIER, K.**, OLIAS, P., ENDERLEIN, D., GRUBER, A. D., LIERZ, M. (2013): Pathogenesis and treatment of *Sarcocystis calchasi* infections in domestic pigeons.\* Tagungsband der First International Conference on Avian, Herpetological and Exotic Mammal Medicine 2013 (ISBN: 978-3-8359-6008-4), Wiesbaden, S. 384-385.

**\*Ausgezeichnet mit dem Helga Gerlach Student Award (First Prize)**

**MAIER, K., OLIAS, P., GRUBER, A. D., LIERZ, M. (2011):** Untersuchungen zur Sarkosporidiose der Haustauben (*Columba livia* f. *domestica*). Poster auf der Sommerveranstaltung des Vereins der Freunde und Förderer der Veterinärmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen, 17.06.2011

**MAIER, K., OLIAS, P., GRUBER, A. D., LIERZ, M. (2011):** Study on the pathogenesis and therapy of *Sarcocystis calchasi* sp. nov. in the domestic pigeon (*Columba livia* f. *domestica*). Poster auf der 4<sup>th</sup> GGL Conference on Life Sciences, Gießen, 21.-22.09.2011

**MAIER, K., OLIAS, P., GRUBER, A. D., LIERZ, M. (2012):** The sarco-sporidiosis of the domestic pigeon – therapeutic approaches. Poster auf der 5<sup>th</sup> GGL Conference on Life Sciences, Gießen, 18.-19.09.2012

**MAIER, K., OLIAS, P., GRUBER, A. D., LIERZ, M. (2012):** Sarcosporidiosis of domestic pigeons. Vortrag in der Vortragsreihe „Current Topics of Infection Biology“, Gießen, 26. 10. 2012

**MAIER, K., OLIAS, P., GRUBER, A. D., LIERZ, M. (2013):** Die Sarkosporidiose der Taube. Vortrag auf der Deutschen Brieftaubenausstellung, Dortmund, 06.01.2013

**MAIER, K., OLIAS, P., GRUBER, A. D., LIERZ, M. (2013):** Pathogenesis of *Sarcocystis calchasi* infections in domestic pigeons (*Columba livia* f. *domestica*) and cockatiels (*Nymphicus hollandicus*). Vortrag auf der 6<sup>th</sup> GGL Conference on Life Sciences, Gießen, 11.-12.09.2013

MAYR, S., **MAIER, K. (2014):** *Sarcocystis calchasi* – ein neuer Parasit in Brieftauben. Geflügelzeitung 11/2014, S. 12-13.

Teile der Arbeit wurden finanziell unterstützt von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Projektnummer: LI 1924/3-1 und GR1491/6-1) sowie von der Justus-Liebig-Universität Gießen in Form eines Graduiertenstipendiums.



*meinen Eltern*



# I. Inhaltsverzeichnis

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 1       | Einleitung .....   | 1  |
| 2       | Literaturübersicht .....   | 3  |
| 2.1     | Sarkozysten .....  | 3  |
| 2.1.1   | Geschichte .....   | 3  |
| 2.1.2   | Lebenszyklus .....   | 4  |
| 2.1.2.1 | Entwicklung im Endwirt .....   | 4  |
| 2.1.2.2 | Entwicklung im Zwischenwirt.....   | 6  |
| 2.1.3   | Struktur der verschiedenen <i>Sarcocystis</i> -Stadien.....                          | 11 |
| 2.1.4   | Vorkommen und Bedeutung von Sarkozysten .....  | 13 |
| 2.2     | Aviäre Sarkozysten .....   | 16 |
| 2.2.1   | Sarkozysten bei Vögeln .....   | 16 |
| 2.2.2   | Sarkozysten bei der Ordnung Columbiformes.....                                       | 16 |
| 2.2.3   | Sarkozysten bei der Ordnung Psittaciformes .....                                     | 17 |
| 2.3     | <i>Sarcocystis calchasi</i> .....  | 20 |
| 2.3.1   | Entdeckung .....   | 20 |
| 2.3.2   | Systematik.....  | 21 |
| 2.3.3   | Wirtsspektrum .....  | 21 |
| 2.3.4   | Verbreitung.....   | 22 |
| 2.3.5   | Diagnose .....   | 23 |
| 2.3.6   | Klinisches Bild und pathologische Veränderungen bei Tauben                           | 24 |
| 2.4     | Bisherige Erkenntnisse zur Pathogenese von Enzephalitiden<br>durch Sarkozysten ..... | 26 |
| 2.4.1   | Enzephalitiden durch Sarkozysten .....   | 26 |
| 2.4.2   | Immunantwort auf Infektionen mit Sarkozysten.....                                    | 27 |
| 2.4.3   | Toxische Eigenschaften der Gattung <i>Sarcocystis</i> .....                          | 31 |
| 2.5     | Therapie der Sarkozysteninfektionen.....   | 33 |
| 2.6     | Aufgabenstellung und Zielsetzung .....   | 36 |
| 3       | Material und Methoden .....  | 37 |
| 3.1     | Material .....   | 37 |

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| 3.1.1     | Sporozysten von <i>S. calchasi</i> .....  | 37 |
| 3.1.2     | Tauben .....  | 37 |
| 3.1.3     | Nymphensittiche .....   | 38 |
| 3.1.4     | Reagenzien und Geräte .....   | 39 |
| 3.2       | Methoden.....   | 40 |
| 3.2.1     | Durchführung der Versuche.....  | 40 |
| 3.2.1.1   | Versuchsteil A – Vorversuch.....  | 40 |
| 3.2.1.2   | Versuchsteil B – Hauptversuch zur Klärung des Verhaltens<br>von <i>S. calchasi</i> im Zwischenwirt Taube .....              | 41 |
| 3.2.1.3   | Versuchsteil C – Versuch zur Klärung der Infektiösität und<br>Pathogenität von <i>S. calchasi</i> für Nymphensittiche ..... | 43 |
| 3.2.1.4   | Versuchsteil D – Behandlungsversuch einer <i>S. calchasi</i> -<br>Infektion bei Tauben mit Toltrazuril.....                 | 44 |
| 3.2.2     | Methoden zur Durchführung der Versuche.....   | 45 |
| 3.2.2.1   | Untersuchungen vor Beginn der Versuche .....  | 45 |
| 3.2.2.2   | Herstellung der Infektionsdosen und Infektion der Tauben<br>und Nymphensittiche .....                                       | 48 |
| 3.2.2.3   | Sektion und Probenahme von Organmaterial.....   | 49 |
| 3.2.2.4   | Untersuchungen zum Ausschluss anderer Infektionen als<br>durch <i>S. calchasi</i> .....                                     | 49 |
| 3.2.2.5   | Histologische Untersuchung der Organproben.....   | 50 |
| 3.2.2.6   | Immunhistochemische Untersuchung der Organproben .....  | 50 |
| 3.2.2.7   | Untersuchung mittels semi-nested Real-time PCR.....   | 51 |
| 3.2.2.7.1 | Etablierung der <i>S. calchasi</i> -spezifischen semi-nested<br>Real-time-PCR .....   | 51 |
| 3.2.2.7.2 | Bestimmung der Sensitivität und Spezifität .....  | 52 |
| 3.2.2.7.3 | Untersuchung der Organproben .....  | 54 |
| 4         | Ergebnisse.....   | 56 |
| 4.1       | Untersuchungen vor Beginn der Versuche .....  | 56 |
| 4.2       | Evaluierung der <i>S. calchasi</i> -spezifischen, semi-nested<br>Real-time PCR.....   | 56 |
| 4.3       | Versuchsteil A – Vorversuch.....  | 57 |

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 4.4   | Versuchsteil B – Hauptversuch zum Verhalten von<br><i>S. calchasi</i> im Zwischenwirt Taube .....                           | 58  |
| 4.4.1 | Klinische Befunde an den Tauben .....   | 58  |
| 4.4.2 | Pathologisch-anatomische Veränderungen an den Organen....   | 58  |
| 4.4.3 | Histopathologische und immunhistochemische Befunde<br>an den Organen .....  | 59  |
| 4.4.4 | Detektion von <i>S. calchasi</i> -spezifischer DNA in den Organen....   | 67  |
| 4.5   | Versuchsteil C – Versuch zur Klärung der Infektiösität und<br>Pathogenität von <i>S. calchasi</i> für Nymphensittiche ..... | 71  |
| 4.5.1 | Klinische Befunde an den Nymphensittichen .....   | 71  |
| 4.5.2 | Pathologisch-anatomische Veränderungen an den Organen....   | 72  |
| 4.5.3 | Histopathologische und immunhistochemische Befunde<br>an den Organen .....  | 73  |
| 4.5.4 | Detektion von <i>S. calchasi</i> -spezifischer DNA in den Organen....   | 76  |
| 4.6   | Versuchsteil D – Behandlungsversuch einer <i>S. calchasi</i> -<br>Infektion bei Tauben mit Toltrazuril .....                | 77  |
| 4.6.1 | Klinische Befunde an den Tauben .....   | 77  |
| 4.6.2 | Pathologisch-anatomische Veränderungen an den Organen....   | 78  |
| 4.6.3 | Histopathologische Befunde an Organen.....  | 79  |
| 4.6.4 | Detektion von <i>S. calchasi</i> -spezifischer DNA in der Muskulatur.   | 80  |
| 5     | Diskussion.....   | 82  |
| 6     | Zusammenfassung.....  | 101 |
| 7     | Summary.....  | 104 |
| 8     | Literaturverzeichnis .....  | 106 |
| 9     | Anhang.....   | 135 |
|       | Anhang I: Aviäre <i>Sarcocystis</i> spp. ....   | 135 |
|       | Anhang II: Reagenzien, Verbrauchsmaterial und Geräte.....   | 137 |
| II.I  | Reagenzien und Verbrauchsmaterial .....   | 137 |

|  |  |     |
|--|--|-----|
| II.I.I   | Reagenzien und Verbrauchsmaterial für die immunhisto-<br>chemische Färbung ..... | 137 |
| II.I.II  | Reagenzien und Verbrauchsmaterial für die PCR .....                              | 138 |
| II.I.III   | Sonstige Reagenzien und Medikamente .....  | 140 |
| II.I.IV  | Medien .....   | 140 |
| II.I.V   | Sonstiges Verbrauchsmaterial .....   | 140 |
| II.II  | Liste der bei den Versuchen verwendeten Geräte .....                             | 141 |
| Anhang III: Protokoll der immunhistochemischen Färbung ..... |  | 143 |
| Danksagung .....   |  | 146 |

## II. Abbildungsverzeichnis

|               |   |    |
|---------------|---|----|
| Abbildung 1:  | Schema des Lebenszyklus von Sarkozysten.....  | 10 |
| Abbildung 2:  | Histologische Schnitte der Leber von Taube B10.3 an<br>Tag 10 p. i. ....  | 60 |
| Abbildung 3:  | Histologischer Schnitt des Gehirns von Taube B20.1 an<br>Tag 20 p. i. ....  | 61 |
| Abbildung 4:  | Histologischer Schnitt der Skelettmuskulatur von<br>Taube B57.1 an Tag 57 p. i. ....  | 62 |
| Abbildung 5:  | Histologischer Schnitt des Gehirns von Taube B59.1 an<br>Tag 59 p. i. ....  | 63 |
| Abbildung 6:  | Histologischer Schnitt des Gehirns von Taube B47.3 an<br>Tag 47 p. i. ....  | 64 |
| Abbildung 7:  | Versuchsgruppe B10: Durchschnittlicher relativer Gehalt<br>an <i>S. calchasi</i> -spezifischer DNA in 13 Organen .....                                | 68 |
| Abbildung 8:  | Versuchsgruppe B20: Durchschnittlicher relativer Gehalt<br>an <i>S. calchasi</i> -spezifischer DNA in 13 Organen .....                                | 68 |
| Abbildung 9:  | Durchschnittlicher relativer Gehalt an <i>S. calchasi</i> -<br>spezifischer DNA in Skelettmuskulatur, Gehirn und Leber<br>von Tag 2 bis 61 p. i. .... | 69 |
| Abbildung 10: | Histologische Schnitte des Gehirns und der Skelett-<br>muskulatur des Nymphensittichs C4.2 an Tag 57 p. i. ....                                       | 74 |
| Abbildung 11: | Relativer Gehalt an <i>S. calchasi</i> -spezifischer DNA in der<br>Skelettmuskulatur der Tauben des Versuchsteils D .....                             | 80 |

### III. Tabellenverzeichnis

|  |     |
|--|-----|
| Tabelle 1: Wirksamkeit verschiedener Wirkstoffe, die gegen Sarkozysteninfektionen eingesetzt wurden .....                        | 35  |
| Tabelle 2: Aufbau des Vorversuchs zur Ermittlung der geeigneten Infektionsdosis.....   | 41  |
| Tabelle 3: Aufbau des Hauptversuchs zum Verhalten von <i>S. calchasi</i> im Zwischenwirt Taube.....                              | 42  |
| Tabelle 4: Versuchsaufbau zur Klärung der Infektiösität und Pathogenität von <i>S. calchasi</i> für Nymphensittiche.....         | 43  |
| Tabelle 5: Aufbau des Behandlungsversuchs mit Toltrazuril.....   | 45  |
| Tabelle 6: Sequenzen der Primer SCa1, SCa2 und SNCa3 (OLIAS et al., 2011) .....  | 53  |
| Tabelle 7: Temperaturprofil der <i>S. calchasi</i> -spezifischen semi-nested Real-time PCR.....                                  | 53  |
| Tabelle 8: Mastermix-Protokoll der <i>S. calchasi</i> -spezifischen semi-nested Real-time PCR.....                               | 53  |
| Tabelle 9: Klinische Befunde des Vorversuchs .....   | 57  |
| Tabelle 10: Ergebnisse der histopathologischen Untersuchung und der PCR der Organe der Tauben des Versuchsteils B.....           | 65  |
| Tabelle 11: Ausprägung der klinischen Phasen der Erkrankung bei den Nymphensittichen des Versuchsteils C .....                   | 72  |
| Tabelle 12: Ergebnisse der histopathologischen Untersuchung und der PCR der Organe der Nymphensittiche der Versuchsgruppe C..... | 75  |
| Tabelle 13: Klinische Befunde an den Tauben des Versuchsteils D .....  | 78  |
| Tabelle 14: Ergebnisse der histopathologischen Untersuchung und der PCR der Organe der Tauben des Versuchsteils D.....           | 79  |
| Tabelle 15: <i>Sarcocystis</i> spp. mit aviärem Zwischenwirt .....   | 135 |
| Tabelle 16: Protokoll der Deparaffinisierung und Dehydrierung .....  | 143 |
| Tabelle 17: Protokoll der Entwässerung.....  | 145 |

## IV. Abkürzungsverzeichnis

|                  |   |
|------------------|---|
| A.               | <i>Accipiter</i>                                      |
| ABC-Lösung       | Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Lösung               |
| ADEM             | Akute Disseminierte Enzephalomyelitis                 |
| Aqua dest.       | Aqua destillata (destilliertes Wasser)                |
| bp               | base pairs (Basenpaare)                               |
| CD               | Cluster of Differentiation (Differenzierungseinheit)  |
| cm               | Zentimeter  |
| ct               | cycle threshold (Beginn des exponentiellen Wachstums) |
| D.               | <i>Didelphis</i>                                      |
| DAB              | 3,3'-Diaminobenzidin                                  |
| DNA              | Desoxyribonukleinsäure                                |
| dpi              | days post infection (Tage nach Infektion)             |
| EAE              | Experimentelle allergische Enzephalitis               |
| EDTA             | Ethylendiamintetraessigsäure                          |
| EG               | Europäische Gemeinschaft                              |
| EPM              | Equine Protozoäre Myeloenzephalitis                   |
| et al.           | et alii (und andere)                                  |
| f.               | forma   |
| fg               | Femtogramm  |
| g                | Gramm bzw. Erdbeschleunigungskonstante                |
| H <sub>2</sub> O | Wasser  |
| HA               | Hämagglutinationstest                                 |
| HA-Einheit       | Hämagglutinierende Einheit                            |
| HAH              | Hämagglutinationshemmtest                             |
| HE               | Hämatoxylin-Eosin                                     |
| I.E.             | Internationale Einheiten                              |
| IgA              | Immunglobulin A                                       |
| IgG              | Immunglobulin G                                       |
| IgM              | Immunglobulin M                                       |
| IFN              | Interferon  |

---

|             |   |
|-------------|---|
| IHC         | Immunhistochemie  |
| IL          | Interleukin   |
| ITS         | Internal Transcribed Spacer   |
| JLU         | Justus-Liebig-Universität   |
| kg          | Kilogramm   |
| KGW         | Körpergewicht   |
| KVRAF       | Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische   |
| L           | Liter   |
| M           | Molar   |
| mA          | Milliampere   |
| mg          | Milligramm  |
| min         | Minuten   |
| Mio.        | Millionen   |
| ml          | Milliliter  |
| mm          | Millimeter  |
| mM          | Millimolar  |
| MSRV-Medium | Modified Semi-solid Rappaport-Vassiliadis-Medium (modifiziertes, halbfestes Rappaport-Vassiliadis-Medium) |
| µg          | Mikrogramm  |
| µl          | Mikroliter  |
| µm          | Mikrometer  |
| NaCl        | Natriumchlorid  |
| ng          | Nanogramm   |
| PBS         | Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Salzlösung)   |
| PCR         | Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)   |
| p. i.       | post infectionem  |
| <i>PMV</i>  | <i>Paramyxovirus</i>  |
| PPE         | Pigeon Protozoal Encephalitis (Protozoäre Enzephalitis der Tauben)  |
| rpm         | rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)  |
| rRNA        | ribosomale Ribonukleinsäure   |
| s           | Sekunden  |

---

|                   |   |
|-------------------|---|
| S.                | <i>Sarcocystis</i>  |
| SCID              | Severe Combined Immunodeficiency (Schwere kombinierte Immundefizienz) |
| sp.               | species (Singular)  |
| sp. nov.          | species nova (neue Art)   |
| SPF               | spezifiziert-pathogen-frei  |
| spp.              | species (Plural)  |
| syn.              | synonym   |
| TBE-Puffer        | TRIS-Borat-EDTA-Puffer  |
| Th1/Th2           | Typ1-/Typ2-T-Helferzelle  |
| TRIS              | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan                                       |
| UV                | Ultraviolett  |
| V                 | Volt  |
| V.                | <i>Vena</i>   |
| var.              | variatio  |
| verd.             | verdünnt  |
| VO                | Verordnung  |
| XLD-Agar          | Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar  |
| ZnCl <sub>2</sub> | Zinkchlorid   |
| ZnSO <sub>4</sub> | Zinksulfat  |
| ZNS               | Zentrales Nervensystem  |



# 1 EINLEITUNG

*Sarcocystis calchasi* wurde im Jahr 2009 als Erreger einer schweren, neurologischen Erkrankung von Tauben beschrieben, die teilweise mit hohen Verlusten in den betroffenen Taubenbeständen einherging (OLIAS et al., 2009b). Tauben stellen im Lebenszyklus von *S. calchasi* den Zwischenwirt dar, während Habicht (*Accipiter gentilis*) und Sperber (*A. nisus*) als Endwirte identifiziert wurden (OLIAS et al., 2009a, OLIAS et al., 2011). Die bei Tauben auftretende, später als PPE (Pigeon Protozoal Encephalitis) bezeichnete Erkrankung (OLIAS et al., 2013) weist einen infektionsdosisabhängigen, biphasischen Verlauf auf. In der akuten Phase tritt vor allem eine unspezifische Symptomatik auf, während die chronische Phase durch schwere, neurologische Symptome gekennzeichnet ist (OLIAS et al., 2010a). Durch experimentelle Infektionen von Tauben konnte gezeigt werden, dass während den beiden klinischen Phasen von PPE nur wenige bis keine Stadien von *S. calchasi* im ZNS vorhanden sind. Gleichzeitig lag jedoch eine disseminierte, granulomatöse Enzephalitis bei allen Tauben während der chronischen Phase der Erkrankung vor (OLIAS et al., 2010a, OLIAS et al., 2013). Obwohl es bereits erste Hinweise auf ein immunvermitteltes Geschehen gibt (OLIAS et al., 2013), ist der Pathomechanismus, der zur Entstehung der entzündlichen Läsionen im Gehirn führt, bislang unklar.

Das Zwischenwirtsspektrum von *S. calchasi* ist bislang nur wenig untersucht. Lediglich das Huhn konnte experimentell als Zwischenwirt ausgeschlossen werden (OLIAS et al., 2010a). Über die Empfänglichkeit von Psittaziden ist bislang nichts bekannt. Von den 375 rezenten Arten der Ordnung Psittaciformes sind ca. 30 % in ihrem Bestand als gefährdet, bedroht oder kritisch bedroht eingestuft (IUCN, 2013).

Die zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit bestand in der Klärung des Verhaltens von *S. calchasi* im Zwischenwirt Taube von der Infektion bis zum Eintritt der chronischen Phase der klinischen Erkrankung. Hierbei sollte der Parasit im Verlauf einer experimentellen Infektion in verschie-

denen Organen lokalisiert werden. Bei der Beantwortung dieser Fragestellung war es von besonderem Interesse, ob ein Zusammenhang zwischen dem erstmaligen Auftreten der Enzephalitis und einem bestimmten Stadium im Lebenszyklus von *S. calchasi* zu beobachten ist. Hierdurch sollte ein Beitrag zur Aufklärung der Pathogenese der granulomatösen Enzephalitis während der chronischen Phase der durch *S. calchasi* hervorgerufenen PPE geleistet werden.

Weiterhin sollte die Infektiösität und Pathogenität von *S. calchasi* für Nymphensittiche (*Nymphicus hollandicus*) untersucht werden. Nymphensittiche sollten hierbei stellvertretend für andere, in ihren Beständen bedrohte Arten der Ordnung Psittaciformes betrachtet werden. Da Nymphensittiche zu den Altweltpapageien gehören, ist ihre Empfänglichkeit gegenüber von Sarkozysten verursachten Erkrankungen durch Infektionen mit *S. falcatula* bekannt (CLUBB und FRENKEL, 1992).

Schließlich sollte die Wirksamkeit des Antiprotozoikums Toltrazuril gegen Infektionen mit *S. calchasi* bei der Taube evaluiert werden. Da von der Chemotherapie anderer Sarkozysteninfektionen bekannt ist, dass der Erfolg teilweise abhängig ist von der Phase des Lebenszyklus, in der sich der Parasit zum Zeitpunkt der Behandlung befindet (DUBEY et al., 2001a), sollte neben der generellen Eignung Toltrazurils auch der Einfluss des Behandlungszeitpunkts untersucht werden.

## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Sarkozysten

#### 2.1.1 Geschichte

Die erste Beschreibung von Sarkozysten erfolgte im Jahr 1843 durch MIESCHER, der von milchig-weißen Schläuchen mit körnigem Inhalt in der Muskulatur einer Hausmaus berichtete. Diese als Miescher'sche Schläuche benannten Strukturen wurden u. a. auch in der Muskulatur von Schweinen gefunden und dort zunächst als *Synchytrium miescherianum* beschrieben (KÜHN, 1865). Die Benennung der Gattung *Sarcocystis* erfolgte schließlich durch LANKESTER im Jahr 1882. LABBÉ (1899) änderte den von KÜHN beschriebenen Namen in *Sarcocystis miescheriana*, welche somit als erstbeschriebene *Sarcocystis* sp. als Typusart der Gattung gilt.

Der zweiwirtige Lebenszyklus der Sarkozysten wurde erst 1972 aufgeklärt. Ehemals der Gattung *Isopora* zugeordnete Parasiten des Hundes, der Katze und des Menschen wurden als sexuelle Entwicklungsstadien von Sarkozystenarten des Rindes, des Schweins und des Schafes identifiziert (HEYDORN und ROMMEL, 1972b, ROMMEL und HEYDORN, 1972, ROMMEL et al., 1972). Eine Neubenennung der Spezies auf Grundlage der Zwischen- und Endwirte (z. B. *Sarcocystis bovihominis*) wurde vorgeschlagen (HEYDORN et al., 1975a), aber vom International Code of Zoological Nomenclature unter Beibehaltung der ursprünglichen Namen abgelehnt (MELVILLE, 1984).

## 2.1.2 Lebenszyklus

Sarkozysten weisen einen obligat zweiwirtigen Lebenszyklus auf. Dieser beinhaltet die Infektion von Zwischenwirten und Endwirten, die in der Regel in einer typischen Räuber-Beute-Beziehung stehen. Die Zwischenwirte gehören regelmäßig zum Beutespektrum der karnivoren oder omnivoren Endwirte. Im Zwischenwirt findet die asexuelle Vermehrung des Parasiten unter Ausbildung der namensgebenden Zysten in der Muskulatur statt (Griechisch: *sarkos* = Fleisch; *kystis* = Blase). Der Endwirt beherbergt die sexuellen Vermehrungsstadien von *Sarcocystis* spp. (MEHLHORN UND HEYDORN, 1978). Der Entwicklungszyklus ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt.

Hinsichtlich der Wirtsspezifität bestehen deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Sarkozystenspezies. Viele Arten sind nach aktuellem Kenntnisstand auf bestimmte Zwischen- und Endwirte beschränkt [z. B. *S. gigantea*: Zwischenwirt: Schaf, Endwirt: Katze (MUNDAY UND OBENDORF, 1984b); *S. cruzi*: Zwischenwirte: Bovidae, Endwirte: Canidae (DUBEY, 1976, XIANG et al., 2011)]. *Sarcocystis falcatula* hingegen ist ein Beispiel für eine Spezies mit einem spezifischen Endwirt, dem Opossum (*Didelphis* spp.) (ROSENTHAL, 2001), und einem breiten Zwischenwirtsspektrum, das mehrere Ordnungen beinhaltet [u. a. Passeriformes, Psittaciformes, Columbiformes, Strigiformes und Falconiformes (BOX UND SMITH, 1982, WÜNSCHMANN et al., 2009, WÜNSCHMANN et al., 2010)].

### 2.1.2.1 Entwicklung im Endwirt

Die Infektion des Endwirts erfolgt durch orale Aufnahme von zystenhaltigem Gewebe (ROMMEL et al., 1974). Die in der Zyste enthaltenen Zystozoen werden im Magen-Darm-Trakt freigesetzt und dringen in die Schleimhaut des Dünndarms ein. In dieser differenzieren sie sich zu Makro- und Mikrogamonten, die weiblichen, bzw. männlichen Vermehrungsstadien (ROMMEL et al., 1979). Der Zeitraum bis zum ersten Auftreten der Gamonten variiert speziesabhängig von wenigen Stunden [z. B. *S. cruzi* und *S. hirsuta* (DUBEY, 1982a, 1983a, JAIN UND SHAH, 1986)]

bis hin zu mehreren Tagen [z. B. *S. idahoensis* (BLEDSOE, 1980)]. Ebenso unterscheidet sich die Lokalisation der Gametogenese von darmlumennah [z. B. *S. gigantea* (MEHLHORN und SCHOLTYSECK, 1974)] bis hin zur Basalmembran des Darmepithels [z. B. *S. hirsuta* (HEYDORN und ROMMEL, 1972a)].

Im Makrogamont reift meist innerhalb von 24 Stunden nach Infektion ein einzelner Makrogamet heran (DUBEY, 1982a, HEYDORN und HARALAMBIDIS, 1982). Im Mikrogamonten entstehen durch Teilung des Nukleus mehrere begeißelte Mikrogameten, die nach vollständiger Ausreifung freigesetzt werden (HEYDORN, 1985, MEHLHORN und HEYDORN, 1979). Bei der Befruchtung verschmilzt das Plasmalemma von Mikro- und Makrogamet. Das Nukleoplasma des Mikrogameten tritt in das Zytoplasma des Makrogameten ein (ENTZEROTH, 1982, SHEFFIELD und FAYER, 1980). Unter Ausbildung einer Wand entsteht anschließend aus der Zygote die Oozyste (MEHLHORN und HEYDORN, 1979). Erste Oozysten werden meist um Tag 4 bis 5 p. i. nachgewiesen [z. B. *S. capracanis* (HEYDORN und HARALAMBIDIS, 1982), *S. hirsuta* (JAIN und SHAH, 1986)]. Diese Zeitspanne ist jedoch speziesabhängig variabel. So wurden z. B. bei *S. cruzi* bereits 20 Stunden p. i. (DUBEY, 1982a) Oozysten erstmals festgestellt, dagegen bei *S. idahoensis* erst 11 Tage p. i. (BLEDSOE, 1980).

Die Oozysten sporulieren vollständig in der Lamina propria des Darmepithels (MEHLHORN und SCHOLTYSECK, 1974). Zunächst bilden sich in der Oozyste zwei Sporoblasten aus, die schließlich zu Sporozysten ausreifen. Jede Sporozyste enthält vier Sporozoiten und einen Residualkörper (MUNDAY, 1975). Vollständig sporulierte Oozysten werden speziesabhängig nach 9 bis 12 Tagen p. i. beobachtet (DUBEY, 1982a, HEYDORN und MEHLHORN, 1987). Die Sporulation verläuft asynchron, d. h. im Darmepithel liegen sowohl sporulierte als auch unsporulierte Oozysten vor (FAYER, 1974). Bei der Freisetzung der sporulierten Oozysten in das Darmlumen rupturiert die fragile Oozystenwand häufig, sodass meist freie Sporozysten mit dem Kot ausgeschieden werden (MEHLHORN und

SCHOLTYSECK, 1974). Diese stellen das infektiöse Stadium für den Zwischenwirt dar (HEYDORN et al., 1975b). Die Präpatenz bis zur Ausscheidung erster infektiöser Sporozysten variiert bei den meisten Sarkozystenarten zwischen 7 und 14 Tagen nach Ingestion der Sarkozysten (DUBEY et al., 1988). Sporozysten werden in variablen Mengen ausgeschieden (FAYER, 1977, PORTER et al., 2001). Die Dauer der Patenz variiert erheblich in Abhängigkeit von der Sarkozystenspezies, beträgt aber meist 6 bis 8 Wochen oder länger (ROMMEL et al., 1979).

### **2.1.2.2 Entwicklung im Zwischenwirt**

Durch Aufnahme von mit sporozystenhaltigem Kot kontaminiertem Futter oder Wasser gelangen die Sporozysten in den Verdauungstrakt des Zwischenwirts (MEHLHORN und HEYDORN, 1978). Im Dünndarm exzystieren die motilen Sporozoiten aus der Sporozyste und dringen mittels bislang unbekannter Mechanismen durch das Darmepithel, von wo aus sie das Endothel kleiner arterieller Gefäße invadieren (DUBEY et al., 1980). Reste der exzystierten Sporozysten können bis zu drei Tage p. i. im Darmtrakt festgestellt werden (O'DONOGHUE und FORD, 1984) und intakte Sporozysten werden als Darmpassanten vom Zwischenwirt noch mehrere Tage p. i. ausgeschieden (MUNDAY, 1985).

Innerhalb der Zellen des Wirtsorganismus findet die asexuelle Vermehrung in Form von Schizogonien (syn. Merogonien) statt. Dabei dringen die freien Zoiten in eine Wirtszelle ein und vermehren sich mehrfach durch Endopolygenie (PACHECO und FAYER, 1977). Diese ist durch den simultanen Teilungsprozess eines stark vergrößerten Nukleus in mehrere Merozoiten gekennzeichnet (HEYDORN und MEHLHORN, 1978). Die Merozoiten werden schließlich mehr oder weniger synchron an der Wirtszelloberfläche unter Zerstörung derselben freigesetzt und infizieren neue Wirtszellen (DUBEY et al., 1980). Der Gewebetropismus und die Anzahl der Vermehrungszyklen unterscheiden sich deutlich in Abhängigkeit von der Sarkozystenspezies. Die meisten Sarkozysten, die große Haussäugetiere als Zwischenwirte nutzen, durchlaufen zwei Generationen

von Schizogonien, die in der Regel einen starken Tropismus zu Endothelzellen aufweisen. Hierbei wird die erste Generation häufig in Endothelzellen von mesenterialen, arteriellen Gefäßen und Arterien der Mesenteriallymphknoten festgestellt, während Schizonten der zweiten Generation in den kapillären Endothelzellen in allen Organen des Körpers beobachtet werden [z. B. *S. cruzi* (DUBEY et al., 1982), *S. hircicanis* (HEYDORN und UNTERHOLZNER, 1983)]. Bei *S. sui hominis* und *S. miescheriana* findet im Unterschied hierzu die Entwicklung der ersten Generation in erster Linie in venösen Endothelzellen in der Leber statt (HEYDORN, 1977, HEYDORN et al., 1980), während z. B. bei *S. hirsuta* die zweite Generation auf ein bestimmtes Gewebe (Muskulatur) beschränkt bleibt (DUBEY, 1983c). Bei einigen Arten (*S. hirsuta*, *S. tenella*) wurden Schizogonien innerhalb von Makrophagen festgestellt (DUBEY, 1982b, O'DONOGHUE und FORD, 1984). Sarkozystenarten, die in Kleinsäugetern beschrieben wurden [z. B. *S. rauschorum* in Halsbandlemmingen (*Dicostonyx richardsoni*)] zeigen nur eine einzige Schizontengeneration, die hauptsächlich in Hepatozyten lokalisiert ist (CAWTHORN et al., 1984, CAWTHORN und BROOKS, 1985b). Einige Sarkozystenarten (u. a. *S. neurona*, *S. gigantea* und *S. falcatula*) weisen Schizogonien in zentralnervösem Nervengewebe auf (DUBEY et al., 2001c, OBENDORF und MUNDAY, 1986, WÜNSCHMANN et al., 2010).

Während der Schizogoniephase tritt eine mehrere Tage andauernde Parasitämie mit Nachweis von Merozoiten im peripheren Blut auf (DUBEY, 1982c, FAYER, 1979, STANEK et al., 2002). Bei den meisten Sarkozystenarten ist die Dauer der Schizogonie zeitlich begrenzt. So dauert etwa bei *S. cruzi* die erste Generation von Tag 7 - 26 p. i. und die zweite von Tag 19 - 46 p. i., wobei deutlich wird, dass sich die beiden Generationen zeitlich überschneiden können (DUBEY, 1982a). *Sarcocystis falcatula* hingegen weist in Wellensittichen eine kontinuierliche Schizogoniephase bis 5,5 Monate p. i. auf, die parallel zur Entwicklung von Sarkozysten stattfindet (SMITH et al., 1987b).

Mit Abschluss der letzten Schizontengeneration wird die Ausbildung von Sarkozysten initiiert. Die frei gewordenen Merozoiten dringen in muskuläre oder neurale Zellen ein und bilden sich durch asexuelle Vermehrung zu Sarkozysten aus (CAWTHORN und SPEER, 1990). Die unreifen Sarkozysten beinhalten zunächst rundliche Metrozyten, die sich wiederholt durch Endodyogenie teilen. Bei der Endodyogenie entstehen zwei gleiche Tochterzellen innerhalb einer Mutterzelle (PACHECO et al., 1978). Zunächst entstehen weitere Metrozyten und anschließend, beginnend im Zentrum der Zyste, werden längliche Zystozoiten ausgebildet (HEYDORN et al., 1975b, HEYDORN und GESTRICH, 1976, MEHLHORN et al., 1975b). Reife Sarkozysten enthalten ausschließlich Zystozoiten und stellen das infektiöse Stadium für den Endwirt dar (DUBEY, 1982b, RUIZ und FRENKEL, 1976).

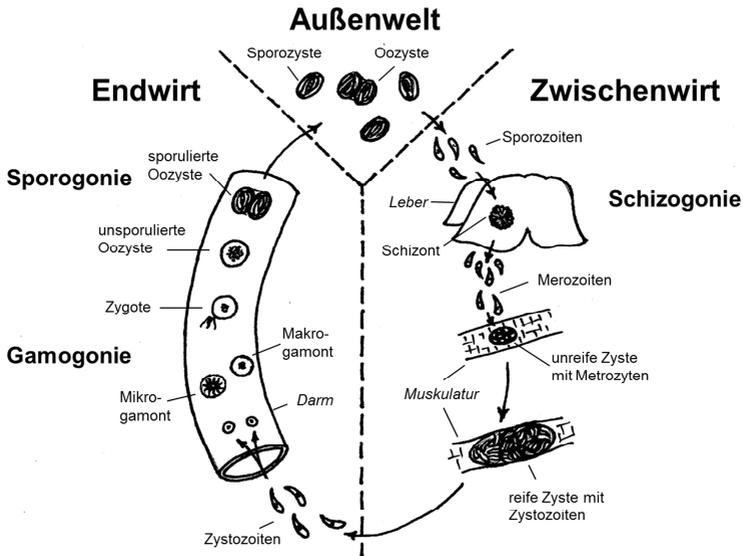
Die Ausreifung der Sarkozysten verläuft asynchron, d. h., es liegen für einen längeren Zeitraum sowohl unreife als auch vollständig ausgereifte Zysten im Zwischenwirt vor (MEHLHORN, 1975, MUNDAY und OBENDORF, 1984a). Der Zeitpunkt des Auftretens der unreifen Zysten und anschließend der ersten reifen Zysten ist abhängig von der Sarkozystenart. In der Hirschmaus (*Peromyscus maniculatus*) wurden erste unreife Zysten von *S. idahoensis* bereits ab Tag 11 p. i. und reife Zysten ab Tag 34 p. i. festgestellt (BLEDSOE, 1980), während beispielsweise im Schaf unreife Zysten von *S. tenella* erst ab Tag 50 p. i. und reife Zysten ab Tag 60 p. i. beobachtet wurden (ERBER, 1982).

Die Lokalisation der Sarkozysten ist ebenfalls abhängig von der Sarkozystenspezies. In den meisten Fällen stellt die quergestreifte Muskulatur des Herzens, der Zunge, des Ösophagus, des Zwerchfells und insbesondere der Skelettmuskulatur das Zielgewebe dar (DUBEY et al., 1988). Es wurden jedoch ebenfalls Sarkozysten in der glatten Muskulatur des Gastrointestinaltrakts [z. B. *S. mucosa* (O'DONOGHUE et al., 1987)], im neuronalen Gewebe des zentralen Nervensystems und in den Purkinjefasern des Herzens nachgewiesen (HECKEROTH und TENTER, 1998, MEHLHORN und HEYDORN, 1977).

Die Anzahl der Zysten wird durch die Anzahl der aufgenommenen Sporozysten (HEMENWAY et al., 2001), die Immunitätslage des Wirts (SCHNIEDER und ROMMEL, 1983) (siehe 2.4.2) und das Alter der Infektion beeinflusst. Eine beginnende Degeneration der Zysten wurde bei *S. idahoensis* ab Tag 520 p. i. (BLEDSOE, 1980) und bei *S. miescheriana* bereits zwischen Tag 35 - 90 p. i. mit einer starken Abnahme der Anzahl der Zysten im weiteren Verlauf festgestellt (BARROWS et al., 1982a, BARROWS et al., 1982b, SCHNIEDER et al., 1984). Bei anderen Sarkozysten-spezies wurden wiederum keine Degenerationserscheinungen an den Zysten bis circa 150 - 200 Tage p. i. beobachtet (MEHLHORN et al., 1975b, MEHLHORN und HEYDORN, 1977, STACKHOUSE et al., 1987). Der Lebenszyklus schließt sich, sobald ein Endwirt Gewebe des Zwischenwirts aufnimmt, das reife Zysten enthält.

Eine Besonderheit hinsichtlich des Lebenszyklus stellt *S. neurona* dar, da neben den eigentlichen Zwischenwirten auch Fehlwirte infiziert werden können, in denen es nicht zur Ausbildung infektiöser Sarkozysten kommt. Zunächst im Pferd als Auslöser der Equinen Protozoären Myeloenzephalitis (EPM) nachgewiesen (DUBEY et al., 1991), zeigt *S. neurona* in diesem Wirt lediglich Schizogonien im zentralnervösen Gewebe, ohne dass bislang infektiöse Zysten aufgefunden wurden (DUBEY et al., 2001c). Als Endwirte wurden das Nordamerikanische und Südamerikanische Opossum (*Didelphis virginiana* und *D. albiventris*) identifiziert (DUBEY und LINDSAY, 1998, DUBEY et al., 2001b). Als weitere Fehlwirte wurden u. a. der Mink (*Mustela vison*), das Steppenzebra (*Equus burchelli bohmi*) und Seehunde (*Phoca vitulina richardsi*) nachgewiesen (DUBEY und HAMIR, 2000, LAPOINTE et al., 1998, MARSH et al., 2000). Schließlich wurden auch Zwischenwirte mit vollständig ausgebildeten Sarkozysten [u. a. das Neunbinden-Gürteltier (*Dasypus novemcinctus*), der Seeotter (*Enhydra lutris nereis*) und der Waschbär (*Procyon lotor*)] nachgewiesen (DUBEY et al., 2001e, LINDSAY et al., 2000b, TANHAUSER et al., 2001).

Als Fehlwirt, aus dem der Parasit nicht von einem Endwirt aufgenommen werden kann, hat sich zudem der Mensch erwiesen. Die durch *S. nesbitti* hervorgerufene „Akute Muskuläre Sarkozystose“ trat episodisch mit hohen Infektionsraten in den Jahren 2011 - 2012 in Malaysia auf (ESPOSITO et al., 2014). Zu der klinischen Symptomatik zählten vor allem ein biphasisches Fieber und Myalgie (ITALIANO et al., 2014). Als Endwirte werden aufgrund des Nachweises von *S. nesbitti*-spezifischer DNA verschiedene, in Malaysia endemische Schlangenarten [Brillenschlange (*Naja naja*), Monokelkobra (*Naja kaouthia*), Netzpython (*Python reticulatus*), Berg-Grubenotter (*Ovophis monticola convictus*) und Gekielte Rattenschlange (*Ptyas carinata*)] vermutet (LAU et al., 2013, LAU et al., 2014).



**Abbildung 1:** Schema des Lebenszyklus von Sarkozysten (modifiziert nach ROMMEL et al., 1979)

### 2.1.3 Struktur der verschiedenen *Sarcocystis*-Stadien

Die **Zysten** von *Sarcocystis* spp. variieren stark in ihrer Größe und Form in Abhängigkeit von der jeweiligen Spezies. Viele Zysten sind lediglich mikroskopisch sichtbar, während einige (z. B. *S. muris*, *S. rileyi*, *S. gigantea*) bereits makroskopisch zu erkennen sind. Die mikroskopisch sichtbaren Zysten können langgestreckt und schmal oder kurz und breit sein (DUBEY et al., 1988). Bei den makroskopischen Zysten existieren fadenförmige [z. B. *S. muris* (RUIZ und FRENKEL, 1976)], reiskornartige [z. B. *S. rileyi* (KUTKIENĖ et al., 2010a)] und rundliche Formen [z. B. *S. gigantea* (MEHLHORN und SCHOLTYSECK, 1973)]. Die Zysten liegen intrazellulär innerhalb einer parasitophoren Vakuole. Die Membran der Vakuole bildet gemeinsam mit angelagertem amorphem Material die Primärhülle und stellt somit keine echte Zystenwand im engeren Sinne dar. Ihr Aufbau unterscheidet sich speziesspezifisch. Hierbei gibt es unterschiedlich geformte (z. B. palisadenartige oder blumenkohlförmige), verschieden hohe Ausstülpungen mit oder ohne filamentäre Elemente (MEHLHORN et al., 1975b). Die endgültige Struktur der Primärhülle bildet sich erst während der Reifung der Zyste aus (GESTRICH et al., 1975). Anhand der verschiedenen Formen der Primärhülle lassen sich die Sarkozysten in 24 Typen einteilen (DUBEY et al., 1988). Bei einigen Arten (z. B. *S. gigantea*) liegt außerdem eine Sekundärhülle vor, die aus von der Wirtszelle angelagertem Bindegewebe besteht (MEHLHORN und SCHOLTYSECK, 1973). Das Innere der Zyste wird bei den meisten Sarkozystenspezies durch Septen gekammert (MEHLHORN, 1975, MEHLHORN und HEYDORN, 1977). Innerhalb der Zyste befinden sich während der frühen Reifungsstadien die teilungsaktiven Metrozyten. Diese sind rundlich und in der HE-Färbung blass basophil. Die reifen Zystozoiten (syn. Bradyzoiten) sind länglich (bananenförmig) geformt und erscheinen kräftig basophil (DUBEY et al., 1988, MEHLHORN et al., 1975b). Bei einigen Spezies liegen sie dicht aneinander innerhalb der Zyste, während sie bei anderen Spezies im lockeren Verbund vorliegen (MEHLHORN et al., 1975a).

**Mikro-** und **Makrogamonten** sind ähnlich den Zysten intrazellulär innerhalb einer von der Wirtszelle gebildeten parasitophoren Vakuole lokalisiert (ENTZEROTH, 1982, MUNDAY, 1975). Junge Mikrogamonten sind unregelmäßig geformt mit intensiv eosinophilem Zytoplasma. Im Laufe der Reifung kondensiert der Nukleus, bevor er sich in der Peripherie des Gamonten mehrfach teilt. Die daraus entstehenden Kerne sind deutlich schwächer basophil und das Zytoplasma ist nur noch schwach eosinophil. Die reifen, zweifach begeißelten Mikrogameten werden schließlich aus der parasitophoren Vakuole freigesetzt (BLEDSOE, 1980, DUBEY, 1982a, HEYDORN und HARALAMBIDIS, 1982). Makrogamonten weisen eine rundliche bis ellipsoide Form auf. Während ihrer Reifung nehmen sie an Größe zu und sowohl Nukleus als auch Zytoplasma werden blasser. Der reife Makrogamet wird von mehrlagigen Membranen umgeben, von denen die äußerste an die Membran der parasitophoren Vakuole stößt (ENTZEROTH, 1982, SHEFFIELD und FAYER, 1980). Das Verhältnis von Makrogamonten zu Mikrogamonten beträgt bei *S. cruzi* etwa 95:1 (DUBEY, 1982a).

Junge **Oozysten** sind ovoid mit einem zentralen, irregulär geformten Nukleus. Während der Ausbildung der Wand entstehen zwei eosinophile Polkappen (BLEDSOE, 1980, JAIN und SHAH, 1986, MUNDAY, 1975). Mit Beginn der Sporulation verlängert sich der Nukleus zu einer bandartigen Struktur, bevor er sich in zwei separate Kerne an den gegenüberliegenden Polen des Sporonten aufteilt (COLWELL und MAHRT, 1983). Während sich das Zytoplasma des Sporonten unter Entstehung von zwei Sporoblasten teilt, erfolgt jeweils eine weitere Teilung der Kerne. Diese teilen sich anschließend nochmals durch je eine weitere Zweiteilung in vier Sporozoiten auf. Durch Ausbildung einer eosinophilen Wand um die Sporoblasten herum entsteht die Sporozyste (BLEDSOE, 1979, CAWTHORN und BROOKS, 1985a, FAYER, 1974). Jede Sporozyste enthält neben den vier Sporozoiten weiterhin einen Residualkörper (ROMMEL et al., 1972).

Unreife **Schizonten** sind durch einen rundlichen, undifferenzierten Zellaufbau mit einem einzelnen, großen, stark basophilen Nukleus

gekennzeichnet. Nukleus und Zytoplasma der Wirtszelle werden meistens verdrängt oder überdeckt durch den Nukleus des Parasiten (O'DONOGHUE und FORD, 1984). Der Schizont wird von einer doppelmembranösen Pellikula umgeben, besitzt aber keine parasitophore Vakuole. Mit zunehmender Reifung erscheint der Nukleus gelappt und mehrere Spindelapparate bilden sich um ihn herum aus, bis sich der Nukleus schließlich in viele Einzelkerne aufteilt (PACHECO und FAYER, 1977). Der Schizont nimmt dabei an Größe deutlich zu (O'DONOGHUE und FORD, 1984). Die Pellikula des Schizonten legt sich schließlich um die gereiften Merozoiten, die daraufhin frei im Zytoplasma der Wirtszelle vorliegen, bevor sie relativ synchron daraus freigesetzt werden (PACHECO und FAYER, 1977). Die Anzahl der gebildeten Merozoiten variiert in Abhängigkeit von der Sarkozystenspezies und der Schizontengeneration und beträgt zwischen durchschnittlich 24 [1. Schizontengeneration von *S. tenella* (O'DONOGHUE und FORD, 1984)] bis zu circa 350 Merozoiten [1. Schizontengeneration von *S. cruzi* (DUBEY et al., 1980)].

#### **2.1.4 Vorkommen und Bedeutung von Sarkozysten**

Die Verbreitung von Sarkozysten in Deutschland wurde Ende der 1970er Jahre mit 98,7 % bei Rindern, 85,4 % bei Schafen und 18,6 % bei Schweinen angegeben, wobei die humanpathogenen Arten *S. hominis* und *S. suis* bei 63,6 % der infizierten Rinder bzw. 60,7 % der infizierten Schweine vorkamen (BOCH und ERBER, 1981). Neuere Studien wiesen in Rindfleisch DNA von *Sarcocystis* spp. mit einer Prävalenz von 67,7 % nach (MORÉ et al., 2014) und zeigten eine serologische Prävalenz von 29 % in Zuchtsauen (DAMRIYASA et al., 2004). In Hunden und Katzen hingegen, die als Endwirte für die meisten Sarkozysten bei großen Hausäugetieren dienen, wurde lediglich eine Prävalenz von 2,2 % beziehungsweise 0,3 % festgestellt (BARUTZKI und SCHAPER, 2011). Außerhalb Deutschlands wurden Prävalenzen von nahezu 100 % in Rindern und Ziegen im Iran, Irak und in Argentinien festgestellt (BARHAM et al., 2005, MORÉ et al., 2011, NOUROLLAHI FARD et al., 2009, SHEKARFOROUSH et al., 2005).

Diesen hohen Prävalenzen steht eine geringe Anzahl an tatsächlich auftretenden Erkrankungen durch *Sarcocystis* spp. gegenüber (CALDOW et al., 2000, FENGER et al., 1997). Die Mehrzahl der Sarkozystenarten ist entweder apathogen oder pathogen mit mäßiger Virulenz für ihre **Zwischenwirte**. Zu den pathogenen Arten zählen u. a. *S. cruzi*, *S. tenella*, *S. capracanis*, *S. miescheriana*, *S. suihominis* und *S. neurona* (TENTER, 1995), wobei auch bei diesen bei geringen Infektionsdosen keine klinischen Erscheinungen auftreten (DUBEY et al., 1981, PHILLIPS und FORD, 1987). Bei *S. neurona* steht eine Seroprävalenz bei Pferden von 45 - 89 % (BENTZ et al., 2003, BLYTHE et al., 1997, SAVILLE et al., 1997) einem Vorkommen von klinisch auftretender EPM von ca. 1 % gegenüber (MACKAY et al., 2000).

Bei pathogenen *Sarcocystis* spp. treten klinische Symptome vor allem während der Schizogoniephase (akute Sarkozystose) auf, während die durch das Auftreten von Zysten gekennzeichnete chronische Phase in der Regel asymptomatisch verläuft. Typische Symptome der akuten Sarkozystose sind Fieberschübe, die mit den Schizogoniephasen korrelieren, Ödeme, Apathie, Inappetenz und Dyspnoe sowie bei hohen Infektionsdosen eine hohe Mortalität (ERBER und GEISEL, 1979, HEYDORN, 1977, 1985, ZIELASKO et al., 1981). Weiterhin können muköse bis hämorrhagische Durchfälle, Muskelschwäche und zentralnervöse Symptome auftreten (BARROWS et al., 1982b, HEYDORN und UNTERHOLZNER, 1983, VASHISHT et al., 2005). Sarkozysten gehören zu den Aborterregern (ERBER et al., 1978, FAYER et al., 1976, MUNDAY, 1981). Die pathologischen Befunde während der akuten Phase werden meist von multifokalen Hämorrhagien und Anämie dominiert. Es können aber auch Myokarditis, Myositis, Hepatitis und Enzephalitis beobachtet werden. Die entzündlichen Veränderungen sind durch Infiltration von mononukleären Zellen geprägt (DUBEY et al., 1981, DUBEY et al., 1982, ZIELASKO et al., 1981).

Weitaus bedeutender als die selten auftretenden klinischen Erkrankungen sind jedoch die wirtschaftlichen Folgen von subklinischen Sarkozysten-

infektionen, da diese mit reduzierten Gewichtszunahmen und verminderter Wollqualität bei Schweinen bzw. Schafen in Zusammenhang stehen (DAUGSCHIES et al., 1988, MUNDAY, 1979, 1984). Der Befund von Zysten in der Muskulatur bei der Schlachttieruntersuchung führt zur Untauglichkeit einzelner Organe oder des gesamten Tierkörpers [VO (EG) 854/2004 Anhang I Abschnitt II Kapitel V Nummer 1 Buchstabe h]. Der daraus resultierende wirtschaftliche Schaden liegt im Bereich mehrstelliger Millionen US-Dollar pro Jahr (DUBEY et al., 1988). Für EPM wurde der wirtschaftliche Schaden, entstehend durch die Behandlungskosten, auf jährlich ca. 55 - 110 Mio. US-Dollar geschätzt (DUBEY et al., 2001c).

**Endwirte** zeigen meist keine klinische Symptomatik nach Infektion mit Sarkozysten. Gelegentlich kann jedoch eine transiente bis fatale Diarrhoe wenige Tage nach Aufnahme von sarkozystenhaltigem Fleisch auftreten (HEYDORN und HARALAMBIDIS, 1982, KUTKIENĖ et al., 2006). Beim Menschen sind *S. hominis* (Zwischenwirt: Rind) und *S. suihominis* (Zwischenwirt: Schwein) Erreger von teilweise schweren Enteritiden (FAYER, 2004).

## 2.2 Aviäre Sarkozysten

### 2.2.1 Sarkozysten bei Vögeln

Vögel können sowohl Endwirte als auch Zwischenwirte von Sarkozysten sein (ČERNÁ, 1984). Derzeit sind 32 Spezies, die Vögel als Zwischenwirte parasitieren, anhand ihrer Zystenmorphologie beschrieben worden (Anhang I, Tabelle 15). Hierzu zählt auch die eingehend beschriebene Spezies *S. falcatula* (BOX et al., 1984). Die Prävalenzen liegen zwischen 12,6 % [diverse Spezies (MUNDAY et al., 1979)], 23,9 % [Corvidae (KUTKIENÉ et al., 2008)] und 25 % [diverse Spezies (LATIF et al., 2010)]. In Greifvögeln wurde sogar eine Prävalenz von 37,8 % festgestellt (LINDSAY und BLAGBURN, 1999). Als Endwirte wurden Vögel der Ordnungen Falconiformes (ČERNÁ und KVAŠŇOVSKÁ, 1986) und Strigiformes (MUNDAY, 1977) sowie der Familie Corvidae (GJERDE und DAHLGREN, 2010) beschrieben, bei denen es sich typischerweise um karnivore Spezies handelt.

### 2.2.2 Sarkozysten bei der Ordnung Columbiformes

Aufgrund ihrer granivoren Ernährungsweise wurden Tauben bislang ausschließlich als Zwischenwirte für *Sarcocystis* spp. beobachtet. Die Erstbeschreibung von *Sarcocystis* spp. bei Tauben erfolgte 1962 durch DYLKO in Weißrussland. In klinisch gesunden Carolinatauben (*Zenaida macroura*) wurden bei 6,8 - 13 % der Tiere Zysten von *Sarcocystis* spp. nachgewiesen (BARROWS und HAYES, 1977). Bei Weißflügeltauben (*Zenaida asiatica*) wiesen 10,4 % eine asymptotische Sarkozysteninfektion auf (CONTI und FORRESTER, 1981). Weiterhin konnte ein geringe Prävalenz (2,5 %) von *Sarcocystis* spp. in Palmtauben (*Streptopelia senegalensis*) festgestellt werden (KAISER und MARKUS, 1983). Drei Fälle mit akuter fataler Pneumonie aufgrund einer *S. falcatula*-ähnlichen Protozoenspezies wurden bei Fächertauben (*Goura victoria*) beschrieben (SUEDMEYER et al., 2001). Experimentell konnte die Empfänglichkeit von Haustauben für *S. falcatula* belegt werden, wobei die Tauben im Gegensatz zu ebenfalls experimentell infizierten Wellensittichen eine weniger

stark ausgeprägte klinische Erkrankung und eine zeitlich begrenzte Schizogoniephase aufwiesen. Schizonten wurden hierbei vor allem in der Lunge und in deutlich geringerem Maße in der Leber und der Milz festgestellt. Zysten traten im Myokard und in der Skelettmuskulatur auf. Pathologische Läsionen lagen am ausgeprägtesten in der Lunge in Form einer hämorrhagischen Pneumonie vor. Im Gehirn wurden weder Läsionen noch parasitäre Stadien nachgewiesen (BOX und SMITH, 1982, SMITH et al., 1990b). Eine natürliche Infektion mit *S. falcatula* wurde aufgrund pathologischer Läsionen und immunhistochemischen Nachweises intrapulmonaler Schizonten in einer Luzon-Dolchstichtaube (*Gallinocolumba luzonica*) vermutet (ECCO et al., 2008). Ringeltauben (*Columba palumbus*) wurden als Zwischenwirte für die bislang nur bei dieser Taubenart nachgewiesenen Spezies *Sarcocystis columbae* sp. nov. beschrieben. Über eine Symptomatik bei den infizierten Ringeltauben ist bislang nichts bekannt. Das Auftreten klinischer Symptome scheint jedoch eher unwahrscheinlich (OLIAS et al., 2010c).

### 2.2.3 Sarkozysten bei der Ordnung Psittaciformes

Das sporadische Auftreten einer muskulären Sarkozystose ohne begleitende Erkrankung wurde bei verschiedenen Arten der Ordnung Psittaciformes beschrieben, u. a. einem Gelbbrustara (*Ara ararauna*), einem Tavisittich (*Brotogeris jugularis*), einem Molukkenkakadu (*Cacatua moluccensis*) und zwei Edelpapageien (*Ecliptus roratus*) (BORST und ZWART, 1973, LATIF et al., 2010, LATIMER et al., 1990). Bei einem Nymphensittich mit Enzephalitis wurden Merozoiten einer nicht näher klassifizierten *Sarcocystis*-Spezies im Gehirn identifiziert (JACOBSON et al., 1984).

Die weitaus größte Bedeutung als Erreger schwerer klinischer Erkrankungen bei Papageienvögeln besitzt derzeit *S. falcatula*. Das Zwischenwirtsspektrum dieser bislang ausschließlich bei Vögeln beschriebenen Sarkozystenart erstreckt sich über die Ordnungen Passeriformes, Columbiformes, Psittaciformes, Strigiformes und Falconiformes (BOX und DUSZYNSKI, 1978, BOX et al., 1984, WÜNSCHMANN et al., 2009,

WÜNSCHMANN et al., 2010), wobei deutliche Unterschiede hinsichtlich der Pathogenität für die Zwischenwirte der verschiedenen Ordnungen bestehen (LUZJAR et al., 2001, SMITH et al., 1990b). Wellensittiche zeigten nach experimenteller Infektion eine schwere pulmonale Erkrankung, die bei Infektionsdosen von  $\geq 400$  Sporozysten/g Körpergewicht (KGW) innerhalb von 14 Tagen zum Tod der Tiere führte. Die Wellensittiche wiesen massenhaft Schizonten und freie Merozoiten in pulmonalen Kapillarendothelien und venösen Endothelzellen sowie akute Pneumonien auf (SMITH et al., 1987a, b). Schizogonien mit reaktiven Entzündungen wurden in geringerem Grad außerdem in Leber, quergestreifter Muskulatur, Niere, Milz und Gehirn nachgewiesen, wobei die Schizogonien in der Skelettmuskulatur bis Tag 168 p. i. persistierten. Zysten in der Pektoralismuskulatur, die erstmals an Tag 8 p. i. nachgewiesen wurden, degenerierten zwischen Tag 28 - 42 p. i., ohne vollständig auszureifen. In der Oberschenkel-, Ösophagus- und Zungenmuskulatur reiften die Zysten hingegen zwischen Tag 44 - 77 p. i. parallel zu kontinuierlichen Schizogonien heran (SMITH et al., 1989). Bei natürlichen Infektionen in diversen Psittaziden, bei denen *S. falcatula* bestätigt wurde oder zumindest aufgrund der Lokalisation, pathologischer Läsionen und immunhistochemischer Färbungen wahrscheinlich erscheint, wurden drei Krankheitsbilder beobachtet. Die Vögel zeigten entweder eine rein muskuläre Form, eine pulmonale Form oder eine Enzephalitis (BOLON et al., 1989, SIEGAL-WILLOTT et al., 2005, SMITH et al., 1990a, VILLAR et al., 2008). Klinisch äußerte sich die muskuläre Form in Schwäche und Lethargie. Häufig lagen Begleitinfektionen mit beispielsweise Mykobakterien bzw. Schimmelpilzen vor (BOLON et al., 1989, VILLAR et al., 2008). Die pulmonale Form war durch eine respiratorische Symptomatik sowie durch perakutes bis akutes Versterben gekennzeichnet (SMITH et al., 1990a, VILLAR et al., 2008). Die Enzephalitis wurde von neurologischen Symptomen (Ataxie, Torticollis, etc.) begleitet (SIEGAL-WILLOTT et al., 2005, VILLAR et al., 2008). Bei Ausbrüchen von *S. falcatula*-Infektionen in größeren Papageienbeständen wurde beobachtet, dass das Auftreten der

akuten Pneumonie und die Mortalität nahezu ausschließlich Altweltpapageien betraf (CLUBB und FRENKEL, 1992, ECCO et al., 2008, GODOY et al., 2009). Als Endwirte wurden bislang nur das Nordamerikanische und das Südamerikanische Opossum bestätigt (BOX et al., 1984, DUBEY et al., 2000). Da das Vorkommen dieser Arten auf den amerikanischen Kontinent beschränkt ist, besteht die Hypothese, dass bei Neuweltsittaziden evolutionsbedingt eine relative Resistenz gegenüber klinischen Erkrankungen durch *S. falcatula* ausgebildet wurde (CLUBB und FRENKEL, 1992).

## 2.3 *Sarcocystis calchasi*

### 2.3.1 Entdeckung

Mit *S. calchasi* wurde erstmals eine *Sarcocystis*-Spezies mit neurologischen Erkrankungen bei Tauben in Verbindung gebracht (OLIAS et al., 2009b). Zwischen 2006 und 2008 führte *S. calchasi* in mehreren Taubenbeständen in Deutschland wiederholt zu Todesfällen in allen Altersklassen. Insgesamt waren 47 von 244 Tauben aus mehreren Beständen betroffen. Klinisch waren Apathie, Polyurie und zentralnervöse Symptomatik (Opisthotonus, Torticollis, Muskelzittern und Paralysen) auffällig. Die Symptome waren identisch zum klinischen Bild der aviären Paramyxovirose [aviäres PMV-1, (ALEXANDER et al., 1984)] und der Salmonellose [meistens *Salmonella* Typhimurium var. Copenhagen, (FADDOUL und FELLOWS, 1965)], die somit die wichtigsten Differentialdiagnosen darstellen. Eine Infektion mit aviärem PMV-1 oder *Salmonella* spp. wurden in den beschriebenen Fällen jedoch ausgeschlossen. Histopathologisch wurden in den Tieren der betroffenen Bestände eine schwere, generalisierte, granulomatöse und nekrotisierende Meningoenzephalitis und Myositis mit Muskelzysten und Zenker'scher Degeneration nachgewiesen. Im Myokard wurden nur wenige Zysten mit keiner oder milder entzündlicher Reaktion gefunden (OLIAS et al., 2009b). Lichtmikroskopisch wurden in der Skelettmuskulatur Zysten von 1 - 2 mm Länge und 20 - 50 µm Breite identifiziert, die eine typische primäre Zystenwand ohne Fortsätze mit glatter, welliger Oberfläche und leichten Invaginationen aufwiesen. Das Innere der Zysten wurde durch dünne Septen unterteilt.

Bei der Sequenzierung der Internal Transcribed Spacer Region (ITS-1) und der 28S rRNA wurden keine mit einer anderen *Sarcocystis*-Spezies identischen Sequenzen nachgewiesen. Die größten Sequenzhomologien wiesen *Frankelia microti*, *Frankelia glareoli* und *S. neurona* auf, während *S. falcatula* nur 51 % ITS-1-Nukleotidsequenzhomologie besaß (OLIAS et al., 2009b). Eine weitere Sequenzierung der 18S rRNA und der D2-Region der 28S rRNA und zeigten nach Abgleich mit den veröffentlichten

Sequenzen in der GenBank eine nahe Verwandtschaft oder sogar eine Synonymität mit einem *Sarcocystis*-Isolat aus einem nordamerikanischen Cooper's Hawk (*Accipiter cooperi*). Größere Homologien wurden ferner für andere *Sarcocystis*-Nachweise bei Vögeln festgestellt, u. a. zu einer *Sarcocystis* sp. aus einer Blässgans (*Anser albifrons*), die nur einen Unterschied von vier Nukleotiden aufwies (OLIAS et al., 2010b). Aufgrund der molekularbiologischen Ergebnisse sowie der morphologischen Beschreibung erfolgte die Abgrenzung und Klassifizierung als eigene Spezies (OLIAS et al., 2009a).

### 2.3.2 Systematik

*Sarcocystis calchasi* wird wie folgt systematisch in den Stamm Apicomplexa eingeordnet (LEVINE, 1986):

**Phylum:** Apicomplexa (LEVINE, 1970)

**Classis:** Sporozoasida (LEUCKART, 1879)

**Subclassis:** Coccidiasina (LEUCKART, 1879)

**Ordo:** Eucoccidiorida (LÉGER und DUBOSQ, 1910)

**Subordo:** Eimeriorina (LÉGER, 1911)

**Familia:** Sarcocystidae (POCHE, 1913)

**Subfamilia:** Sarcocystinae (POCHE, 1913)

**Genus:** *Sarcocystis* (LANKESTER, 1882)

**Species:** *Sarcocystis calchasi* (OLIAS et al., 2009a)

### 2.3.3 Wirtsspektrum

Durch experimentelle Infektionen mehrerer in Frage kommender Endwirte wurde zunächst der europäische Habicht (*Accipiter gentilis*) als Endwirt identifiziert. Hunde (*Canis lupus familiaris*), Frettchen (*Mustela putorius furo*), Ratten (*Rattus norvegicus domesticus*), Mäuse (*Mus musculus domesticus*) und Ger-Saker-Hybridfalken (*Falco rusticolus* x *Falco cherrug*)

wurden als Endwirte ausgeschlossen (OLIAS et al., 2009a). Ab Tag 6 nach experimenteller Infektion mit zystenhaltigem Muskelfleisch von natürlich mit *S. calchasi*-infizierten Tauben schieden die Habichte ohne klinische Symptomatik Sporozysten aus. Die histologische Untersuchung der Gewebe eines infizierten Habichts ergab einen massiven Befall mit sporulierten und unsporulierten Oozysten in der Lamina propria des Dünndarms. Alle anderen untersuchten Organe wiesen keine parasitären Stadien auf (OLIAS et al., 2009a). Mittels Sequenzabgleich der D2-Region der 28S rRNA konnte bestätigt werden, dass es sich bei den festgestellten Oozysten um *S. calchasi* handelte (OLIAS et al., 2010b). Durch Nachweis von *S. calchasi*-Oozysten im Darm natürlich infizierter Tiere wurde inzwischen auch der Sperber (*Accipiter nisus*) als weiterer Endwirt identifiziert (OLIAS et al., 2011).

Als alternativer Zwischenwirt wurde das Huhn (*Gallus gallus f. domestica*) mittels experimenteller Infektion mit Sporozysten, die aus einem experimentell infizierten Habicht isoliert wurden, ausgeschlossen (OLIAS et al., 2010a). Die Ringeltaube konnte bislang als Zwischenwirt für *S. calchasi* weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Es wurde jedoch in der Muskulatur von Ringeltauben eine weitere Sarkozystenspezies, *S. columbae* sp. nov., nachgewiesen, die zwar nah verwandt ist, aber dennoch genetische und morphologische Unterschiede zu *S. calchasi* aufweist (OLIAS et al., 2010c).

### 2.3.4 Verbreitung

Die Erstbeschreibung von *S. calchasi* erfolgte anhand von Feldinfektionen in drei Brieftaubenbeständen in Berlin (OLIAS et al., 2009b). Eine darauffolgende Untersuchung von Habichten und Sperbern aus Norddeutschland ergab in den Endwirten von *S. calchasi* eine Prävalenz von 62 % (Habichte) bzw. 71,4 % (Sperber) (OLIAS et al., 2011).

Der erste Nachweis von *S. calchasi* außerhalb Deutschlands erfolgte in einer Stadttaube in Minnesota, USA, mit neurologischer Symptomatik und

schwerer, granulomatöser Meningoenzephalitis (WÜNSCHMANN et al., 2011). In einer späteren Untersuchung wurden in fünf (8,3 %) von 60 untersuchten Stadtauben aus Minnesota und in einer Brieftaube aus Missouri, USA, *S. calchasi* nachgewiesen, wobei die Prävalenz von *S. calchasi*-positiven Tauben, die zuvor neurologische Symptomatik gezeigt hatten, bei 35,7 % lag (OLIAS et al., 2014).

### 2.3.5 Diagnose

Im Endwirt kann die Diagnose einer patenten Sarkozysteninfektion anhand einer Kotuntersuchung mittels verschiedener Flotationsmethoden (z. B. Zucker-, NaCl/ZnCl<sub>2</sub>- oder ZnSO<sub>4</sub>-Lösungen mit einer spezifischen Dichte von 1,3 g/L) oder mittels der histologischen Untersuchung des Darmgewebes erfolgen (ROMMEL et al., 1995). Eine morphologische Unterscheidung zwischen verschiedenen Sarkozystenspezies ist hierbei nicht möglich (CAWTHORN und SPEER, 1990).

Im Zwischenwirt kann eine Sarkozysteninfektion am lebenden Tier bislang lediglich durch die Entnahme einer Muskelbiopsie festgestellt werden (ROMMEL et al., 1979). Der Nachweis ist jedoch nur dann erfolgreich, wenn sich bereits Zysten ausgebildet haben. Bei geringem Befall können falsch-negative Ergebnisse die Folge sein (DUBEY et al., 1988). Am toten Tier können weitere Organe, wie z. B. Leber und Milz untersucht werden, sodass bei der Infektion mit *S. calchasi* auch die während der akuten Phase auftretenden Schizonten nachgewiesen werden können (OLIAS et al., 2010a). Die Untersuchung der Organe auf *S. calchasi* erfolgt mittels Histologie sowie immunhistochemisch mittels eines polyklonalen Anti-*S. calchasi*-Antikörpers (OLIAS et al., 2013). Aufgrund morphologischer Ähnlichkeit zu anderen Sarkozystenspezies (OLIAS et al., 2010c) sowie hoher Kreuzreaktivität polyklonaler Antiseren mit Antigenen heterologer Sarkozystenspezies (JEFFREY et al., 1988, TENTER, 1995, WÜNSCHMANN et al., 2010) kann durch mikroskopische Untersuchungen jedoch lediglich eine gattungsspezifische Diagnose erfolgen.

Zur speziesspezifischen Diagnose von Stadien von *S. calchasi* sowohl im Endwirt als auch im Zwischenwirt steht eine *S. calchasi*-spezifische semi-nested PCR zur Verfügung. Die Primerpaare SCA1/SCa2 (1. PCR) und SCA1/SNCa3 (2. PCR) binden an spezifische Sequenzen der ITS-1-Region. Das PCR-Produkt nach der zweiten PCR weist eine Größe von 136 Basenpaaren (bp) auf (OLIAS et al., 2011).

### **2.3.6 Klinisches Bild und pathologische Veränderungen bei Tauben**

Die experimentelle Infektion von Haustauben mit unterschiedlichen Dosen von Sporozysten aus der Dünndarmmukosa eines experimentell mit *S. calchasi* infizierten Habichts konnte die in der Feldinfektion beobachtete Symptomatik reproduzieren (OLIAS et al., 2010b). Hierbei wurde ebenfalls gezeigt, dass abhängig von der Infektionsdosis unterschiedliche klinische Verläufe zu beobachten sind. Tauben, die mit  $10^2$  Sporozysten infiziert wurden, blieben zunächst symptomlos, bis 58 - 65 Tage p. i. neurologische Symptome auftraten. Dagegen zeigten Tauben, die mit  $10^3$  bis  $10^4$  Sporozysten infiziert wurden, einen biphasischen Krankheitsverlauf. In der akuten Krankheitsphase zeigten die Tiere 10 - 11 Tage p. i. eine wenige Tage andauernde Apathie und Polyurie. Sie erholten sich anschließend jedoch wieder. Zwischen Tag 51 - 57 p. i. folgte eine zweite, chronische Krankheitsphase mit neurologischen Symptomen. Tauben, die mit höheren Dosen infiziert wurden, starben innerhalb von 7 - 12 Tagen p. i., nachdem sie Apathie und Polyurie, allerdings keine zentralnervösen Symptome gezeigt hatten (OLIAS et al., 2010a). Das Krankheitsbild wurde später auch unter dem Namen Pigeon Protozoal Encephalitis (PPE) beschrieben (OLIAS et al., 2013).

Makroskopisch fanden sich nur bei Tauben, die akut innerhalb weniger Tage verstarben, Veränderungen in Form einer vergrößerten, verfärbten Leber mit multifokalen Nekrosen. Histologisch wurden multifokale Nekrosen, mononukleäre Entzündungszellinfiltrationen und Schizonten in Leber und Milz festgestellt. Weiterhin wurden Nekrosen und Schizonten in

geringerer Anzahl in Lungen, Knochenmark und in oder neben Endothelzellen von Blutgefäßen des Bindegewebes diverser Organe nachgewiesen. Tauben mit zentralnervösen Symptomen wiesen eine multifokale, granulomatöse Enzephalitis sowie massenhaft *Sarcocystis*-Muskelstadien und eine Myositis in der gesamten untersuchten Skelettmuskulatur auf, während im Myokard nur wenige Zysten mit einer milden Myokarditis auftraten. Die Zysten wurden mittels Sequenzabgleich der D2-Region der 28S rRNA als *S. calchasi* identifiziert (OLIAS et al., 2010a). Zunächst wurden keine Parasitenstadien im Gehirn der von Enzephalitiden betroffenen Tauben nachgewiesen (OLIAS et al., 2010b). Auch in natürlich infizierten Tieren wurden lediglich bei einem einzigen Tier wenige Schizonten im Gehirn festgestellt (OLIAS et al., 2009b). In späteren Untersuchungen konnten in jeweils etwa der Hälfte der Tauben, die während der akuten und chronischen Phase untersucht worden waren, wenige Stadien von *S. calchasi* im Gehirn mittels Immunhistochemie bestätigt werden. In der akuten Phase handelte es sich hierbei um Schizonten, in der chronischen Phase um Zysten, die jedoch keine Assoziation zu den entzündlichen Veränderungen im Gehirn aufwiesen (OLIAS et al., 2013). Dem gegenüber stehen die Befunde an drei von sechs natürlich infizierten Stadttauben in den USA, in denen intraläsionale Schizonten von *S. calchasi* nachgewiesen wurden (OLIAS et al., 2014), sodass die Pathogenese der Enzephalitis bei Infektionen mit *S. calchasi* zunächst unklar bleibt.

## 2.4 Bisherige Erkenntnisse zur Pathogenese von Enzephalitiden durch Sarkozysten

### 2.4.1 Enzephalitiden durch Sarkozysten

Enzephalitiden gehören zu den häufig auftretenden pathologischen Veränderungen bei Infektionen mit Sarkozysten. Zu den Tierarten, bei denen Entzündungen im zentralen Nervensystem (Enzephalitis oder Enzephalomyelitis) zeitgleich zu einer Sarkozysteninfektion beschrieben wurden, gehören Rinder (DUBEY et al., 1982), Pferde (DUBEY et al., 1991), Schafe (HENDERSON et al., 1997, MORGAN et al., 1984, MUNDAY und OBENDORF, 1984a), Ziegen (DUBEY et al., 1981), Hunde (COOLEY et al., 2007) und Katzen (DUBEY et al., 1994). Auch bei Wildtieren wurden diese Veränderungen beschrieben, beispielsweise beim Rothirsch (*Cervus elaphus*) (FOREYT et al., 1995), Luchs (*Felis lynx canadensis*) (FOREST et al., 2000), Seehund (*Phoca vitulina richardsi*) (LAPOINTE et al., 1998), Seeotter (*Enhydra lutris* ssp.) (MILLER et al., 2010, THOMAS et al., 2007), Waschbär (*Procyon lotos*) (DUBEY et al., 2001e), Marderhund (*Nyctereutes procyonoides viverrinus*) (KUBO et al., 2010) oder beim Amerikanischen Nerz (*Mustela vison*) (DUBEY und HEDSTROM, 1993). Zu den aviären Zwischenwirten, bei denen über Enzephalitiden im Rahmen von Sarkozysteninfektionen berichtet wurden, zählen Haushuhn (*Gallus gallus* f. *domestica*) (MUTALIB et al., 1995), Truthuhn (*Meleagris gallopavo*) (TEGLAS et al., 1998), Auerhuhn (*Tetrao urogallus*) (GUSTAFSSON et al., 1997), Habicht (*Accipiter gentilis atricapillus*) (AGUILAR et al., 1991), Weißkopfseeadler, (*Haliaeetus leucocephalus*) (OLSON et al., 2007), Steinadler (*Aquila chrysaetos*) (WÜNSCHMANN et al., 2010), Virginia-Uhu (*Bubo virginianus*) (WÜNSCHMANN et al., 2009), Basstölpel (*Morus bassanus*) (SPALDING et al., 2002), Stachelibis (*Threskiornis spinicollis*) (DUBEY et al., 2001f) und diverse Papageienarten (JACOBSON et al., 1984, SIEGAL-WILLOTT et al., 2005, SMITH et al., 1989, VILLAR et al., 2008).

Bei den beschriebenen Fällen waren die Läsionen im ZNS in den meisten Fällen mit Merozoiten von *Sarcocystis* spp. assoziiert, die entweder direkt

im neuralen Gewebe oder in Gefäßendothelien des vaskulären Systems des ZNS lokalisiert waren. Einzelne Berichte beschreiben jedoch auch zentralnervöse Entzündungsgeschehen ohne den gleichzeitigen Nachweis protozoärer Organismen im ZNS (FOREYT et al., 1995, MUNDAY und OBENDORF, 1984a, OBENDORF und MUNDAY, 1986). Ebenso wurden *Sarcocystis*-Zysten im Gehirn nachgewiesen, die entweder nicht mit den entzündlichen Läsionen der vorliegenden Enzephalitis assoziiert waren (HENDERSON et al., 1997, SIEGAL-WILLOTT et al., 2005) oder überhaupt nicht mit einer Enzephalitis in Zusammenhang standen (JAKOB et al., 1998).

Als mögliche Ursachen für die Entstehung der zentralnervösen Läsionen wurden eine immunologische Reaktion auf parasitäres Antigen, nekrotisches Endothel oder extravasales Blut sowie eine lokale, verzögerte Hypersensitivitätsreaktion, die die Infiltration des Gewebes mit mononukleären Zellen beinhaltet, diskutiert (DUBEY et al., 1988, SMITH et al., 1989). Weiterhin wurde die Freisetzung toxischer Stoffwechselprodukte bei der Degeneration der Zysten oder während der Parasitämie als mögliche Ursache für die Entstehung neurologischer Symptome vorgeschlagen (DUBEY et al., 1988, FAYER, 1979).

#### **2.4.2 Immunantwort auf Infektionen mit Sarkozysten**

Das Immunsystem reagiert auf eine Infektion mit Sarkozysten mit einer spezifischen Antwort. Wenige Tage nach Infektion kann mittels verschiedener serologischer Tests (z. B. Enzyme-linked Immunosorbent Assay, Immunfluoreszenztest oder Hämagglutinationshemmtest) ein Anstieg *Sarcocystis*-spezifischer Antikörper nachgewiesen werden (LUNDE und FAYER, 1977, TENTER, 1988). Bei Vergleich der verschiedenen Antikörperklassen wurde beobachtet, dass zunächst ein transientser Anstieg der IgM-Fraktion auftritt, gefolgt von einer länger andauernden IgG-Antwort (FAYER und LUNDE, 1977, GASBARRE et al., 1984, O'DONOGHUE und WEYRETER, 1984, WEYRETER et al., 1984). JÄKEL et al. (2001) konnte bei experimentellen Infektionen von Wanderratten mit *S. singaporensis* zeigen, dass

während der akuten Phase der Infektion vor allem spezifische IgG2b- und IgG2c-Antikörper ansteigen, was einem Th1-Profil entspricht, während in der chronischen Phase außerdem IgG1-, IgG2a- und IgA-Antikörpertiter ansteigen, was auf ein gemischtes Th1-/Th2-Profil hindeutet. Neben der humoralen Immunantwort kommt es ebenfalls zur Ausbildung einer zellulären Immunreaktion bei Sarkozysteninfektionen, die durch eine gesteigerte Blastogenese der Lymphozyten nach Stimulation mit Sarkozysten-Antigen bzw. einen erhöhten Anteil von T-Lymphozyten in den Sarkozysten-assoziierten Läsionen charakterisiert ist. (GASBARRE et al., 1984, HOFER et al., 1982, O'DONOGHUE und WILKINSON, 1988, SCOTT et al., 2005).

Hinsichtlich der Belastbarkeit der entwickelten Immunität konnte gezeigt werden, dass eine vorherige Immunisierung mit geringen Dosen infektiöser Sporozysten zu einer Reduzierung der klinischen Symptomatik und der Anzahl der Zysten nach Belastungsinfektion mit einer letalen Sporozystendosis führt (FAYER und DUBEY, 1984, HOFER et al., 1982, O'DONOGHUE und WILKINSON, 1988). Der Schutz vor klinischer Symptomatik sowie die Mortalität sind hierbei abhängig von der Höhe der ersten, immunisierenden Sporozystendosis, wobei höhere Dosen eine deutlich stärker belastbare Immunität hervorrufen (DUBEY, 1981, FORD, 1985, ZIELASKO et al., 1981). Die Dauer der Immunität ist nach einmaliger Immunisierung zeitlich begrenzt (WEBER et al., 1983). Die kontinuierliche Verabreichung kleiner Dosen konnte gegenüber einer einmaligen Immunisierung eine deutlich gesteigerte und erheblich länger andauernde Immunität hervorrufen (SCHNIEDER und ROMMEL, 1983). Eine Immunisierung mit Zysten oder Zystenextrakten führte trotz Antikörperbildung zu keiner protektiven Immunität, weshalb die hierfür notwendigen Antigene vermutlich von Schizonten während der frühen Phase der Infektion ausgebildet werden (GUT, 1982, O'DONOGHUE et al., 1985). Bei trächtigen Tieren wurde eine deutliche Beeinträchtigung der Immunität nach vorheriger Immunisierung beobachtet, da eine Immunisierung sie bei Belastungsinfektionen im Vergleich zu nichtträchtigen Tieren nur vor

deutlich geringeren Sporozystendosen schützte (DUBEY, 1983b). Bei ihren Nachkommen wurde keine Immunität festgestellt (DUBEY, 1983b, 1984, MUNDAY, 1982).

Der Verlauf des Antikörpertiteranstiegs ist unabhängig von ein- oder mehrmaliger homologer Reinfektion (HOFER et al., 1982, REITER et al., 1981, ZIMMERMANN et al., 1984). Das Vorhandensein von Antikörpern schützt nicht vollständig vor klinischer Symptomatik (WEYRETER et al., 1984). Weiterhin konnte für *S. neurona* gezeigt werden, dass die humorale Immunantwort nicht entscheidend für die Ausbildung der belastbaren Immunität ist (WITONSKY et al., 2005a). Hinsichtlich der zellulären Immunität wurde belegt, dass sowohl CD4<sup>+</sup>- als auch CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten an der Immunreaktion beteiligt sind, wobei jedoch letztere die entscheidende Rolle hinsichtlich einer protektiven Immunität spielen (WITONSKY et al., 2003a, WITONSKY et al., 2005b). Eine wesentliche Beteiligung wurde weiterhin für Interferon (IFN)- $\gamma$  festgestellt, dessen Konzentration im Rahmen einer Th1-Immunantwort ansteigt (ABDEL-BAKI et al., 2009, WITONSKY et al., 2003b).

Die Immunreaktion des Wirtes kann durch Sarkozysten jedoch nicht nur hervorgerufen, sondern auch moduliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass während der Schizogoniephase eine Immunsuppression hervorgerufen wird (FRELIER, 1980). Diese bezieht sich vor allem auf parasitäre Antigene (SPENCER et al., 2004). Es konnte jedoch auch eine erhöhte Empfänglichkeit gegenüber anderen Infektionen (z. B. Kokzidien) beobachtet werden (DUBEY, 1983d). Hierbei wurde vor allem eine Abnahme der IFN- $\gamma$ -Produktion festgestellt (SPENCER et al., 2004, WITONSKY et al., 2008).

Bei experimenteller Infektion von Tauben wurde belegt, dass *S. calchasi* ebenfalls in der Lage ist, die Immunantwort des Wirts zu beeinflussen. Während der akuten Phase der Erkrankung (Schizogoniephase) wurde eine verminderte Th1-Immunantwort mit signifikant niedrigeren Konzentrationen der Th1-assoziierten Zytokine IFN- $\gamma$ , Interleukin (IL)-12 und IL-18

nachgewiesen. Während der chronischen Phase (Zystenstadium) wurde hingegen eine extensive Th1-gewichtete, T-Zell-vermittelte Immunantwort festgestellt, die als verzögerte Hypersensitivitätsreaktion gedeutet wurde (OLIAS et al., 2013). Diese Art der allergischen Reaktion wurde bereits von SILLER (1960, 1965) bei Hühnern beschrieben. Hierbei kam es drei bis vier Monate nach intramuskulärer Inokulation von heterologem Organmaterial und hitzeinaktivierten Mykobakterien zu einer Enzephalomyelitis mit lymphozytären, perivaskulären Infiltrationen und Gliosis.

Belege für die Verursachung der neurologischen Läsionen durch eine überschießende Immunreaktion konnte die Infektion von immundefizienten Pferden mit *S. neurona* erbringen. Die Pferde mit schwerer kombinierter Immundefizienz (SCID) zeigten eine persistente Parasitämie, jedoch konnten weder eine Neuroinvasion von *S. neurona* noch Läsionen im ZNS nachgewiesen werden (SELLON et al., 2004).

Autoimmune Pathomechanismen bei der Entstehung von Enzephalitiden sind in der Humanmedizin hinreichend bekannt. Die Akute Disseminierte Enzephalomyelitis (ADEM) ist eine immunvermittelte, entzündliche und demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems, die in der Regel im Anschluss an eine Infektion auftritt (ALPER, 2012). Vorangehende Infektionen sind viraler oder bakterieller Genese oder eine ADEM tritt im Anschluss an eine Impfung auf (DALE, 2003). Es wurde jedoch auch eine ADEM in Folge einer *Plasmodium vivax*-Malaria, d. h. mit parasitärem Auslöser, beobachtet (KOIBUCHI et al., 2003). Kennzeichnend für die ADEM ist die Abwesenheit von Erregerstrukturen im entzündlich veränderten ZNS (DALE, 2003). Als Ursache für diese Form der Autoimmunreaktion wird eine molekulare Mimikry vermutet, bei der strukturelle Ähnlichkeiten zwischen dem Erreger und dem neuronalen Gewebe des Wirts zu einer T-Zell-Aktivierung führen, die jedoch nicht ausreichend ist, um eine Toleranz hervorzurufen (ALPER, 2012). Im Tiermodell (u. a. Mäuse, Ratten und Meerschweinchen) konnte die Erkrankung durch Immunisierung mit Hirngewebe-spezifischen Antigenen nachgestellt werden. Die

sich daraufhin entwickelnde experimentelle allergische Enzephalomyelitis (EAE) dient aufgrund der ähnlichen Pathogenese nicht nur als Modell für die ADEM, sondern vor allem auch für die Multiple Sklerose (BATOULIS et al., 2011, SHIN et al., 2012).

### 2.4.3 Toxische Eigenschaften der Gattung *Sarcocystis*

Die toxischen Eigenschaften von Sarkozysten wurden bereits 1890 von PFEIFFER festgestellt, als er den Zysteninhalt von *S. gigantea* in die Trachea und die Muskulatur von Kaninchen injizierte, die daraufhin innerhalb von 12 - 24 Stunden verstarben. Er vermutete als Ursache hierfür ein toxisches Stoffwechselprodukt des Parasiten. Eine Fraktionierung der Zysten in Zystenwand, Zystozoen und Zystenflüssigkeit ergab, dass alle drei Fraktionen eine neurotoxische Wirkung bei Kaninchen besaßen (HIEPE et al., 1981). Die toxische Wirkung von dem nicht näher charakterisierten „Sarkotoxin“ wurde auch für Zystenextrakte aus *S. cruzi* (SAITO et al., 1995), *S. fusiformis* (SALEQUE et al., 1991), *S. tenella* und *S. kortei* (MANDOUR, 1969) nachgewiesen, wobei sich zeigte, dass das Extrakt von *S. cruzi* nur für Kaninchen, nicht aber für Mäuse, Meerschweinchen und Hühner toxisch ist (SAITO et al., 1995). Das *S. fusiformis*-Extrakt führte sowohl bei Kaninchen als auch bei Mäusen zum Tod (SALEQUE et al., 1991), während das Extrakt aus *S. pitymysi*-Zysten sich wiederum als nicht toxisch für Kaninchen erwies (MANDOUR, 1969). Als Wirkungsweise hinsichtlich der Pathogenese von pathologischen Veränderungen bei Sarkozysteninfektionen wurde die Freisetzung des Sarkotoxins bei Ruptur von Zysten vorgeschlagen, das daraufhin eine Endotoxin-ähnliche Wirkung entfaltet (MANDOUR, 1969). Auf immunologischer Basis konnte in Kaninchen nach Injektion eines *S. cruzi*-Zystenextrakts eine Überproduktion von Tumornekrosefaktor  $\alpha$  und eine Abnahme von Stickstoffmonoxid festgestellt werden, die mit der toxischen Wirkung in Zusammenhang stehen sollen (NAKAMURA et al., 1999).

In den Zysten von *S. gigantea* wurde weiterhin eine Lektinfraktion identifiziert, die mitogene Eigenschaften in Bezug auf Lymphozyten-

kulturen aufwies (MONTAG et al., 1986, TIETZ et al., 1986). Hierbei wurde sowohl eine Aktivierung von B-Zellen als auch von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten festgestellt (TIETZ et al., 1990, TIETZ et al., 1991). Die Lektinfraktion wurde von der das Sarkotoxin enthaltenden Fraktion unterschieden, da sich erstere als nicht toxisch für Kaninchen erwies (TIETZ et al., 1989). Eine genaue Beteiligung des Lektins an der Pathogenese der Sarkozysteninfektion konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

## 2.5 Therapie der Sarkozysteninfektionen

Eine Vielzahl an Wirkstoffen mit antiprotozoären Eigenschaften ist in der Vergangenheit hinsichtlich ihrer Wirksamkeit gegen Sarkozysten evaluiert worden (siehe Tabelle 1). Teilweise wurden eine Wirksamkeit lediglich bei der prophylaktischen, nicht aber bei der therapeutischen Verabreichung gesehen und es konnten Unterschiede beim Zeitpunkt des Therapiebeginns festgestellt werden (DUBEY et al., 2001a). Es wurde jedoch entweder die klinische Symptomatik, die Reduktion bzw. Elimination parasitärer Stadien oder die Höhe der spezifischen Antikörpertiter als Parameter zur Beurteilung der Wirksamkeit gewählt, sodass die Vergleichbarkeit der Studien insgesamt stark eingeschränkt ist.

Das Triazinderivat Toltrazuril wird in der Veterinärmedizin gegen ein breites Spektrum von Kokzidien sowohl beim Geflügel als auch bei Säugetieren eingesetzt [*Eimeria* sp. (RAMADAN et al., 1997), *Isospora* sp. (SKAMPARDONIS et al., 2010), *Sarcocystis* sp. (HABERKORN, 1996), *Neospora caninum* (HAERDI et al., 2006) und *Toxoplasma* sp. (KUL et al., 2013)]. Der wichtigste Metabolit Toltrazurilsulfon (Ponazuril) (FURR und KENNEDY, 2000) wird derzeit standardmäßig zur Therapie von *S. neurona*-Infektionen beim Pferd eingesetzt (DIRIKOLU et al., 2009, MACKAY et al., 2008). Hinsichtlich der Wirkungsweise von Toltrazuril konnte bei Eimerien gezeigt werden, dass bereits eine einmalige Applikation ausreicht, um eine Anschwellung des perinukleären Raumes, der Mitochondrien und des endoplasmatischen Retikulums der Parasiten zu bewirken. Diese Effekte treten bei sämtlichen intrazellulären Entwicklungsstadien auf. In Schizonten und Mikrogameten führt dies zu einer Störung der Zellkernteilungen und bei den Makrogameten unterbleibt die Ausbildung der Oozystenwand (MEHLHORN et al., 1984). Dies wird vermutlich durch eine Hemmung der DNA-Synthese erreicht, die wiederum auf einer Inhibition bestimmter Enzyme der parasitären mitochondrialen Atmungskette (Succinat-Cytochrom-C-Reduktase, NADH Oxidase und Succinatoxidase) sowie der Pyrimidinsynthese (Dihydrofolatreduktase und Dihydroorotat-Cytochrom-

C-Reduktase) beruht (HARDER und HABERKORN, 1989). Weiterhin wurde als Target von Toltrazuril ein Chlorophyll a-D1-Komplex vorgeschlagen, der Teil eines rudimentären Fotosystems der Apikomplexa ist (HACKSTEIN et al., 1995).

Die Wirksamkeit von Ponazuril in vitro (Inhibition der Merozoitenproduktion von > 95 %) konnte ab einer Konzentration von 5,0 µg/ml belegt werden (LINDSAY et al., 2000a). Im klinischen Versuch an Pferden wurden nach zehntägiger Verabreichung von Toltrazuril in den Dosierungen 2,5 mg/kg KGW, 5,0 mg/kg KGW und 7,5 mg/kg KGW im Serum Toltrazuril-Konzentrationen von 13,4 µg/ml, 19,7 µg/ml bzw. 26,5 µg/ml nachgewiesen (FURR und KENNEDY, 2000). In Rindern wurde nach einmaliger Verabreichung von Ponazuril eine Serumkonzentration von 4,8 µg/ml festgestellt (DIRIKOLU et al., 2009). Ein Einfluss auf die Antikörpertiterentwicklung in *S. neurona*-seropositiven, klinisch gesunden Pferden konnte nach 60-tägiger Therapie mit Ponazuril nicht beobachtet werden (PUSTERLA et al., 2013). Studien zum Einsatz von Ponazuril an experimentell mit *S. neurona* infizierten Mäusen und Pferden sowie natürlich infizierten Pferden mit EPM konnten zumindest eine partielle Wirksamkeit hinsichtlich der Entwicklung bzw. Besserung klinischer Symptome und der Reduzierung der Antikörperbildung belegen (FRANKLIN et al., 2003, FURR et al., 2001, FURR et al., 2006, MACKAY et al., 2008). Bei experimentell mit *Neospora caninum* infizierten Mäusen konnte eine Behandlung mit Toltrazuril und Ponazuril die Entstehung zerebraler Läsionen vollständig verhindern (GOTTSTEIN et al., 2001). Fallberichte zum erfolgreichen Einsatz von Ponazuril hinsichtlich einer gänzlichen Genesung liegen zur Behandlung von klinischen Sarkozysten bei einer Katze (BISBY et al., 2010), einem Seelöwen (CARLSON-BREMER et al., 2012) und einem Seehund (MYLNICZENKO et al., 2008) vor. Zur Behandlung von Pferden mit EPM wird das in den USA für diese Indikation zugelassene Ponazuril-Präparat Marquis® (Bayer HealthCare LLC, Shawnee Mission, KS, USA) einmal täglich in der Dosierung 5 mg/kg KGW über einen Zeitraum von 28 Tagen angewendet (Produktinformation).

**Tabelle 1: Wirksamkeit verschiedener Wirkstoffe, die gegen Sarkozysteninfektionen eingesetzt wurden**

| Wirkstoff                      | Sarkozysten-spezies  | Wirksamkeit    | Literatur   |
|--------------------------------|----------------------|----------------|---|
| Amprolium                      | <i>S. cruzi</i>      | P: +           | FAYER und JOHNSON, 1975   |
|                                | <i>S. muris</i>      | T: –           | ROMMEL et al., 1981   |
| Aprinocid                      | <i>S. muris</i>      | T: –           | ROMMEL et al., 1981   |
| Bay g 7183<br>(Triazinderivat) | <i>S. muris</i>      | T: +           | ROMMEL et al., 1981   |
|                                | <i>S. capracanis</i> | T: –           | HEYDORN et al., 1981  |
| Decoquinat                     | <i>S. cruzi</i>      | P: –           | FOREYT, 1986  |
| Diclazuril                     | <i>S. neurona</i>    | T: (+)         | BENTZ et al., 2000  |
|                                |                      | P: +<br>T: (+) | DUBEY et al., 2001a   |
| Halofuginon                    | <i>S. capracanis</i> | P: +<br>T: (+) | VOIGT und HEYDORN, 1981   |
|                                | <i>S. tenella</i>    | P: +<br>T: +   | HEYDORN et al., 1981  |
|                                | <i>S. muris</i>      | T: (+)         | ROMMEL et al., 1981   |
| Lasalocid                      | <i>S. capracanis</i> | T: –           | HEYDORN et al., 1981  |
|                                | <i>S. cruzi</i>      | P: (+)         | FOREYT, 1986  |
| Monensin                       | <i>S. cruzi</i>      | P: +           | FOREYT, 1986  |
|                                | <i>S. muris</i>      | T: –           | ROMMEL et al., 1981   |
| Ponazuril                      | <i>S. neurona</i>    | T: (+)         | FRANKLIN et al., 2003<br>FURR et al., 2001<br>MACKAY et al., 2008 |
|                                |                      | T: +           | ROMMEL et al., 1981   |
| Pyranteltartrat                | <i>S. neurona</i>    | P: –           | ROSSANO et al., 2005  |
| Robenidin                      | <i>S. capracanis</i> | T: –           | HEYDORN et al., 1981  |
| Salinomycin                    | <i>S. tenella</i>    | P: (+)         | LEEK und FAYER, 1983  |
| Spiramycin                     | <i>S. capracanis</i> | T: –           | HEYDORN et al., 1981  |
| Sulfonamide                    | <i>S. muris</i>      | T: –           | ROMMEL et al., 1981   |
| Sulfonamid +<br>Diaveridin     | <i>S. muris</i>      | T: –           | ROMMEL et al., 1981   |
| Sulfonamid +<br>Pyrethamin     | <i>S. muris</i>      | T: +           | ROMMEL et al., 1981   |
| Sulfonamid +<br>Trimethoprim   | <i>S. capracanis</i> | T: –           | VOIGT und HEYDORN, 1981<br>HEYDORN et al., 1981                   |
|                                | <i>S. muris</i>      | T: (+)         | ROMMEL et al., 1981   |
| Zoalen                         | <i>S. muris</i>      | T: +           | ROMMEL et al., 1981   |

P = prophylaktisch; T = therapeutisch; + = wirksam; (+) = teilweise wirksam; – = nicht wirksam

## 2.6 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Mit der vorliegenden Arbeit sollte das Verhalten von *S. calchasi* im Zwischenwirt Taube von der Infektion bis zum Eintreten der klinischen Symptomatik geklärt werden. Hierbei war die zentrale Fragestellung, ob das Auftreten der in der chronischen Phase der PPE auftretenden, granulomatösen Enzephalitis mit einem bestimmten Stadium im Lebenszyklus von *S. calchasi* assoziiert ist. Anhand der Lokalisation des Parasiten zu verschiedenen Zeitpunkten nach experimenteller Infektion sollten Erkenntnisse gewonnen werden, ob eine direkte Pathogenese durch Parasitenstadien im ZNS vorliegt oder ob eine indirekte Pathogenese im Sinne eines immunpathologischen Geschehens bzw. durch toxische Stoffwechselprodukte für die entzündlichen Veränderungen im ZNS verantwortlich ist.

Weiterhin sollte die Empfänglichkeit von Nymphensittichen für Infektionen mit *S. calchasi* untersucht werden. Hierbei sollte der Nymphensittich stellvertretend für andere Arten der Ordnung Psittaciformes betrachtet werden, insbesondere für solche, die in ihren Beständen aktuell bedroht sind. Da Infektionen mit der nah verwandten Spezies *S. falcatula* zu fatalen Pneumonien und Enzephalitiden bei Altweltpapageien führen (CLUBB und FRENKEL, 1992, VILLAR et al., 2008), sollte die potentielle Bedrohung durch *S. calchasi* für diese Arten beurteilt werden.

Schließlich sollte die Eignung des Triazinderivats Toltrazuril zur Therapie von *S. calchasi*-Infektionen bei der Taube bewertet werden. Da das Präparat seit langem gegen Kokzidien beim Geflügel verwendet wird (RAMADAN et al., 1997) und der Toltrazurilmetabolit Ponazuril gegenwärtig zur Therapie von *S. neurona*-Infektionen eingesetzt wird (MACKAY et al., 2008), sollte die Wirksamkeit auch gegen *S. calchasi* untersucht werden. Hierbei sollte insbesondere die Abhängigkeit des Zeitpunkts der Therapie nach experimenteller Infektion evaluiert werden.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Sporozysten von *S. calchasi*

Die für die Infektionsversuche verwendeten Sporozysten von *S. calchasi* wurden aus einem Habicht gewonnen, der im Rahmen der Erstbeschreibung von *S. calchasi* experimentell mit zystenhaltigem Fleisch von natürlich infizierten Tauben gefüttert worden war (OLIAS et al., 2009a). Sporozysten desselben Habichts waren bereits für Infektionsversuche verwendet worden (OLIAS et al., 2010a, OLIAS et al., 2010b), was die Vergleichbarkeit dieser Studie zu den vorangegangenen Studien sichern sollte. Die Sporozysten wurden nach ROMMEL et al. aufgereinigt (ROMMEL et al., 1995) und bis zum Beginn der Versuche bei 4 °C in einer wässrigen Suspension mit Penicillin (200 I.E./ml), Streptomycin (200 µg/ml) und Amphotericin B (1 µg/ml) gelagert (= Stammsuspension).

#### 3.1.2 Tauben

Für die Durchführung der Versuche wurden Tauben eingesetzt, die zuvor keinen Kontakt zu *S. calchasi* hatten. Da *S. calchasi* über den Kot von infizierten Habichten und Sperbern übertragen wird (OLIAS et al., 2011), war eine Vermeidung des Kontakts zu den Exkrementen der Endwirte notwendig. Die Tauben stammten daher aus einem Zuchtbestand mit allseits geschlossenen Volieren. Weder die Zuchttiere noch ihre Nachzucht hatten während der Zuchtsaison, aus der die Versuchstiere hervorgingen, die Möglichkeit zum Freiflug.

Vor Beginn und während der Versuche wurden die Versuchstiere in einer Voliere mit einem Innenraum und einem überdachten Außenbereich an der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische (KVRAF), Justus-Liebig-Universität (JLU) Gießen gehalten. Die Voliere war mit ausreichend Sitzstangen und Schlafnestern ausgestattet. Sowohl bei anderen Sarkozysten als auch bei *S. calchasi* konnte nachgewiesen werden, dass die Tiere nach oraler Aufnahme von Sporozysten diese noch für eine be-

grenzte Zeit mit dem Kot ausscheiden (MUNDAY, 1985, OLIAS et al., 2010a). Da diese weiterhin infektiös waren, wurden die für diese Versuche verwendeten Tiere zur Vermeidung von Superinfektionen nach der Inokulation mit *S. calchasi*-Sporozysten für die Dauer von drei Tagen einzeln in mit Sperrholzplatten unterteilte Transportkisten untergebracht. Die Transportkisten befanden sich in einem geschlossenen Innenraum, in dem zuvor Maßnahmen zur Schädner- und Insektenbekämpfung ergriffen worden waren, um eine Übertragung von Sporozysten durch belebte Vektoren zu vermeiden. Die Tauben des Vorversuchs wurden während der gesamten Dauer des Vorversuchs (15 Tage) einzeln in Boxen gehalten, die mit zwei Sitzstangen ausgestattet waren. Die Boxen befanden sich ebenfalls in einem geschlossenen Innenraum, in dem eine Schädner- und Insektenbekämpfung durchgeführt wurde. Den Tieren stand während der gesamten Versuchsdauer täglich frisches, kommerzielles Taubenfutter (Taubenhaus Lang, Langgöns), das bis zur Fütterung in geschlossenen Behältern gelagert wurde, und frisches Trinkwasser *ad libitum* zur Verfügung. Das Alter der Tiere bei Beginn der Versuche lag bei unter einem Jahr. Es waren Tiere beider Geschlechter zu etwa gleichen Anteilen vertreten. Alle Tiere waren klinisch gesund.

### 3.1.3 Nymphensittiche

Die Nymphensittiche stammten aus einem kontrollierten Zuchtbestand der KVRAF, JLU Gießen. Der Bestand wird regelmäßig stichprobenhaft auf das aviäre Bornavirus, aviäres *PMV-1* und *Chlamydia psittaci* mit negativem Ergebnis untersucht. Vor Beginn der Versuche wurden die Tiere in Volieren mit einem Innenraum und einem überdachten Außenbereich gehalten. Während der Versuche waren jeweils zwei Tiere in einem mit Sitzstangen ausgestatteten Käfig untergebracht. Die Käfige standen in einem geschlossenen Innenraum und eine Schädner- und Insektenbekämpfung war zuvor durchgeführt worden. Die Tiere erhielten kommerzielles Großsittichfutter (Versele-Laga, Deinze, Belgien) und Trinkwasser *ad libitum*, das täglich erneuert wurde. Die Tiere waren bei

Versuchsbeginn adult und beide Geschlechter waren etwa zu gleichen Anteilen vertreten. Alle Tiere waren klinisch gesund.

Alle hier aufgeführten Versuche wurden mit der Genehmigung des Regierungspräsidiums Gießen durchgeführt [Geschäftszeichen: V54-19c 20-15 (1) GI 18/9 Nr. 01/2010].

### **3.1.4 Reagenzien und Geräte**

Die bei den Versuchen verwendeten Reagenzien und Geräte sind im Anhang II aufgeführt.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Durchführung der Versuche

#### 3.2.1.1 Versuchsteil A – Vorversuch

In einem Vorversuch sollte zunächst eine Infektionsdosis bestimmt werden, bei der es nur zu milden Symptomen während der akuten Phase der klinischen Erkrankung kommt und die Tiere diese Phase der Infektion sicher überleben. Erwartungsgemäß konnte anschließend mit dem Eintreten der chronischen Phase gerechnet werden (OLIAS et al., 2010a). Sowohl für den Versuchsteil B zum Verhalten im Zwischenwirt als auch für den Versuchsteil D zur Wirksamkeit von Toltrazuril war es von essentieller Bedeutung, dass die akute Phase der Erkrankung überstanden wird.

Hierfür erhielt je eine Taube eine Infektionsdosis von 100, 200, 500, 750 bzw. 1.000 *S. calchasi*-Sporozysten einmalig in den Kropf (siehe 3.2.2.2). Die Tauben wurden separat gehalten und täglich im Hinblick auf die Entwicklung klinischer Symptomatik beurteilt. Bei Entwicklung schwerer klinischer Symptomatik wurden die Tauben vorzeitig euthanasiert. Das Ende des Versuchs mit der Euthanasie aller verbliebenen Tauben wurde an Tag 15 p. i. angesetzt, da bis zu diesem Zeitpunkt mit dem Auftreten klinischer Symptomatik im Zuge der akuten Phase der Erkrankung zu rechnen war (OLIAS et al., 2010a). Die Euthanasie erfolgte unter Inhalationsnarkose mit Isofluran (Volumenprozent: 5 %) durch Blutentzug aus der *V. jugularis*. Der Aufbau des Vorversuchs ist in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2: Aufbau des Vorversuchs zur Ermittlung der geeigneten Infektionsdosis**

| Tiernummer | Anzahl | Infektionsdosis (Sporozysten/Tier) | Tötungszeitpunkt (Tag p. i.)* |
|------------|--------|------------------------------------|-------------------------------|
| A1         | 1      | 100                                | 15                            |
| A2         | 1      | 200                                | 15                            |
| A3         | 1      | 500                                | 15                            |
| A4         | 1      | 750                                | 15                            |
| A5         | 1      | 1.000                              | 15                            |

\*sofern nicht zuvor schwere klinische Symptome auftreten

### 3.2.1.2 Versuchsteil B – Hauptversuch zur Klärung des Verhaltens von *S. calchasi* im Zwischenwirt Taube

Das Ziel des Versuchsteils B lag neben dem Verhalten des Parasiten im Zwischenwirt vorrangig in der Aufklärung der Entstehung der im Laufe der Infektion mit *S. calchasi* auftretenden Enzephalitis. Deshalb wurde der Schwerpunkt der Untersuchungen auf die chronische Phase der Erkrankung gelegt, während der die Enzephalitis festgestellt worden war (OLIAS et al., 2010a). Weiterhin sollte die Lokalisation des Parasiten in den verschiedenen Geweben zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion untersucht werden.

Die 45 Tauben dieses Versuchsteils wurden entsprechend den Ergebnissen des Vorversuchs (siehe 4.3) einmalig mit 200 *S. calchasi*-Sporozysten in den Kropf inokuliert (siehe 3.2.2.2). Drei weitere Tauben (Gruppe BNK) erhielten als Negativkontrolltiere das gleiche Inokulatvolumen an Leitungswasser (siehe Tabelle 3). Die Tauben wurden zur Vermeidung von Superinfektionen durch passagierte, infektiöse Sporozysten drei Tage lang separat gehalten, bevor sie für die verbliebene Versuchsdauer gemeinsam in einer Voliere untergebracht wurden (siehe 3.1.2). Die Tiere wurden täglich hinsichtlich der Entwicklung klinischer Symptomatik kontrolliert.

In unterschiedlichen Intervallen von 2 - 10 Tagen wurde jeweils eine Gruppe bestehend aus drei Tauben euthanasiert, wobei der Schwerpunkt auf die chronische klinische Phase gelegt wurde (siehe Tabelle 3). Da das Ziel des Versuchs die Ermittlung der Pathogenese und die Verteilung des Parasiten im Wirt war und somit kein Gruppenvergleich und keine Signifikanzberechnung erfolgen sollten, wurde mit drei Tieren die kleinste statistische Einheit gewählt. Die drei Tauben einer Gruppe wurden jeweils zufällig der gesamten Versuchsgruppe entnommen. Die Euthanasie erfolgte durch Blutentzug aus der *V. jugularis* unter Inhalationsnarkose mit Isofluran (Volumenprozent: 5 %). Die Negativkontrolltiere wurden zusammen mit der letzten Gruppe an Tag 61 p. i. euthanasiert.

**Tabelle 3:** Aufbau des Hauptversuchs zum Verhalten von *S. calchasi* im Zwischenwirt Taube

| Versuchsgruppe | Anzahl | Infektionsdosis (Sporozysten/Tier) | Tötungszeitpunkt (Tag p. i.) |
|----------------|--------|------------------------------------|------------------------------|
| B2             | 3      | 200                                | 2                            |
| B5             | 3      | 200                                | 5                            |
| B10            | 3      | 200                                | 10                           |
| B20            | 3      | 200                                | 20                           |
| B30            | 3      | 200                                | 30                           |
| B40            | 3      | 200                                | 40                           |
| B45            | 3      | 200                                | 45                           |
| B47            | 3      | 200                                | 47                           |
| B49            | 3      | 200                                | 49                           |
| B51            | 3      | 200                                | 51                           |
| B53            | 3      | 200                                | 53                           |
| B55            | 3      | 200                                | 55                           |
| B57            | 3      | 200                                | 57                           |
| B59            | 3      | 200                                | 59                           |
| B61            | 3      | 200                                | 61                           |
| BNK            | 3      | -                                  | 61                           |

### 3.2.1.3 Versuchsteil C – Versuch zur Klärung der Infektiösität und Pathogenität von *S. calchasi* für Nymphensittiche

Vier Gruppen bestehend aus je zwei Nymphensittichen (C1 - C4) wurden jeweils mit  $3 \times 10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  bzw.  $10^2$  *S. calchasi*-Sporozysten in den Kropf inokuliert. Drei weitere Nymphensittiche dienten als Negativkontrolltiere. Hiervon wurde ein Nymphensittich (CNK1) mit Leitungswasser inokuliert, die anderen beiden (CNK2) mit gefiltertem Medium der Stammsuspension (siehe 3.2.2.2). Die Tiere wurden den Gruppen randomisiert zugeordnet (siehe Tabelle 4). Die beiden Tiere einer Infektionsgruppe wurden jeweils gemeinsam in einem Käfig gehalten und täglich klinisch kontrolliert.

Die Nymphensittiche wurden bei Einsetzen schwerer klinischer Symptomatik euthanasiert. Alle verbliebenen Tiere inklusive der Negativkontrolltiere wurden am Tag 76 p. i. euthanasiert. Die Euthanasie erfolgte unter Isoflurannarkose (Volumenprozent: 5 %) durch Blutentzug aus dem Herz.

**Tabelle 4:** Versuchsaufbau zur Klärung der Infektiösität und Pathogenität von *S. calchasi* für Nymphensittiche

| Versuchsgruppe | Anzahl | Infektionsdosis (Sporozysten/Tier) | Tötungszeitpunkt (Tag p. i.)* |
|----------------|--------|------------------------------------|-------------------------------|
| C1             | 2      | 3.000.000                          | 76                            |
| C2             | 2      | 100.000                            | 76                            |
| C3             | 2      | 10.000                             | 76                            |
| C4             | 2      | 100                                | 76                            |
| CNK1           | 1      | 0 (H <sub>2</sub> O)               | 76                            |
| CNK2           | 2      | 0 (Filtrat)                        | 76                            |

\*sofern nicht zuvor schwere klinische Symptome auftreten

### 3.2.1.4 Versuchsteil D – Behandlungsversuch einer *S. calchasi*-Infektion bei Tauben mit Toltrazuril

Im Versuchsteil D sollte die Wirksamkeit von Toltrazuril in unterschiedlichen Phasen der Infektion mit *S. calchasi* in Tauben untersucht werden. Es wurden drei Phasen ausgewählt: Die akute Phase der Erkrankung (Phase 1), ca. 10 Tage vor dem erwarteten Auftreten der neurologischen Symptomatik (Phase 2) und der Beginn der chronischen Phase der klinischen Erkrankung mit neurologischer Symptomatik (Phase 3). In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass bei mittleren Infektionsdosen der Beginn der akuten Phase an Tag 10 p. i. liegt und die ersten neurologischen Symptome (Beginn der chronischen Phase) am Tag 51 p. i. auftreten (OLIAS et al., 2010a).

Es wurden neun Tauben mit 400 *S. calchasi*-Sporozysten in den Kropf inokuliert (siehe 3.2.2.2). Die höhere Infektionsdosis im Vergleich zum Versuchsteil B wurde gewählt, um eine deutlichere klinische akute Phase hervorzurufen, jedoch ohne dass die Tiere verstarben. Analog zum Versuchsteil B wurden die Tauben zunächst für drei Tage nach Inokulation separat gehalten und anschließend gemeinsam in einer Voliere untergebracht. Die Tiere wurden täglich klinisch kontrolliert. Die erste Gruppe (D1) bestehend aus drei Tauben erhielt Toltrazuril (Baycox® 2,5%, Bayer, Leverkusen) in der Dosierung 25 mg/kg KGW in den Kropf an den Tagen 10 und 11 p. i. (Phase 1). Den Tauben der zweiten Gruppe (D2) wurde Toltrazuril in gleicher Weise an den Tagen 40 und 41 p. i. (Phase 2) appliziert und die dritte Gruppe (D3) wurde mit Toltrazuril in ebenfalls gleicher Dosierung an zwei aufeinanderfolgenden Tagen bei Einsetzen der neurologischen Symptomatik (Phase 3) behandelt (siehe Tabelle 5). Die Zuordnung zu den Gruppen erfolgte durch zufällige Entnahme aus der gesamten Versuchsgruppe. Als Kontrollen dienten die Tiere des etwa zur gleichen Zeit stattfindenden Versuchsteils B (Positiv- und Negativkontrolle).

Am Ende des Versuchs, an Tag 73 p. i., wurden die Tauben euthanasiert. Die Euthanasie erfolgte durch Blutentzug unter Isoflurannarkose (Volumenprozent: 5 %).

**Tabelle 5: Aufbau des Behandlungsversuchs mit Toltrazuril**

| Versuchsgruppe | Anzahl | Infektionsdosis (Sporozysten/ Tier) | Behandlung mit Toltrazuril (Tag p. i.)    | Tötungszeitpunkt (Tag p. i.) |
|----------------|--------|-------------------------------------|---|------------------------------|
| D1             | 3      | 400                                 | 10 und 11                                 | 73                           |
| D2             | 3      | 400                                 | 40 und 41                                 | 73                           |
| D3             | 3      | 400                                 | An 2 Tagen bei Einsetzen der ZNS-Symptome | 73                           |

### 3.2.2 Methoden zur Durchführung der Versuche

#### 3.2.2.1 Untersuchungen vor Beginn der Versuche

Vor Beginn der Versuche wurde eine Sammelkotprobe der Tauben und Nymphensittiche von drei aufeinanderfolgenden Tagen auf Endoparasiten und Salmonellen untersucht. Weiterhin wurden von den Tauben frische Kropftupfer auf *Trichomonas* spp. getestet. Allen Tauben wurde ca. 1 ml Blut aus der *V. cutanea ulnaris superficialis* (Flügelvene) entnommen, um auf spezifische Antikörper gegen aviäres *PMV-1* zu testen. Allen Tauben und Nymphensittichen wurde eine Muskelbiopsie entnommen und histologisch auf das Vorhandensein von Zysten untersucht.

Die Untersuchung auf Stadien von Endoparasiten wurde mittels Flotationsverfahren durchgeführt (DEPLAZES et al., 2013). Hierzu wurde ca. 25 g Kotmaterial mit hypertonischer Kochsalzlösung vermischt und in ein Reagenzglas gefüllt, das mit einem Deckglas bedeckt wurde. Nach einer Flotationsdauer von 20 Minuten wurde der an einem Deckglas haftende Flüssigkeitsspiegel mikroskopisch bei einer Vergrößerung von 1:200 auf das Vorhandensein von Parasitenstadien untersucht.

Die Untersuchung auf Salmonellen erfolgte mittels eines selektiven Anzuchtverfahrens (SELBITZ, 2011). Hierzu wurde 25 g Kot mit 225 ml gepuffertem Peptonwasser vermengt und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden jeweils dreimal 25 µl der vorangereicherten Suspension in modifiziertes, halbfestes Rappaport-Vassiliadis-(MSRV)-Medium überführt und für 48 Stunden bei 42 °C inkubiert. Aus der gelblich verfärbten Schwärmzone um die Inokulationsstellen herum wurde mit einer Impföse Material aus dem MSRV-Medium auf Gassner-Agar und XLD-Agar übertragen und für weitere 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Salmonellenverdächtiges Koloniematerial (gelbe Verfärbung auf dem Gassner-Agar, schwarze Verfärbung auf dem XLD-Agar) wurde mittels Objektträgerschnellagglutination mithilfe eines omnivalenten Salmonellenantigenpräparats [Anti-Salmonella (A-67), omnivalent, Sifin Institut, Berlin] auf die Zugehörigkeit zur Gattung *Salmonella* überprüft.

Die Kropftupfer der Tauben wurden unverzüglich nach Entnahme auf einem Objektträger in einem Tropfen angewärmter Kochsalzlösung ausgestrichen und mikroskopisch bei einer Vergrößerung von 1:100 untersucht (KUMMERFELD, 2011).

Die Taubenblutproben wurden nach Entfernung der zellulären Bestandteile mithilfe eines Hämagglutinationshemmtests (HAH) auf spezifische Antikörper gegen aviäres *PMV-1* untersucht. Hierfür wurde zunächst zur Bestimmung der hämagglutinierenden Einheiten des Testvirus ein Hämagglutinationstest (HA) durchgeführt. Sowohl HA als auch HAH wurden nach der Arbeitsanweisung 2 a zur Diagnosestellung der Newcastle Disease des OIE Manual 2004 durchgeführt (OIE, 2004). Auf einer 96-er Mikrotiterplatte mit V-förmigen Kavitäten wurden 25 µl PBS je Kavität vorgelegt. Das *PMV-1*-Testvirus [F-Stamm (ASPLIN, 1952), ursprünglich zur Verfügung gestellt von Dr. J. Alexander, Weybridge, UK] wurde mit PBS 1:32 vorverdünnt. Je 25 µl der vorverdünnten Virussuspension wurden im Doppelansatz in die erste Kavität gegeben und eine zweifache Verdünnungsreihe bis zur Verdünnungsstufe 12 (1:4096) hergestellt. Nach

Zugabe von nochmals je 25 µl PBS und 25 µl einer 1%igen Hühnererythrozytensuspension je Kavität (siehe Anhang II) wurde die Testplatte für 40 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Auswertung des HA erfolgte durch Schrägstellung der Platte und Bewertung der Agglutination (= kein Verlaufen der Erythrozyten aus dem Boden der Kavität). Der Test wurde bei Bedarf mit veränderter Verdünnung des Testvirus wiederholt, bis 4 HA-Einheiten eingestellt waren, d. h. bis zur Verdünnung 1:4 eine vollständige Agglutination eintrat.

Bei der Durchführung des HAH wurden wieder zunächst 25 µl PBS in die Kavitäten einer 96-er Mikrotiterplatte mit V-förmigen Kavitäten vorgelegt und anschließend in die erste Reihe die zu untersuchenden Seren gegeben. Als Positivkontrolle wurde ein polyklonales Antiserum gegen aviäres *PMV-1* (zur Verfügung gestellt von Dr. J. Alexander, Weybridge, UK) verwendet, als Negativkontrolle Serum eines SPF-Huhns. Die aufgetragenen Seren inklusive der Kontrollseren wurden in einer zweifachen Verdünnungsreihe bis zur Verdünnungsstufe 12 verdünnt. Anschließend wurden je 25 µl der auf 4 HA-Einheiten eingestellten Virus-suspension zugegeben und die Testplatte für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 25 µl der 1%igen Hühnererythrozytensuspension wurde die Platte nochmals für 40 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor der Titer durch Schrägstellung der Platte abgelesen wurde. Der Titer ergab sich aus der höchsten Verdünnungsstufe, bei der die Agglutination gehemmt war. Nach OIE-Vorgaben gilt der Titer ab der Verdünnungsstufe 4 (1:16 Verdünnung) als positiv.

Die Entnahme der Muskelbiopsie bei Tauben und Nymphensittichen erfolgte unter Inhalationsanästhesie mit Isofluran (Einleitung: 5 Volumenprozent; Erhaltung: 2,5 Volumenprozent). Eine ca. 1 cm lange Hautinzision wurde parallel zur *Carina sterni* angebracht und ein ca. 0,5 x 0,1 cm großes Stück des *M. pectoralis* in dessen Faserverlauf entnommen. Der Verschluss der Muskulatur und der Haut erfolgte mit jeweils einem Einzelheft (Coated Vicryl 4-0, Ethicon LLC, Guaynabo, Puerto Rico, USA).

Das entnommene Biopat wurde in 5%ige Formaldehydlösung überführt und histologisch untersucht (siehe 3.2.2.5).

### **3.2.2.2 Herstellung der Infektionsdosen und Infektion der Tauben und Nymphensittiche**

Nach Resuspension der Sporozysten durch Schwenken wurden 50  $\mu$ l der Stammsuspension in 1 ml Leitungswasser überführt. Diese Suspension wurde für ca. 10 Sekunden mithilfe eines Vortex-Schüttlers durchmischt und direkt im Anschluss daran 0,5  $\mu$ l auf einen Objektträger aufgetragen. Die darin enthaltenen Sporozysten wurden bei einer 1:200-fachen Vergrößerung ausgezählt. Die Suspension wurde mit Leitungswasser weiter verdünnt, bis eine Dichte von ca. 20 - 40 Sporozysten in 0,5  $\mu$ l erreicht war (= Endverdünnung). Insgesamt wurde die Sporozystenanzahl zehnmal in je 0,5  $\mu$ l dieser Endverdünnung ausgezählt und der Mittelwert der sich daraus ergebenden zehn Werte als Konzentration der Sporozysten in der Endverdünnung berechnet. Um für die Inokulation der Versuchstiere ein ausreichend großes Gesamtvolumen zu erhalten, wurde die entsprechende Menge der Endverdünnung in Leitungswasser gegeben, sodass ein Inokulat von 1 ml (Tauben) bzw. 0,5 ml (Nymphensittiche) vorlag. Die Inokulate für die Negativkontrollen bestand aus gleichen Volumina Leitungswasser. Für den Versuchsteil C an den Nymphensittichen wurde außerdem noch 1 ml des durch einen Filter mit einer Porenweite von 3  $\mu$ m filtrierten Mediums der Stammsuspension als weitere Negativkontrolle verwendet. Die Porenweite war geeignet, um Sporozysten von *S. calchasi* [Größe: ca. 11,9 x 7,9  $\mu$ m (OLIAS et al., 2009a)] zurückzuhalten, gegebenenfalls im Medium enthaltene Viren, Bakterien oder toxische Substanzen jedoch ins Filtrat passieren konnten.

Die Inokulate wurden unverzüglich nach ihrer Herstellung über eine Knopfkanüle direkt in den Kropf der Tiere appliziert. Um die in der Knopfkanüle verbliebenen Sporozysten ebenfalls in den Kropf zu überführen, wurde diese nachfolgend mit 1 ml (Tauben) bzw. 0,5 ml (Nymphensittiche) Leitungswasser gespült. Im Anschluss an die Inokulation

wurden die Tiere für etwa 10 Minuten hinsichtlich einer möglichen Regurgitation des Inokulats beobachtet.

### **3.2.2.3 Sektion und Probenahme von Organmaterial**

An den Versuchstieren (Tauben und Nymphensittiche) wurde unmittelbar nach der Euthanasie durch Blutentzug eine Sektion durchgeführt. Von folgenden Organen wurden steril Proben entnommen: Skelettmuskulatur (je drei Proben aus dem *M. pectoralis* und der Oberschenkelmuskulatur), Gehirn, Rückenmark, *N. ischiadicus*, Herz, Leber, Lunge, Niere, Milz, Ösophagus, Kropf, Darm und Knochenmark. Hierbei wurden von jeder Organprobe jeweils ein max. 1 x 1 x 1 cm großes Stück Organmaterial bzw. vom Gehirn die Hälfte in 5%ige Formaldehydlösung überführt und das restliche Material unverzüglich bei -80 °C eingefroren. Weiterhin wurden aus dem Herzblut, der Leber und der Lunge sterile Tupferproben für die bakteriologische Untersuchung gewonnen und Abstriche von vier Lokalisationen der Darmschleimhaut wurden für die parasitologische Untersuchung angefertigt.

### **3.2.2.4 Untersuchungen zum Ausschluss anderer Infektionen als durch *S. calchasi***

Die bakteriologische Untersuchung erfolgte nach Standardmethoden (AMTSBERG und VERSPOHL, 2011). Hierzu wurden die aus Herzblut, Leber und Lunge entnommenen Tupferproben auf Columbia-Agar mit Schafblut und Gassner-Agar ausgestrichen und für 48 Stunden unter aeroben Bedingungen bei 37 °C inkubiert. Die Abstriche der Darmschleimhaut der Versuchstiere wurden mikroskopisch bei einer Vergrößerung von 1:200 untersucht. Parasitenstadien wurden anhand ihrer Morphologie identifiziert (DEPLAZES et al., 2013).

### **3.2.2.5 Histologische Untersuchung der Organproben**

Die formalinfixierten Organproben wurden zu Schnittpräparaten von etwa 2 - 3 mm Dicke verarbeitet. Von der Gehirnhälfte wurden fünf bis sechs Transversalschnittpräparate angefertigt, vom Rückenmark zwei ca. 0,5 cm lange Längsschnitt- und zwei Querschnittpräparate. Aus dem Darm wurden von zwei Lokalisationen Querschnittpräparate angefertigt. Alle weiteren Organproben wurden jeweils einmalig geschnitten und in Gewebereinbettkassetten überführt.

Die folgenden Schritte wurden freundlicherweise von Frau Petra Nehrig, Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin, durchgeführt: Die Entwässerung der Organproben erfolgte automatisiert mittels eines Einbettautomaten. Anschließend wurden die Einbettkassetten mit flüssigem Paraffin aufgefüllt und auf einer Kälteplatte von max. 4 °C ausgekühlt. Aus den Paraffinblöcken wurden je drei Schnitte von 4 µm Dicke hergestellt und auf Objektträger gezogen. Nach Trocknung wurde von den drei Schnitten pro Paraffinblock jeweils ein Schnitt mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt. Die anderen beiden Schnitte wurden für die immunhistochemische Färbung (siehe Kap. 3.2.2.6) bzw. als Reserve verwendet. Die Auswertung der Proben aus den Versuchsteilen A und C wurde durch Dr. Philipp Olias, Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin, vorgenommen.

### **3.2.2.6 Immunhistochemische Untersuchung der Organproben**

Die Schnitte aus dem Versuchsteil B und ein Teil der Schnitte (Skelettmuskulatur, Gehirn, Rückenmark, Herz, Lunge, Milz, Darm) aus Versuchsteil C wurden immunhistochemisch gefärbt und untersucht. Die immunhistochemischen Präparate des Versuchsteils C wurden freundlicherweise von Frau Manuela Dauer angefertigt und von Dr. Philipp Olias, beide Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin, untersucht.

Bei dem für die immunhistochemische Färbung verwendeten Primärantikörper handelt es sich um einen polyklonalen Kaninchenantikörper

(anti-ScB), der durch Immunisierung von Kaninchen mit in Zellkultur gewonnenen *S. calchasi*-Merozoiten hergestellt wurde (OLIAS et al., 2013). In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass der anti-ScB-Antikörper sowohl an Merozoiten als auch an Zystozoen von *S. calchasi* bindet (OLIAS et al., 2013). Das Protokoll zur immunhistochemischen Färbung befindet sich im Anhang III.

### **3.2.2.7 Untersuchung mittels semi-nested Real-time PCR**

#### **3.2.2.7.1 Etablierung der *S. calchasi*-spezifischen semi-nested Real-time-PCR**

Für die Erfassung der relativen DNA-Mengen in den verschiedenen Organen der Versuchstiere wurde eine semiquantitative *S. calchasi*-spezifische Real-time PCR etabliert. Als Grundlage für die Entwicklung eines geeigneten Protokolls diente die von OLIAS et al. (2011) beschriebene konventionelle PCR zur Detektierung der ITS-1-Region von *S. calchasi*. Als Positivkontrolle wurde DNA verwendet, die aus den Sporozysten isoliert wurde, mit denen die Infektionsversuche durchgeführt worden waren (Methode der DNA-Isolierung: siehe 3.2.2.7.3). Nuklease-freies Wasser wurde als Negativkontrolle eingesetzt.

Zunächst wurde das Protokoll von OLIAS et al. (2011) als konventionelle PCR durchgeführt. Zur Optimierung der Spezifität und zur Vermeidung unspezifischer Banden wurde als DNA-Polymerase eine Hotstart-Polymerase (HotStarTaq DNA Polymerase, Qiagen, Hilden) eingesetzt, zum Mastermix der Zusatz Q-Solution addiert und die Konzentration der Primer Sca1, Sca2 und SNCa3 (siehe Tabelle 6) auf 10 pmol/µl verringert. Um die Hotstart-DNA-Polymerase zu aktivieren, wurde zum Temperaturprofil initial eine 15-minütige Phase bei 95 °C hinzugefügt (siehe Tabelle 7). Die erste PCR der semi-nested PCR wurde weiterhin als konventionelle PCR durchgeführt. Für die zweite PCR wurde dem PCR-Mastermix SYBR Green I-Farbstoff zugefügt und das Protokoll in ansonsten unveränderter Form als Real-time PCR angewendet (siehe Tabelle 8).

Zur Bestätigung, dass es sich bei dem PCR-Produkt tatsächlich um Sequenzen von *S. calchasi* handelt, wurden die Produkte der Positivkontrolle sowie einer Organprobe (Milz von Taube B10.3) sequenziert. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit dem GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) entsprechend den Angaben des Herstellers. Da die Größe des erwarteten Amplikons weniger als 500 bp betrug (136 bp), wurden 20 µl des PCR-Produkts zu gleichen Anteilen mit Isopropanol und Bindungspuffer vermischt und auf eine Säule aufgetragen. Nach Zentrifugation wurden 700 µl Waschpuffer auf die Säule aufgetragen und abzentrifugiert. Die aufgereinigte DNA wurde in 30 µl nukleasefreiem Wasser eluiert und nach photometrischer Messung des DNA-Gehalts (NanoDrop 2000c Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific; Wellenlänge: 260 nm) auf eine Konzentration von 10 ng/µl eingestellt. Die Sequenzierung wurde von einem kommerziellen Sequenzierservice (LGC Genomics, Berlin) durchgeführt. Die Sequenzen wurden mithilfe des BLAST Programms [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Stand 02/2015)] mit allen in der GenBank gelisteten Sequenzen verglichen.

#### **3.2.2.7.2 Bestimmung der Sensitivität und Spezifität**

Zur Bestimmung der Sensitivität wurde zunächst der DNA-Gehalt der Positivkontrolle photometrisch bestimmt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe in zehnfachen Verdünnungsschritten bis zur Verdünnungsstufe  $10^{-8}$  angelegt und mit der semi-nested Real-time PCR untersucht. Die Spezifität wurde evaluiert, indem mit dem Protokoll DNA von *S. calchasi* sowie DNA der nah verwandten Spezies *S. columbae*, *S. turdusi* (beide aus dem Darm von natürlich infizierten Habicht und Sperbern gewonnen) und *S. falcatula* (*Sarcocystis falcatula* Stiles, ATCC® 50701, ATCC, Washington DC, USA) untersucht wurde.

**Tabelle 6:** Sequenzen der Primer S<sub>Ca</sub>1, S<sub>Ca</sub>2 und S<sub>N</sub>Ca3 (OLIAS et al., 2011)

| Primer             | Sequenz (5' – 3')         | Richtung |
|--------------------|---------------------------|----------|
| S <sub>Ca</sub> 1  | CTCCTTGCTCGAGAATGAACATGAG | Forward  |
| S <sub>Ca</sub> 2  | GATCATCTTTTCGACGACAATATCG | Reverse  |
| S <sub>N</sub> Ca3 | TCCAGAGAAGATCCCCTGGCTAC   | Reverse  |

**Tabelle 7:** Temperaturprofil der *S. calchasi*-spezifischen semi-nested Real-time PCR

| Reagenz              | Temperatur | Zeit   | Zyklen |
|----------------------|------------|--------|--------|
| Initiale Aktivierung | 95 °C      | 15 min | -      |
| Denaturierung        | 95 °C      | 30 s   | 40     |
| Hybridisierung       | 55 °C      | 30 s   |        |
| Elongation           | 72 °C      | 1 min  |        |
| Finale Extension     | 72 °C      | 10 min | -      |

**Tabelle 8:** Mastermix-Protokoll der *S. calchasi*-spezifischen semi-nested Real-time PCR

| Reagenz   | Konzentrationen pro Reaktion |           |
|---|------------------------------|-----------|
|   | 1. PCR                       | 2. PCR    |
| PCR Buffer, 10x <sup>1</sup>                        | 2,5 µl                       | 2,5 µl    |
| dNTPs (2 mM) <sup>2</sup>                           | 2,5 µl                       | 2,5 µl    |
| Primer S <sub>Ca</sub> 1 (10 pmol/µl) <sup>3</sup>  | 0,5 µl                       | 0,5 µl    |
| Primer S <sub>Ca</sub> 2 (10 pmol/µl) <sup>3</sup>  | 0,5 µl                       | -         |
| Primer S <sub>N</sub> Ca3 (10 pmol/µl) <sup>3</sup> | -                            | 0,5 µl    |
| SYBR-Green (1:500 verd.) <sup>4</sup>               | -                            | 0,25 µl   |
| Q-Solution <sup>1</sup>                             | 5 µl                         | 5 µl      |
| HotStarTaq-DNA-Polymerase <sup>1</sup>              | 0,125 µl                     | 0,125 µl  |
| Nukleasefreies Wasser <sup>1</sup>                  | 11,375 µl                    | 11,125 µl |
| Total:  | 22,5 µl                      | 22,5 µl   |
| + 2,5 µl DNA-Probenmaterial                         |                              |           |

verd. = verdünnt; 1 = Qiagen; 2 = Thermo Fisher Scientific; 3 = hergestellt von biomers.net, Ulm; 4 = peqlab

### 3.2.2.7.3 Untersuchung der Organproben

Von den Tauben der Gruppen B2, B5, B10, B20 und der Kontrollgruppe des Versuchsteils B wurden jeweils alle beprobten 13 Organe mittels Real-time PCR untersucht. Von den verbliebenen Gruppen dieses Versuchsteils wurden nur Skelettmuskulatur, Gehirn und Leber der Tauben untersucht, da hier der relative Gehalt an *S. calchasi*-spezifischer DNA im Gehirn im Vergleich zur Muskulatur und zur Leber bestimmt werden sollte. Bei den Tauben aus Versuchsteil D erfolgte lediglich die Untersuchung der Skelettmuskulatur zur Bestätigung von *S. calchasi*. Von den Nymphensittichen aus Versuchsteil C wurden Skelettmuskulatur, Gehirn, Leber, Lunge, Milz und Darm untersucht. Da hierbei der relative DNA-Gehalt der Organe nicht Teil der Fragestellung war, wurden die Organproben der Nymphensittiche mittels konventioneller PCR untersucht (modifiziertes Protokoll nach OLIAS et al., 2011, siehe 3.2.2.7.1).

Für die Isolierung der DNA aus den Organproben wurde ein ca. 1 g schweres Stück des Organs in 360 µl Lysispuffer zerkleinert. Nach Abzentrifugation des dabei entstandenen Schaumes wurden 40 µl Proteinase K hinzugefügt. Anschließend wurde das Gemisch über Nacht auf einem Thermomixer bei 56 °C inkubiert. Die Isolierung erfolgte automatisiert (QIAcube, Programm: DNEasy Blood & Tissue Kit, Tissue & rodent tails, Qiagen) mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). Als Isolationskontrolle wurde jedem Isolationsdurchgang eine Probe bestehend aus 200 µl Lysispuffer beigefügt. Nach Abschluss der Isolierung wurde der DNA-Gehalt des Eluats photometrisch bestimmt und durch Verdünnung mit nukleasefreiem Wasser auf 5 ng/µl eingestellt.

Mit allen untersuchten Proben, den Isolationskontrollen, je einer Positiv- und Negativkontrolle wurde zunächst die erste, konventionelle PCR mit dem Primerpaar Sca1/Sca2 durchgeführt (siehe Tabelle 8). Die PCR-Produkte wurden anschließend im Verhältnis 1:500 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt. Bei den Proben, die mittels semiquantitativer Real-time PCR untersucht werden sollten (Versuchsteile B und D), wurde von der

1:500-verdünnten Positivkontrolle eine zehnfache Verdünnungsreihe bis zur Verdünnung  $10^{-6}$  angelegt. Anschließend wurden die verdünnten PCR-Produkte der ersten PCR inklusive der Verdünnungsreihe der Positivkontrolle mittels des Real-time PCR-Protokolls mit den Primern SCA1/SNCA3 (siehe Tabelle 8) untersucht. Durch Vergleich der Schmelzkurven der Proben mit der Schmelzkurve der Positivkontrolle wurde die Spezifität des Ergebnisses kontrolliert. Zur Bestimmung des relativen, *S. calchasi*-spezifischen DNA-Gehalts der Proben wurden die ct-Werte erfasst.

Von den Proben, die mittels konventioneller PCR untersucht wurden (Versuchsteil C), wurden die verdünnten Produkte der ersten PCR, dazugehörige Isolationskontrollen sowie je eine Positiv- und Negativkontrolle mit dem Primerpaar SCA1/SNCA3 mit dem gleichen Protokoll wie bei der ersten PCR (siehe Tabelle 8) untersucht. Die PCR-Produkte wurden auf ein 1,6%iges Agarosegel mit dem Zusatz des DNA-Farbstoffs GelRed® (Biotium, Hayward, CA, USA) aufgetragen. Für die Schätzung der Größe des Amplikons wurde außerdem eine 50 bp-DNA-Leiter aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in TBE-Puffer (pH 8,0) bei 100 V und 140 mA durchgeführt. Die Höhe der Banden wurde anschließend unter UV-Licht mit denen der DNA-Leiter und der Positivkontrolle verglichen.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Untersuchungen vor Beginn der Versuche

In dem untersuchten Sammelkot der Tauben und Nymphensittiche vor Versuchsbeginn wurden keine parasitären Stadien festgestellt. Nach Anreicherung des Sammelkots und selektiver Anzucht wurden keine Salmonellen nachgewiesen. In den untersuchten Kropftupfern der Tauben wurden im Nativpräparat unmittelbar nach Tupferentnahme keine Trichomonaden festgestellt. Im Hämagglutinationshemmtest der Seren aller Tauben wurde ein Antikörpertiter gegen aviäres *PMV-1* von  $< 1:2$  nachgewiesen, d. h., es wurden keine spezifischen Antikörper gegen *PMV-1* nachgewiesen. Histologisch wurden keine Zysten in den untersuchten Muskelbiopтатаen der Tauben und Nymphensittiche festgestellt.

### 4.2 Evaluierung der *S. calchasi*-spezifischen, semi-nested Real-time PCR

Die Sequenzierung der Produkte der mittels *S. calchasi*-spezifischer, semi-nested Real-time PCR untersuchten DNA ergab nach Abgleich mit den in der GenBank hinterlegten Sequenzen sowohl bei der Positivkontrolle als auch der untersuchten Organprobe eine 100%ige Homologie mit *S. calchasi*. Bei der Messung der DNA-Konzentration der Positivkontrolle wurde ein DNA-Gehalt von 3,2 ng/μl bestimmt. Von der zehnfachen Verdünnungsreihe der Positivkontrolle wurden mittels Real-time PCR die Proben bis zur Verdünnungsstufe  $10^{-5}$  detektiert. Daraus ergab sich eine untere Nachweisgrenze von 32 fg DNA/μl. Bei der Spezifitätsuntersuchung wurde von der Real-time PCR lediglich DNA von *S. calchasi* detektiert. Die DNA von *S. columbae*, *S. turdusi* und *S. falcatula* wurde nicht amplifiziert.

### 4.3 Versuchsteil A – Vorversuch

Die klinischen Befunde des Vorversuchs sind in Tabelle 9 dargestellt. Die Tauben, die mit den Infektionsdosen 100, 500 und 1.000 Sporozysten infiziert wurden (A1, A3, A5), entwickelten zwischen Tag 5 und 10 p. i. eine transiente Polyurie, während diese bei den Tauben A2 und A4 (Infektionsdosis 200 bzw. 750 Sporozysten) ausblieb. Die Taube A5 (infiziert mit 1.000 Sporozysten) verstarb an Tag 11 p. i. nach kurzzeitiger Apathie und Inappetenz. Die übrigen Tauben zeigten weiterhin keine klinische Symptomatik und wurden am Versuchsende an Tag 15 p. i. euthanasiert. In den Organen aller fünf Tauben wurde histologisch *Sarcocystis* sp. nachgewiesen.

**Tabelle 9: Klinische Befunde des Vorversuchs**

| Tier-nummer                        | A1           | A2           | A3           | A4           | A5           |
|------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Infektionsdosis (Sporozysten/Tier) | 100          | 200          | 500          | 750          | 1.000        |
| Polyurie                           | Tag 5 p. i.  | -            | Tag 10 p. i. | -            | Tag 5 p. i.  |
| Verstorben                         | -            | -            | -            | -            | Tag 11 p. i. |
| Euthanasie                         | Tag 15 p. i. | -            |

Da 1.000 Sporozysten pro Tier bereits zu einem tödlichen Verlauf in der akuten Phase geführt hatten, wurden als Infektionsdosis für den Versuchsteil B 200 Sporozysten pro Tier gewählt. Diese vergleichsweise niedrige Dosis sollte sicherstellen, dass auch bei einer möglichen Virulenzsteigerung der Sporozysten eine mild verlaufende akute Phase induziert wird. Für den Versuchsteil D wurde eine Infektionsdosis von 400 Sporozysten pro Tier gewählt. Hier sollte eine deutliche akute Phase auftreten, die unter Feldbedingungen eine eindeutige Behandlungsindikation geben würde.

## **4.4 Versuchsteil B – Hauptversuch zum Verhalten von *S. calchasi* im Zwischenwirt Taube**

Die Nummerierung der Tauben des Versuchsteils B erfolgte anhand ihrer Gruppennummer, die dem Tag der Euthanasie entspricht, und der individuellen Tiernummer innerhalb der Gruppe (z. B.: B10.2 = Versuchsteil B, zweite Taube, die am Tag 10 p. i. euthanasiert wurde).

### **4.4.1 Klinische Befunde an den Tauben**

Erwartungsgemäß trat bei den mit *S. calchasi*-Sporozysten inokulierten Tauben ein zweiphasiger Krankheitsverlauf auf. Alle Tauben zeigten ab Tag 10 p. i. Apathie, aufgeplustertes Gefieder und eine gering- bis mittelgradige Polyurie. Vereinzelt wurde eine kräftige Gelbfärbung des Harnsäureanteils in den Fäzes beobachtet. Nach Tag 13 p. i. erholten sich die Tauben wieder und waren anschließend klinisch unauffällig.

Ab Tag 47 p. i. trat bei allen inokulierten Tauben eine geringgradige Ataxie auf, deren Intensität zwischen den Tagen 50 und 56 p. i. etwas zunahm. Bei zwei Tauben (B55.3; B59.2) war die Ataxie von Tag 47 p. i. an mittelgradig ausgeprägt und zwei weitere Tauben (B49.1; B61.1) zeigten außerdem mittelgradigen Torticollis. Drei Tauben (B49.1; B51.1; B55.3) entwickelten zwischen Tag 48 und 50 p. i. eine schwere Ataxie. Bis zum Ende des Versuchs an Tag 61 p. i. zeigten alle verbliebenen Tauben wieder Ataxien von geringgradiger Ausprägung. Die Kontrolltiere (BNK) zeigten zu keinem Zeitpunkt des Versuchs klinische Symptome.

### **4.4.2 Pathologisch-anatomische Veränderungen an den Organen**

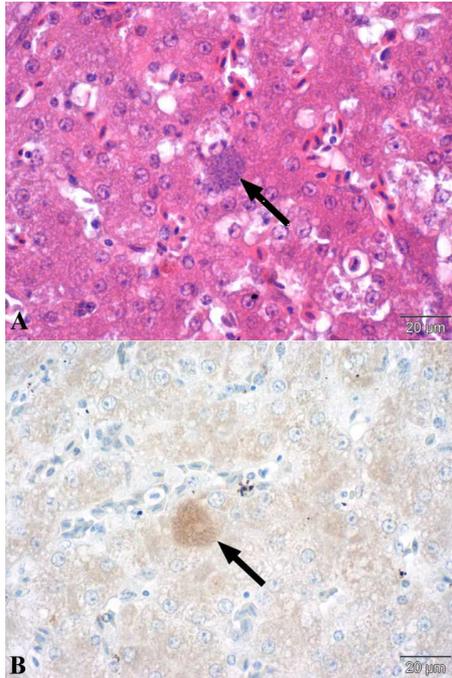
Makroskopisch sichtbare Befunde wurden nur an Organen von Tauben erhoben, die während der akuten Phase der Erkrankung euthanasiert wurden. Zwei Tauben (B10.1; B10.3), die an Tag 10 p. i. euthanasiert wurden, zeigten Veränderungen an Leber und Milz. Die Leber der Taube B10.1 wies multifokale, helle Herde mit hämorrhagischem Randsaum auf. Bei der Taube B10.3 war die Leber hochgradig vergrößert und

das Leberparenchym war von multifokalen bis diffusen, nekrotischen Läsionen durchzogen. Beide Tiere zeigten eine mittel- bis hochgradige Splenomegalie. Alle weiteren Tauben dieses Versuchsteils inklusive der Taube B10.2 wiesen keine wesentlichen makroskopischen Veränderungen an den Organen auf.

In der bakteriologischen Untersuchung von Herzblut, Leber und Lunge wurde bei allen Tauben kein aerobes Keimwachstum festgestellt. In der parasitologischen Untersuchung wurden bei vier Tauben (B30.1; B45.2; B47.2; B61.1) vereinzelt bis geringgradig Kokzidien in den Darmabstrichen nachgewiesen.

#### **4.4.3 Histopathologische und immunhistochemische Befunde an den Organen**

In allen Tauben der Versuchsgruppen B2 und B5 (euthanasiert an den **Tagen 2 bzw. 5 p. i.**) wurden in den untersuchten Organen weder in der histopathologischen Untersuchung, noch mittels immunhistochemischer Färbung (IHC) Stadien von *S. calchasi* identifiziert. An **Tag 10 p. i.** wurde in der Leber der Tauben, bei denen bereits makroskopische Leberveränderungen auffällig waren, eine geringgradige (B10.1) bzw. mittelgradige (B10.3), nekrotisierende Hepatitis mit lymphozytärer Komponente festgestellt. Die Leber von Taube B10.2 wies keine entzündlichen Veränderungen auf. In der Leber von Taube B10.3 wurden in geringer Anzahl Schizonten nachgewiesen, die in der IHC mit dem anti-ScB-Antikörper angefärbt wurden (siehe Abbildung 2). Die Schizonten waren hauptsächlich in Hepatozyten lokalisiert. Ansonsten wurden in keinem anderen Organ und in keiner weiteren Taube des gesamten Versuchs Schizonten nachgewiesen.

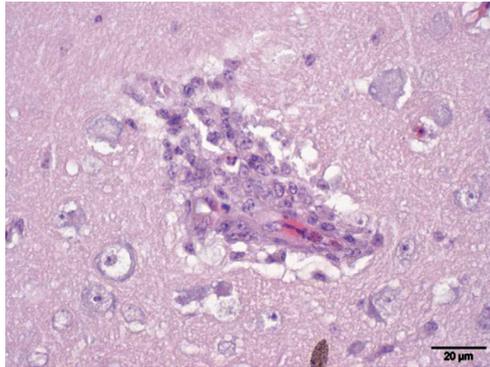


**Abbildung 2: Histologische Schnitte der Leber von Taube B10.3 an Tag 10 p. i. (MAIER et al., 2015)**

A) Schizont (Pfeil); HE-Färbung, Maßstabsbalken: 20 µm

B) Schizont, der mit dem anti-ScB-Antikörper (Pfeil) markiert wurde; Maßstabsbalken: 20 µm

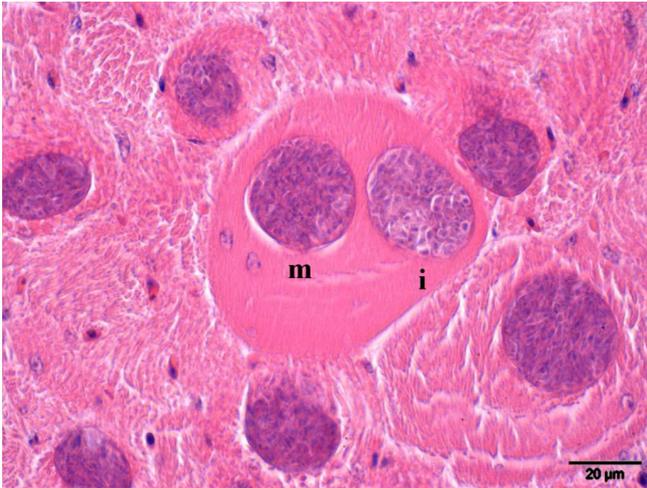
In der Skelettmuskulatur der drei Tauben, die an **Tag 20 p. i.** euthanasiert wurden (Gruppe B20), lagen in geringer bis mittlerer Menge unreife Zysten mit rundlichen, blass basophilen Metrozyten vor. In der IHC wurden die Metrozyten positiv mit dem anti-ScB-Antikörper angefärbt. Zwei der Tauben (B20.1; B20.2) wiesen zudem im Gehirn geringgradige, entzündliche Läsionen in Form von perivaskulären Manschetten aus vornehmlich Lymphozyten (siehe Abbildung 3) sowie Gliaknoten auf.



**Abbildung 3: Histologischer Schnitt des Gehirns von Taube B20.1 an Tag 20 p. i. (MAIER et al., 2015)**

Perivaskuläre Manschette aus Lymphozyten und vereinzelt Histiozyten und Granulozyten um ein Blutgefäß im Gehirn; HE-Färbung, Maßstabsbalken: 20 µm

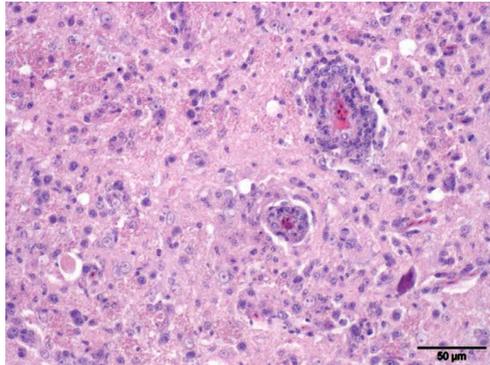
Von **Tag 30 p. i. bis** zum Ende des Versuchs an **Tag 61 p. i.** enthielt die Skelettmuskulatur von 23 der verbliebenen 33 Tauben (Gruppen B30 - B61) hauptsächlich reife Zysten. Neben den reifen Zysten mit stark basophilen länglichen Zystozoitien wurden immer auch noch einige unreife Zysten identifiziert (Abbildung 4). Die Zysten färbten sich in der IHC positiv an. In zehn Tieren wurden histologisch keine Zysten nachgewiesen. In 22 Tauben lag eine hochgradige, multifokale, akute bis chronische Rhabdomyositis mit Verlust der Querstreifung, eosinophiles Zytoplasma sowie eine Infiltration mit zahlreichen Makrophagen und wenigen Lymphozyten und heterophilen Granulozyten vor. In einer dieser Tauben (B61.1) wurde ebenfalls eine Myositis festgestellt, ohne dass gleichzeitig Zysten nachgewiesen wurden. In 16 Tauben wurden wenige unreife Zysten im Myokard identifiziert.



**Abbildung 4: Histologischer Schnitt der Skelettmuskulatur von Taube B57.1 an Tag 57 p. i. (MAIER et al., 2015)**

Neben einer reifen Zyste mit länglichen, stark basophilen Zystozoen (m) liegt eine unreife Zyste mit rundlichen, blass basophilen Metrozyten (i); HE-Färbung, Maßstabsbalken: 20 µm

In 22 von 33 Tauben, die von Tag 30 bis 61 p. i. euthanasiert wurden, lag eine granulomatöse Enzephalitis vor. In drei Tauben (B55.1; B55.3; B59.1) wurden hochgradige, mononukleäre, entzündliche Infiltrationen, perivaskuläre Manschetten und eine Gliosis im Gehirn identifiziert (siehe Abbildung 5). Elf Tauben wiesen mittelgradige, entzündliche Läsionen auf und in acht Tauben wurde lediglich eine geringgradige Enzephalitis festgestellt. Bei zwei Tauben (B53.2; B61.1) lag eine geringgradige bzw. mittelgradige Enzephalitis vor, ohne dass gleichzeitig Zysten in der Muskulatur nachgewiesen wurden. In elf Tauben wurde neben der Enzephalitis eine gering- bis mittelgradige, lymphozytäre Myelitis identifiziert.

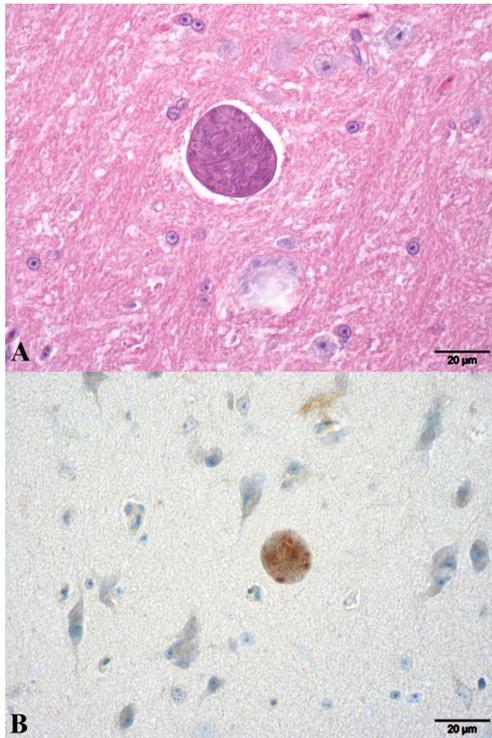


**Abbildung 5: Histologischer Schnitt des Gehirns von Taube B59.1 an Tag 59 p. i. (MAIER et al., 2015)**

Der Schnitt zeigt eine hochgradige, granulomatöse und nekrotisierende Enzephalitis mit lymphohistiozytären, perivaskulären Manschetten und hochgradiger Gliosis; HE-Färbung, Maßstabsbalken: 50 µm

In sieben Tauben (B47.3; B49.1; B49.2; B51.1; B55.1; B55.2; B57.1) wurden Zysten von *S. calchasi* im Gehirn nachgewiesen. Bei zwei Tauben (B49.1; B55.2) erfolgte der Nachweis nur in den für die IHC angefertigten Schnitten, in einer (B51.1) nur im HE-Schnitt. In vier Tauben wurde lediglich eine einzige Zyste identifiziert, in drei Tauben (B49.2; B55.2; B57.1) wurden jeweils zwei Zysten nachgewiesen. Sieben dieser insgesamt zehn Zysten waren im Großhirn lokalisiert, die anderen drei im Kleinhirn. Alle sieben Tauben wiesen eine gering- bis hochgradige, granulomatöse Enzephalitis auf, jedoch war keine der Zysten mit den entzündlichen Veränderungen im ZNS assoziiert. Alle in den IHC-Schnitten festgestellten Zysten wurden mit dem anti-ScB-Antikörper angefärbt (siehe Abbildung 6).

In der Kontrollgruppe (BNK) wurden histologisch und mittels IHC keine Stadien von *S. calchasi* sowie keine entzündlichen Veränderungen nachgewiesen. Die Ergebnisse der histopathologischen Untersuchung sind in Tabelle 10 zusammengefasst.



**Abbildung 6: Histologischer Schnitt des Gehirns von Taube B47.3 an Tag 47 p. i. (MAIER et al., 2015)**

A) Einzelne, reife Zyste ohne entzündliche Reaktion im angrenzenden Neuropil; HE-Färbung, Maßstabsbalken: 20 µm

B) Einzelne Zyste, die immunhistochemisch mit dem anti-ScB-Antikörper angefärbt wurde; Maßstabsbalken: 20 µm

**Tabelle 10:** Ergebnisse der histopathologischen Untersuchung und der PCR der Organe der Tauben des Versuchsteils B

| Tier-nummer | Histopathologie + IHC                        |   |                                      |  | PCR<br><br>(Gehirn/<br>Muskulatur/<br>Leber) |             |
|-------------|--|---|--------------------------------------|--|--|-------------|
|             | Gehirn<br><br>(Zysten/<br>Enze-<br>phalitis) | Skelett-<br>muskulatur<br><br>(Zysten/<br>Myositis) | Herz<br><br>(Zysten/<br>Myokarditis) | Leber<br><br>(Schizon-<br>ten/<br>Hepatitis) |  |             |
| B2          | 1  | - / -   | - / -                                | - / -  | - / -  | neg/neg/neg |
|             | 2  | - / -   | - / -                                | - / -  | - / -  | neg/neg/neg |
|             | 3  | - / -   | - / -                                | - / -  | - / -  | neg/neg/neg |
| B5          | 1  | - / -   | - / -                                | - / -  | - / -  | neg/neg/neg |
|             | 2  | - / -   | - / -                                | - / -  | - / -  | neg/neg/neg |
|             | 3  | - / -   | - / -                                | - / -  | - / -  | neg/neg/neg |
| B10         | 1  | - / -   | - / -                                | - / -  | - / +  | neg/pos/pos |
|             | 2  | - / -   | - / -                                | - / -  | - / -  | neg/neg/neg |
|             | 3  | - / -   | - / -                                | - / -  | + / ++                                       | pos/pos/pos |
| B20         | 1  | - / +   | ++ / +                               | + / -  | - / -  | pos/pos/pos |
|             | 2  | - / +   | + / +++                              | - / -  | - / -  | pos/pos/neg |
|             | 3  | - / -   | + / +                                | - / -  | - / -  | neg/pos/neg |
| B30         | 1  | - / -   | - / -                                | - / -  | - / -  | neg/neg/neg |
|             | 2  | - / +   | +++ / +                              | ++ / +                                       | - / -  | pos/pos/pos |
|             | 3  | - / -   | +++ / +++                            | ++ / -                                       | - / -  | pos/pos/pos |
| B40         | 1  | - / -   | +++ / ++                             | - / -  | - / -  | pos/pos/neg |
|             | 2  | - / -   | +++ / +++                            | ++ / -                                       | - / -  | pos/pos/neg |
|             | 3  | - / -   | ++ / +                               | - / -  | - / -  | pos/pos/pos |
| B45         | 1  | - / +   | +++ / +                              | - / -  | - / -  | pos/pos/pos |
|             | 2  | - / -   | +++ / ++                             | + / +  | - / -  | pos/pos/neg |
|             | 3  | - / +   | +++ / -                              | - / -  | - / -  | pos/pos/neg |
| B47         | 1  | - / +   | +++ / +                              | + / -  | - / -  | pos/pos/pos |
|             | 2  | - / -   | - / -                                | - / -  | - / -  | pos/pos/neg |
|             | 3  | + / +   | +++ / +                              | + / +  | - / -  | pos/pos/neg |

**Fortsetzung von Tabelle 10**

| Tier-<br>nummer | Histopathologie + IHC                    |   |                                  |  | PCR<br><br>(Gehirn/<br>Muskulatur/<br>Leber) |                      |
|-----------------|--|---|----------------------------------|--|--|----------------------|
|                 | Gehirn<br>(Zysten/<br>Enze-<br>phalitis) | Skelett-<br>muskulatur<br>(Zysten/<br>Myositis) | Herz<br>(Zysten/<br>Myokarditis) | Leber<br>(Schizon-<br>ten/<br>Hepatitis) |  |                      |
| B49             | 1  | + / + <sup>#</sup>                              | ++ / -                           | - / -                                    | - / -  | <b>pos/pos/neg</b>   |
|                 | 2  | +* / ++ <sup>#</sup>                            | +++ / ++                         | - / -                                    | - / -  | <b>pos/pos/pos</b>   |
|                 | 3  | - / ++ <sup>#</sup>                             | +++ / +                          | - / -                                    | - / -  | <b>pos/pos/neg</b>   |
| B51             | 1  | + / ++ <sup>#</sup>                             | +++ / ++                         | ++ / -                                   | - / -  | <b>pos/pos/pos</b>   |
|                 | 2  | - / -   | - / -                            | - / -                                    | - / -  | <b>pos/pos/neg</b>   |
|                 | 3  | - / -   | - / -                            | - / -                                    | - / -  | neg/neg/neg          |
| B53             | 1  | - / +   | +++ / +                          | + / -                                    | - / -  | <b>pos/pos/neg</b>   |
|                 | 2  | - / +   | - / -                            | - / -                                    | - / -  | <b>pos/pos/neg</b>   |
|                 | 3  | - / -   | - / -                            | - / -                                    | - / -  | <b>pos/pos/neg</b>   |
| B55             | 1  | + / +++ <sup>#</sup>                            | +++ / ++                         | + / -                                    | - / -  | <b>pos/pos/pos</b>   |
|                 | 2  | - / ++ <sup>#</sup>                             | +++ / +++                        | ++ / -                                   | - / -  | <b>pos/pos/neg</b>   |
|                 | 3  | - / +++ <sup>#</sup>                            | +++ / +                          | + / -                                    | - / -  | <b>pos/pos/pos</b>   |
| B57             | 1  | + / ++ <sup>#</sup>                             | +++ / +                          | + / +                                    | - / -  | <b>pos/pos/pos</b>   |
|                 | 2  | - / -   | +++ / +++                        | - / -                                    | - / -  | <b>pos/pos/neg</b>   |
|                 | 3  | - / ++  | +++ / +                          | - / -                                    | - / -  | <b>pos/pos/neg</b>   |
| B59             | 1  | +* / +++ <sup>#</sup>                           | +++ / +                          | + / -                                    | - / -  | <b>pos/pos/pos</b>   |
|                 | 2  | - / ++ <sup>#</sup>                             | +++ / +                          | + / -                                    | - / -  | <b>pos/pos/pos</b>   |
|                 | 3  | - / -   | - / -                            | - / -                                    | - / -  | neg/ <b>pos</b> /neg |
| B61             | 1  | - / ++  | - / +                            | - / -                                    | - / -  | <b>pos</b> /neg/neg  |
|                 | 2  | - / -   | - / -                            | - / -                                    | - / -  | neg/ <b>pos</b> /neg |
|                 | 3  | - / ++ <sup>#</sup>                             | +++ / ++                         | + / -                                    | - / -  | <b>pos/pos</b> /neg  |
| BNK             | 1  | - / -   | - / -                            | - / -                                    | - / -  | neg/neg/neg          |
|                 | 2  | - / -   | - / -                            | - / -                                    | - / -  | neg/neg/neg          |
|                 | 3  | - / -   | - / -                            | - / -                                    | - / -  | neg/neg/neg          |

Intensität: - = nicht vorhanden, + = geringgradig, ++ = mittelgradig, +++ = hochgradig;

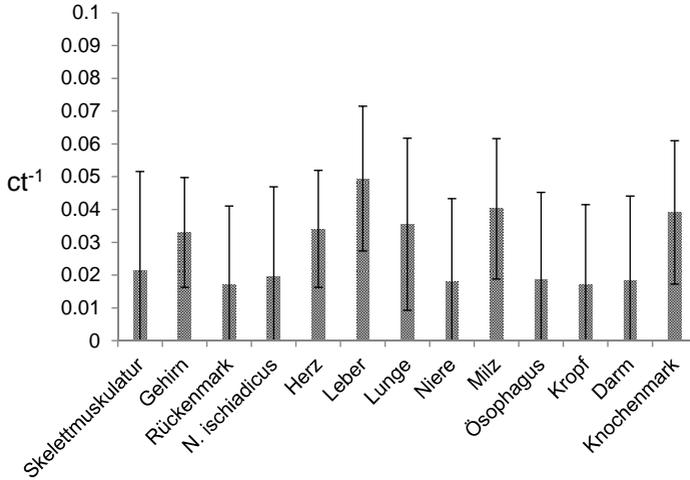
\* = nur in der IHC nachgewiesen; # = außerdem Myelitis; pos = positiv, neg = negativ

#### 4.4.4 Detektion von *S. calchasi*-spezifischer DNA in den Organen

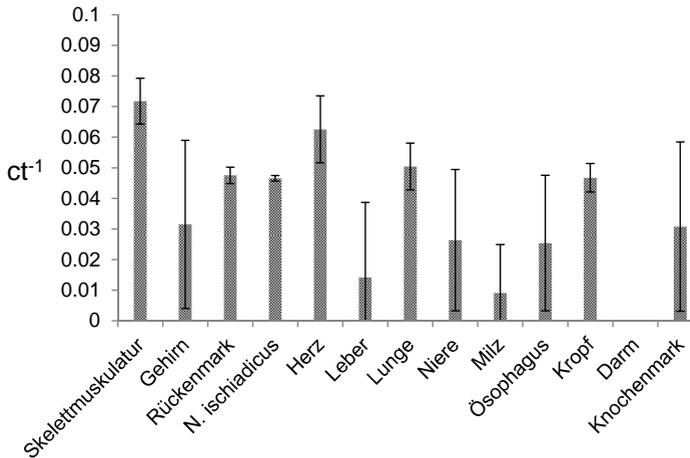
In den Organen der Tauben, die an den Tagen 2 und 5 p. i. euthanasiert wurden (Gruppen B2 und B5), wurde keine spezifische DNA von *S. calchasi* nachgewiesen (untersuchte Organe: Skelettmuskulatur, Gehirn, Rückenmark, *N. ischiadicus*, Herz, Leber, Lunge, Niere, Milz, Ösophagus, Kropf, Darm und Knochenmark).

In der Gruppe B10 (Euthanasie an Tag 10 p. i.) wurde in der Taube mit geringgradigen, makroskopischen und histologischen Veränderungen in der Leber (B10.1) spezifische DNA von *S. calchasi* in insgesamt sechs Organen (Skelettmuskulatur, Herz, Leber, Lunge, Milz, Knochenmark) festgestellt. Von der Taube mit hochgradiger Hepatitis und Schizonten in der Leber (B10.3) wurden alle 13 untersuchten Organe positiv mittels *S. calchasi*-spezifischer Real-time PCR untersucht. Die Organe der dritten Taube der Gruppe B10 (B10.2) blieben in der PCR komplett negativ. Durchschnittlich wurden in der Gruppe B10 die höchsten relativen Mengen an *S. calchasi*-spezifischer DNA in der Leber und der Milz detektiert (siehe Abbildung 7).

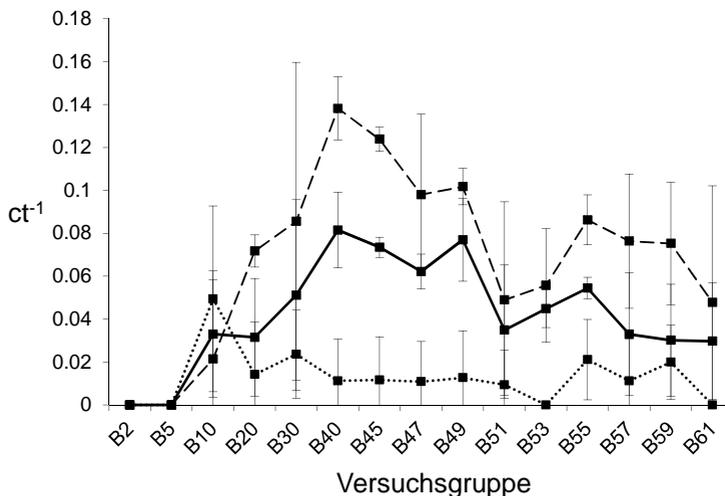
In der Gruppe B20, die an Tag 20 p. i. euthanasiert wurde, erfolgte der Nachweis von *S. calchasi*-spezifischer DNA in allen 13 untersuchten Organen mit Ausnahme des Darms. Die höchsten, relativen DNA-Gehalte wiesen Skelettmuskulatur und Herz auf, in denen gleichzeitig histologisch Zysten von *S. calchasi* nachgewiesen worden waren. Die niedrigsten, gemessenen DNA-Gehalte wurden in Leber und Milz festgestellt (siehe Abbildung 8).



**Abbildung 7:** Versuchsgruppe B10: Durchschnittlicher relativer Gehalt an *S. calchasi*-spezifischer DNA in 13 Organen  
(Balken: Mittelwert; Klammer: Standardabweichung)



**Abbildung 8:** Versuchsgruppe B20: Durchschnittlicher relativer Gehalt an *S. calchasi*-spezifischer DNA in 13 Organen  
(Balken: Mittelwert; Klammer: Standardabweichung)



**Abbildung 9: Durchschnittlicher relativer Gehalt an *S. calchasi*-spezifischer DNA in Skelettmuskulatur, Gehirn und Leber von Tag 2 bis 61 p. i.** (Schwarze Linie: Gehirn; gestrichelte Linie: Skelettmuskulatur; gepunktete Linie: Leber; Klammern: Standardabweichung)

Von Tag 30 - 61 p. i. wurde spezifische DNA von *S. calchasi* in Skelettmuskulatur, Leber und Gehirn bei 31 von insgesamt 33 Tauben festgestellt. Lediglich in zwei Tauben (B30.1; B51.3) wurde in allen drei Organen keine *S. calchasi*-spezifische DNA detektiert. Acht Tauben, in denen keine Zysten von *S. calchasi* in der histopathologischen Untersuchung und mittels IHC nachgewiesen wurden, waren in wenigstens einem der drei untersuchten Organe positiv in der PCR (siehe Tabelle 10). Der relative DNA-Gehalt in Skelettmuskulatur und Gehirn nahm bis zum 40. Tag p. i. zu und danach wieder ab. In der Leber wurden die höchsten relativen DNA-Gehalte an Tag 10 p. i. festgestellt. Anschließend lagen sie deutlich unter denen in Skelettmuskulatur und Gehirn. Im gesamten Versuchsverlauf waren die relativen DNA-Gehalte in der Skelettmuskulatur stets höher als in Gehirn und Leber mit Ausnahme der Gruppe B10 (siehe Abbildung 9).

Zusammenfassend ergab sich, dass die Lokalisation von *S. calchasi* im Körper der Tauben an den Tagen 2 und 5 p. i. nicht bestimmt werden konnte. An Tag 10 p. i. wurden Schizonten in der Leber einer Taube nachgewiesen, was mit dem Auftreten klinischer Symptomatik in der akuten Phase von PPE einherging. Ab Tag 20 p. i. traten unreife Zysten in der Skelettmuskulatur und dem Myokard auf. Parallel hierzu wurde eine geringgradige Enzephalitis bestehend aus perivaskulären, lymphozytären Manschetten und einer geringgradigen Gliosis festgestellt. Ab Tag 30 p. i. lagen hauptsächlich reife Zysten neben bis zum Versuchsende weiterhin vorhandenen unreifen Zysten in der quergestreiften Muskulatur vor. Ab Tag 49 p. i. wurde eine Zunahme des Grades der Enzephalitis festgestellt. Parallel hierzu kam es ab Tag 47 p. i. zu klinischen, neurologischen Symptomen im Rahmen der chronischen Phase der Erkrankung. *Sarcocystis calchasi*-spezifische DNA wurde ab Tag 10 p. i. in deutlich mehr Organen bzw. Tauben festgestellt als parasitäre Stadien mittels histologischer Nachweismethoden.

## **4.5 Versuchsteil C – Versuch zur Klärung der Infektiösität und Pathogenität von *S. calchasi* für Nymphensittiche**

### **4.5.1 Klinische Befunde an den Nymphensittichen**

Von Tag 7 bis 18 p. i. zeigten die inokulierten Nymphensittiche in unterschiedlichen Schweregraden Apathie, aufgeplustertes Gefieder und Polyurie mit teilweise gelblichem Harnsäureanteil. An Tag 7 p. i. verstarb der Nymphensittich C1.2 (Infektionsdosis:  $3 \times 10^6$  Sporozysten) ohne vorherige Symptomatik. An Tag 10 p. i. zeigte der Nymphensittich C3.2 ( $10^5$  Sporozysten) aufgeplustertes Gefieder und eine geringgradige Polyurie und verstarb am nächsten Tag. Am selben Tag entwickelte der Nymphensittich C4.1 ( $10^2$  Sporozysten) eine hochgradige Apathie, saß auf dem Käfigboden und zeigte eine geringgradige Polyurie. Aus ethischen Gründen wurde dieser Nymphensittich zu diesem Zeitpunkt euthanasiert. Alle weiteren Nymphensittiche erholten sich wieder und waren anschließend klinisch unauffällig.

Von Tag 57 p. i. an zeigte der Nymphensittich C4.2 ( $10^2$  Sporozysten) eine hochgradige Ataxie, Torticollis und Tremor. Er befand sich dauerhaft in Brustlage und wurde noch am selben Tag euthanasiert. An Tag 63 p. i. zeigten der Nymphensittich C2.1 eine geringgradige Kopfschiefhaltung und der Nymphensittich C2.2 (beide:  $10^6$  Sporozysten) eine geringgradige Ataxie. Beide Nymphensittiche wiesen eine geringere Fluchtdistanz bei Annäherung mit der Hand auf. Der Nymphensittich C2.1 wurde am Tag 64 p. i. euthanasiert. Der Nymphensittich C2.2 behielt die geringgradige Ataxie bis zum Versuchsende an Tag 76 p. i. bei, an dem er gemeinsam mit den anderen verbliebenen Nymphensittichen (C1.1; C3.1; CNK1; CNK2), die keine neurologischen Symptome gezeigt hatten, euthanasiert wurde. Die Kontrolltiere (Gruppe CNK1 und CNK2) zeigten zu keinem Zeitpunkt des Versuchs eine klinische Symptomatik. Die Ausprägung der klinischen Symptome der Nymphensittiche ist in Tabelle 11 dargestellt.

**Tabelle 11:** Ausprägung der klinischen Phasen der Erkrankung bei den Nymphensittichen des Versuchsteils C

| Tier-nummer | Infektionsdosis<br>(Sporozysten/<br>Tier) | Verstorben*/<br>Euthanasie<br>(Tag p. i.) | Akute Phase<br>(Apathie,<br>Polyurie) | Chronische<br>Phase<br>(ZNS-<br>Symptome) |
|-------------|---|---|---------------------------------------|---|
| C1.1        | 3 Mio.                                    | 76  | ++                                    | -   |
| C1.2        | 3 Mio.                                    | 7*  | +++                                   | /   |
| C2.1        | 100.000                                   | 64  | ++                                    | +   |
| C2.2        | 100.000                                   | 76  | ++                                    | +   |
| C3.1        | 10.000                                    | 76  | +                                     | -   |
| C3.2        | 10.000                                    | 11*                                       | +++                                   | /   |
| C4.1        | 100                                       | 11  | +++                                   | /   |
| C4.2        | 100                                       | 57  | +                                     | +++                                       |
| CNK1        | 0 (H <sub>2</sub> O)                      | 76  | -                                     | -   |
| CNK2.1      | 0 (Filtrat)                               | 76  | -                                     | -   |
| CNK2.2      | 0 (Filtrat)                               | 76  | -                                     | -   |

- = keine Symptome; + = geringgradige Symptomatik (Apathie, Polyurie bzw. ZNS-Symptome); ++ = mittelgradige Symptomatik; +++ = hochgradige Symptomatik; / = entfällt, da bereits verstorben/euthanasiert; \* = verstorben

#### 4.5.2 Pathologisch-anatomische Veränderungen an den Organen

Bei den während der akuten Phase euthanasierten bzw. verstorbenen Nymphensittichen (C1.2; C3.2; C4.1) wurde eine mittelgradig vergrößerte Leber mit multifokalen bis konfluierenden, gelblichen Herden und eine mittel- bis hochgradig vergrößerte Milz festgestellt. Der mit hochgradiger neurologischer Symptomatik an Tag 57 p. i. euthanasierte Nymphensittich wies Hämatome im Bereich der *Carina sterni* und an der Schädelkalotte auf. Die weiteren inokulierten Nymphensittiche wiesen eine gering- bis hochgradig vergrößerte Milz auf. Bei den Kontrolltieren (CNK1 und CNK2) wurden keine makroskopischen Veränderungen an den Organen nachgewiesen. In der bakteriologischen Untersuchung von Herzblut, Leber und

Lunge wurde kein aerobes Keimwachstum festgestellt und es wurden keine parasitären Stadien in den Darmabstrichen nachgewiesen.

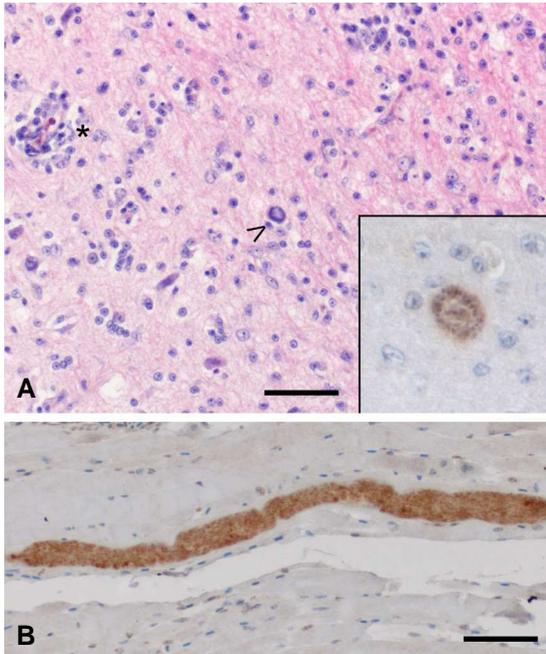
#### **4.5.3 Histopathologische und immunhistochemische Befunde an den Organen**

Die während der akuten Phase euthanasierten bzw. verstorbenen Nymphensittiche (C1.2; C3.2; C4.1) wiesen eine mittel- bis hochgradige, lymphohistiozytäre und nekrotisierende Hepatitis sowie eine gering- bis mittelgradige Splenitis auf. In Leber und Milz wurden in geringen Mengen Schizonten nachgewiesen, die bei der IHC durch den anti-ScB-Antikörper angefärbt wurden. In dem an Tag 7 p. i. perakut verstorbenen Nymphensittich (C1.2) wurde außerdem eine hochgradige Enteritis festgestellt.

Der an Tag 57 p. i. mit hochgradiger neurologischer Symptomatik euthanasierte Nymphensittich (C4.2) zeigte einen mittelgradigen Befall der Skelettmuskulatur mit Zysten und eine mittelgradige, lymphohistiozytäre und nekrotisierende Meningoenzephalitis mit Gliosis. Innerhalb der neuralen Läsionen wurden Schizonten nachgewiesen, die ebenso wie die Zysten in der Muskulatur durch den anti-ScB-Antikörper angefärbt wurden (siehe Abbildung 10).

Alle weiteren inokulierten Nymphensittiche wiesen einen minimalen bis mittelgradigen Befall an Zysten in der Skelettmuskulatur auf, die außer bei dem Nymphensittich mit mittelgradigem Zystenbefall (C3.1) von einer geringgradigen Myositis begleitet wurden. Im Myokard wurden keine Zysten nachgewiesen. Alle Zysten in der Skelettmuskulatur wurden in der IHC positiv angefärbt. Alle Tiere zeigten eine lymphohistiozytäre, nekrotisierende Enzephalitis und Gliosis, die bei den Tieren mit minimalem Zystengehalt in der Skelettmuskulatur (C2.1; C2.2) hochgradig, bei den anderen mittelgradig ausgeprägt waren. Es wurden weder Schizonten, noch Zysten in den Gehirnen dieser Tiere nachgewiesen. Ein Nymphensittich (C3.1) zeigte außerdem eine mittelgradige Myelitis.

Bei den Kontrolltieren wurden keine histopathologischen Veränderungen an den Organen festgestellt. Es wurden bei ihnen keine Stadien von Sarkozysten identifiziert. Die Befunde der histopathologischen Untersuchung sind in Tabelle 12 zusammengefasst.



**Abbildung 10:** Histologische Schnitte des Gehirns (A) und der Skelettmuskulatur (B) des Nymphensittichs C4.2 an Tag 57 p. i. (OLIAS et al., 2014)

A) Lymphohistiozytäre, nekrotisierende Enzephalitis mit Schizont (Pfeilspitze) nahe eines zerebralen Gefäßes mit perivaskulärer Lymphozytenmanschette (Stern); HE-Färbung, Maßstabsbalken: 50 µm

Kleines Bild: Schizont mit rosettenartig angeordneten Merozoiten, immunhistochemisch mit dem anti-ScB-Antikörper markiert

B) Längsschnitt einer Zyste in der Skelettmuskulatur, immunhistochemisch mit dem anti-ScB-Antikörper markiert; Maßstabsbalken: 50 µm

**Tabelle 12:** Ergebnisse der histopathologischen Untersuchung und der PCR der Organe der Nymphensittiche der Versuchsgruppe C

| Tier-nr. | Infektionsdosis (Sporozysten/Tier) | Probenahme (Tag p. l.) | Leber          |      | Milz           |      | Lunge |      | Darm           |      | Skelettmuskulatur |      |           | Gehirn       |      |  |
|----------|------------------------------------|------------------------|----------------|------|----------------|------|-------|------|----------------|------|-------------------|------|-----------|--------------|------|--|
|          |                                    |                        | Sch./Hepatitis | PCR  | Sch./Splenitis | PCR  | Sch.  | PCR  | Sch./Enteritis | PCR  | Zys./Myositis     | PCR  | Sch./Zys. | Enzephalitis | PCR  |  |
| C1.1     | 3 Mio.                             | 76                     | - / -          | neg. | - / -          | pos. | -     | neg. | - / -          | neg. | - / -             | pos. | - / -     | ++           | neg. |  |
| C1.2     | 3 Mio.                             | 7                      | ++ / ++        | pos. | ++ / +         | pos. | -     | pos. | - / +++        | pos. | - / -             | pos. | - / -     | -            | pos. |  |
| C2.1     | 100.000                            | 64                     | - / -          | neg. | - / -          | neg. | -     | neg. | - / -          | neg. | - / -             | pos. | - / -     | +++          | pos. |  |
| C2.2     | 100.000                            | 76                     | - / -          | neg. | - / -          | neg. | -     | neg. | - / -          | neg. | - / -             | pos. | - / -     | +++          | pos. |  |
| C3.1     | 10.000                             | 76                     | - / -          | neg. | - / -          | neg. | -     | neg. | - / -          | pos. | - / -             | pos. | - / -     | ++           | pos. |  |
| C3.2     | 10.000                             | 11                     | ++ / +++       | pos. | ++ / +         | pos. | -     | pos. | - / -          | pos. | - / -             | pos. | - / -     | -            | pos. |  |
| C4.1     | 100                                | 11                     | ++ / +++       | pos. | n. u.          | pos. | -     | pos. | - / -          | pos. | - / -             | pos. | - / -     | -            | pos. |  |
| C4.2     | 100                                | 57                     | - / -          | pos. | - / -          | neg. | -     | pos. | - / -          | pos. | - / -             | pos. | + / -     | ++           | pos. |  |
| CNK 1    | 0 (H <sub>2</sub> O)               | 76                     | - / -          | neg. | - / -          | neg. | -     | neg. | - / -          | neg. | - / -             | neg. | - / -     | -            | neg. |  |
| CNK 2.1  | 0 (Filtrat)                        | 76                     | - / -          | neg. | - / -          | neg. | -     | neg. | - / -          | neg. | - / -             | neg. | - / -     | -            | neg. |  |
| CNK 2.2  | 0 (Filtrat)                        | 76                     | - / -          | neg. | - / -          | neg. | -     | neg. | - / -          | neg. | - / -             | neg. | - / -     | -            | neg. |  |

Sch. = Schizonten, Zys. = Zysten; Intensität: - = nicht vorhanden, + = geringgradig, ++ = mittelgradig, +++ = hochgradig; n. u. = nicht untersucht; pos. = positiv, neg. = negativ

#### 4.5.4 Detektion von *S. calchasi*-spezifischer DNA in den Organen

Spezifische DNA von *S. calchasi* wurde in der Skelettmuskulatur aller inokulierten Nymphensittiche sowie in allen Organen detektiert, in denen bereits der mikroskopische Nachweis von Stadien von *S. calchasi* erfolgt war (Leber und Milz der in der akuten Phase verstorbenen bzw. euthanasierten Nymphensittiche C1.2, C3.2, C4.1 und Gehirn des in der chronischen Phase euthanasierten Nymphensittichs C4.2). Bei den Nymphensittichen, bei denen eine Enzephalitis vorlag (C1.1, C2.1, C2.2, C3.1, C4.2), wurde mit Ausnahme von C1.1 *S. calchasi*-spezifische DNA im Gehirn nachgewiesen. Insgesamt wurde in 20 Organen (je 1 x Leber und Milz, 3 x Skelettmuskulatur, 4 x Lunge, 5 x Darm und 6 x Gehirn) spezifische DNA von *S. calchasi* detektiert, ohne dass gleichzeitig ein mikroskopischer Nachweis von *S. calchasi* erfolgte. Die Befunde der Untersuchung der Organe mittels *S. calchasi*-spezifischer semi-nested PCR sind in Tabelle 12 dargestellt.

Zusammenfassend zeigten die Nymphensittiche eine klinische Erkrankung, die hinsichtlich ihres Verlaufs (biphasisch) und der auftretenden Symptomatik vergleichbar mit der PPE der Tauben war. Eine wie bei den Tauben vorhandene Dosisabhängigkeit der auftretenden klinischen Phasen konnte jedoch nicht festgestellt werden.

## 4.6 Versuchsteil D – Behandlungsversuch einer *S. calchasi*-Infektion bei Tauben mit Toltrazuril

### 4.6.1 Klinische Befunde an den Tauben

Die Tauben aller drei Gruppen (D1-D3) zeigten einen biphasischen Krankheitsverlauf. Die Zeitpunkte und Ausprägung der einzelnen Phasen sind in Tabelle 13 dargestellt.

In der **Gruppe D1** (behandelt mit Toltrazuril an den Tagen 10 und 11 p. i.) traten von Tag 10 bis 17 p. i. Apathie, aufgeplustertes Gefieder und Polyurie mit teilweise gelblichem Harnsäureanteil auf. Die Tiere blieben daraufhin symptomfrei, bis von Tag 50 bis 55 p. i. eine leichte Ataxie auftrat.

Die Tauben der **Gruppe D2** (behandelt mit Toltrazuril an den Tagen 40 und 41 p. i.) zeigten ebenfalls eine akute Phase mit Apathie und Polyurie von Tag 10 bis 17 p. i. sowie eine chronische Phase von Tag 50 bis 55 p. i. mit leichten Ataxien. Bei der Taube D2.1 entwickelte sich ab Tag 67 p. i. bis zum Versuchsende eine mittelgradige Ataxie und eine Entlastung des linken Ständers.

Die **Gruppe D3** (behandelt mit Toltrazuril bei Eintreten der neurologischen Symptome an zwei aufeinander folgenden Tagen) wies zeitgleich mit den Tauben der anderen Gruppen eine akute Phase von Tag 10 bis 17 p. i. auf. An Tag 49 p. i. trat zunächst bei der Taube D3.1 eine mittelgradige Ataxie auf, die bis zum Ende des Versuchs erhalten blieb. Die Taube D3.2 zeigte an Tag 50 p. i. zunächst eine leichte Ataxie, die ab Tag 51 p. i. mittelgradig ausgeprägt war, bevor sie ab Tag 67 p. i. bis zum Versuchsende wieder eine geringgradige Intensität aufwies. Bei der Taube D3.3 nahm die Intensität der Ataxie, beginnend ab Tag 50 p. i., stetig bis zu einer hochgradigen Ausprägung zu, die bis zum Versuchsende unverändert blieb. Die Behandlung mit Toltrazuril erfolgte an den Tagen 50 und 51 p. i. (D3.1) bzw. 51 und 52 p. i. (D3.2 und D3.3).

Die inokulierten Tauben des Versuchsteils B, die als Positivkontrolle für diesen Versuchsteil dienten, zeigten vergleichbar zu den Gruppen D1 bis

D3 von Tag 10 bis 13 p. i. die akute Phase der PPE. Von Tag 47 p. i. bis zum Versuchsende traten leichte bis mittelgradige Ataxien auf (siehe auch Kap. 4.4.1). Die Tauben der Negativkontrollgruppe des Versuchsteils B, die gleichzeitig auch als Negativkontrolle für den Versuchsteil D dienten, zeigten zu keinem Zeitpunkt nach der Infektion klinische Symptomatik.

**Tabelle 13: Klinische Befunde an den Tauben des Versuchsteils D**

| Tier-nummer |   | Behandlung mit Toltrazuril (Tage p. i.) | Tötungszeitpunkt (Tag p. i.) | Akute Phase (Apathie, Polyurie) (Tage p. i.) | Chronische Phase (ZNS-Symptome) (Tage p. i. (Intensität)) |
|-------------|---|---|------------------------------|--|---|
| D1          | 1 | 10 und 11                               | 73                           | 10 - 17                                      | 50 - 55<br>(geringgradig)                                 |
|             | 2 |   |                              |  |   |
|             | 3 |   |                              |  |   |
| D2          | 1 | 40 und 41                               | 73                           | 10 - 17                                      | 50 - 73<br>(mittelgradig)                                 |
|             | 2 |   |                              |  | 50 - 55<br>(geringgradig)                                 |
|             | 3 |   |                              |  |   |
| D3          | 1 | 50 und 51                               | 73                           | 10 - 17                                      | 49 - 73<br>(mittelgradig)                                 |
|             | 2 | 51 und 52                               |                              |  | 50 - 73<br>(gering- bis mittelgradig)                     |
|             | 3 |   |                              |  | 50 - 73<br>(gering- bis hochgradig)                       |

#### 4.6.2 Pathologisch-anatomische Veränderungen an den Organen

Makroskopisch wiesen die Organe der Tauben ebenso wie bei den während der chronischen Phase der PPE untersuchten Tauben des Versuchsteils B keine wesentlichen Veränderungen auf. Bei vier Tauben (D1.1; D2.1; D2.2; D3.1) lag eine geringgradig vergrößerte Milz vor. In der bakteriologischen Untersuchung von Herzblut, Leber und Lunge wurde kein aerobes Keimwachstum festgestellt und in der Untersuchung der Darmabstriche wurden keine parasitären Stadien nachgewiesen.

### 4.6.3 Histopathologische Befunde an Organen

In der histopathologischen Untersuchung wurden in der Skelettmuskulatur aller Tauben Zysten nachgewiesen, bei den Tauben D1.3 und D3.3 in geringer Menge und bei der Taube D1.1 in mittlerer Menge. Bei den restlichen Tauben wurde ein hochgradiger Befall mit Zysten in der Skelettmuskulatur identifiziert. Es wurden außerdem Zysten im Myokard festgestellt. In allen Tauben wurde eine granulomatöse und nekrotisierende Enzephalitis nachgewiesen, die bei den Tauben D1.2, D2.1 und D3.2 von mittlerer Intensität, bei den übrigen Tauben nur geringgradig ausgeprägt war. In drei Tauben (D1.2; D2.1; D3.3) lag außerdem eine geringgradige Myelitis vor. Unterschiede zu den während der chronischen Phase der PPE getöteten Tauben des Versuchsteils B konnten nicht festgestellt werden. Die Befunde der histopathologischen Untersuchung sind in Tabelle 14 dargestellt.

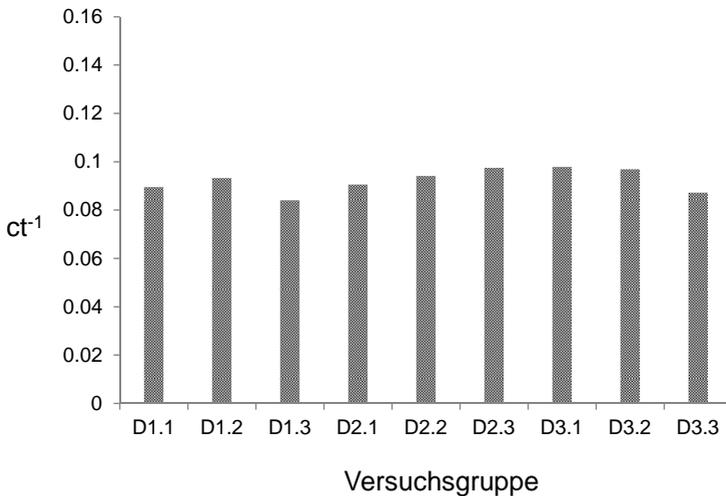
**Tabelle 14: Ergebnisse der histopathologischen Untersuchung und der PCR der Organe der Tauben des Versuchsteils D**

| Tier-<br>num-<br>mer | Behand-<br>lung mit<br>Toltra-<br>zuril<br><br>(Tage p. i.) | Histopathologie                    |                  |                               |                               | PCR<br>(Skelett-<br>muskulatur) |      |
|----------------------|---|------------------------------------|------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|------|
|                      |   | Skelett-<br>muskulatur<br>(Zysten) | Herz<br>(Zysten) | Gehirn<br>(Enze-<br>phalitis) | Rücken-<br>mark<br>(Myelitis) |                                 |      |
| D1                   | 1   | 10 und 11                          | ++               | -                             | +                             | -                               | pos. |
|                      | 2   |                                    | +++              | +                             | ++                            | +                               | pos. |
|                      | 3   |                                    | +                | -                             | +                             | -                               | pos. |
| D2                   | 1   | 40 und 41                          | +++              | +                             | ++                            | +                               | pos. |
|                      | 2   |                                    | +++              | +                             | +                             | -                               | pos. |
|                      | 3   |                                    | +++              | +                             | +                             | -                               | pos. |
| D3                   | 1   | 50 und 51                          | +++              | +                             | +                             | -                               | pos. |
|                      | 2   | 51 und 52                          | +++              | +                             | ++                            | -                               | pos. |
|                      | 3   |                                    | +                | -                             | +                             | +                               | pos. |

Intensität: - = nicht vorhanden, + = geringgradig, ++ = mittelgradig, +++ = hochgradig;  
pos. = positiv

#### 4.6.4 Detektion von *S. calchasi*-spezifischer DNA in der Muskulatur

In der Muskulatur aller Tauben wurde *S. calchasi*-spezifische DNA nachgewiesen (siehe auch Tabelle 14). Hinsichtlich des relativen Gehalts der DNA wurde kein Unterschied zwischen den Tauben der unterschiedlichen Behandlungsgruppen festgestellt (siehe Abbildung 11). Die einzelnen ct-Werte rangierten zwischen 10,21 und 11,88. Im Vergleich hierzu lag der mittlere ct-Wert in der Muskulatur der Tauben des Versuchsteils B ab Tag 20 p. i. (erstes Auftreten von Sarkozysten) bei 12,86.



**Abbildung 11:** Relativer Gehalt an *S. calchasi*-spezifischer DNA in der Skelettmuskulatur der Tauben des Versuchsteils D

Zusammenfassend konnten keine deutlichen Unterschiede zwischen den drei Behandlungsgruppen sowie zu den Tauben des Versuchsteils B festgestellt werden. Alle mit Toltrazuril behandelten Gruppen zeigten einen biphasischen Krankheitsverlauf mit Apathie und Polyurie in der akuten Phase und neurologischen Symptomen in der chronischen Phase. Tendenziell zeigten die Tauben der Gruppe 3 (behandelt bei Einsetzen der ZNS-Symptome) eine stärker ausgeprägte neurologische Symptomatik. Hinsichtlich der histopathologischen Veränderungen, des Zystenbefalls und des relativen Gehalts an *S. calchasi*-spezifischer DNA wurden jedoch keine Unterschiede zwischen den Gruppen und zum Versuchsteil B festgestellt.

## 5 DISKUSSION

Die Ziele der vorliegenden Arbeit bestanden in der Untersuchung der Entwicklung von *S. calchasi* im Zwischenwirt unter besonderer Berücksichtigung von Hinweisen auf die Pathogenese der durch *S. calchasi* verursachten Enzephalitis sowie des Zwischenwirtsspektrums von *S. calchasi* und potentieller therapeutischer Maßnahmen. Hierfür wurde die Lokalisation von *S. calchasi* in der Taube zu verschiedenen Zeitpunkten nach experimenteller Infektion bestimmt. Der Schwerpunkt lag dabei auf der durch neurologische Symptomatik gekennzeichneten chronischen Phase der Erkrankung. Als alternative Zwischenwirte wurden Nymphensittiche als Vertreter der Ordnung Psittaciformes experimentell mit Sporozysten von *S. calchasi* infiziert. Als mögliche Therapiemaßnahme der Pigeon Protozoal Encephalitis in Tauben sollte die Eignung von Toltrazuril zu verschiedenen Zeitpunkten nach experimenteller Infektion untersucht werden.

Der Vergleich von mikroskopischen Methoden (histopathologische und immunhistochemische Untersuchung) mit der *S. calchasi*-spezifischen semi-nested Real-time PCR zeigte, dass bei letzterer deutlich häufiger positive Ergebnisse auftraten. Neun Tauben, bei denen keine Stadien von *S. calchasi* in der histopathologischen Untersuchung und der IHC nachgewiesen werden konnten, waren mittels der PCR in wenigstens einem der getesteten Organe positiv, d. h., nur in 75 % der 36 in der PCR positiv getesteten Tauben wurde auch mittels histologischer Methoden *S. calchasi* nachgewiesen. In zwei Tauben an Tag 10 p. i. und allen drei Tauben an Tag 20 p. i. wurde *S. calchasi*-spezifische DNA in nahezu allen Organen nachgewiesen, obwohl Schizonten nur in der Leber einer Taube an Tag 10 p. i. und Zysten nur in Skelettmuskulatur und Herz von den drei Tauben an Tag 20 p. i. histologisch nachgewiesen worden waren. Auch bei den Nymphensittichen gelang nur in 12 von 30 Organen (40 %), in denen DNA von *S. calchasi* nachgewiesen worden war, gleichzeitig der histologische Nachweis. Ähnliches konnte bei der Bewertung einer

Multiplex Real-time PCR für verschiedene Sarkozysten des Rindes beobachtet werden (MORÉ et al., 2013). Die höhere Sensitivität der PCR gegenüber der mikroskopischen Untersuchung von homogenisierten Muskelpräparaten wurde u. a. mit dem Übersehen kleiner Parasitenstadien bei der mikroskopischen Auswertung erklärt (MORÉ et al., 2013). In Studien mit anderen protozoären Parasiten wurde eine höhere Sensitivität von verschiedenen PCR-Methoden gegenüber der mikroskopischen Identifizierung von *Plasmodium falciparum* in Blutausstrichen festgestellt. Als Gründe hierfür wurden das Vorliegen vielfältiger Kopien des Zielgens, mehrkernige Schizonten sowie aus zerstörten Zellen freigesetzte Parasiten-DNA diskutiert (MALHOTRA et al., 2005). MARY et al. (2006) vermuteten für die höhere Sensitivität einer quantitativen *Leishmania infantum*-PCR die Persistenz der parasitären DNA in – teilweise im Blut zirkulierenden – phagozytären Zellen, die somit zu positiven PCR-Ergebnissen ohne das gleichzeitige Vorliegen eines intakten parasitären Entwicklungsstadiums führen. Diese Hypothesen können – zumindest teilweise – auch für die *S. calchasi*-spezifische Real-time PCR zutreffend sein. Bei der Wahl des Diagnostikums für eine Infektion mit *S. calchasi* erscheint die PCR den histologischen Methoden deutlich überlegen, da selbst kleine Mengen an *S. calchasi*-spezifischer DNA nachgewiesen werden können.

Als untere Nachweisgrenze wurde für die semi-nested Real-time PCR eine DNA-Konzentration von 32 fg/µl bestimmt. Bei der mikroskopischen Untersuchung konnte hingegen gezeigt werden, dass bereits die Untersuchung eines nur wenige Mikrometer entfernten Schnittes zu unterschiedlichen Ergebnissen führen kann. Eine Taube, in der im HE-gefärbten Schnittpräparat eine Zyste nachgewiesen wurde, war negativ in der IHC, während bei zwei Tauben, in deren Gehirnen immunhistochemisch Zysten nachgewiesen wurden, keine Zysten im HE-Präparat identifiziert werden konnten. Auch hinsichtlich der Spezifität scheint die PCR einen Vorteil gegenüber der Histologie und IHC zu haben, da die DNA drei weiterer, teilweise sehr nah verwandter Sarkozystenspezies negativ getestet wurde [*S. falcatula*, *S. columbae* (OLIAS et al., 2010c),

*S. turdusi* (KUTKIENE et al., 2012a)]. Für mehrere immunhistochemische Verfahren mit polyklonalen Antikörpern hingegen konnte bei anderen Sarkozystenspezies gezeigt werden, dass diese nur wenig spezies-spezifisch sind (JEFFREY et al., 1988, TENTER, 1995, WÜNSCHMANN et al., 2010). Dennoch bleiben Histologie und IHC weiterhin wertvolle Verfahren, um das aktuelle Vorliegen von *S. calchasi*-Zysten in der Muskulatur bewerten und somit eine echte Infektion von im Blutkreislauf zirkulierender DNA abgrenzen zu können.

Im Vorversuch zur Bestimmung der für die folgenden Versuche geeigneten Infektionsdosis wurde gezeigt, dass bereits eine Dosis von 1.000 Sporozysten pro Tier zu einem tödlichen Verlauf während der akuten Phase führt. Da bei früheren experimentellen Infektionen mit demselben *S. calchasi*-Stamm diese Dosierung lediglich zu einer moderaten klinischen Symptomatik während der akuten Phase von PPE geführt hatte (OLIAS et al., 2010a), belegt dies eine Steigerung der Virulenz der Sporozysten von *S. calchasi* während der Lagerung in einer wässrigen Suspension bei 4 °C. In Studien zur Langzeitlagerung von *S. neurona*-Sporozysten wurde hingegen bei gleicher Lagerung eine Abnahme der Infektiösität und Virulenz beobachtet (ELSHEIKHA et al., 2004).

Um zu gewährleisten, dass die Tauben im Hauptversuch nicht bereits während der akuten Phase versterben, wurde mit 200 Sporozysten pro Tier eine sehr niedrige Infektionsdosis gewählt. Hierbei sollte sichergestellt werden, dass auch eine weitere Zunahme der Virulenz sowie die gewisse Variabilität der Sporozystenzahlen in den Infektionsdosen nicht zur Applikation einer letalen Dosis führen. Da die zuvor im Hauptversuch mit 200 Sporozysten infizierten Tauben nur eine sehr milde ausgeprägte Symptomatik während der akuten Phase entwickelt hatten, wurde für den Behandlungsversuch eine Infektionsdosis von 400 Sporozysten pro Tier gewählt. Hiermit wurden deutliche klinische Symptome erzielt, die eine eindeutige Indikation für eine Behandlung der Tiere ergeben.

Nach experimenteller Infektion von 45 Tauben mit Sporozysten von *S. calchasi* konnte das bereits in früheren Studien beobachtete biphasische Krankheitsbild der PPE reproduziert werden (OLIAS et al., 2010a). Die Tauben zeigten von Tag 10 bis 13 p. i. eine akute Phase mit unspezifischer Allgemeinsymptomatik (Apathie, aufgeplustertes Gefieder). Nach einer asymptomatischen Phase setzten an Tag 47 p. i. neurologische Symptome (v. a. Ataxie) ein. Resultierend hieraus ergibt sich, dass die Tauben erfolgreich mit *S. calchasi* infiziert wurden.

An den Tagen 2 und 5 p. i. wurde *S. calchasi* in den untersuchten Organen der Tauben weder mit histologischen Methoden, noch mittels PCR nachgewiesen. Vergleichbare Studien mit *S. neurona* in Ponys bzw. Waschbären konnten belegen, dass der Parasit bereits ab dem ersten Tag nach Inokulation im Gewebe des Fehlwirts bzw. Zwischenwirts nachweisbar ist. ELITSUR et al. (2007) konnten zu diesem Zeitpunkt bereits *S. neurona* aus den Mesenteriallymphknoten infizierter Ponys mittels Bioassay in Knock-out Mäusen isolieren. Ein histologischer Nachweis von *S. neurona* konnte jedoch auch bis zum Ende der Studie an Tag 9 p. i. nicht erbracht werden. Im Darm experimentell infizierter Waschbären wurden ab Tag 1 p. i. einzelne Zoitzen von *S. neurona* mittels Histologie und IHC nachgewiesen, jedoch traten Schizonten erst an Tag 7 p. i. auf (STANEK et al., 2002). Weiterhin liegt die untere Nachweisgrenze der *S. calchasi*-spezifischen Real-Time PCR (32 fg DNA/ $\mu$ l) relativ hoch im Vergleich zur unteren Nachweisgrenze einer für Sarkozysten des Rindes entwickelten PCR, die mit 0,0125 bis 0,125 fg plasmider DNA angegeben wird (MORÉ et al., 2013). Rückschließend kann für die Infektion mit *S. calchasi* vermutet werden, dass an den Tagen 2 und 5 p. i. die asexuelle Vermehrung durch Schizogonie entweder noch nicht oder zumindest nicht in ausreichendem Maße stattgefunden hat. Der Nachweis einzelner wandernder Zoitzen im Darm während dieser frühen Phase der Infektion kann insbesondere bei niedrigen Infektionsdosen schwierig sein. Verglichen mit der vorliegenden Studie waren die Infektionsdosen in den beiden vorgenannten Studien mit *S. neurona* deutlich höher. Die Ponys

wurden nach Schätzung der durchschnittlichen Körpergewichte mit einer Dosis von ca. 600.000 Sporozysten/kg KGW (ELITSUR et al., 2007) und die Waschbären mit ca. 800.000 Sporozysten/kg KGW (STANEK et al., 2002) infiziert. Im Vergleich hierzu wurden die Tauben, deren durchschnittliches Körpergewicht bei ca. 500 g lag, mit 400 Sporozysten/kg KGW (entsprechend 200 Sporozysten pro Tier) infiziert. Konsequenterweise muss daher in Betracht gezogen werden, dass eine niedrige Parasitenlast während der frühen Phase der Infektion leicht die Nachweisgrenze der diagnostischen Tests unterschreiten kann, was in diesem Fall vermutlich geschehen ist, da mit Ausnahme von drei Tauben *S. calchasi* in allen zu späteren Zeitpunkten untersuchten Tauben nachgewiesen werden konnte.

An Tag 10 p. i. wurden in einer von drei Tauben eine geringe Anzahl an Schizonten in der Leber sowie eine nekrotisierende Hepatitis festgestellt. Obwohl in einer weiteren Taube an diesem Tag eine Hepatitis und DNA von *S. calchasi* in mehreren Organen nachgewiesen wurde, stellte dies den einzigen mikroskopischen Nachweis von Schizonten während des gesamten Versuchs dar. Die Schizonten waren hauptsächlich in Hepatozyten lokalisiert. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Schizonten von *S. calchasi* vor allem in Leber und Milz, jedoch auch in vielen anderen Organen (z. B. Lunge, Knochenmark) vorkommen und einen Tropismus zu Hepatozyten und Endothelzellen aufweisen (OLIAS et al., 2009a). Eine Erklärung für den ausschließlichen Nachweis von Schizonten in der Leber und hier auch hauptsächlich in Hepatozyten liegt vermutlich auch in der relativ niedrigen Infektionsdosis in der vorliegenden Studie. In den Studien zuvor waren lediglich Tauben untersucht worden, die während der akuten Phase verstorben waren, d. h. mit mindestens  $10^5$  Sporozysten infiziert worden waren (OLIAS et al., 2010a). Es erscheint möglich, dass Endothelzellen erst bei höheren Infektionsdosen in ausreichendem Maße Schizonten aufweisen, sodass sie mittels histologischer Nachweisverfahren detektiert werden können. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten auf einen vermutlich vorrangigen Tropismus von *S. calchasi*-Merozoiten zu Hepatozyten hin, was ebenfalls

in der klinischen Symptomatik deutlich wird. Die während der akuten Phase auftretende gelbe Verfärbung des Harnsäureanteils der Fäzes ist wahrscheinlich auf die vermehrte Ausscheidung von Biliverdin zurückzuführen, das aus der nekrotisierend entzündeten Leber freigesetzt wird (SCOPE, 2003). Da diese Symptomatik bereits am Tag 14 p. i. nicht mehr auftrat und auch in allen nachfolgend untersuchten Tauben keine pathologischen Veränderungen der Leber festgestellt wurden, folgt der durch Schizogonien von *S. calchasi* hervorgerufenen Hepatitis eine vollständige Regeneration des Leberparenchyms. Ein Tropismus zu Hepatozyten ist auch bei anderen Sarkozystenspezies belegt. So wurde z. B. *Sarcocystis rauschorum* im Zwischenwirt, dem Richardson-Halsbandlemming (*Dicrostonyx richardsoni*), lediglich in Hepatozyten nachgewiesen (CAWTHORN et al., 1984). Hierbei wurde eine einzelne Schizogoniephase sowie eine reaktive Hepatitis zwischen Tag 4 und 11 p. i. beobachtet und ein physiologisches Lebergewebe war bereits ab Tag 15 p. i. nachweisbar (STACKHOUSE et al., 1987). Auch für *S. calchasi* kann eine einzelne Schizogoniephase mit Hauptlokalisation in der Leber sowie in geringerem Maße in Endothelzellen im gesamten Organismus vermutet werden. Hierzu müssten allerdings noch weitere Studien mit besonderer Betrachtung der frühen Entwicklung von *S. calchasi* im Zwischenwirt (Tag 1 - 14 p. i.) erfolgen.

Erste entzündliche Veränderungen im Gehirn konnten bereits in zwei Tauben, die an Tag 20 p. i. euthanasiert wurden, identifiziert werden. Somit wurde die Enzephalitis etwa vier Wochen, bevor die ersten neurologischen Symptome an Tag 47 p. i. auftraten, nachgewiesen. Zum gleichen Zeitpunkt lagen bereits erste, unreife Zysten in der Skelettmuskulatur und im Myokard vor. Schizonten wurden zu keinem Zeitpunkt während des gesamten Versuchs im Gehirn nachgewiesen. In sieben von 22 Tauben mit Enzephalitis (31,8 %) wurden vereinzelt Zysten im Gehirn identifiziert, die jedoch außerhalb der von den entzündlichen Läsionen betroffenen Hirnareale lagen. Somit konnte *S. calchasi* zu keinem der untersuchten Zeitpunkte in direktem Kontakt mit den Läsionen im ZNS nachgewiesen werden. Dies steht im Einklang mit den Erkenntnissen aus

den vorherigen Untersuchungen an natürlich und experimentell infizierten Tauben während der akuten und chronischen Phase (OLIAS et al., 2009b, OLIAS et al., 2013). Jedoch unterscheiden sich diese Befunde von den meisten durch Sarkozysten hervorgerufenen Enzephalitiden. Auch bei Feldinfektionen von Stadttauben in den USA mit *S. calchasi* konnten bei der Hälfte der Tiere Schizonten innerhalb der Läsionen im ZNS nachgewiesen werden (OLIAS et al., 2014). Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie und den zuvor in Deutschland aufgetretenen natürlichen und experimentellen Infektionen. Da jedoch zeitgleich Zysten in der Muskulatur vorlagen, kann in den untersuchten Stadttauben aus den USA eine Zweitinfektion nicht ausgeschlossen werden. Natürlich vorkommende, sarkozystenbedingte Enzephalitiden bei Vögeln [z. B. Haushuhn (MUTALIB et al., 1995), Truthuhn (TEGLAS et al., 1998) und verschiedene Greifvögel (WÜNSCHMANN et al., 2010)] stehen meist in direktem Zusammenhang mit der Schizogoniestadium des Parasiten. In den zentralnervösen Läsionen finden sich hierbei massenhaft Schizonten und Merozoiten der jeweiligen Sarkozystenart (z. B. *S. falcatula*). Experimentelle Infektionen von Wellensittichen mit *S. falcatula* konnten zeigen, dass die durch die Schizogonien hervorgerufenen Schäden am Wirtsorganismus (v. a. Pneumonie, aber auch Enzephalitis) hauptverantwortlich für die entzündlichen Veränderungen sind (SMITH et al., 1989). Die bei experimentellen und natürlichen Infektionen von *S. calchasi* beobachtete Abwesenheit von Sarkozysten im entzündlich veränderten ZNS wird u. a. auch bei Schafen beschrieben, bei denen nach experimenteller Infektion mit *S. gigantea* keine parasitären Stadien im Gehirn identifiziert werden konnten (MUNDAY und OBENDORF, 1984a, OBENDORF und MUNDAY, 1986). Auch in experimentell mit Sarkozysten infizierten Rothirschen wurde eine disseminierte Enzephalomyelitis festgestellt, ohne dass der Nachweis von Sarkozystenstadien im ZNS erbracht werden konnte (FOREYT et al., 1995). JAKOB et al. (1998) hingegen wiesen Zysten von *S. kirmsei* im Gehirn eines Beos nach, ohne dass gleichzeitig entzündliche oder proliferative Veränderungen vorlagen.

Aus diesen Berichten geht deutlich hervor, dass in diesen Fällen weder die Sarkozysten zeitgleich zur Enzephalitis auftraten, noch dass das Vorliegen von Zysten im Gehirn zwingend eine Enzephalitis zur Folge hatte. Daraus ergibt sich, dass vermutlich andere, indirekte Mechanismen die entzündlichen Veränderungen im ZNS auslösen.

Die Pathogenese der während der chronischen Phase der *S. calchasi*-Infektion auftretenden Enzephalitiden ist weiterhin ungeklärt. In der vorliegenden Arbeit ergab sich jedoch als Hinweis hierfür das frühzeitige Auftreten der Enzephalitis bei den Tauben an Tag 20 nach Infektion. Weiterhin wurden in einem Nymphensittich intraläsionale Schizonten im Gehirn an Tag 57 p. i. nachgewiesen, wobei sich jedoch der Verlauf der Pathogenese in den verschiedenen Wirtspezies gegebenenfalls unterscheiden kann. Hieraus ergeben sich zwei Haupthypothesen hinsichtlich der Entstehung der zerebralen Läsionen. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass Schizonten ins ZNS eingedrungen sind, aber zu den Zeitpunkten der Untersuchung nicht mehr vorhanden oder nicht mehr nachweisbar waren, d. h. eine direkte Pathogenese vorliegt. Die Alternative besteht in einer indirekten Pathogenese, d. h. dem Vorliegen eines außerhalb des ZNS lokalisierten Auslösers für die Entzündung wie z. B. Schizonten in der Leber oder Zysten in der Muskulatur.

Für die erste Hypothese spricht, dass, obwohl Zysten von *S. calchasi* nur in den Gehirnen von sieben Tauben identifiziert wurden, *S. calchasi*-spezifische DNA im Gehirn von 32 Tauben nachgewiesen wurde. Einschränkend muss jedoch berücksichtigt werden, dass mittels PCR auch im Blut zirkulierende DNA von *S. calchasi* nachgewiesen werden könnte und somit kein Nachweis von Gewebestadien erbracht wurde. Dennoch wiesen die Gehirne mit Ausnahme von Tag 10 p. i. bis zum Ende des Versuchs deutlich höhere Gehalte an *S. calchasi*-spezifischer DNA auf als die Lebern. Die Hypothese, dass zu einem bislang unbestimmten Zeitpunkt nach der Infektion Schizonten im Gehirn vorliegen, wird weiterhin gestützt von den Ergebnissen von OLIAS et al. (2013), die Schizonten von

*S. calchasi* in 50 % der während der akuten Phase verstorbenen Tauben nachweisen konnten. Da diese Tauben mit mindestens  $8 \times 10^4$  Sporozysten infiziert worden waren, lag die Infektionsdosis etwa zweihundertfach über der in der vorliegenden Studie eingesetzten Dosis. Die im Gehirn nachgewiesenen Schizonten waren außerdem nicht mit entzündlichen Reaktionen assoziiert, sodass spekuliert werden kann, dass die anschließend auftretenden Enzephalitiden Folge der raschen Beseitigung der Schizonten durch die mononukleären Immunzellen sind. Beweise für diese Hypothese liegen jedoch noch nicht vor.

ELITSUR et al. (2007) berichteten von ähnlichen Befunden in experimentell mit *S. neurona* infizierten Ponys. Sie identifizierten entzündliche Läsionen, die mit den bei EPM auftretenden Läsionen vereinbar waren, konnten jedoch den Parasiten weder histologisch, noch immunhistochemisch nachweisen. Das Vorliegen von *S. neurona* wurde jedoch durch Kultivierung in Zellkultur in zwei von drei Ponys belegt. Schlussfolgend besteht die Möglichkeit, dass auch *S. calchasi* von Tag 10 p. i. an im Gehirn der Tauben vorliegt, zwar in so geringer Anzahl, dass die Nachweisgrenze der histologischen Diagnoseverfahren unterschritten wird, die jedoch ausreichend ist, um die entzündlichen Veränderungen auszulösen.

Eine weitere Möglichkeit der Entstehung der Enzephalitis besteht in einem außerhalb des ZNS lokalisierten Auslöser einer verzögerten Hypersensitivitätsreaktion. Bei experimentellen Infektionen mit *S. calchasi* konnte, wie bereits von *S. neurona* bekannt (WITONSKY et al., 2008), eine Beeinflussung des Immunsystems des Zwischenwirts belegt werden. Während der akuten, durch Schizogonien des Parasiten gekennzeichneten Phase wurde im Gehirn eine signifikant verminderte Transkription der Th1-assoziierten Zytokine IL-12, IL-18 und IFN- $\gamma$  nachgewiesen (OLIAS et al., 2013). Dies lässt vermuten, dass der Parasit auf diese Weise in der Lage ist, der zellulären Immunantwort zu entgehen. Während der chronischen Phase wurde eine extensive Th1-gewichtete, T-Zell-vermittelte Immunantwort festgestellt, deren Charakteristika auf eine verzögerte Hypersensi-

tivitätsreaktion hindeuten (OLIAS et al., 2013). Dies steht im Einklang mit der bei Infektionen mit *S. neurona* beobachteten Immunantwort, die vor allem zellulär (SPENCER et al., 2004, WITONSKY et al., 2005a) und durch eine kritische Rolle der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen gekennzeichnet ist (WITONSKY et al., 2005b). Eine Immunsuppression führte bei Pferden nach Infektion mit *S. neurona* zu einer persistenten Parasitämie, doch wurde keine Neuroinvasion oder Enzephalomyelitis nachgewiesen, was für eine immunvermittelte Pathogenese der durch *S. neurona* ausgelösten Enzephalomyelitis spricht (SELLON et al., 2004). Die Ergebnisse der vorliegenden Studien unterstützen die Theorie, dass die Enzephalitis bereits zu einem frühen Zeitpunkt während der Infektion ausgelöst wird. Da die ersten entzündlichen Veränderungen im Gehirn bereits an Tag 20 p. i. auftraten, werden sie entweder während der akuten Schizogonienphase oder während der Bildung erster unreifer Zysten ausgelöst. Eine Zunahme des Schweregrades der Enzephalitis wurde ab Tag 49 p. i. beobachtet. Zeitgleich kam es weder zu einer Erhöhung der Anzahl der muskulären Zysten, noch zu einer Zunahme des relativen Gehalts an spezifischer DNA von *S. calchasi* in der Muskulatur oder dem Gehirn. In zwei Tauben wurde eine gering- bzw. mittelgradige Enzephalitis festgestellt, ohne dass in der Skelettmuskulatur Zysten identifiziert werden konnten. Auch bei den Nymphensittichen war ebenfalls kein direkter Zusammenhang zwischen der Schwere der Enzephalitis und der Anzahl der Zysten erkennbar. Dies unterstützt die Theorie einer verzögerten Hypersensitivitätsreaktion. Ein der Enzephalitis durch *S. calchasi* ähnliches Bild wurde von SILLER (1960) in Hühnern beobachtet, der drei bis vier Monate nach Injektion von inaktivierten Mykobakterien in die Pektoralismuskulatur eine lymphozytären Enzephalomyelitis feststellte. Sowohl bei der von SILLER (1960) beschriebenen allergischen Enzephalomyelitis in Hühnern als auch für die im Verlauf von *S. calchasi*-Infektionen auftretenden Enzephalitiden bzw. Enzephalomyelitiden kann eine ähnliche Pathogenese wie bei der humanen Akuten Disseminierten Enzephalomyelitis vermutet werden. Da diese auch nach parasitären Infektionen gezeigt werden konnte (KOIBUCHI

et al., 2003) und durch das Fehlen von Erregerstrukturen im entzündlich veränderten zentralnervösen Gewebe gekennzeichnet ist (DALE, 2003), können ähnliche Pathogenesemechanismen im Sinne einer molekularen Mimikry (ALPER, 2012) somit auch für *S. calchasi*-Infektionen angenommen werden. Insgesamt erscheint diese Hypothese am wahrscheinlichsten.

Weiterhin denkbar wäre die Freisetzung eines Stoffwechselprodukts des Parasiten, das eine neurotoxische Wirkung aufweist. Die für die toxische Wirkung des Sarkotoxins vermutete Pathogenese, die Freisetzung durch Ruptur der Zysten (MANDOUR, 1969), erscheint für *S. calchasi* jedoch eher unwahrscheinlich, da die Enzephalitis bereits in einem Stadium auftritt, in dem lediglich unreife Zysten nachgewiesen wurden. Degenerierende Zysten wurden zu diesem Zeitpunkt nicht beobachtet, sodass sich keine Hinweise auf die Freisetzung des Zysteninhalts ergaben.

Für *S. calchasi* lässt sich feststellen, dass die Enzephalitis bereits in einem frühen Stadium der Infektion ausgelöst wird. Sie durchläuft eine sukzessive Zunahme der Intensität, die sich in der chronischen Phase der Erkrankung in einer neurologischen Symptomatik äußert. Ob es sich bei dem Auslöser um Schizonten oder unreife Zysten handelt, bleibt zunächst unklar. Eine geringe Anzahl unreifer Zysten konnte bis zum Ende des Versuchs in der Skelettmuskulatur nachgewiesen werden. Diese könnten eventuell als kontinuierlicher Auslöser wirken, ähnlich der chronischen Toxoplasmose, bei der eine fortwährende Neubildung von Zysten beobachtet werden kann (DUBEY et al., 1998).

Hinsichtlich der semiquantitativen Bewertung des spezifischen *S. calchasi*-DNA-Gehaltes in den Organen der Taube im Verlauf der Infektion konnte erwartungsgemäß gezeigt werden, dass die höchsten relativen DNA-Gehalte in den Organen vorlagen, in denen auch der mikroskopische Nachweis von *S. calchasi* erfolgreich war. Am Tag 10 p. i. wurden die höchsten relativen Konzentrationen von *S. calchasi*-spezifischer DNA in der Leber festgestellt, in der bei einer Taube histologisch Schizonten

nachgewiesen worden waren. An Tag 20 p. i. hingegen wiesen Skelettmuskulatur und Herz, die zu diesem Zeitpunkt bereits unreife Zysten enthielten, die höchsten relativen DNA-Gehalte auf. Dennoch konnte an beiden Tagen spezifische DNA von *S. calchasi* in fast allen anderen Organen detektiert werden, wobei es sich hierbei möglicherweise um DNA von in der Blutbahn zirkulierenden Merozoiten handelt. Die beobachtete Zunahme des *S. calchasi*-spezifischen DNA-Gehalts in der Skelettmuskulatur und im Gehirn bis Tag 40 p. i. sowie die anschließende Abnahme stehen nicht in direktem Zusammenhang mit der Anzahl der Zysten und bleibt zunächst ungeklärt.

Die Empfänglichkeit von Nymphensittichen für *S. calchasi* wurde mit verschiedenen Infektionsdosen ( $10^2$  bis  $3 \times 10^6$  Sporozysten pro Tier) untersucht. Hierbei sollte der Nymphensittich stellvertretend für andere, teilweise in ihren Beständen bedrohte Arten der Ordnung Psittaciformes untersucht werden. Der Nymphensittich konnte experimentell als Zwischenwirt für *S. calchasi* bestätigt werden. Bei den Nymphensittichen trat ein ähnliches Krankheitsbild wie bei den Tauben auf. Beginnend ab Tag 7 bis 11 p. i. zeigten alle Tiere eine akute Krankheitsphase mit unspezifischer Symptomatik (Apathie, aufgeplustertes Gefieder) sowie gelb gefärbter Harnsäure. Bei den drei während der akuten Phase verstorbenen bzw. euthanasierten Nymphensittichen fanden sich, analog zur PPE bei den Tauben, eine nekrotisierende Hepatitis und Splenitis mit intraläsionalem Nachweis von Schizonten. Ein Nymphensittich, der während der akuten Phase verstorben war, wies zudem eine hochgradige Enteritis auf, wobei unklar bleibt, ob diese im Zusammenhang mit der *S. calchasi*-Infektion steht. Es wurden jedoch weder in der parasitologischen, noch in der histologischen Untersuchung Hinweise auf einen anderen Erreger gefunden, sodass die Ursache der Enteritis spekulativ bleibt. Drei der die akute Phase überlebenden Nymphensittiche zeigten von Tag 57 bis 63 p. i. in der chronischen Phase der Erkrankung neurologische Symptome, deren Intensität stark variierte. Alle während dieser chronischen Phase oder am Ende des Versuchs an Tag 76 p. i.

untersuchten, inokulierten Nymphensittiche wiesen in der Skelettmuskulatur Zysten von *S. calchasi* auf und zeigten eine mittel- bis hochgradige lymphohistiozytäre und nekrotisierende Enzephalitis. Der an Tag 57 p. i. mit hochgradigen neurologischen Symptomen euthanasierte Nymphensittich wies intraläsionale Schizonten im Gehirn auf. In den anderen Nymphensittichen wurden – ebenso wie bei den Tauben – weder Schizonten noch Zysten im Gehirn nachgewiesen. Es kann vermutet werden, dass eine ähnliche Pathogenese der Enzephalitis wie bei den Tauben vorliegt. Der Verlauf der *S. calchasi*-Infektion könnte sich jedoch in dieser – aufgrund des wesentlich variableren klinischen Bildes eventuell weniger adaptierten – Wirtsspezies auch grundlegend von den bei Tauben gewonnenen Erkenntnissen unterscheiden. Der Nachweis von intraläsionalen Schizonten bei dem Nymphensittich an Tag 57 p. i. lässt die Hypothese zu, dass auch bei den anderen Tieren, die erst später untersucht wurden, zu diesem Zeitpunkt Schizonten im Gehirn vorlagen. Hierzu müssten jedoch weitere Untersuchungen an mehreren Tieren und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach experimenteller Infektion erfolgen.

Der größte Unterschied zur PPE der Tauben bestand in der Unabhängigkeit der Schwere der Symptomatik, pathologischen Läsionen und Zystenanzahl von der Infektionsdosis. Anders als bei dem stark dosisabhängigen Infektionsverlauf der Tauben, waren neben einem Nymphensittich mit der höchsten Infektionsdosis ( $3 \times 10^6$  Sporozysten) zwei Nymphensittiche mit deutlich niedrigeren Infektionsdosen ( $10^4$  und  $10^2$  Sporozysten) während der akuten Phase fatal betroffen, sodass sie verstarben bzw. euthanasiert werden mussten. Von den verbliebenen Nymphensittichen zeigte der Nymphensittich mit der niedrigsten Infektionsdosis ( $10^2$  Sporozysten) die am stärksten ausgeprägte neurologische Symptomatik. Der Nymphensittich mit der höchsten Infektionsdosis entwickelte keine Symptome während der chronischen Phase. Auch konnte kein Zusammenhang zwischen der Anzahl an Zysten in der Muskulatur und der Schwere der Enzephalitis festgestellt werden. Die beiden Nymphensittiche mit einer hochgradig ausgeprägten Enzephalitis

wiesen lediglich einen minimalen Befall der Skelettmuskulatur auf, was ebenfalls die Hypothese einer indirekten Pathogenese stützt. Insgesamt zeigten die Nymphensittiche ein deutlich heterogeneres klinisches und pathologisches Bild als die Tauben.

In der Zwischenzeit wurde von einem ersten Fall von natürlich mit *S. calchasi* infizierten Papageienvögeln in den USA berichtet (RIMOLDI et al., 2013). Betroffen waren zwei Alexandrasittiche (*Polytelis alexandrae*), ein Nasenkakadu (*Cacatua tenuirostris*) und zwei Rosakakadus (*Eolophus roseicapilla*) aus einem Bestand mit 25 Papageienvögeln und 21 Tauben (keine Haustauben). Die Tiere zeigten schwere neurologische Symptome (u. a. Torticollis, Nystagmus und Festliegen) und verstarben nach 7 - 11 Tagen bzw. mussten euthanasiert werden. Eine Fächertaube (*Goura victoria*) zeigte ebenfalls neurologische Symptome, erholte sich aber nach mehreren Wochen unter Behandlung mit u. a. Trimethoprim-Sulfonamid und Meloxicam. Die fünf Psittaziden wiesen eine lymphoplasmazytäre und histiozytäre Enzephalitis mit intraläsionalen Schizonten auf. In der Skelettmuskulatur wurden Zysten nachgewiesen, deren Zystenwand-aufbau identisch mit *S. calchasi* bzw. *S. columbae* war. Durch Sequenzierung der 18S rRNA und der ITS-1 wurden die parasitären Stadien als *S. calchasi* bestätigt. In einer Muskelbiopsie der Fächertaube wurden hingegen keine Zysten nachgewiesen (RIMOLDI et al., 2013). Wie auch bei den natürlich infizierten Tauben in den USA (OLIAS et al., 2014), wurde trotz eines ähnlichen klinischen Verlaufs ein deutlich anderes histopathologisches Bild gesehen als nach experimenteller Infektion mit dem aus der Region Berlin isolierten *S. calchasi*-Stamm. Der Nachweis von intraläsionalen Schizonten in den Tieren in den USA könnte mit der Möglichkeit der wiederholten Infektion unter Feldbedingungen sowie mit Unterschieden zwischen den einzelnen *S. calchasi*-Stämmen erklärt werden. Außerdem bleibt fraglich, ob die Pathogenese der *S. calchasi*-Infektion in Tauben und Papageienvögeln generell identisch verläuft, da beispielsweise von *S. falcatula* bekannt ist, dass sich der Verlauf der Infektion zwischen diesen beiden Ordnungen deutlich unterscheidet

(SMITH et al., 1990b). Insgesamt bleibt somit auch die Pathogenese der Enzephalitis bei Papageienvögeln weiterhin unklar.

Der Nymphensittich gehört einer anderen Ordnung (Psittaciformes) an als die zunächst als Zwischenwirt bestätigte Taube (Ordnung Columbiformes). Dies deutet auf ein potentiell weiteres Zwischenwirtspektrum hin, als ursprünglich aufgrund des Ausschlusses von Hühnern als Zwischenwirte angenommen wurde (OLIAS et al., 2010a). Angesichts der hohen Virulenz von *S. calchasi* kann ähnlich wie für *S. neurona* angenommen werden, dass eine geringe Zwischenwirtspezifität von evolutionärem Vorteil ist. Aufgrund der durch den Parasiten verursachten Morbidität und/oder Mortalität ist es für sein Überleben von Vorteil, auf alternative Zwischenwirte ausweichen zu können, falls die Populationsdichte des ursprünglichen Zwischenwirts durch zu hohe Verluste stark abnehmen sollte (ELSHEIKHA, 2009).

Da die Erkrankung der Nymphensittiche durch einen schweren, bei 50 % der Tiere fatalen Verlauf der Infektion gekennzeichnet ist, kann bei Übertragung der Erkenntnissen zu *S. falcatula* außerdem vermutet werden, dass der Nymphensittich ein evolutionär neuer Zwischenwirt für *S. calchasi* ist, der sich noch nicht an den Parasiten adaptiert hat. Für *S. falcatula* wurde demonstriert, dass insbesondere solche Spezies, die zuvor keinen Kontakt mit dem Parasiten gehabt hatten, mit deutlich schwereren klinischen Symptomen auf eine *S. falcatula*-Infektion reagierten. Da das Vorkommen von *S. falcatula* aufgrund seiner Zwischenwirte (Nord- und Südamerikanisches Opossum) auf den amerikanischen Kontinent beschränkt ist, sind von fatalen Erkrankungen fast ausschließlich Altweltpapageien betroffen (CLUBB und FRENKEL, 1992). Über die ursprüngliche und aktuelle Verbreitung von *S. calchasi* ist bislang noch sehr wenig bekannt und die Bedeutung von *S. calchasi* für weitere Vögel der Ordnung Psittaciformes, von denen knapp ein Drittel weltweit bedroht sind (IUCN, 2013), ist derzeit noch nicht abzuschätzen. Da in den von der Enzephalitis betroffenen Nymphensittichen in vier von fünf Tieren keine

Stadien von *S. calchasi* im Gehirn nachgewiesen werden konnten, besteht die Möglichkeit, dass die Parasitose in der Vergangenheit häufig nicht diagnostiziert wurde. Der vorgenannte Ausbruch von *S. calchasi*-Infektionen bei mehreren Papageienvögeln in den USA (RIMOLDI et al., 2013) gibt zumindest einen ersten Anhaltspunkt dafür, dass die Erkrankung in Psittaziden vorkommt und für bedrohte Arten von kritischer Bedeutung sein kann.

Die Wirksamkeit von Toltrazuril gegen *S. calchasi* wurde in der Dosierung 25 mg/kg KGW an zwei aufeinanderfolgenden Tagen zu drei verschiedenen Zeitpunkten nach experimenteller Infektion (10 Tage p. i., 40 Tage p. i. und bei Einsetzen der neurologischen Symptome) evaluiert. Es wurden keine deutlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen und zur Positivkontrolle festgestellt. Somit konnte die Wirksamkeit von Toltrazuril zu keinem der drei untersuchten Zeitpunkte bestätigt werden. Tendenziell zeigte die Gruppe, die Toltrazuril erst bei Einsetzen der ZNS-Symptomatik erhalten hatte, etwas schwerere klinische Symptome in der chronischen Phase, jedoch konnten sich histologisch keine Unterschiede hinsichtlich des Schweregrades der entzündlichen Veränderungen im Gehirn und der Anzahl der Zysten erkennen lassen. Auch der relative Gehalt von *S. calchasi*-spezifischer DNA in der Skelettmuskulatur war in allen drei Gruppen nahezu gleich mit ct-Werten, die zwischen 10,21 bis 11,88 lagen.

Hinsichtlich der Wirksamkeit von Toltrazuril bei *Eimeria*-Arten ist bekannt, dass es gegen intrazelluläre Schizontengenerationen wirksam ist, nicht jedoch nach Ausbildung der Oozystenwand (MEHLHORN et al., 1984). Eine Wirksamkeit gegen reife Zystenstadien erscheint vor allem aufgrund des vermuteten Wirkungsmechanismus von Toltrazuril eher unwahrscheinlich, da dieser vor allem über eine Hemmung der DNA-Synthese vermittelt wird. Da die Zystoziten nur eine sehr geringe Teilungsaktivität aufweisen (GESTRICH et al., 1975), bieten sie somit wenig Angriffspunkte für Toltrazuril. Dennoch war zumindest mit einer Wirksamkeit in der ersten

Behandlungsgruppe, die Toltrazuril während der Schizogoniephase erhalten hatte, gerechnet worden. Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben eines therapeutischen Effekts auch in dieser Phase der Erkrankung könnte in der unterschiedlichen Lokalisation der Schizontengenerationen von *Eimeria*- und *Sarcocystis*-Arten liegen. Während erstere im Darm, nahe dem Resorptionsort von Toltrazuril nach oraler Eingabe lokalisiert sind (STOCKDALE und FERNANDO, 1975), befinden sich Schizonten von *S. calchasi* vor allem in Hepatozyten. Zwar konnten für Toltrazuril bei Pferden bereits in niedrigeren Dosierungen ausreichend hohe Serumspiegel festgestellt werden (FURR und KENNEDY, 2000), jedoch ist derzeit nichts über die Höhe der Toltrazurilkonzentration im Leberparenchym bekannt. Dennoch scheint eine geringe Gewebepenetration von Toltrazuril als Grund für die ausgebliebene therapeutische Wirkung während der Schizontenphase eher fraglich zu sein. Untersuchungen an mit *S. neurona* infizierten Interferon- $\gamma$ -Knock-out-Mäusen hatten gezeigt, dass das Toltrazuril ähnliche Triazinderivat Diclazuril nur bis zu einem Behandlungszeitpunkt, der vor oder während der ersten Schizontengeneration liegt, wirksam ist. Ein wesentlicher Unterschied zur vorliegenden Studie bestand allerdings in der wesentlich längeren Behandlungsdauer von mindestens 18 Tagen (DUBEY et al., 2001a). Ansatzpunkt zukünftiger Untersuchungen könnte die Verwendung höherer Dosierungen sein, sodass ein ausreichend hoher Wirkspiegel im Leberparenchym erreicht wird. Dosierungen für Tauben wurden bis 35 mg/kg KGW beschrieben (VERCRUYSE, 1990), sodass mit der verwendeten Dosierung noch nicht die obere Grenze der therapeutischen Breite erreicht ist. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verlängerung des Behandlungsintervalls. Bei Infektionen mit *S. neurona* wird Ponazuril, der Hauptmetabolit von Toltrazuril, an 28 aufeinanderfolgenden Tagen verabreicht (FURR et al., 2001). Eine ähnlich lange Behandlungsdauer könnte bei Infektionen mit *S. calchasi* erforderlich sein. Allerdings muss bedacht werden, dass in praxi Behandlungen in der Regel erst nach dem Auftreten klinischer Symptomatik erfolgen, sodass sowohl langandauernde als auch prophy-

laktische Behandlungen nach bekanntem Infektionszeitpunkt eher von theoretischer Natur sind. Schließlich könnte auch die Verwendung anderer Wirkstoffe zur Identifizierung eines geeigneten Therapeutikums gegen Infektionen mit *S. calchasi* beitragen. Für den Wirkstoff Primaquin sowie die Wirkstoffkombination Sulfonamid/Pyrethamin konnte z. B. eine therapeutische Wirksamkeit gegen *S. muris* bei Mäusen festgestellt werden (ROMMEL et al., 1981).

Solange jedoch keine wirksame Behandlung gegen *S. calchasi* bekannt ist, stehen bei der Bekämpfung des Parasiten insbesondere prophylaktische Maßnahmen im Vordergrund. Hierzu zählt vor allem die Verhinderung des Eintrags von potentiell mit Sporozysten kontaminiertem Habicht- bzw. Sperberkot in die Außenvolieren von Tauben und Papageienvögeln. Dies kann durch eine Bedachung der Volieren erreicht werden. Der Ausschluss des Zugangs der Endwirte zu den Haltungseinrichtungen der Zwischenwirte hat sich bereits bei anderen Sarkozysten-spezies als wirkungsvolle Maßnahme zur Vermeidung von Neuinfektionen erwiesen. So konnten beispielsweise bei Papageienvögeln erneute Krankheitsfälle durch *S. falcatula* durch Elektrozäune, die das Eindringen von Opossums in die Volieren unterbanden, verhindert werden (CLUBB und FRENKEL, 1992). Außerdem ist durch eine gezielte Insektenbekämpfung die Möglichkeit der Übertragung von Sporozysten über belebte Vektoren zu reduzieren (CLUBB und FRENKEL, 1992).

Um die Gefahr durch eingetragene *S. calchasi*-Sporozysten zu minimieren, sollte eine regelmäßige Reinigung und Desinfektion der Volieren erfolgen. Als wirksame Desinfektionsmaßnahmen gegen *Sarcocystis*-Sporozysten sind derzeit lediglich das Aufbringen von 100%igem Ammoniumhydroxid sowie eine thermische Exposition (> 60 °C für > 1 min bzw. 55 °C für > 15 min) bekannt (DUBEY et al., 2002). Obwohl deren Wirksamkeit gegen *Sarcocystis*-Sporozysten nicht belegt ist, kann weiterhin von einer Wirksamkeit der Desinfektionsmittel ausgegangen werden, die laut der Desinfektionsmittelliste der Deutschen Veterinär-

medizinischen Gesellschaft (DVG) gegen *Eimeria tenella* wirksam sind (DVG, 2015).

Eine aktive Immunisierung der Zwischenwirte konnte durch einmalige oder wiederholte Applikationen geringer Sporozystendosen u. a. von *S. cruzi* (FAYER und DUBEY, 1984), *S. tenella* (FORD, 1985) und *S. miescheriana* (SCHNIEDER und ROMMEL, 1983) erzielt werden. Dennoch erscheint dies bei *S. calchasi* mit erheblich Risiken verbunden, da bereits geringe Infektionsdosen (100 Sporozysten pro Taube) zu einer neurologischen Symptomatik führen (OLIAS et al., 2010a). Eine zeitweise in den USA zugelassene Inaktivatvakzine gegen *S. neurona* wurde mittlerweile wieder vom Markt genommen, da eine Wirksamkeit nicht hinreichend belegt werden können und die Impfung eine eingeschränkte Aussagekraft diagnostischer Tests zur Folge hatte (WITONSKY et al., 2004). Eine mögliche Option einer zukünftigen Vakzinierung der Zwischenwirte gegen *S. calchasi* besteht in der Applikation mittels UV-Licht attenuierter Sporozysten. Diese Methode der aktiven Immunisierung hatte bei Schafen zur Ausbildung abnormaler Zysten und zu einer protektiven Immunität nach Belastungsinfektion mit *S. tenella* geführt (ABDEL-BAKI et al., 2009).

Aufgrund der schätzungsweise hohen Prävalenz in den Endwirten (OLIAS et al., 2011) und der vermutlich weltweiten Verbreitung (WÜNSCHMANN et al., 2011), sollte *S. calchasi* bei unspezifischen Allgemeinerkrankungen und insbesondere bei neurologischer Symptomatik bei Tauben und Papageienvögel als wichtige Differenzialdiagnose beachtet werden. Eine rasche Diagnose ermöglicht es, gezielte vorbeugende Maßnahmen gegen Neuinfektionen von den noch nicht infizierten Tieren ergreifen zu können.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Der protozoäre Parasit *Sarcocystis calchasi* (Stamm: Apicomplexa) ist Erreger der Pigeon Protozoal Encephalitis (PPE), einer biphasischen Erkrankung mit neurologischer Symptomatik bei Haustauben. Trotz hochgradiger entzündlicher Veränderungen im Gehirn wurden bislang nur vereinzelt Stadien des Parasiten in Assoziation mit den Läsionen identifiziert und die Ursache der Enzephalitis ist weiterhin unbekannt. Mit der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die bei der Infektion mit *S. calchasi* auftretende Enzephalitis in Zusammenhang mit bestimmten Stadien des Lebenszyklus des Parasiten steht und ob sich daraus Hinweise für die Pathogenese der Enzephalitis ergeben. Hierzu wurden 45 Tauben mit 200 *S. calchasi*-Sporozysten pro Tier oral infiziert und über einen Zeitraum von 61 Tagen in Intervallen von 2 bis 10 Tagen wurden jeweils 3 Tauben euthanasiert. Für die Bestimmung des relativen Gehalts an *S. calchasi*-spezifischer DNA wurde eine semiquantitative Real-time PCR etabliert. Nachdem an Tag 2 und 5 p. i. *S. calchasi* in keinem der untersuchten Organe nachgewiesen werden konnte, erfolgte an Tag 10 p. i. der Nachweis von Schizonten in der Leber einer Taube. Es wurde gezeigt, dass entzündliche Veränderungen im Gehirn bereits ab Tag 20 p. i. nachweisbar sind, d. h. etwa vier Wochen vor dem Auftreten der neurologischen Symptomatik in der chronischen Phase der klinischen Erkrankung. Der Auslöser der granulomatösen Enzephalitis kann somit zeitlich auf Stadien von *S. calchasi* begrenzt werden, die sich zu einem frühen Zeitpunkt nach Infektion ausbilden. Die bis zu Tag 20 p. i. auftretenden und somit als Auslöser in Frage kommenden Stadien sind die an Tag 10 p. i. nachgewiesenen Schizonten sowie unreife Zysten, die an Tag 20 p. i. in Skelettmuskulatur und Myokard identifiziert wurden. Folglich werden eine Neuroinvasion von Schizonten, die im vorliegenden Versuch unterhalb der mikroskopischen Nachweisgrenze lag, Schizogonien, die außerhalb des ZNS lokalisiert sind oder die Ausbildung früher, unreifer Zysten als mögliche Auslöser diskutiert. Eine immunvermittelte Pathogenese im Sinne einer durch autoimmune Mechanismen hervorgerufenen

Entzündungsreaktion erscheint wahrscheinlich, da sich kein Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der Enzephalitis und der Anzahl der muskulären Zysten erkennen ließ.

Ferner wurde demonstriert, dass die *S. calchasi*-spezifische Real-time PCR deutlich sensitiver als histologische Methoden (Histologie und Immunhistochemie) ist. Nur in 75 % der mittels PCR positiv getesteten, experimentell infizierten Tauben wurde ebenfalls ein histologischer Nachweis von Sarkozystenstadien erbracht. Die untere Nachweisgrenze der PCR wurde mit 32 fg DNA/ $\mu$ l ermittelt. Bei der Überprüfung der Spezifität wurde aus vier getesteten, nah verwandten Sarkozystenpezies (*S. calchasi*, *S. columbae*, *S. turdusi* und *S. falcatula*) lediglich *S. calchasi* detektiert. Somit erweist sich die Real-time PCR als sensitives und spezifisches Verfahren zum Nachweis einer Infektion mit *S. calchasi*.

Weiterhin sollte die Empfänglichkeit von Nymphensittichen für *S. calchasi* untersucht werden. Hierbei sollte der Nymphensittich stellvertretend für andere, teilweise in ihren Beständen bedrohte Arten der Ordnung Psittaciformes betrachtet werden. Hierfür wurden zehn Nymphensittiche mit unterschiedlichen Infektionsdosen ( $10^2$  bis  $3 \times 10^6$  *S. calchasi*-Sporozysten pro Tier) infiziert. Das klinische und pathologische Bild der sich daraufhin entwickelten Erkrankung wies große Ähnlichkeiten zur PPE der Tauben auf. Der Nymphensittich wurde somit experimentell als Zwischenwirt von *S. calchasi* bestätigt. Es wurde jedoch hinsichtlich des klinischen Verlaufs und der Schwere der Läsionen im Gegensatz zur Erkrankung bei den Tauben keine Abhängigkeit von der Infektionsdosis festgestellt. Dies lässt auf eine fehlende Adaptation der Nymphensittiche, d. h. ein evolutionär junges Wirts-Parasit-Verhältnis schließen. Insgesamt deutet die Empfänglichkeit des Nymphensittichs als Vertreter der Ordnung Psittaciformes auf ein potentiell weites Zwischenwirtsspektrum von *S. calchasi* hin.

Schließlich sollte die Wirksamkeit von Toltrazuril gegen *S. calchasi* in der Taube evaluiert werden. Neun Tauben wurden mit 400 *S. calchasi*-Sporozysten pro Tier infiziert. Jeweils drei Tauben wurden während der akuten

Phase an Tag 10 p. i., etwa zehn Tage vor der chronischen Phase an Tag 40 p. i. und bei Einsetzen der neurologischen Symptome mit Toltrazuril behandelt. Die Wirksamkeit konnte in der angewandten Dosierung (25 mg/kg KGW an zwei aufeinanderfolgenden Tagen) zu keinem der untersuchten Zeitpunkte belegt werden. Somit existiert bislang kein Wirkstoff, dessen therapeutische Wirkung gegen *S. calchasi* nachgewiesen ist. Prophylaktische Maßnahmen zur Verhinderung von Neuinfektionen stehen bei der Bekämpfung von *S. calchasi* in Tauben- und Papageienbeständen weiterhin im Vordergrund.

## 7 SUMMARY

The apicomplexan parasite *Sarcocystis calchasi* is the causative agent of Pigeon Protozoal Encephalitis (PPE), a biphasic, neurologic disease in domestic pigeons. Despite severe inflammatory lesions in the brain, associated parasitic stages have only rarely been identified and the cause of the encephalitis remains obscure. The aim of the present study was therefore to investigate if the encephalitis is associated with certain stages of the parasite's life cycle and if this provides evidence on the pathogenesis of the encephalitis. Forty-five pigeons were orally inoculated with 200 *S. calchasi* sporocysts each and euthanized in groups of three pigeons at intervals of 2 to 10 days over a period of 61 days. In order to evaluate the relative amount of *S. calchasi*-specific DNA a semi-quantitative real-time PCR was established. At 2 and 5 days post infection (dpi), *S. calchasi* was not detected in any of the investigated organs but at dpi 10, schizonts were identified in the liver of one pigeon. It was demonstrated that inflammatory lesions in the brains of the pigeons appeared at dpi 20 which is approximately four weeks earlier than the onset of neurological signs during the chronic phase of the clinical disease. The trigger of the granulomatous encephalitis can be limited to stages of *S. calchasi* that appear early after infection. The stages that appeared until dpi 20 and thus may serve as triggers were schizonts which were detected at dpi 10 and immature sarcocysts which were identified in skeletal muscle and myocardium at dpi 20. Consequently, neuroinvasion of schizonts that was below the detection limit of microscopic techniques in the present study, schizogony located outside the CNS, or the formation of early immature sarcocysts are discussed as possible triggers. An immune-mediated pathogenesis in terms of an inflammation by autoimmune mechanisms seems very likely since an association between the severity of the encephalitis and the number of muscular sarcocysts was not recognized.

It was also demonstrated that the *S. calchasi*-specific real-time PCR is more sensitive compared to histologic methods (histology and immunohistochemistry). Stages of *S. calchasi* were detected by histology in only 75 % of experimentally infected pigeons which were tested positive by PCR. The lower detection limit was determined as 32 fg DNA/ $\mu$ l. When testing four closely related *Sarcocystis* species (*S. calchasi*, *S. columbae*, *S. turdusi*, and *S. falcatula*) only *S. calchasi* was detected. Thus, the real-time PCR was demonstrated to be a sensitive and specific method for the detection of an infection with *S. calchasi*.

Furthermore, the susceptibility of cockatiels for *S. calchasi* was investigated. The cockatiel was chosen as representative for other endangered species of the order Psittaciformes. Therefore, ten cockatiels were experimentally infected with various doses of *S. calchasi* sporocysts ( $10^2$  to  $3 \times 10^6$  sporocysts). Clinical signs and pathologic lesions of the developing disease resembled PPE of pigeons in many aspects. Thus, the cockatiel was experimentally confirmed as intermediate host of *S. calchasi*. However, the clinical course and the severity of lesions were more diverse compared to PPE in pigeons and independent of the infectious dose. This indicates an insufficient adaptation of the cockatiel, i.e. an evolutionary young parasite-host-relationship. Altogether, the results suggest a broad intermediate host spectrum of *S. calchasi*.

Finally, the efficacy of toltrazuril against *S. calchasi* was evaluated. Nine pigeons were inoculated with 400 *S. calchasi* sporocysts and three pigeons each were treated with toltrazuril during the acute phase at dpi 10, approx. 10 days before the chronic phase at dpi 40 and at the onset of neurologic signs. With the applied dosage (25 mg/kg body weight on two consecutive days), toltrazuril was demonstrated to be not effective against *S. calchasi* at any investigated time. Since currently an effective medication against *S. calchasi* is not available, prevention remains the most important factor for protecting pigeon and psittacine flocks from threads posed by *S. calchasi*.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- ABDEL-BAKI, A.-A., ALLAM, G., SAKRAN, T. und EL-MALAH, E.-M. (2009): Lambs infected with UV-attenuated sporocysts of *Sarcocystis ovicanis* produced abnormal sarcocysts and induced protective immunity against a challenge infection. The Korean Journal of Parasitology **47(2)**, 131-138.
- AGUILAR, R. F., SHAW, D. P., DUBEY, J. P. und REDIG, P. (1991): *Sarcocystis*-associated encephalitis in an immature Northern goshawk (*Accipiter gentilis atricapillus*). Journal of Zoo and Wildlife Medicine **22(4)**, 466-469.
- ALEXANDER, D. J., WILSON, G. W., THAIN, J. A. und LISTER, S. A. (1984): Avian paramyxovirus type 1 infection of racing pigeons: 3 epizootiological considerations. Veterinary Record **115(9)**, 213-216.
- ALPER, G. (2012): Acute disseminated encephalomyelitis. Journal of Child Neurology **27(11)**, 1408-1425.
- AMTSBERG, G. und VERSPOHL, J. (2011): Kulturelle Untersuchung. In: SELBITZ, H.-J., TRUYEN, V. und VALENTIN-WEIGAND, P. (eds.). Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 9. Auflage. Enke Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH&Co KG, Stuttgart. S. 54-61.
- ASPLIN, F. D. (1952): Immunisation against Newcastle Disease with a virus of low virulence (Strain F) and observations on sub-clinical infection in partially resistant fowls. Veterinary Record **64(17)**, 245-249.
- BARHAM, M., STÜTZER, H., KARANIS, P., LATIF, B. M. und NEISS, W. F. (2005): Seasonal variation in *Sarcocystis* species infections in goats in northern Iraq. Parasitology **130(2)**, 151-156.
- BARROWS, P. L. und HAYES, F. A. (1977): Studies of endoparasites of the mourning dove (*Zenaidura macroura*) in the southeast United States. Journal of Wildlife Diseases **13(1)**, 24-28.
- BARROWS, P. L., PRESTWOOD, A. K., ADAMS, D. D. und DYKSTRA, M. J. (1982a): Development of *Sarcocystis suicanis* Erber, 1977 in the pig. Journal of Parasitology **68(4)**, 674-680.
- BARROWS, P. L., PRESTWOOD, A. K. und GREEN, C. E. (1982b): Experimental *Sarcocystis suicanis* infections: disease in growing pigs. American Journal of Veterinary Research **43(8)**, 1409-1412.
- BARUTZKI, D. und SCHAPER, R. (2011): Results of parasitological examinations of faecal samples from cats and dogs in Germany between 2003 and 2010. Parasitology Research **109 Suppl 1**, 45-60.

- BATOULIS, H., RECKS, M. S., ADDICKS, K. und KUERTEN, S. (2011): Experimental autoimmune encephalomyelitis--achievements and prospective advances. *APMIS* **119(12)**, 819-830.
- BENTZ, B. G., DIRIKOLU, L., CARTER, W. G., SAVILLE, W. J., WILLIAMS, N. M., BERNARD, W. V., WULFF-STROBEL, C., BAKER, C. B., MCCRILLIS, S., REED, S., HARKINS, J. D., GRANSTROM, D. E. und TOBIN, T. (2000): Diclazuril and equine protozoal encephalomyelitis (EPM): a clinical report. *Equine Veterinary Education* **12(4)**, 195-200.
- BENTZ, B. G., EALEY, K. A., MORROW, J., CLAYPOOL, P. L. und SALIKI, J. T. (2003): Seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in equids residing in Oklahoma. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **15(6)**, 597-600.
- BISBY, T. M., HOLMAN, P. J., PITOC, G. A., PACKER, R. A., THOMPSON, C. A. und RASKIN, R. E. (2010): *Sarcocystis* sp. encephalomyelitis in a cat. *Veterinary Clinical Pathology* **39(1)**, 105-112.
- BLED SOE, B. (1979): Sporogony of *Sarcocystis idahoensis* in the Gopher Snake, *Pituophis melanoleucus* (Daudin). *Journal of Parasitology* **65(6)**, 875-879.
- BLED SOE, B. (1980): *Sarcocystis idahoensis* sp. n. in deer mice *Peromyscus maniculatus* (Wagner) and gopher snakes *Pituophis melanoleucus* (Daudin). *Journal of Protozoology* **27(1)**, 93-102.
- BLYTHE, L. L., GRANSTROM, D. E., HANSEN, D. E., WALKER, L. L., BARTLETT, J. und STAMPER, S. (1997): Seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in horses residing in Oregon. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **210(4)**, 525-527.
- BOCH, J. und ERBER, M. (1981): Vorkommen sowie wirtschaftliche und hygienische Bedeutung der Sarkosporidien von Rind, Schaf und Schwein. *Fleischwirtschaft* **61(3)**, 427-431.
- BOLON, B., GREINER, E. C. und MAYS, M. B. (1989): Microscopic features of *Sarcocystis falcatula* in skeletal muscle from a Patagonian conure. *Veterinary Pathology* **26(3)**, 282-284.
- BORST, G. H. und ZWART, P. (1973): Sarcosporidiosis in psittaciformes. *Zeitschrift für Parasitenkunde* **42(4)**, 293-298.
- BOX, E. D. und DUSZYNSKI, D. W. (1978): Experimental transmission of *Sarcocystis* from icterid birds to sparrows and canaries by sporocysts from the opossum. *Journal of Parasitology* **64(4)**, 682-688.
- BOX, E. D. und SMITH, J. H. (1982): The intermediate host spectrum in a *Sarcocystis* species of birds. *Journal of Parasitology* **68(4)**, 668-673.

- BOX, E. D., MEIER, J. L. und SMITH, J. H. (1984): Description of *Sarcocystis falcatula* stiles, 1893, a parasite of birds and opossums. *Journal of Protozoology* **31(4)**, 521-524.
- CALDOW, G. L., GIDLOW, J. R. und SCHOCK, A. (2000): Clinical, pathological and epidemiological findings in three outbreaks of ovine protozoan myeloencephalitis. *Veterinary Record* **146(1)**, 7-10.
- CARLSON-BREMER, D. P., GULLAND, F. M., JOHNSON, C. K., COLEGROVE, K. M. und VAN BONN, W. G. (2012): Diagnosis and treatment of *Sarcocystis neurona*-induced myositis in a free-ranging California sea lion. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **240(3)**, 324-328.
- CAWTHORN, R. J., GAJADHAR, A. und BROOKS, R. (1984): Description of *Sarcocystis rauschorum* sp.n. (Protozoa: Sarcocystidae) with experimental cyclic transmission between varying lemmings (*Dicrostonyx richardsoni*) and snowy owls (*Nyctea scandiaca*). *Canadian Journal of Zoology* **62(2)**, 217-225.
- CAWTHORN, R. J. und BROOKS, R. J. (1985a): Light microscopical observations on sporogony of *Sarcocystis rauschorum* (Protozoa: Sarcocystidae) in snowy owls (*Nyctea scandiaca*). *Canadian Journal of Zoology* **63(6)**, 1455-1458.
- CAWTHORN, R. J. und BROOKS, R. J. (1985b): Histological observations on precystis merogony and metrocyte formation of *Sarcocystis rauschorum* (Apicomplexa: Sarcocystidae) in varying lemmings, *Dicrostonyx richardsoni*. *Canadian Journal of Zoology* **63(12)**, 2907-2912.
- CAWTHORN, R. J. und SPEER, C. A. (1990): *Sarcocystis*: Infection and disease of humans, livestock, wildlife and other hosts. In: LONG, P. L. (ed.). *Coccidiosis of Man and Domestic animals*. CRC Press, Boca Raton. S. 91-120.
- ČERNÁ, Z. (1984): The role of birds as definitive hosts and intermediate hosts of heteroxenous coccidians. *Journal of Protozoology* **31(4)**, 579-581.
- ČERNÁ, Z. und KVAŠŇOVSKÁ, Z. (1986): Life-cycle Involving bird-bird relation in *Sarcocystis*-coccidia with the description of *Sarcocystis accipitris* sp-n. *Folia Parasitologica* **33**, 305-309.
- CLUBB, S. L. und FRENKEL, J. K. (1992): *Sarcocystis falcatula* of opossums: transmission by cockroaches with fatal pulmonary disease in psittacine birds. *Journal of Parasitology* **78(1)**, 116-124.
- COLWELL, D. D. und MAHRT, J. L. (1983): Development of *Sarcocystis alceslatrans* Dubey, 1980, in the small intestine of dogs. *American Journal of Veterinary Research* **44(10)**, 1813-1818.

CONTI, J. A. und FORRESTER, D. J. (1981): Interrelationships of parasites of white-winged doves and mourning doves in Florida. *Journal of Wildlife Diseases* **17(4)**, 529-536.

COOLEY, A. J., BARR, B. und REJMANEK, D. (2007): *Sarcocystis neurona* encephalitis in a dog. *Veterinary Pathology* **44(6)**, 956-961.

DALE, R. C. (2003): Acute disseminated encephalomyelitis. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases* **14(2)**, 90-95.

DAMRIYASA, I., BAUER, C., EDELHOFER, R., FAILING, K., LIND, P., PETERSEN, E., SCHARES, G., TENTER, A., VOLMER, R. und ZAHNER, H. (2004): Cross-sectional survey in pig breeding farms in Hesse, Germany: seroprevalence and risk factors of infections with *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. and *Neospora caninum* in sows. *Veterinary Parasitology* **126(3)**, 271-286.

DAUGSCHIES, A., SCHNIEDER, T., ROMMEL, M. und BICKHARDT, K. (1988): The effects of *Sarcocystis miescheriana* infections on blood enzymes and weight gain of stress-sensitive and stress-insensitive pigs. *Veterinary Parasitology* **27(3-4)**, 221-229.

DEPLAZES, P., ECKERT, J., VON SAMSON-HIMMELSJERNA, G. und ZAHNER, H. (2013): Labordiagnostische Methoden. In: DEPLAZES, P., ECKERT, J., VON SAMSON-HIMMELSJERNA, G. und ZAHNER, H. (eds.). *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin*, 3. Auflage. Enke Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH&Co KG, Stuttgart. S. 508-524.

DIRIKOLU, L., YOHN, R., GARRETT, E. F., CHAKKATH, T. und FERGUSON, D. C. (2009): Detection, quantifications and pharmacokinetics of toltrazuril sulfone (Ponazuril) in cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **32(3)**, 280-288.

DUBEY, J. P. (1976): A review of *Sarcocystis* of domestic animals and of other coccidia of cats and dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **169(10)**, 1061-1078.

DUBEY, J. P., SPEER, C. A. und DOUGLASS, T. G. (1980): Development and ultrastructure of first-generation meronts of *Sarcocystis cruzi* in calves fed sporocysts from coyote feces. *Journal of Protozoology* **27(4)**, 380-387.

DUBEY, J. P. (1981): Development of immunity to sarcocystosis in dairy goats. *American Journal of Veterinary Research* **42(5)**, 800-804.

DUBEY, J. P., WEISBRODE, S. E., SPEER, C. A. und SHARMA, S. P. (1981): Sarcocystosis in goats: clinical signs and pathologic and hematologic findings. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **178(7)**, 683-699.

DUBEY, J. P. (1982a): Development of ox-coyote cycle of *Sarcocystis cruzi*. *Journal of Protozoology* **29(4)**, 591-601.

- DUBEY, J. P. (1982b): Development of the ox-cat cycle of *Sarcocystis hirsuta*. Proceedings of the Helminthological Society Washington **49(2)**, 295-304.
- DUBEY, J. P. (1982c): Quantitative parasitemia in calves fed *Sarcocystis cruzi* sporocysts from coyotes. American Journal of Veterinary Research **43(6)**, 1085-1086.
- DUBEY, J. P., SPEER, C. A. und EPLING, G. P. (1982): Sarcocystosis in newborn calves fed *Sarcocystis cruzi* sporocysts from coyotes. American Journal of Veterinary Research **43(12)**, 2147-2164.
- DUBEY, J. P. (1983a): Microgametogony of *Sarcocystis hirsuta* in the intestine of the cat. Parasitology **86 (Pt 1)**, 7-9.
- DUBEY, J. P. (1983b): Impaired protective immunity to sarcocystosis in pregnant dairy goats. American Journal of Veterinary Research **44(1)**, 132-134.
- DUBEY, J. P. (1983c): Clinical sarcocystosis in calves fed *Sarcocystis hirsuta* sporocysts from cats. Veterinary Pathology **20(1)**, 90-98.
- DUBEY, J. P. (1983d): Immunity to sarcocystosis: modification of intestinal coccidiosis, and disappearance of sarcocysts in dairy goats. Veterinary Parasitology **13(1)**, 23-34.
- DUBEY, J. P. (1984): Protective immunity to *Sarcocystis capracanis*-induced abortion in dairy goats. Journal of Protozoology **31(4)**, 553-555.
- DUBEY, J. P., SPEER, C. A. und FAYER, R. (1988): Sarcocystosis of animals and man. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- DUBEY, J. P., DAVIS, S. W., SPEER, C. A., BOWMAN, D. D., DE LAHUNTA, A., GRANSTROM, D. E., TOPPER, M. J., HAMIR, A. N., CUMMINGS, J. F. und SUTER, M. M. (1991): *Sarcocystis neurona* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa), the etiologic agent of equine protozoal myeloencephalitis. Journal of Parasitology **77(2)**, 212-218.
- DUBEY, J. P. und HEDSTROM, O. R. (1993): Meningoencephalitis in mink associated with a *Sarcocystis neurona*-like organism. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation **5(3)**, 467-471.
- DUBEY, J. P., HIGGINS, R. J., BARR, B. C., SPANGLER, W. L., KOLLIN, B. und JORGENSEN, L. S. (1994): *Sarcocystis*-associated meningoencephalomyelitis in a cat. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation **6(1)**, 118-120.

DUBEY, J. P. und LINDSAY, D. S. (1998): Isolation in immunodeficient mice of *Sarcocystis neurona* from opossum (*Didelphis virginiana*) faeces, and its differentiation from *Sarcocystis falcatula*. International Journal for Parasitology **28(12)**, 1823-1828.

DUBEY, J. P., LINDSAY, D. S. und SPEER, C. A. (1998): Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clinical Microbiology Reviews **11(2)**, 267-299.

DUBEY, J. P. und HAMIR, A. N. (2000): Immunohistochemical confirmation of *Sarcocystis neurona* infections in raccoons, mink, cat, skunk, and pony. Journal of Parasitology **86(5)**, 1150-1152.

DUBEY, J. P., LINDSAY, D. S., VENTURINI, L. und VENTURINI, C. (2000): Characterization of *Sarcocystis falcatula* isolates from the Argentinian opossum, *Didelphis albiventris*. Journal of Eukaryotic Microbiology **47(3)**, 260-263.

DUBEY, J. P., FRITZ, D., LINDSAY, D. S., SHEN, S. K., KWOK, O. C. und THOMPSON, K. C. (2001a): Diclazuril preventive therapy of gamma interferon knockout mice fed *Sarcocystis neurona* sporocysts. Veterinary Parasitology **94(4)**, 257-264.

DUBEY, J. P., LINDSAY, D. S., KERBER, C. E., KASAI, N., PENA, H. F., GENNARI, S. M., KWOK, O. C., SHEN, S. K. und ROSENTHAL, B. M. (2001b): First isolation of *Sarcocystis neurona* from the South American opossum, *Didelphis albiventris*, from Brazil. Veterinary Parasitology **95(2-4)**, 295-304.

DUBEY, J. P., LINDSAY, D. S., SAVILLE, W. J., REED, S. M., GRANSTROM, D. E. und SPEER, C. A. (2001c): A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). Veterinary Parasitology **95(2-4)**, 89-131.

DUBEY, J. P., ROSENTHAL, B. M. und SPEER, C. A. (2001d): *Sarcocystis lindsayi* n. sp. (Protozoa: Sarcocystidae) from the South American opossum, *Didelphis albiventris* from Brazil. Journal of Eukaryotic Microbiology **48(5)**, 595-603.

DUBEY, J. P., SAVILLE, W. J., STANEK, J. F., LINDSAY, D. S., ROSENTHAL, B. M., OGLESBEE, M. J., ROSYPAL, A. C., NJOKU, C. J., STICH, R. W., KWOK, O. C., SHEN, S. K., HAMIR, A. N. und REED, S. M. (2001e): *Sarcocystis neurona* infections in raccoons (*Procyon lotor*): evidence for natural infection with sarcocysts, transmission of infection to opossums (*Didelphis virginiana*), and experimental induction of neurologic disease in raccoons. Veterinary Parasitology **100(3-4)**, 117-129.

- DUBEY, J. P., SAVILLE, W. J., SREEKUMAR, C., SHEN, S. K., LINDSAY, O. S., PENA, H. F., VIANNA, M. C., GENNARI, S. M. und REED, S. M. (2002): Effects of high temperature and disinfectants on the viability of *Sarcocystis neurona* sporocysts. *Journal of Parasitology* **88(6)**, 1252-1254.
- DUBEY, J. P., CAWTHORN, R. J., SPEER, C. A. und WOBESER, G. A. (2003): Redescription of the sarcocysts of *Sarcocystis rileyi* (Apicomplexa: Sarcocystidae). *Journal of Eukaryotic Microbiology* **50(6)**, 476-482.
- DUBEY, J. P., LANE, E. und WILPE, E. (2004): *Sarcocystis ramphystosi* n. sp. and *Sarcocystis sulfuratusi* n. sp. from the keel-billed toucan (*Ramphastos sulfuratus*). *Acta Parasitologica* **49(2)**, 93-101.
- DUBEY, J. R., JOHNSON, G. C., BERMUDEZ, A., SUEDEMEYER, K. W. und FRITZ, D. L. (2001f): Neural sarcocystosis in a straw-necked ibis (*Carphibis spinicollis*) associated with a *Sarcocystis neurona*-like organism and description of muscular sarcocysts of an unidentified *Sarcocystis* species. *Journal of Parasitology* **87(6)**, 1317-1322.
- DVG (2015): 13. Liste der nach den Richtlinien der DVG (4. Auflage sowie 3. Auflage für Übergangszeit) geprüften und als wirksam befundenen Desinfektionsmittel für den Tierhaltungsbereich (Handelspräparate).
- DYLKO, N. I. (1962): The occurrence of *Sarcocystis* spp. in Belarus. *Doklady Akad Nauk BSSR* **6**, 399-400.
- ECCO, R., LUPPI, M. M., MALTA, M. C. C., ARAÚJO, M. R., GUEDES, R. M. C. und SHIVAPRASAD, H. L. (2008): An outbreak of sarcocystosis in psittacines and a pigeon in a zoological collection in Brazil. *Avian Diseases* **52(4)**, 706-710.
- ELITSUR, E., MARSH, A. E., REED, S. M., DUBEY, J. P., OGLESBEE, M. J., MURPHY, J. E. und SAVILLE, W. J. A. (2007): Early migration of *Sarcocystis neurona* in ponies fed sporocysts. *Journal of Parasitology* **93(5)**, 1222-1225.
- ELSHEIKHA, H., MURPHY, A. und MANSFIELD, L. (2004): Viability of sporocysts after long-term storage. *Veterinary Parasitology* **123(3-4)**, 257-264.
- ELSHEIKHA, H. M. (2009): Has *Sarcocystis neurona* Dubey et al., 1991 (Sporozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae) cospeciated with its intermediate hosts? *Veterinary Parasitology* **163(4)**, 307-314.
- ENTZEROTH, R. (1982): Ultrastructure of gamonts and gametes and fertilization of *Sarcocystis* sp. from the roe deer (*Capreolus capreolus*) in dogs. *Zeitschrift für Parasitenkunde* **67(2)**, 147-153.

ERBER, M., MEYER, J. und BOCH, J. (1978): Aborte beim Schwein durch Sarkosporidien (*Sarcocystis suicanis*). Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift **91(20)**, 393-395.

ERBER, M. und GEISEL, O. (1979): Untersuchungen zur Klinik und Pathologie der *Sarcocystis-suicanis*-Infektion beim Schwein. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift **92(10)**, 197-202.

ERBER, M. (1982): Life cycle of *Sarcocystis tenella* in sheep and dog. Zeitschrift für Parasitenkunde **68(2)**, 171-180.

ESPOSITO, D. H., STICH, A., EPELBOIN, L., MALVY, D., HAN, P. V., BOTTIEAU, E., DA SILVA, A., ZANGER, P., SLESACK, G., VAN GENDEREN, P. J. J., ROSENTHAL, B. M., CRAMER, J. P., VISSER, L. G., MUNOZ, J., DREW, C. P., GOLDSMITH, C. S., STEINER, F., WAGNER, N., GROBUSCH, M. P., PLIER, D. A., TAPPE, D., SOTIR, M. J., BROWN, C., BRUNETTE, G. W., FAYER, R., VON SONNENBURG, F., NEUMAYR, A., KOZARSKY, P. E., VAN DEN ENDEN, E., VAN ESBROECK, M., GHESQUIERE, W., NGUYEN, D., RECEVEUR, M. C., PEYRON, F., PAROLA, P., SAVINI, H., CAUMES, E., PERIGNON, A., DEVELOUX, M., RAPP, C., KELLER, C. A., HADITSCH, M., GUTHOFF, W., LIEBOLD, I., SCHAFFER, J., GOBBI, F., KORTMANN, W., VAN TWILLERT, G., GOORHUIS, A., HARRIS, V., VAN VUGT, M., STJUNIS, K., ARONICA, E., VAN LIESHOUT, L., ROESTENBERG, M., VAN WOUT, J., BARKHAM, T., LIM, P. L., CHIAN, L. K., HATZ, C., BRUGGER, S. D., FURRER, H., CHAPPUIS, F., MICHEL, Y., CHOOCHUMPORN, S., NARKWIBOONWONG, T., DRYDEN, M. S., BENEDICT, T., HANDALI, S., WILKINS, P. P., SHIEH, W. J., ZAKI, S., KOGELMAN, L. und HATCH, S. (2014): Acute Muscular Sarcocystosis: An international investigation among ill travelers returning from Tioman Island, Malaysia, 2011-2012. Clinical Infectious Diseases **59(10)**, 1401-1410.

FADDOUL, G. P. und FELLOWS, G. W. (1965): Clinical manifestations of paratyphoid infection in pigeons. Avian Diseases **22**, 377-381.

FAYER, R. (1974): Development of *Sarcocystis fusiformis* in the small intestine of the dog. Journal of Parasitology **60(4)**, 660-665.

FAYER, R. und JOHNSON, A. J. (1975): Effect of amprolium on acute sarcocystosis in experimentally infected calves. Journal of Parasitology **61(5)**, 932-936.

FAYER, R., JOHNSON, A. J. und LUNDE, M. (1976): Abortion and other signs of disease in cows experimentally infected with *Sarcocystis fusiformis* from dogs. Journal of Infectious Diseases **134(6)**, 624-628.

FAYER, R. (1977): Production of *Sarcocystis cruzi* sporocysts by dogs fed experimentally infected and naturally infected beef. Journal of Parasitology **63(6)**, 1072-1075.

- FAYER, R. und LUNDE, M. N. (1977): Changes in serum and plasma proteins and in IgG and IgM antibodies in calves experimentally infected with *Sarcocystis* from dogs. *Journal of Parasitology* **63(3)**, 438-442.
- FAYER, R. (1979): Multiplication of *Sarcocystis bovicanis* in the bovine bloodstream. *Journal of Parasitology* **65(6)**, 980-982.
- FAYER, R. und DUBEY, J. P. (1984): Protective immunity against clinical sarcocystosis in cattle. *Veterinary Parasitology* **15(3-4)**, 187-201.
- FAYER, R. (2004): *Sarcocystis* spp. in human infections. *Clinical Microbiology Reviews* **17(4)**, 894-902.
- FENGER, C. K., GRANSTROM, D. E., LANGEMEIER, J. L. und STAMPER, S. (1997): Epizootic of equine protozoal myeloencephalitis on a farm. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **210(7)**, 923-927.
- FORD, G. E. (1985): Immunity of sheep to homologous challenge with dog-borne *Sarcocystis* species following varying levels of prior exposure. *International Journal for Parasitology* **15(6)**, 629-634.
- FOREST, T. W., ABOU-MADI, N., SUMMERS, B. A., TORNQUIST, S. J. und COOPER, B. J. (2000): *Sarcocystis neurona*-like encephalitis in a Canada lynx (*Felis lynx canadensis*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **31(3)**, 383-387.
- FOREYT, W. J. (1986): Evaluation of decoquinate, lasalocid, and monensin against experimentally induced sarcocystosis in calves. *American Journal of Veterinary Research* **47(8)**, 1674-1676.
- FOREYT, W. J., BALDWIN, T. J. und LAGERQUIST, J. E. (1995): Experimental infections of *Sarcocystis* spp. in Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus*) calves. *Journal of Wildlife Diseases* **31(4)**, 462-466.
- FRANKLIN, R. P., MACKAY, R. J., GILLIS, K. D., TANHAUSER, S. M., GINN, P. E. und KENNEDY, T. J. (2003): Effect of a single dose of ponazuril on neural infection and clinical disease in *Sarcocystis neurona*-challenged interferon-gamma knockout mice. *Veterinary Parasitology* **114(2)**, 123-130.
- FRELIER, P. F. (1980): Experimentally induced bovine sarcocystosis: correlation of in vitro lymphocyte function with structural changes in lymphoid tissue. *American Journal of Veterinary Research* **41(8)**, 1201-1207.
- FURR, M. und KENNEDY, T. (2000): Cerebrospinal fluid and blood concentrations of toltrazuril 5% suspension in the horse after oral dosing. *Veterinary Therapeutics* **1(2)**, 125-132.

- FURR, M., KENNEDY, T., MACKAY, R., REED, S., ANDREWS, F., BERNARD, B., BAIN, F. und BYARS, D. (2001): Efficacy of ponazuril 15% oral paste as a treatment for equine protozoal myeloencephalitis. *Veterinary Therapeutics* **2(3)**, 215-222.
- FURR, M., MCKENZIE, H., SAVILLE, W. J., DUBEY, J. P., REED, S. M. und DAVIS, W. (2006): Prophylactic administration of ponazuril reduces clinical signs and delays seroconversion in horses challenged with *Sarcocystis neurona*. *Journal of Parasitology* **92(3)**, 637-643.
- GASBARRE, L. C., SUTER, P. und FAYER, R. (1984): Humoral and cellular immune responses in cattle and sheep inoculated with *Sarcocystis*. *American Journal of Veterinary Research* **45(8)**, 1592-1596.
- GESTRICH, R., MEHLHORN, H. und HEYDORN, A. O. (1975): Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Cysten von *Sarcocystis fusiformis* in der Muskulatur von Kälbern nach experimenteller Infektion mit Oocysten und Sporocysten der großen Form von *Isospora bigemina* der Katze. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, I. Abt. Originale A* **233**, 261-276.
- GJERDE, B. und DAHLGREN, S. S. (2010): Corvid birds (Corvidae) act as definitive hosts for *Sarcocystis ovalis* in moose (*Alces alces*). *Parasitology Research* **107(6)**, 1445-1453.
- GODOY, S. N., DE PAULA, C. D., CUBAS, Z. S., MATUSHIMA, E. R. und CATÃO-DIAS, J. (2009): Occurrence of *Sarcocystis falcatula* in captive psittacine birds in Brazil. *Journal of Avian Medicine and Surgery* **23(1)**, 18-23.
- GOTTSTEIN, B., EPERON, S., DAI, W. J., CANNAS, A., HEMPHILL, A. und GREIF, G. (2001): Efficacy of toltrazuril and ponazuril against experimental *Neospora caninum* infection in mice. *Parasitology Research* **87(1)**, 43-48.
- GUSTAFSSON, K., BOOK, M., DUBEY, J. P. und UGGLA, A. (1997): Meningoencephalitis in capercaillie (*Tetrao urogallus* L.) caused by a *Sarcocystis*-like organism. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **28(3)**, 280-284.
- GUT, J. (1982): Infection of mice immunized with formalized cystozoites of *Sarcocystis dispersa* Cerna, Kolarova et Sulc, 1978. *Folia Parasitologica* **29(3)**, 285-288.
- HABERKORN, A. (1996): Chemotherapy of human and animal coccidiosis: state and perspectives. *Parasitology Research* **82(3)**, 193-199.
- HACKSTEIN, J. H., MACKENSTEDT, U., MEHLHORN, H., MEIJERINK, J. P., SCHUBERT, H. und LEUNISSEN, J. A. (1995): Parasitic apicomplexans harbor a chlorophyll a-D1 complex, the potential target for therapeutic triazines. *Parasitology Research* **81(3)**, 207-216.

- HAERDI, C., HAESSIG, M., SAGER, H., GREIF, G., STAUBLI, D. und GOTTSTEIN, B. (2006): Humoral immune reaction of newborn calves congenitally infected with *Neospora caninum* and experimentally treated with toltrazuril. *Parasitology Research* **99(5)**, 534-540.
- HARDER, A. und HABERKORN, A. (1989): Possible mode of action of toltrazuril: studies on two *Eimeria* species and mammalian and *Ascaris suum* enzymes. *Parasitology Research* **76(1)**, 8-12.
- HECKEROTH, A. R. und TENTER, A. M. (1998): Comparison of immunological and molecular methods for the diagnosis of infections with pathogenic *Sarcocystis* species in sheep. *Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine* **23(6)**, 293-302.
- HEMENWAY, M. P., AVERY, M. L., GINN, P. E., SCHAACK, S., DAME, J. B. und GREINER, E. C. (2001): Influence of size of sporocyst inoculum upon the size and number of sarcocysts of *Sarcocystis falcatula* which develop in the brown-headed cowbird. *Veterinary Parasitology* **95(2-4)**, 321-326.
- HENDERSON, J. M., DIES, K. H., HAINES, D. M., HIGGS, G. W. und AYROUD, M. (1997): Neurological symptoms associated with sarcocystosis in adult sheep. *Canadian Veterinary Journal* **38(3)**, 168-170.
- HEYDORN, A. O. und ROMMEL, M. (1972a): Beiträge zum Lebenszyklus der Sarkosporidien IV. Entwicklungsstadien von *S. fusiformis* in der Dünndarmschleimhaut der Katze. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* **85(17)**, 333-336.
- HEYDORN, A. O. und ROMMEL, M. (1972b): Beiträge zum Lebenszyklus der Sarkosporidien II. Hund und Katze als Überträger der Sarkosporidien des Rindes. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* **85(7)**, 121-140.
- HEYDORN, A. O., GESTRICH, R., MEHLHORN, H. und ROMMEL, M. (1975a): Proposal for a new nomenclature of the Sarcosporidia. *Zeitschrift für Parasitenkunde* **48(2)**, 73-82.
- HEYDORN, A. O., MEHLHORN, H. und GESTRICH, R. (1975b): Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Cysten von *Sarcocystis fusiformis* in der Muskulatur von Kälbern nach experimenteller Infektion mit Oocysten und Sporocysten von *Isoospora hominis* Railliet et Lucet 1891 2. Die Feinstruktur der Merozoiten und Merozoiten. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, I. Abt. Originale A* **232**, 373-391.
- HEYDORN, A. O. und GESTRICH, R. (1976): Beiträge zum Lebenszyklus der Sarkosporidien VII. Entwicklungsstadien von *Sarcocystis ovicanis* im Schaf. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* **89(1)**, 1-5.

HEYDORN, A. O. (1977): Beiträge zum Lebenszyklus der Sarkosporidien. IX. Entwicklungszyklus von *Sarcocystis suihominis* n. spec. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift **90(11)**, 218-224.

HEYDORN, A. O. und MEHLHORN, H. (1978): Light and electron microscopic studies on *Sarcocystis suihominis* 2. The schizogony preceding cyst formation. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, I. Abt. Originale A **240**, 123-134.

HEYDORN, A. O., MATUSCHKA, F. R. und IPCZYNSKI, V. (1980): Zur Schizogonie von *Sarcocystis suicanis* im Schwein. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift **94(3)**, 49-51.

HEYDORN, A. O., HARALAMBIDIS, S. und MATUSCHKA, F.-R. (1981): Zur Chemoprophylaxe und Therapie der akuten Sarkosporidiose. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift **94(11)**, 229-234.

HEYDORN, A. O. und HARALAMBIDIS, S. (1982): Zur Entwicklung von *Sarcocystis capracanis* Fischer, 1979. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift **95(14)**, 265-271.

HEYDORN, A. O. und UNTERHOLZNER, J. (1983): Zur Entwicklung von *Sarcocystis hircicanis* n. sp. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift **96(8)**, 275-282.

HEYDORN, A. O. (1985): Zur Entwicklung von *Sarcocystis arieticanis* n. sp. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift **98(7)**, 231-241.

HEYDORN, A. O. und MEHLHORN, H. (1987): Fine structure of *Sarcocystis arieticanis* Heydorn, 1985 in its intermediate and final hosts (sheep and dog). Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, I. Abt. Originale A **264**, 353-362.

HIEPE, F., LITZKE, L.-F., SCHEIBNER, G., JUNGMANN, R., HIEPE, T. und MONTAG, T. (1981): Untersuchungen zur toxischen Wirkung von Extrakten aus *Sarcocystis-ovifelis*-Makrozysten auf Kaninchen. Monatshefte für Veterinärmedizin **3623**, 908-910.

HOFER, J., BOCH, J. und ERBER, M. (1982): Zelluläre und humorale Reaktion bei Mäusen nach experimenteller *Sarcocystis muris*- und *S. dispersa*-Infektion. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift **95(9)**, 169-175.

ITALIANO, C. M., WONG, K. T., ABUBAKAR, S., LAU, Y. L., RAMLI, N., SYED OMAR, S. F., KAHAR BADOR, M. und TAN, C. T. (2014): *Sarcocystis nesbitti* causes acute, relapsing febrile myositis with a high attack rate: Description of a large outbreak of muscular sarcocystosis in Pangkor Island, Malaysia, 2012. PLoS Neglected Tropical Diseases **8(5)**, 2876-2884.

IUCN (2013): The IUCN Redlist of Threatened Species. Version 2013.2. <http://www.iucnredlist.org/>. Download am 11. April 2014.

JACOBSON, E. R., GARDINER, C. H., NICHOLSON, A. und PAGE, C. D. (1984): *Sarcocystis* encephalitis in a cockatiel. Journal of the American Veterinary Medical Association **185(8)**, 904-906.

JAIN, P. C. und SHAH, H. L. (1986): Gametogony and sporogony of *Sarcocystis fusiformis* of buffaloes in the small intestine of experimentally infected cats. Veterinary Parasitology **21(3)**, 205-209.

JÄKEL, T., KHOPRASERT, Y., KLIEMT, D. und MACKENSTEDT, U. (2001): Immunoglobulin subclass responses of wild brown rats to *Sarcocystis singaporensis*. International Journal for Parasitology **31(3)**, 273-283.

JAKOB, W., STOLTE, M., ODENING, K. und BOCKHARDT, I. (1998): *Sarcocystis kirmsei* in the brain of a hill mynah (*Gracula religiosa*). Journal of Comparative Pathology **118(1)**, 75-80.

JEFFREY, M., O'TOOLE, D., SMITH, T. und BRIDGES, A. W. (1988): Immunocytochemistry of ovine sporozoan encephalitis and encephalomyelitis. Journal of Comparative Pathology **98(2)**, 213-224.

KAISER, I. A. und MARKUS, M. B. (1983): *Sarcocystis* infection in wild Southern African birds. South African Journal of Science **79**, 470-471.

KOIBUCHI, T., NAKAMURA, T., MIURA, T., ENDO, T., NAKAMURA, H., TAKAHASHI, T., KIM, H. S., WATAYA, Y., WASHIZAKI, K., YOSHIKAWA, K. und IWAMOTO, A. (2003): Acute disseminated encephalomyelitis following *Plasmodium vivax* malaria. Journal of Infection and Chemotherapy **9(3)**, 254-256.

KRONE, O., RUDOLPH, M. und JAKOB, W. (2000): Protozoa in the breast muscle of raptors in Germany. Acta Protozoologica **29(1)**, 35-42.

KUBO, M., KAWACHI, T., MURAKAMI, M., TOKUHIRO, S., AGATSUMA, T., ITO, K., OKANO, T., ASANO, M., FUKUSHI, H., NAGATAKI, M., SAKAI, H. und YANAI, T. (2010): Meningoencephalitis associated with *Sarcocystis* spp. in a free-living Japanese raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides viverrinus*). Journal of Comparative Pathology **143(2-3)**, 185-189.

KÜHN, J. (1865): Untersuchungen über die Trichinenkrankheit der Schweine. Mitteilungen des Landwirtschaftlichen Instituts der Universität du Halle.

KUL, O., YILDIZ, K., OCAL, N., FREYRE, A., DENIZ, A., KARAHAN, S., ATMACA, H. T., GOKPINAR, S., DINCEL, G. C., UZUNALIOGLU, T. und TERZI, O. S. (2013): In-vivo efficacy of toltrazuril on experimentally induced *Toxoplasma gondii* tissue cysts in lambs: a novel strategy for prevention of human exposure to meat-borne toxoplasmosis. *Research in Veterinary Science* **94(2)**, 269-76.

KUMMERFELD, N. (2011): Parasitäre Erkrankungen. In: KALETA, E. F. und KRAUTWALD-JUNGHANNS, M.-E. (eds.). *Kompendium der Ziervogelkrankheiten, Papageien - Tauben - Sperlingsvögel*, 4. Auflage. Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH&Co KG, Hannover. S. 192-194.

KUTKIENE, L., PRAKAS, P., BUTKAUSKAS, D. und SRUOGA, A. (2012a): Description of *Sarcocystis turdusi* sp. nov. from the common blackbird (*Turdus merula*). *Parasitology* **139(11)**, 1438-1443.

KUTKIENE, L., PRAKAS, P., SRUOGA, A. und BUTKAUSKAS, D. (2012b): Description of *Sarcocystis anasi* sp. nov. and *Sarcocystis albifronsi* sp. nov. in birds of the order Anseriformes. *Parasitology Research* **110(2)**, 1043-1046.

KUTKIENÉ, L., SRUOGA, A. und BUTKAUSKAS, D. (2006): *Sarcocystis* sp. from white-fronted goose (*Anser albifrons*): cyst morphology and life cycle studies. *Parasitology Research* **99(5)**, 562-565.

KUTKIENÉ, L., PRAKAS, P., SRUOGA, A. und BUTKAUSKAS, D. (2008): *Sarcocystis* in the birds family Corvidae with description of *Sarcocystis cornixi* sp. nov. from the hooded crow (*Corvus cornix*). *Parasitology Research* **104(2)**, 329-336.

KUTKIENÉ, L., PRAKAS, P., SRUOGA, A. und BUTKAUSKAS, D. (2010a): Identification of *Sarcocystis rileyi* from the mallard duck (*Anas platyrhynchos*) in Europe: cyst morphology and results of DNA analysis. *Parasitology Research* **108(3)**, 709-714.

KUTKIENÉ, L., PRAKAS, P., SRUOGA, A. und BUTKAUSKAS, D. (2010b): The mallard duck (*Anas platyrhynchos*) as intermediate host for *Sarcocystis wobeseri* sp. nov. from the barnacle goose (*Branta leucopsis*). *Parasitology Research* **107(4)**, 879-888.

LABBÉ, A. (1899): Sporozoa, Das Tierreich, **5**.

LANKESTER, E. R. (1882): On *Drepanidium ranarum* the cell-parasite of the frog's blood and spleen (Gaule's Würmschen). *Quarterly Journal of Microscopical Science* **22**, 53-65.

- LAPOINTE, J. M., DUIGNAN, P. J., MARSH, A. E., GULLAND, F. M., BARR, B. C., NAYDAN, D. K., KING, D. P., FARMAN, C. A., HUNTINGDON, K. A. und LOWENSTINE, L. J. (1998): Meningoencephalitis due to a *Sarcocystis neurona*-like protozoan in Pacific harbor seals (*Phoca vitulina richardsi*). *Journal of Parasitology* **84(6)**, 1184-1189.
- LATIF, B., VELLAYAN, S., OMAR, E., ABDULLAH, S. und MAT DESA, N. (2010): Sarcocystosis among wild captive and zoo animals in Malaysia. *Korean Journal of Parasitology* **48(3)**, 213-217.
- LATIMER, K. S., PERRY, R. W., MO, I. P., NIETFELD, J. C., STEFFENS, W. L., 3RD, HARRISON, G. J. und RITCHIE, B. W. (1990): Myocardial sarcocystosis in a grand eclectus parrot (*Eclectus roratus*) and a Moluccan cockatoo (*Cacatua moluccensis*). *Avian Diseases* **34(2)**, 501-505.
- LAU, Y. L., CHANG, P. Y., SUBRAMANIAM, V., NG, Y. H., MAHMUD, R., AHMAD, A. F. und FONG, M. Y. (2013): Genetic assemblage of *Sarcocystis* spp. in Malaysian snakes. *Parasites and Vectors* **6(1)**, 257-262.
- LAU, Y. L., CHANG, P. Y., TAN, C. T., FONG, M. Y., MAHMUD, R. und WONG, K. T. (2014): *Sarcocystis nesbitti* infection in human skeletal muscle: Possible transmission from snakes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **90(2)**, 361-364.
- LEEK, R. G. und FAYER, R. (1983): Experimental *Sarcocystis ovis* infection in lambs: salinomycin chemoprophylaxis and protective immunity. *Journal of Parasitology* **69(2)**, 271-276.
- LÉGER, L. und DUBOSCQ, O. (1910): *Selenococcidium intermedium* L. et D. et la systématique des sporozoaires. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale* **5**, 187-238.
- LÉGER, L. (1911): *Caryospora simplex*, coccidie monosporée et la classification des coccidies. *Archiv für Protistenkunde* **22**, 71-86.
- LEUCKART, R. (1879): *Die Parasiten des Menschen*, 2. Auflage, Leipzig.
- LEVINE, N. D. (1970): Taxonomy of the Sporozoa. *Journal of Parasitology* **56(II)**, 208-209.
- LEVINE, N. D. (1986): The Taxonomy of *Sarcocystis* (Protozoa, Apicomplexa) Species. *Journal of Parasitology* **72(3)**, 372-382.
- LINDSAY, D. S. und BLAGBURN, B. L. (1999): Prevalence of encysted apicomplexans in muscles of raptors. *Veterinary Parasitology* **80(4)**, 341-344.
- LINDSAY, D. S., DUBEY, J. P. und KENNEDY, T. J. (2000a): Determination of the activity of ponazuril against *Sarcocystis neurona* in cell cultures. *Veterinary Parasitology* **92(2)**, 165-169.

- LINDSAY, D. S., THOMAS, N. J. und DUBEY, J. P. (2000b): Biological characterisation of *Sarcocystis neurona* isolated from a Southern sea otter (*Enhydra lutris nereis*). International Journal for Parasitology **30(5)**, 617-624.
- LUNDE, M. N. und FAYER, R. (1977): Serologic test for antibody to *Sarcocystis* in cattle. Journal of Parasitology **63(2)**, 222-225.
- LUZNAR, S. L., AVERY, M. L., DAME, J. B., MACKAY, R. J. und GREINER, E. C. (2001): Development of *Sarcocystis falcatula* in its intermediate host, the Brown-headed Cowbird (*Molothrus ater*). Veterinary Parasitology **95(2-4)**, 327-334.
- MACKAY, R. J., GRANSTROM, D. E., SAVILLE, W. J. und REED, S. M. (2000): Equine protozoal myeloencephalitis. Veterinary Clinics of North America. Equine Practice **16(3)**, 405-425.
- MACKAY, R. J., TANHAUSER, S. T., GILLIS, K. D., MAYHEW, I. G. und KENNEDY, T. J. (2008): Effect of intermittent oral administration of ponazuril on experimental *Sarcocystis neurona* infection of horses. American Journal of Veterinary Research **69(3)**, 396-402.
- MAIER, K., OLIAS, P., ENDERLEIN, D., KLOPFLEISCH, R., MAYR, S. L., GRUBER, A. D. und LIERZ, M. (2015): Parasite distribution and early stage encephalitis in *Sarcocystis calchasi* infections in domestic pigeons (*Columba livia* f. *domestica*). Avian Pathology **44(1)**, 5-12.
- MALHOTRA, I., DENT, A., MUNGAI, P., MUCHIRI, E. und KING, C. L. (2005): Real-time quantitative PCR for determining the burden of *Plasmodium falciparum* parasites during pregnancy and infancy. Journal of Clinical Microbiology **43(8)**, 3630-3635.
- MANDOUR, A. M. (1969): Studies on the toxicity of *Sarcocystis*. Journal of Medical Microbiology **2(3)**, 361-363.
- MARSH, A. E., DENVER, M., HILL, F. I., MCELHANEY, M. R., TRUPKIEWICZ, J. G., STEWART, J. und TELL, L. (2000): Detection of *Sarcocystis neurona* in the brain of a Grant's zebra (*Equus burchelli bohmi*). Journal of Zoo and Wildlife Medicine **31(1)**, 82-86.
- MARY, C., FARAUT, F., DROGOUL, M. P., XERIDAT, B., SCHLEINIZ, N., CUISENIER, B. und DUMON, H. (2006): Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **75(5)**, 858-863.

MEHLHORN, H. und SCHOLTYSECK, E. (1973): Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Cystenstadien von *Sarcocystis tenella* aus der Oesophagus-Muskulatur des Schafes. Zeitschrift für Parasitenkunde **41(4)**, 291-310.

MEHLHORN, H. und SCHOLTYSECK, E. (1974): Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Entwicklungsstadien von *Sarcocystis tenella* aus der Darmwand der Hauskatze. Zeitschrift für Parasitenkunde **43(4)**, 251-270.

MEHLHORN, H. (1975): Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Cysten von *Sarcocystis ovis* Heydorn et al. (1975) in der Muskulatur von Schafen. Zeitschrift für Parasitenkunde **48(2)**, 83-93.

MEHLHORN, H., HEYDORN, A. O. und GESTRICH, R. (1975a): Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Cysten von *Sarcocystis fursiformis* in der Muskulatur von Kälbern nach experimenteller Infektion mit Oocysten und Sporocysten der großen Form von *Isospora bigemina* des Hundes 1. Zur Entstehung der Cyste und der "Cystenwand". Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, I. Abt. Originale A **232**, 392-409.

MEHLHORN, H., HEYDORN, A. O. und GESTRICH, R. (1975b): Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Cysten von *Sarcocystis fusiformis* in der Muskulatur von Kälbern nach experimenteller Infektion mit Oocysten und Sporocysten von *Isospora hominis* Railliet et Lucet, 1891 1. Zur Entstehung der Cyste und der Cystenwand. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, I. Abt. Originale A **231**, 301-322.

MEHLHORN, H. und HEYDORN, A. O. (1977): Light and electron microscopic studies of *Sarcocystis suihominis* 1. The development of cysts in experimentally infected pigs. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, I. Abt. Originale A **239**, 124-139.

MEHLHORN, H. und HEYDORN, A. O. (1978): The sarcosporidia (Protozoa, Sporozoa): life cycle and fine structure. Advances in Parasitology **16**, 43-91.

MEHLHORN, H. und HEYDORN, A. O. (1979): Electron microscopical study on gamogony of *Sarcocystis suihominis* in human tissue cultures. Zeitschrift für Parasitenkunde **58(2)**, 97-113.

MEHLHORN, H., ORTMANN-FALKENSTEIN, G. und HABERKORN, A. (1984): The effects of sym. Triazinones on developmental stages of *Eimeria tenella*, *E. maxima* and *E. acervulina*: a light and electron microscopical study. Zeitschrift für Parasitenkunde **70(2)**, 173-182.

MELVILLE, R. V. (1984): Reply to Frenkel, Mehlhorn, and Heydorn on protozoan nomina dubia. *Journal of Parasitology* **70(5)**, 815.

MIESCHER, F. (1843): Über eigenthümliche Schläuche in den Muskeln einer Hausmaus. Bericht über die Verhandlungen der Naturforschenden Gesellschaft in Basel **5**, 198-202.

MILLER, M. A., CONRAD, P. A., HARRIS, M., HATFIELD, B., LANGLOIS, G., JESSUP, D. A., MAGARGAL, S. L., PACKHAM, A. E., TOY-CHOUTKA, S., MELLI, A. C., MURRAY, M. A., GULLAND, F. M. und GRIGG, M. E. (2010): A protozoal-associated epizootic impacting marine wildlife: Mass-mortality of southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*) due to *Sarcocystis neurona* infection. *Veterinary Parasitology* **172(3-4)**, 183-194.

MONTAG, T., HIEPE, F., TIETZ, H. J., BROSE, E., MANN, W., LIEBENTHAL, C. und HIEPE, T. (1986): Determination of the mitogenic effect of *Sarcocystis gigantea* extracts in the lectin fraction. *Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine* **11 Suppl**, 35-38.

MORÉ, G., ABRAHAMOVICH, P., JURADO, S., BACIGALUPE, D., MARIN, J. C., RAMBEAUD, M., VENTURINI, L. und VENTURINI, M. C. (2011): Prevalence of *Sarcocystis* spp. in Argentinean cattle. *Veterinary Parasitology* **177(1-2)**, 162-165.

MORÉ, G., SCHARES, S., MAKSIMOV, A., CONRATHS, F. J., VENTURINI, M. C. und SCHARES, G. (2013): Development of a multiplex real time PCR to differentiate *Sarcocystis* spp. affecting cattle. *Veterinary Parasitology* **197(1-2)**, 85-94.

MORÉ, G., PANTCHEV, A., SKUBALLA, J., LANGENMAYER, M. C., MAKSIMOV, P., CONRATHS, F. J., VENTURINI, M. C. und SCHARES, G. (2014): *Sarcocystis sinensis* is the most prevalent thick-walled *Sarcocystis* species in beef on sale for consumers in Germany. *Parasitology Research* **113(6)**, 2223-2230.

MORGAN, G., TERLECKI, S. und BRADLEY, R. (1984): A suspected case of *Sarcocystis* encephalitis in sheep. *British Veterinary Journal* **140(1)**, 64-69.

MUNDAY, B. L. (1975): The developmental cycle of a species of *Sarcocystis* occurring in dogs and sheep, with observations on pathogenicity in the intermediate host. *Zeitschrift für Parasitenkunde* **46(2)**, 111-123.

MUNDAY, B. L. (1977): A species of *Sarcocystis* using owls as definitive hosts. *Journal of Wildlife Diseases* **13(2)**, 205-207.

MUNDAY, B. L. (1979): The effect of *Sarcocystis ovicanis* on growth rate and haematokrit in lambs. *Veterinary Parasitology* **5**, 129-135.

- MUNDAY, B. L., HARTLEY, W. J., HARRIGAN, K. E., PRESIDENTE, P. J. und OBENDORF, D. L. (1979): *Sarcocystis* and related organisms in Australian wildlife: II. Survey findings in birds, reptiles, amphibians and fish. *Journal of Wildlife Diseases* **15(1)**, 57-73.
- MUNDAY, B. L. (1981): Premature parturition in ewes inoculated with *Sarcocystis ovicanis*. *Veterinary Parasitology* **9(1)**, 17-26.
- MUNDAY, B. L. (1982): Effects of preparturient inoculation of pregnant ewes with *Sarcocystis ovicanis* upon the susceptibility of their progeny. *Veterinary Parasitology* **9(3-4)**, 273-276.
- MUNDAY, B. L. (1984): The effect of *Sarcocystis tenella* on wool growth in sheep. *Veterinary Parasitology* **15(2)**, 91-94.
- MUNDAY, B. L. und OBENDORF, D. L. (1984a): Morphology of *Sarcocystis gigantea* in experimentally-infected sheep. *Veterinary Parasitology* **16(3-4)**, 193-199.
- MUNDAY, B. L. und OBENDORF, D. L. (1984b): Development and growth of *Sarcocystis gigantea* in experimentally-infected sheep. *Veterinary Parasitology* **15(3-4)**, 203-211.
- MUNDAY, B. L. (1985): Demonstration of viable *Sarcocystis* sporocysts in the faeces of a lamb dosed orally. *Veterinary Parasitology* **17(4)**, 355-357.
- MUTALIB, A., KEIRS, R., MASLIN, W., TOPPER, M. und DUBEY, J. P. (1995): *Sarcocystis*-associated encephalitis in chickens. *Avian Diseases* **39(2)**, 436-440.
- MYLNICZENKO, N. D., KEARNS, K. S. und MELLI, A. C. (2008): Diagnosis and treatment of *Sarcocystis neurona* in a captive harbor seal (*Phoca vitulina*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **39(2)**, 228-235.
- NAKAMURA, Y., SAITO, M., SHIBATA, Y. und ITAGAKI, H. (1999): Induction of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide in rabbits inoculated with a cyst extract of *Sarcocystis cruzi*. *Veterinary Parasitology* **85(4)**, 235-243.
- NOUROLLAHI FARD, S. R., ASGHARI, M. und NOURI, F. (2009): Survey of *Sarcocystis* infection in slaughtered cattle in Kerman, Iran. *Tropical Animal Health and Production* **41(8)**, 1633-1636.
- O'DONOGHUE, P. J. und FORD, G. E. (1984): The asexual pre-cyst development of *Sarcocystis tenella* in experimentally infected specific-pathogen-free lambs. *International Journal for Parasitology* **14(4)**, 345-355.

- O'DONOGHUE, P. J. und WEYRETER, H. (1984): Examinations on the serodiagnosis of *Sarcocystis* infections. II. Class-specific immunoglobulin responses in mice, pigs, and sheep. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, I. Abt. Originale A **257(1)**, 168-184.
- O'DONOGHUE, P. J., ROMMEL, M., WEBER, M. und WEYRETER, H. (1985): Attempted immunization of swine against acute sarcocystosis using cystozoite-derived vaccines. Veterinary Immunology and Immunopathology **8(1-2)**, 83-92.
- O'DONOGHUE, P. J., OBENDORF, D. L., O'CALLAGHAN, M. G., MOORE, E. und DIXON, B. R. (1987): *Sarcocystis mucosa* (Blanchard 1885) Labbe 1889 in unadorned rock wallabies (*Petrogale assimilis*) and Bennett's wallabies (*Macropus rufogriseus*). Parasitology Research **73(2)**, 113-120.
- O'DONOGHUE, P. J. und WILKINSON, R. G. (1988): Antibody development and cellular immune responses in sheep immunized and challenged with *Sarcocystis tenella* sporocysts. Veterinary Parasitology **27(3-4)**, 251-265.
- OBENDORF, D. L. und MUNDAY, B. L. (1986): Demonstration of schizogonous stages of *Sarcocystis gigantea* in experimentally infected sheep. Veterinary Parasitology **19(1-2)**, 35-38.
- ODENING, K. (1998): The present state of of species-systematics in *Sarcocystis* Lankester, 1882 (Protista, Sporozoa, Coccidia). Systemic Parasitology **41**, 209-233.
- OIE (2004): Newcastle Disease. In: HEALTH, W. O. o. A. (ed.). Manual of standards for diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, Paris.
- OLIAS, P., GRUBER, A. D., HAFEZ, H. M., HEYDORN, A. O., MEHLHORN, H. und LIERZ, M. (2009a): *Sarcocystis calchasi* sp. nov. of the domestic pigeon (*Columba livia* f. *domestica*) and the Northern goshawk (*Accipiter gentilis*): light and electron microscopical characteristics. Parasitology Research **106(3)**, 577-585.
- OLIAS, P., GRUBER, A. D., HEYDORN, A. O., KOHLS, A., MEHLHORN, H., HAFEZ, H. M. und LIERZ, M. (2009b): A novel *Sarcocystis*-associated encephalitis and myositis in racing pigeons. Avian Pathology **38(2)**, 121-128.
- OLIAS, P., GRUBER, A. D., HEYDORN, A. O., KOHLS, A., HAFEZ, H. M. und LIERZ, M. (2010a): Unusual biphasic disease in domestic pigeons (*Columba livia* f. *domestica*) following experimental infection with *Sarcocystis calchasi*. Avian Diseases **54(3)**, 1032-1037.
- OLIAS, P., GRUBER, A. D., KOHLS, A., HAFEZ, H. M., HEYDORN, A. O., MEHLHORN, H. und LIERZ, M. (2010b): *Sarcocystis* species lethal for domestic pigeons. Emerging Infectious Diseases **16(3)**, 497-499.

- OLIAS, P., OLIAS, L., LIERZ, M., MEHLHORN, H. und GRUBER, A. D. (2010c): *Sarcocystis calchasi* is distinct to *Sarcocystis columbae* sp. nov. from the wood pigeon (*Columba palumbus*) and *Sarcocystis* sp. from the sparrowhawk (*Accipiter nisus*). *Veterinary Parasitology* **171(1-2)**, 7-14.
- OLIAS, P., OLIAS, L., KRÜCKEN, J., LIERZ, M. und GRUBER, A. D. (2011): High prevalence of *Sarcocystis calchasi* sporocysts in European *Accipiter* hawks. *Veterinary Parasitology* **175(3-4)**, 230-236.
- OLIAS, P., MEYER, A., KLOPFLEISCH, R., LIERZ, M., KASPERS, B. und GRUBER, A. D. (2013): Modulation of the host Th1 immune response in pigeon protozoal encephalitis caused by *Sarcocystis calchasi*. *Veterinary Research* **44(1)**, 10-19.
- OLIAS, P., MAIER, K., WUENSCHMANN, A., REED, L., ARMÍÉN, A. G., SHAW, D. P., GRUBER, A. D. und LIERZ, M. (2014): *Sarcocystis calchasi* has an expanded host range and induces neurological disease in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) and North American rock pigeons (*Columbia livia* f. *dom.*). *Veterinary Parasitology* **200(1-2)**, 59-65.
- OLSON, E. J., WUNSCHMANN, A. und DUBEY, J. P. (2007): *Sarcocystis* sp.-associated meningoencephalitis in a bald eagle (*Haliaeetus leucocephalus*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **19(5)**, 564-568.
- PACHECO, N. und FAYER, R. (1977): Fine structure of *Sarcocystis cruzi* schizonts. *Journal of Protozoology* **24(3)**, 382-388.
- PACHECO, N. D., SHEFFIELD, H. G. und FAYER, R. (1978): Fine structure of immature cysts of *Sarcocystis cruzi*. *Journal of Parasitology* **64(2)**, 320-325.
- PAK, S. M., SLYAROVA, O. N. und PAK, L. S. (1989): *Sarcocystis alectorivulpes* and *Sarcocystis alectoributeonis*-new sarcosporidian species of *Alectoris chugar*. *Izvestiya Akademii Nauk Kazakhskoi Sovetskoj Sotsialisticheskoi Respubliki, Serya Biologicheskaya* **6**, 25-30.
- PECKA, Z. (1988): Parasitic Protozoa of the genus *Sarcocystis* (Apicomplexa, Sarcocystidae) in pheasants, hens and some free-living birds in Czechoslovakia. *Vestníkčeskoslovenské Společnosti Zoologické* **52**, 266-270.
- PFEIFFER, L. (1890): Ueber einige neue Formen von Miescher'schen Schläuchen mit Mikro-. Myxo- und Sarcosporidieninhalt. *Archiv für Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin* **122(3)**, 552-573.

PHILLIPS, P. H. und FORD, G. E. (1987): Clinical, haematological and plasma biochemical changes in specified-pathogen-free (sporozoa) lambs experimentally infected with low numbers of *Sarcocystis tenella* sporocysts. *Veterinary Parasitology* **24(1-2)**, 15-23.

POCHE, F. (1913): Das System der Protozoa. *Archiv für Protistenkunde* **30**, 125-321.

PORTER, R. A., GINN, P. E., DAME, J. B. und GREINER, E. C. (2001): Evaluation of the shedding of *Sarcocystis falcatula* sporocysts in experimentally infected Virginia opossums (*Didelphis virginiana*). *Veterinary Parasitology* **95(2-4)**, 313-319.

PRAKAS, P., KUTKIENE, L., BUTKAUSKAS, D., SRUOGA, A. und ZALAKEVICIUS, M. (2013): Molecular and morphological investigations of *Sarcocystis corvusi* sp. nov. from the jackdaw (*Corvus monedula*). *Parasitology Research* **112(3)**, 1163-1167.

PRAKAS, P., KUTKIENE, L., BUTKAUSKAS, D., SRUOGA, A. und ZALAKEVICIUS, M. (2014): Description of *Sarcocystis lari* sp. n. (Apicomplexa: Sarcocystidae) from the great black-backed gull, *Larus marinus* (Charadriiformes: Laridae), on the basis of cyst morphology and molecular data. *Folia Parasitologica* **61(1)**, 11-17.

PUSTERLA, N., PACKHAM, A., WILSON, W. D., WHITE, A., BELLAMY, P., RENIER, A. C. und CONRAD, P. A. (2013): Short communication: evaluation of the kinetics of antibodies against *Sarcocystis neurona* in serum from seropositive healthy horses without neurological deficits treated with ponazuril paste. *Veterinary Record* **173(10)**, 249-251.

RAMADAN, A., ABO EL-SOUD, K. und EL-BAHY, M. M. (1997): Anticoccidial efficacy of toltrazuril and halofuginone against *Eimeria tenella* infection in broiler chickens in Egypt. *Research in Veterinary Science* **62(2)**, 175-178.

REITER, I., WEILAND, G., ROSCHER, B., MEYER, J. und FRAHM, K. (1981): Versuche zum serologischen Nachweis der Sarkosporidiose an experimentell mit Sarkosporidien infizierten Rindern und Schafen. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* **94(21)**, 425-430.

RIMOLDI, G., SPEER, B., WELLEHAN, J. F. X., BRADWAY, D. S., WRIGHT, L., REAVILL, D., BARR, B. C., CHILDRESS, A., SHIVAPRASAD, H. L. und CHIN, R. P. (2013): An outbreak of *Sarcocystis calchasi* encephalitis in multiple psittacine species within an enclosed zoological aviary. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **25(6)**, 775-781.

ROMMEL, M. und HEYDORN, A. O. (1972): Beiträge zum Lebenszyklus der Sarkosporidien III. *Isospora hominis* (RAILLET und LUCET, 1981) WENYON, 1923, eine Dauerform der Sarkosporidien des Rindes und des Schweins. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift **85(8)**, 143-145.

ROMMEL, M., HEYDORN, A. O. und GRUBER, F. (1972): Beiträge zum Lebenszyklus der Sarkosporidien I. Die Sporozyste von *S. tenella* in den Fäzes der Katze. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift **85(6)**, 101-120.

ROMMEL, M., HEYDORN, A. O., FISCHLE, B. und GESTRICH, R. (1974): Beiträge zum Lebenszyklus der Sarkosporidien V. Weitere Endwirte der Sarkosporidien von Rind, Schaf und Schwein und die Bedeutung des Zwischenwirtes für die Verbreitung der Parasitose. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift **87(20)**, 392-396.

ROMMEL, M., HEYDORN, A. O. und ERBER, M. (1979): Die Sarkosporidiose der Haustiere und des Menschen. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift **92(23)**, 457-464.

ROMMEL, M., SCHWERTDFEGER, A. und BLEWASKA, S. (1981): The *Sarcocystis muris*-infection as a model for research on the chemotherapy of acute sarcocystosis of domestic animals. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, I. Abt. Originale A **250**, 268-276.

ROMMEL, M., TENTER, A., HORN, K., DAUGSCHIES, A., MERTENS, C., HEYDORN, A. O., ESCHENBACHER, K. H. und KLEIN, H. (1995): *Sarcocystis* species. In: ECKERT, J., BRAUN, R., SHIRLEY, M. W. und COUDERT, P. (eds.). COST 89/820: Biotechnology: Guidelines on techniques in coccidiosis research. Office for official publications on the European Communities, Luxembourg. S. 241-284.

ROSENTHAL, B. M. (2001): Relationships among *Sarcocystis* species transmitted by New World opossums (*Didelphis* spp.). Veterinary Parasitology **95(2-4)**, 133-142.

ROSSANO, M. G., SCHOTT, H. C., 3RD, KANEENE, J. B., MURPHY, A. J., KRUTTLIN, E. A., HINES, M. T., SELLON, D. C., PATTERSON, J. S., ELSHEIKHA, H. M., DUBEY, J. P. und MANSFIELD, L. S. (2005): Effect of daily administration of pyrantel tartrate in preventing infection in horses experimentally challenged with *Sarcocystis neurona*. American Journal of Veterinary Research **66(5)**, 846-852.

RUIZ, A. und FRENKEL, J. K. (1976): Recognition of cyclic transmission of *Sarcocystis muris* by cats. Journal of Infectious Diseases **133(4)**, 409-418.

SAITO, M., TAGUCHI, K., SHIBATA, Y., KOBAYASHI, T., SHIMURA, K. und ITAGAKI, H. (1995): Toxicity and properties of the extract from *Sarcocystis cruzi* cysts. *Journal of Veterinary Medical Science* **57(6)**, 1049-1051.

SALEQUE, A., BHATIA, B. B., JUYAL, P. D. und RAHMAN, H. (1991): Toxicity of cyst extract of *Sarcocystis fusiformis* from buffalo in rabbits and mice. *Veterinary Parasitology* **38(1)**, 61-65.

SAVILLE, W. J., REED, S. M., GRANSTROM, D. E., HINCHCLIFF, K. W., KOHN, C. W., WITTUM, T. E. und STAMPER, S. (1997): Seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in horses residing in Ohio. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **210(4)**, 519-524.

SCHNIEDER, T. und ROMMEL, M. (1983): Ausbildung und Dauer der Immunität gegen *Sarcocystis miescheriana* im Schwein bei kontinuierlicher Verabreichung kleiner Mengen von Sporozysten. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* **96(5)**, 167-170.

SCHNIEDER, T., TRAUTWEIN, G. und ROMMEL, M. (1984): Untersuchungen zur Persistenz der Zysten von *Sarcocystis miescheriana* in der Muskulatur des Schweines nach ein- und mehrmaliger Infektion. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* **97(10)**, 356-359.

SCOPE, A. (2003): Klinischer Untersuchungsgang. In: KALETA, E. F. und KRAUTWALD-JUNGHANNS, M.-E. (eds.). *Kompendium der Ziervogelkrankheiten - Papageien, Tauben, Sperlingsvögel*, 4. Auflage. Schütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co KG, Hannover. S. 46-52.

SCOTT, P., WITONSKY, S., ROBERTSON, J. und DAFT, B. (2005): Increased presence of T lymphocytes in central nervous system of EPM affected horses. *Journal of Parasitology* **91(6)**, 1499-1502.

SELBITZ, H.-J. (2011): Gattung *Salmonella*. In: SELBITZ, H.-J., TRUYEN, U. und VALENTIN-WEIGAND, P. (eds.). *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, 9. Auflage. Enke Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH&Co KG, Stuttgart. S. 199-214.

SELLON, D. C., KNOWLES, D. P., GREINER, E. C., LONG, M. T., HINES, M. T., HOCHSTATTER, T., TIBARY, A. und DAME, J. B. (2004): Infection of immunodeficient horses with *Sarcocystis neurona* does not result in neurologic disease. *Clinical and Vaccine Immunology* **11(6)**, 1134-1139.

SHEFFIELD, H. G. und FAYER, R. (1980): Fertilization in the coccidia: fusion of *Sarcocystis bovicanis* gametes. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* **47(1)**, 118-121.

SHEKARFOROUSH, S. S., RAZAVI, S. M., DEGHAN, S. A. und SARIHI, K. (2005): Prevalence of *Sarcocystis* species in slaughtered goats in Shiraz, Iran. *Veterinary Record* **156(13)**, 418-420.

- SHIN, T., AHN, M. und MATSUMOTO, Y. (2012): Mechanism of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats: recent insights from macrophages. *Anat Cell Biol* **45(3)**, 141-148.
- SIEGAL-WILLOTT, J. L., POLLOCK, C. G., CARPENTER, J. W. und NIETFELD, J. (2005): Encephalitis caused by *Sarcocystis falcatula*-like organisms in a White Cockatoo (*Cacatua alba*). *Journal of Avian Medicine and Surgery* **19(1)**, 19-24.
- SILLER, W. G. (1960): Experimental allergic encephalomyelitis in the fowl. *Journal of Pathology and Bacteriology* **80**, 43-53.
- SILLER, W. G. und WIGHT, P. A. (1965): Further studies of experimental allergic encephalomyelitis in the fowl. 3. The encephalopathic effect of homologous and heterologous allergens, and the susceptibility of different lines in a closed flock. *Immunology* **8**, 223-229.
- SKAMPARDONIS, V., SOTIRAKI, S., KOSTOULAS, P. und LEONTIDES, L. (2010): Effect of toltrazuril treatment in nursing piglets naturally infected with *Isospora suis*. *Veterinary Parasitology* **172(1-2)**, 46-52.
- SMITH, J. H., MEIER, J. L., NEILL, P. J. und BOX, E. D. (1987a): Pathogenesis of *Sarcocystis falcatula* in the budgerigar. II. Pulmonary pathology. *Laboratory Investigation* **56(1)**, 72-84.
- SMITH, J. H., MEIER, J. L., NEILL, P. J. und BOX, E. D. (1987b): Pathogenesis of *Sarcocystis falcatula* in the budgerigar. I. Early pulmonary schizogony. *Laboratory Investigation* **56(1)**, 60-71.
- SMITH, J. H., NEILL, P. J. und BOX, E. D. (1989): Pathogenesis of *Sarcocystis falcatula* (Apicomplexa: Sarcocystidae) in the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*). III. Pathologic and quantitative parasitologic analysis of extrapulmonary disease. *Journal of Parasitology* **75(2)**, 270-287.
- SMITH, J. H., CRAIG, T. M., DILLARD, E. A., 3RD, NEILL, P. J. und JONES, L. P. (1990a): Naturally occurring apicomplexan acute interstitial pneumonitis in thick-billed parrots (*Rhynchopsitta pachyrhyncha*). *Journal of Parasitology* **76(2)**, 285-288.
- SMITH, J. H., NEILL, P. J., DILLARD, E. A., 3RD und BOX, E. D. (1990b): Pathology of experimental *Sarcocystis falcatula* infections of canaries (*Serinus canarius*) and pigeons (*Columba livia*). *Journal of Parasitology* **76(1)**, 59-68.
- SPALDING, M. G., YOWELL, C. A., LINDSAY, D. S., GREINER, E. C. und DAME, J. B. (2002): *Sarcocystis* meningoencephalitis in a northern gannet (*Morus bassanus*). *Journal of Wildlife Diseases* **38(2)**, 432-437.

- SPENCER, J. A., ELLISON, S. E., GUARINO, A. J. und BLAGBURN, B. L. (2004): Cell-mediated immune responses in horses with Equine Protozoal Myeloencephalitis. *Journal of Parasitology* **90(2)**, 428-430.
- STACKHOUSE, L. L., CAWTHORN, R. J. und J., B. R. (1987): Pathogenesis of infection with *Sarcocystis rauschorum* (Apicomplexa) in experimentally infected varying lemmings (*Dicrostonyx richardsoni*). *Journal of Wildlife Diseases* **23(4)**, 566-571.
- STANEK, J. F., DUBEY, J. P., OGLESBEE, M. J., REED, S. M., LINDSAY, D. S., CAPITINI, L. A., NJOKU, C. J., VITTITOW, K. L. und SAVILLE, W. J. (2002): Life cycle of *Sarcocystis neurona* in its natural intermediate host, the raccoon, *Procyon lotor*. *Journal of Parasitology* **88(6)**, 1151-1158.
- STOCKDALE, P. H. und FERNANDO, M. A. (1975): The development of the lesions caused by second generation schizonts of *Eimeria necatrix*. *Research in Veterinary Science* **19(2)**, 204-208.
- SUEDMEYER, W. K., BERMUDEZ, A. J., BARR, B. C. und MARSH, A. E. (2001): Acute pulmonary *Sarcocystis falcatula*-like infection in three Victoria crowned pigeons (*Goura victoria*) housed indoors. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **32(2)**, 252-256.
- TANHAUSER, S. M., CHEADLE, M. A., MASSEY, E. T., MAYER, B. A., SCHROEDTER, D. E., DAME, J. B., GREINER, E. C. und MACKAY, R. J. (2001): The nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*) is naturally infected with *Sarcocystis neurona*. *International Journal for Parasitology* **31(4)**, 325-329.
- TEGLAS, M. B., LITTLE, S. E., LATIMER, K. S. und DUBEY, J. P. (1998): *Sarcocystis*-associated encephalitis and myocarditis in a wild turkey (*Meleagris gallopavo*). *Journal of Parasitology* **84(3)**, 661-663.
- TENTER, A. M. (1988): Comparison of Dot-ELISA, ELISA and IFAT for the detection of IgG antibodies to *Sarcocystis muris* in experimentally infected and immunized mice. *Veterinary Parasitology* **29(2-3)**, 89-104.
- TENTER, A. M. (1995): Current research on *Sarcocystis* species of domestic animals. *International Journal for Parasitology* **25(11)**, 1311-1330.
- THOMAS, N. J., DUBEY, J. P., LINDSAY, D. S., COLE, R. A. und METEYER, C. U. (2007): Protozoal meningoencephalitis in sea otters (*Enhydra lutris*): a histopathological and immunohistochemical study of naturally occurring cases. *Journal of Comparative Pathology* **137(2-3)**, 102-121.

- TIETZ, H. J., MONTAG, T., PRONIN, A., BROSE, E., MANN, W., KERSTEN, H., HIEPE, F. und HIEPE, T. (1986): Mitogenicity of extracts from *Sarcocystis gigantea* on human and animal lymphocytes. Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine **11 Suppl**, 31-34.
- TIETZ, H. J., MONTAG, T., BROSE, E., WIDERA, P., SOKOLOWSKA-KOHLER, W., MANN, W. und HIEPE, T. (1989): Interactions between *Sarcocystis gigantea* lectin and toxin-containing fractions in human lymphocyte cultures. Parasitology Research **76(1)**, 32-35.
- TIETZ, H. J., MONTAG, T., BROSE, E., WIDERA, P., KIESSIG, S. T., MANN, W. und HIEPE, T. (1990): *Sarcocystis gigantea* lectin--mitogen and polyclonal B-cell activator. Parasitology Research **76(4)**, 332-335.
- TIETZ, H. J., MONTAG, T., VOLK, H. D., BROSE, E., GANTENBERG, R., WEICHOLD, F. F. und HIEPE, T. (1991): Activation of human CD4+ and CD8+ cells by *Sarcocystis gigantea* lectin. Parasitology Research **77(7)**, 577-580.
- VASHISHT, K., LICHTENSTEIGER, C. A., MILLER, L. A., GONDIM, L. F. P. und MCALLISTER, M. M. (2005): Naturally occurring *Sarcocystis neurona*-like infection in a dog with myositis. Veterinary Parasitology **133(1)**, 19-25.
- VERCRUYSE, J. (1990): Efficacy of toltrazuril and clazuril against experimental infections with *Eimeria labbeana* and *E. columbarum* in racing pigeons. Avian Diseases **34(1)**, 73-79.
- VILLAR, D., KRAMER, M., HOWARD, L., HAMMOND, E., CRAY, C. und LATIMER, K. (2008): Clinical presentation and pathology of sarcocystosis in psittaciform birds: 11 cases. Avian Diseases **52(1)**, 187-194.
- VOIGT, W. P. und HEYDORN, A. O. (1981): Chemotherapy of sarcosporidiosis and theileriosis in domestic animals. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, I. Abt. Originale A **250**, 256-259.
- WEBER, M., WEYRETER, H., O'DONOGHUE, P. J., ROMMEL, M. und TRAUTWEIN, G. (1983): Persistence of acquired immunity to *Sarcocystis miescheriana* infection in growing pigs. Veterinary Parasitology **13(4)**, 287-297.
- WENZEL, R., ERBER, M., BOCH, J. und SCHELLNER, H. P. (1982): Sarkosporidien- Infektion bei Haushuhn, Fasan und Blesshuhn. Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift **95**, 188-193.
- WEYRETER, H., O'DONOGHUE, P. J., WEBER, M. und ROMMEL, M. (1984): Class-specific antibody responses in pigs following immunization and challenge with sporocysts of *Sarcocystis miescheriana*. Veterinary Parasitology **16(3-4)**, 201-205.

WITONSKY, S., MORROW, J. K., LEGER, C., DASCANIO, J., BUECHNER-MAXWELL, V., PALMER, W., KLINE, K. und COOK, A. (2004): *Sarcocystis neurona*-specific immunoglobulin G in the serum and cerebrospinal fluid of horses administered *S. neurona* vaccine. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **18(1)**, 98-103.

WITONSKY, S. G., GOGAL, R. M., JR., DUNCAN, R. B. und LINDSAY, D. S. (2003a): Protective immune response to experimental infection with *Sarcocystis neurona* in 57BL/6 mice. *Journal of Parasitology* **89(5)**, 924-931.

WITONSKY, S. G., GOGAL, R. M., JR., DUNCAN, R. B. und LINDSAY, D. S. (2003b): Immunopathologic effects associated with *Sarcocystis neurona*-infected interferon-gamma knockout mice. *Journal of Parasitology* **89(5)**, 932-940.

WITONSKY, S. G., GOGAL JR, R. M., DUNCAN JR, R. B., NORTON, H., WARD, D., YANG, J. und LINDSAY, D. S. (2005a): Humoral immunity is not critical for protection against experimental infection with *Sarcocystis neurona* in B-cell-deficient mice. *Journal of Parasitology* **91(4)**, 830-837.

WITONSKY, S. G., GOGAL, R. M., DUNCAN, R. B., NORTON, H., WARD, D. und LINDSAY, D. S. (2005b): Prevention of meningo/encephalomyelitis due to *Sarcocystis neurona* infection in mice is mediated by CD8 cells. *International Journal for Parasitology* **35(1)**, 113-123.

WITONSKY, S. G., ELLISON, S., YANG, J., GOGAL, R. M., LAWLER, H., SUZUKI, Y., SRIRANGANATHAN, N., ANDREWS, F., WARD, D. und LINDSAY, D. S. (2008): Horses experimentally infected with *Sarcocystis neurona* develop altered immune responses in vitro. *Journal of Parasitology* **94(5)**, 1047-1054.

WÜNSCHMANN, A., REJMANEK, D., CRUZ-MARTINEZ, L. und BARR, B. C. (2009): *Sarcocystis falcatula*-associated encephalitis in a free-ranging great horned owl (*Bubo virginianus*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **21(2)**, 283-287.

WÜNSCHMANN, A., REJMANEK, D., CONRAD, P. A., HALL, N., CRUZ-MARTINEZ, L., VAUGHN, S. B. und BARR, B. C. (2010): Natural fatal *Sarcocystis falcatula* infections in free-ranging eagles in North America. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **22(2)**, 282-289.

WÜNSCHMANN, A., ARMIEN, A. G., REED, L., GRUBER, A. D. und OLIAS, P. (2011): *Sarcocystis calchasi*-associated neurologic disease in a domestic pigeon in North America. *Transboundary and Emerging Diseases* **58(6)**, 526-530.

XIANG, Z., HE, Y., ZHAO, H., ROSENTHAL, B. M., DUNAMS, D. B., LI, X., ZUO, Y., FENG, G., CUI, L. und YANG, Z. (2011): *Sarcocystis cruzi*: Comparative studies confirm natural infections of buffaloes. *Experimental Parasitology* **127(2)**, 460-466.

ZIELASKO, B., PETRICH, J., TRAUTWEIN, G. und ROMMEL, M. (1981): Untersuchungen über pathologisch-anatomische Veränderungen und die Entwicklung der Immunität bei der *Sarcocystis-suicanis*-Infektion. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* **94(11)**, 223-228.

ZIMMERMANN, U., SCHNIEDER, T. und ROMMEL, M. (1984): Untersuchungen über die Dynamik der Antikörperentwicklung bei Schweinen nach mehrfacher Immunisierung mit Sporozysten von *Sarcocystis miescheriana* und einmaliger Belastungsinfektion. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* **97(11)**, 408-411.

## 9 ANHANG

### Anhang I: Aviäre *Sarcocystis* spp.

**Tabelle 15: *Sarcocystis* spp. mit aviärem Zwischenwirt**

| <b>Sarcocystis-Spezies</b> | <b>Endwirt</b>  | <b>Zwischenwirt</b>                                    | <b>Literatur</b>                                |
|----------------------------|---|--|---|
| <i>S. accipitris</i>       | Habicht<br>( <i>Accipiter gentilis</i> )  | Kanarienvogel<br>( <i>Serinus canaria</i> )            | ČERNÁ und<br>KVAŠNOVSKÁ, 1986                   |
| <i>S. albifronsi</i>       | Polarfuchs<br>( <i>Alopex lagopus</i> )   | Weißwangengans<br>( <i>Anser albifrons</i> )           | KUTKIENE et al.,<br>2012b                       |
| <i>S. alectoributeonis</i> | Mäusebussard<br>( <i>Buteo buteo</i> )  | Chukarhuhn<br>( <i>Alectoris chukar</i> )              | PAK et al., 1989                                |
| <i>S. alectorivulpes</i>   | Rotfuchs<br>( <i>Vulpes vulpes</i> ),<br>Steppenfuchs<br>( <i>Alopex corsac</i> ) | Chukarhuhn<br>( <i>Alectoris chukar</i> )              | PAK et al., 1989                                |
| <i>S. ammodrami</i>        | n. b.   | Wachtelammer<br>( <i>Ammodramus humeralis</i> )        | ODENING, 1998                                   |
| <i>S. anasi</i>            | n. b.   | Stockente<br>( <i>Anas platyrhynchos</i> )             | KUTKIENE et al.,<br>2012b                       |
| <i>S. aramidis</i>         | n. b.   | Saracurallele<br>( <i>Aramides saracura</i> )          | ODENING, 1998                                   |
| <i>S. calchasi</i>         | Habichtartige ( <i>A. gentilis</i> , <i>A. nisus</i> )                            | Haustaube ( <i>Columba livia</i> f. <i>domestica</i> ) | OLIAS et al., 2009a                             |
| <i>S. colii</i>            | n. b.   | Rotzügel-Mausvogel<br>( <i>Urocolius indicus</i> )     | ODENING, 1998                                   |
| <i>S. columbae</i>         | Habichtartige ( <i>A. gentilis</i> , <i>A. nisus</i> )                            | Ringeltaube<br>( <i>Columba palumbus</i> )             | OLIAS et al., 2010c                             |
| <i>S. cornixi</i>          | n. b.   | Aaskrähne<br>( <i>Corvus cornix</i> )                  | KUTKIENE et al.,<br>2008                        |
| <i>S. corvusi</i>          | n. b.   | Dohle<br>( <i>Corvus monedula</i> )                    | PRAKAS et al.,<br>2013                          |
| <i>S. falcatula</i>        | Opossums<br>( <i>D. virginiana</i> ,<br><i>D. albiventris</i> )                   | Passeri-, Columbi-,<br>Psittaci- und<br>Falconiformes  | BOX et al., 1984,<br>WÜNSCHMANN et<br>al., 2010 |
| <i>S. garzettae</i>        | n. b.   | Seidenreiher<br>( <i>Egretta garzetta</i> )            | ODENING, 1998                                   |
| <i>S. horvathi</i>         | Hund<br>( <i>Canis familiaris</i> )   | Haushuhn ( <i>Gallus gallus</i> f. <i>domesticus</i> ) | WENZEL et al.,<br>1982                          |
| <i>S. jacarinae</i>        | n. b.   | Jacariniammer<br>( <i>Volatinia jacarina</i> )         | ODENING, 1998                                   |

**Fortsetzung von Tabelle 15**

|                        |  |   |                                   |
|------------------------|--|---|-----------------------------------|
| <i>S. kaiserae</i>     | n. b.  | Palmtaube ( <i>Streptopelia senegalensis</i> )                                      | KAISER und MARKUS, 1983           |
| <i>S. kirmsei</i>      | n. b.  | Prälattfasan ( <i>Diardigallus diardi</i> ), Beo ( <i>Gracula religiosa</i> )       | JAKOB et al., 1998, ODENING, 1998 |
| <i>S. lari</i>         | n. b.  | Mantelmöwe ( <i>Larus marinus</i> )   | PRAKAS et al., 2014               |
| <i>S. lindsayi</i>     | Südamer. Opossum ( <i>D. albiventris</i> )                     | Wellensittich ( <i>Melospittacus undulatus</i> )                                    | DUBEY et al., 2001d               |
| <i>S. nontella</i>     | n. b.  | Mäusebussard ( <i>Buteo buteo</i> )   | ODENING, 1998                     |
| <i>S. oliverioi</i>    | n. b.  | Grünbürzel-Sperlingspapagei ( <i>Forpus passerinus</i> )                            | ODENING, 1998                     |
| <i>S. otus</i>         | n. b.  | Waldohreule ( <i>Asia otus</i> )  | KRONE et al., 2000                |
| <i>S. peckai</i>       | Hund ( <i>Canis familiaris</i> )                               | Fasan ( <i>Phasianus colchicus</i> )  | PECKA, 1988                       |
| <i>S. phoeniconaii</i> | n. b.  | Zwergflamingo ( <i>Phoeniconaias minor</i> )  | ODENING, 1998                     |
| <i>S. sulfuratusi</i>  | n. b.  | Fischertukan ( <i>Ramphastos sulfuratus</i> )                                       | DUBEY et al., 2004                |
| <i>S. rileyi</i>       | Streifenskunk ( <i>Mephitis mephitis</i> )                     | Anseriformes  | DUBEY et al., 2003                |
| <i>S. setophagae</i>   | n. b.  | Schnäpperwaldsänger ( <i>Setophaga ruticilla</i> )                                  | ODENING, 1998                     |
| <i>S. spaldingae</i>   | n. b.  | Ciconiiformes   | ODENING, 1998                     |
| <i>S. turdusi</i>      | n. b.  | Amsel ( <i>Turdus merula</i> )  | KUTKIENE et al., 2012a            |
| <i>S. wenzeli</i>      | Hund ( <i>Canis familiaris</i> ), Katze ( <i>Felis catus</i> ) | Haushuhn ( <i>Gallus gallus</i> f. <i>domesticus</i> )                              | WENZEL et al., 1982               |
| <i>S. wobeseri</i>     | n. b.  | Weißwangengans ( <i>Branta leucopsis</i> ), Stockente ( <i>Anas platyrhynchos</i> ) | KUTKIENĖ et al., 2010a            |

n. b. = nicht bekannt

## Anhang II: Reagenzien, Verbrauchsmaterial und Geräte

### II.I Reagenzien und Verbrauchsmaterial

#### II.I.I Reagenzien und Verbrauchsmaterial für die immunhistochemische Färbung

**ABC-Lösung:**

|                    |   |
|--------------------|---|
| Vectostain ABC Kit | Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA |
|--------------------|---|

**Alkoholreihe:**

|                         |                                   |
|-------------------------|-----------------------------------|
| Ethanol                 | Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe |
| Xylol z.A., chem solute | Th. Geyer GmbH & Co KG, Renningen |

**Antikörper:**

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| Biotinylated Anti-Rabbit IgG (H+L) | Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA |
|------------------------------------|---|

**Blockserum:**

|                       |   |
|-----------------------|---|
| Goat Serum Donor Herd | Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA |
| Roti-Immunoblock      | Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe       |

**DAB-Substrat:**

|                     |                       |
|---------------------|-----------------------|
| DAB-Puffertabletten | Merck KGaA, Darmstadt |
|---------------------|-----------------------|

**Eindeckmedium:**

|                          |                       |
|--------------------------|-----------------------|
| Kaisers Glyceringelatine | Merck KGaA, Darmstadt |
|--------------------------|-----------------------|

**Hämalaun nach Mayer:**

|   |                                   |
|---|-----------------------------------|
| Hämatoxylin (Monohydrat) für die Mikroskopie    | Merck KGaA, Darmstadt             |
| Natriumiodat zur Analyse $\text{NaIO}_3$        | Merck KGaA, Darmstadt             |
| Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat (Kaliaalaun) | Merck KGaA, Darmstadt             |
| Chloralhydrate pure                             | AppliChem GmbH, Darmstadt         |
| Citronensäure-Monohydrat                        | Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe |

**Waschlösungen:**

|   |                                   |
|---|-----------------------------------|
| PBS tablets<br>(1 Tabl. auf 1.000 ml Aqua dest., pH 7,4 einstellen) | Medicago AB, Uppsala, Schweden    |
| Triton X 100  | Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe |

**Zitratpuffer:**

|                     |                       |
|---------------------|-----------------------|
| 0,1 M Zitronensäure | Merck KGaA, Darmstadt |
| 0,1 M Natriumcitrat | Merck KGaA, Darmstadt |

**Sonstige Reagenzien:**

|                            |   |
|----------------------------|---|
| Albumin, from bovine serum | Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA |
| Wasserstoffperoxid 30%     | Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe       |

**Verbrauchsmaterial:**

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| SuperFrost*/Plus-Objektträger | Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig                   |
| Coverplates                   | Thermo Fisher Scientific Inc., Astmoor, Runcorn, UK |

**Herstellung von Hämalaun nach Mayer:**

|         |              |
|---------|--------------|
| 1 g     | Hämatoxylin  |
| 0,2 g   | Natriumiodat |
| 50 g    | Kalialaun    |
| 1000 ml | Aqua dest.   |

Zu der Lösung dazugeben:

|       |               |
|-------|---------------|
| 50 g  | Chloralhydrat |
| 0,5 g | Citronensäure |

**III.II Reagenzien und Verbrauchsmaterial für die PCR****DNA-Isolierung:**

|                           |                                   |
|---------------------------|-----------------------------------|
| DNeasy Blood & Tissue Kit | Qiagen GmbH, Hilden               |
| Ethanol absolute          | VWR International GmbH, Darmstadt |
| Nuclease-Free Water       | Qiagen GmbH, Hilden               |
| Stainless Steel Beads     | Qiagen GmbH, Hilden               |

**Mastermix:**

|                           |   |
|---------------------------|---|
| HotStarTaq DNA Polymerase | Qiagen GmbH, Hilden                                   |
| KAPA SYBR FAST qPCR       | PEQLAB Biotechnologie GmbH,<br>Erlangen               |
| dNTP Mix, 10 mM each      | Thermo Fisher Scientific Inc.,<br>Wilmington, DE, USA |

**DNA-Aufreinigung:**

|                              |   |
|------------------------------|---|
| GeneJET PCR Purification Kit | Thermo Fisher Scientific Inc.,<br>Wilmington, DE, USA |
| 1-Propanol, ROTIPURAN        | Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe                     |

**Agarose-Gelelektrophorese:**

|  |   |
|--|---|
| 6x DNA Loading Dye                                     | Thermo Fisher Scientific Inc.,<br>Wilmington, DE, USA |
| Agarose NEE0   | Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe                     |
| GelRed® Nucleic Acid Gel Stain                         | Biotium Inc., Hayward, CA, USA                        |
| GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder                            | Thermo Fisher Scientific Inc.,<br>Wilmington, DE, USA |
| TBE-Puffer:  |   |
| TRIS   | Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe                     |
| Borsäure krist.  | Merck KGaA, Darmstadt                                 |
| Ethylendiamintetraessigsäure<br>Dinatriumsalz Dihydrat | Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe                     |

**Verbrauchsmaterial:**

|  |   |
|--|---|
| Filter Tip Universal 10-1000µl           | Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster,<br>Österreich |
| PP-PCR-Gefäß, NAT., 0,2ML,<br>Dünnwandig | Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster,<br>Österreich |
| SafeSeal Micro Tubes                     | Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht                    |
| Strip Tubes and Caps, 0.1ml              | Qiagen GmbH, Hilden                               |

**Herstellung von TBE-Puffer:**

|                                  |           |
|----------------------------------|-----------|
| 1,33 M                           | TRIS      |
| 600 mM                           | Borsäure  |
| 100 mM                           | EDTA      |
| 5000 ml                          | Aqua dest |
| pH 8,8 einstellen, autoklavieren |           |

### II.I.III Sonstige Reagenzien und Medikamente

|   |   |
|---|---|
| Anti-Salmonella (A-67), omnivalent                                      | Sifin Institut für Immunpräparate und Nährmedien GmbH, Berlin |
| Baycox® 2,5%  | Bayer Vital GmbH, Leverkusen                                  |
| Buffered Peptone Water (ISO)  | Oxoid Ltd., Basingstoke, UK                                   |
| Formalin 37%ig (Formalin-Hydrat)  | VWR International GmbH, Darmstadt                             |
| Isofluran-Actavis   | Actavis Deutschland GmbH, Langenfeld                          |
| Natriumchlorid-Lösung 0,9% WDT  | Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG, Garbsen     |
| 38 g/l Natriumzitat-2-hydrat<br>(in Aqua dest. gelöst und autoklaviert) | Merck KGaA, Darmstadt   |
| PBS tablets<br>(1 Tabl. in 500 ml Aqua dest. gelöst)                    | Life Technologies Corp., Darmstadt                            |

### II.I.IV Medien

|   |   |
|---|---|
| Columbia-Agar-Fertigplatte mit Schafblut                  | Oxoid Deutschland GmbH, Wesel             |
| Gassner-Nährboden-Fertigplatten                           | Oxoid Deutschland GmbH, Wesel             |
| Rappaport-Vassiliadis (MSRV)<br>Medium Semisolid Modified | bioMérieux Deutschland GmbH,<br>Nürtingen |
| XLD-Agar  | Oxoid Deutschland GmbH, Wesel             |

### II.I.V Sonstiges Verbrauchsmaterial

|  |  |
|--|--|
| Coated Vicryl Plus 4-0                           | Ethicon LLC, Guaynabo, Puerto Rico,<br>USA           |
| Deckgläser                                       | Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co<br>KG, Sondheim |
| Mikrotestplatte PS 96er System V-<br>Form, 0,3ml | Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe                         |
| Objektträger, gebrauchsfertig,<br>gereinigt      | Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co<br>KG, Sondheim |
| Spritzenfilter FP 30/5,0 CN-S                    | Schleicher&Schuell Bioscience GmbH,<br>Dassel        |

### **Herstellung einer 1%igen Hühnererythrozytensuspension:**

Es werden 2 ml Natriumzitrat in ein Reagenzglas vorgelegt. Anschließend werden aus der *V. cutanea ulnaris superficialis* (Flügelvene) eines klinikseigenen SPF-Huhns 8 ml Blut entnommen. Nach vorsichtigem Schwenken wird das Zitratblut zentrifugiert (5 min, 2.880 x g) und anschließend das Plasma und der Leukozytensaum abgenommen. Es folgt ein dreimaliges Waschen mit steriler NaCl-Lösung, bevor die Erythrozyten schließlich in NaCl-Lösung im Verhältnis 1:10 suspensiert und im Kühlschrank aufbewahrt werden. Die Gebrauchslösung wird bei Bedarf frisch angesetzt, indem auf 1 ml der 10%igen Erythrozytensuspension 9 ml PBS gegeben werden.

## **II.II Liste der bei den Versuchen verwendeten Geräte**

### **Automatische Pipetten:**

|  |  |
|--|--|
| Eppendorf Reference <sup>®</sup> , 0,5-10µl  | Eppendorf AG, Hamburg  |
| Eppendorf XPlorer <sup>®</sup> , 15-300µl  | Eppendorf AG, Hamburg  |
| Pipetman <sup>®</sup> , P10, 1-10µl; P20, 2-20µl;<br>P100, 20-100µl; P200, 50-200µl;<br>P1000, 200-1.000µl | Gilson International France S.A.S.,<br>Villiers-le-Bel, France |

### **Eindeckautomat:**

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| Tissue Tek <sup>®</sup> VIP | Sakura Finetek Germany GmbH,<br>Heppenheim |
|-----------------------------|--|

### **Geräte für die Durchführung der Elektrophorese:**

|                          |                                     |
|--------------------------|-------------------------------------|
| Biometra Ti5             | Biometra GmbH, Göttingen            |
| Canon Power Shot G5      | Whatman GmbH, Göttingen             |
| Elektrophoresekammer     | Von Keutz Labortechnik, Reiskirchen |
| Unipack 250 Power Supply | UniEquip GmbH, Planegg              |

### **Geräte für die Durchführung der PCR:**

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| QIAcube                        | Qiagen GmbH, Hilden                                   |
| NanoDrop 2000c                 | Thermo Fisher Scientific Inc.,<br>Wilmington, DE, USA |
| PTC-200 Peltier Thermal Cycler | MJ Research Inc, St. Bruno, Kanada                    |
| Rotor-Gene Q                   | Qiagen GmbH, Hilden                                   |
| Thermomixer Comfort            | Eppendorf AG, Hamburg                                 |
| Tissuelyser LT                 | Qiagen GmbH, Hilden                                   |

**Mikroskope:**

Axioskop

Carl Zeiss AG, Jena

Leica DM 2500

Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH,  
Wetzlar**Narkosegerät:**

Isoflurane Vapor 19.3

Drägerwerk AG, Lübeck

**Vortex-Schüttler:**

REAX 2000

Heidolph Instruments GmbH & Co KG,  
Schwabach**Werkbank:**

Safeflow 1.2

Nunc GmbH &amp; Co KG, Wiesbaden

**Zentrifugen:**

Hettich Universal 32R

Andreas Hettich GmbH & Co KG,  
Tuttlingen

Mikro20

Andreas Hettich GmbH & Co KG,  
Tuttlingen

Rotanta/T

Andreas Hettich GmbH & Co KG,  
Tuttlingen

## Anhang III: Protokoll der immunhistochemischen Färbung

### 1. Deparaffinisierung in der absteigenden Alkoholreihe

**Tabelle 16:** Protokoll der Deparaffinisierung und Dehydrierung

| Reagenz      | Zeit   | Wiederholungen |
|--------------|--------|----------------|
| Xylol        | 10 min | 2              |
| Ethanol 100% | 3 min  | 2              |
| Ethanol 96%  | 3 min  | 2              |
| Ethanol 70%  | 3 min  | 1              |

### 2. Hemmung der endogenen Peroxidase

- 180 ml PBS und 20 ml Wasserstoffperoxid in große Küvette füllen
- Küvette mit Schnitten in die große Küvette platzieren, sodass die Objektträger vollständig mit Flüssigkeit bedeckt sind
- 15 min auf den Magnetrührer (300 rpm)

### 3. Spülen mit Aqua dest.

- Küvette mit Schnitten kurz in Bad mit Aqua dest. stellen

### 4. Demaskierung mit Citratpuffer

- 13,5 ml Lösung A (0,1M Zitronensäure)
- 61,5 ml Lösung B (0,1M Natriumcitrat)
- 7,5 ml Triton 5%
- ad. 750 ml Aqua dest.
- Lösung in Schale mit Siedeperlen füllen
- 12 min in Mikrowelle vorwärmen (600 Watt)
- Küvette mit Schnitten in die Schale geben
- 12 min in der Mikrowelle erhitzen (600 Watt)
- 15 min abkühlen lassen bei Raumtemperatur
- Küvette mit Schnitten in PBS überführen

### 5. Schnitte in Coverplates montieren

- nach Montage in den Coverplates diese 2-3 mal mit PBS + Triton 0,05% auffüllen

## 6. Zugabe des Blockserum

- 4500  $\mu$ l PBS + 500  $\mu$ l R $\ddot{o}$ ti-Immublock ansetzen
- mit Ziegennormalserum im Verh $\ddot{a}$ ltnis 1:5 verd $\ddot{u}$ nnen
- 90  $\mu$ l pro Schnitt auf die Coverplates geben
- 30 min Inkubation bei Raumtemperatur

## 7. Aufbringen des Prim $\ddot{a}$ rantik $\ddot{o}$ rper

- Prim $\ddot{a}$ rantik $\ddot{o}$ rper (anti-ScB) mit PBS/BSA 2% verd $\ddot{u}$ nnen (1:10.000)
- 90  $\mu$ l pro Schnitt auf die Coverplates geben
- 90  $\mu$ l des Negativkontrollserum auf den Negativkontrollschnitt geben
- $\ddot{u}$ ber Nacht bei 4  $^{\circ}$ C inkubieren

## 8. Aufw $\ddot{a}$ rmen und Sp $\ddot{u}$ len

- 30 min bei Raumtemperatur aufw $\ddot{a}$ rmen lassen
- w $\ddot{a}$ hrenddessen dreimal sp $\ddot{u}$ len mit PBS + Triton 0,05%

## 9. ABC-L $\ddot{o}$ sung ansetzen

- 1000  $\mu$ l PBS
- 12  $\mu$ l Reagenz A
- 12  $\mu$ l Reagenz B

## 10. Aufbringen des Sekund $\ddot{a}$ rantik $\ddot{o}$ rper

- 5 ml PBS + 75  $\mu$ l Ziegennormalserum
- Sekund $\ddot{a}$ rantik $\ddot{o}$ rper (Ziege-anti-Kaninchen-IgG) 1:200 mit PBS + Ziegennormalserum verd $\ddot{u}$ nnen
- 90  $\mu$ l pro Schnitt auf die Coverplates geben
- 30 min Inkubation bei Raumtemperatur
- 3 mal sp $\ddot{u}$ len mit PBS + Triton 0,05%

## 11. Zugabe der ABC-L $\ddot{o}$ sung

- 90  $\mu$ l pro Schnitt auf die Coverplates geben
- 30 min Inkubation

## 12. Inkubation des Substrats (DAB)

- Schnitte aus Coverplates entfernen und in Aqua dest. zwischenlagern
- 200 µl Aqua dest + 4 Tabletten DAB auf Magnetrührer (700 rpm)
- nach Auflösung der Tablette Lösung in Küvette filtrieren
- 10 µl Wasserstoffperoxid zugeben
- Küvette mit Schnitten für 8 min hineingeben
- Schnitte zurück in Aqua dest. überführen, welches anschließend durch frisches Aqua dest. zu ersetzen ist
- 10 min Inkubation bei Raumtemperatur

## 13. Gegenfärbung

- Schnitte für 2 min in Küvette mit Hämalan nach Mayer stellen
- Schnitte in Küvette mit Leitungswasser überführen, Wasser wechseln solange bis es klar bleibt
- mind. 10 min Inkubation bei Raumtemperatur

## 14. Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe

**Tabelle 17: Protokoll der Entwässerung**

| Reagenz      | Zeit  | Wiederholungen |
|--------------|-------|----------------|
| Ethanol 70%  | 3 min | 1              |
| Ethanol 96%  | 3 min | 2              |
| Ethanol 100% | 3 min | 3              |
| Xylol        | 3 min | 2              |

## 15. Schnitte eindecken

## DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Michael Lierz möchte ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung von Arbeitsplatz, Material und Literatur und ganz besonders für die jederzeit gewährte Unterstützung bei Fragen und Problemen sowie die konstruktiven Kritiken herzlich danken.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Philipp Olias für die Durchführung eines Teils der histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen, der Hilfestellung bei der histologischen Auswertung und den zahl- und hilfreichen Ratschlägen bei diversen Fragestellungen.

Großen Dank möchte ich auch an Herrn Dr. Dirk Enderlein für seine Unterstützung und Geduld bei der Etablierung der PCR richten.

Vielen Dank auch an die Mitarbeiter des Instituts für Veterinärpathologie, Freie Universität Berlin, allen voran Herr Prof. Dr. Achim D. Gruber für die zahlreichen konstruktiven Kritiken zu diversen Schriftsätzen. Herrn Prof. Dr. Robert Klopffleisch möchte ich für die Hilfestellung bei der histopathologischen Diagnosestellung und Frau Dr. Olivia Kershaw für die Hilfe bei der Beurteilung der immunhistochemischen Färbung danken. Besonders möchte ich mich auch bei Frau Petra Nehrig für die Anfertigung und Färbung der histologischen Schnittpräparate und Frau Manuela Dauer für die Einweisung und Beaufsichtigung bei der Anfertigung der immunhistochemischen Färbung bedanken. Frau Aleksandra Zuraw danke ich für die unkomplizierte schnelle Hilfe beim Hin- und Hersenden von Probenmaterial und Frau Anne Kujawa für die Hilfe bei vielen kleinen Problemen, die in einem fremden Institut so auftreten.

Den (ehemaligen) Mitarbeitern der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische möchte ich für die vielen gemeinsam miteinander verbrachten, oft heiteren Stunden sowie die jederzeit gewährte Unterstützung, die bei der Durchführung von Versuchen dringend notwendig ist. Allen voran möchte ich Frau Anne Piepenbring, Frau Franca Möller Palau-Ribes, Frau

Susanne Paries, Frau Helena Schneider, Frau Sylvia L. Mayr, Frau Stephani Fischer und Herrn Andreas Rademacher sowie den Studenten des jeweiligen 9./10. Semesters für ihre tatkräftige Hilfe bei der Durchführung der Sektionen und bei der Blutabnahme danken. Großer Dank gilt außerdem Frau Antoinette Huhn für die Hilfe in der parasitologischen und bakteriologischen Diagnostik, Frau Sandra David-Holl für die Unterstützung bei der serologischen Diagnostik sowie Herrn Michael Schwarz und Herrn Samuel Strauch für die Betreuung der Tauben.

Herrn Roland Schmölz möchte ich für die Bereitstellung der Tauben danken.

Frau Dr. Dagmar Sommer möchte ich für ihre konstruktiven Anregungen zum Manuskript herzlich danken.

Der Justus-Liebig-Universität möchte ich für die Gewährung ihres Graduiertenstipendium danken und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung von Teilen des Projekts (Projektnummer: LI 1924/3-1 und GR1491/6-1).

Schließlich möchte ich auch ganz besonders meinen Eltern danken für ihre jahrelange, in allen Lebenslagen gewährte Unterstützung und Geduld, die sie mit mir und meiner Doktorarbeit erwiesen haben. Meinem Bruder Sören möchte für seine Anmerkungen an das Manuskript, die Hilfestellung bei technischen Problemen sowie für das jederzeit offene Ohr für alle weiteren Probleme danken. Vielen Dank an Christian dafür, dass er mich auf die Feinheiten der deutschen Sprache aufmerksam gemacht hat und auch in den schwierigen Phasen der Entstehung dieser Arbeit für mich da war, und an meine Freunde für die Ablenkung, ohne die ich die Jahre der Entstehung dieses Werkes wahrscheinlich nicht unbeschadet überstanden hätte.

Ich erkläre:

Ich habe die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Aussagen beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, die in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, den 15.06.2015

Kristina Maier





**ISBN 978-3-86345-270-4**



Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH  
35392 Gießen · Friedrichstraße 17 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375  
E-Mail: [info@dvG.de](mailto:info@dvG.de) · Internet: [www.dvG.de](http://www.dvG.de)