

Der folgende Text ist Wortgleich mit einer Veröffentlichung beim bpt-Kongress 2019 S. 236-239. Die Rechte liegen beim Autor, weshalb der Text im Zuge der ÖGT-Tagung am 16.10.2020, mit neuem Titel, den Zuhörern zur Verfügung gestellt wird. Bezgl. Copyright und Urheberrechte gelten die üblichen gesetzl. Bestimmungen.

Der Vortrag am 16.10.2020 und damit nachfolgender Text sind Frau Univ.-Prof. Dr. Lore Vasicek† gewidmet.

Schwarzkopfkrankheit: Vergangenheit – Gegenwart - Zukunft

Michael Hess, Dipl. ECPVS (michael.hess@vetmeduni.ac.at)

Klinik für Geflügel und Fische

Veterinärmedizinische Universität Wien

1210 Wien

Österreich

Histomonose und *Histomonas meleagridis*

Die Schwarzkopfkrankheit, Typhlohepatitis oder Histomonose bei Puten wurde von Smith (1895) zum ersten Mal beschrieben. Wesentliche Erkenntnisse zur Ätiologie konnten durch die Untersuchungen von Tyzzer (1920) gewonnen werden. In dieser Arbeit werden zum ersten Mal Flagellen und Pseudopodien, als morphologisches Hauptkriterium des Erregers, beschrieben, was den Erreger als Protozoon einstuft. Die Morphologie des Parasiten und das Vorkommen bei Puten führten zur Bezeichnung *Histomonas meleagridis*. Die Erkenntnis, dass der Parasit bei Hühnern ebenfalls vorkommen kann, führte zur Empfehlung diese Tierarten getrennt zu halten. Als weitere empfängliche Vogelarten werden insbesondere Perlhuhn, Fasan, Pfau und Wachtel beschrieben, während das Wassergeflügel als nicht empfänglich gilt (McDougald, 2005). Durch die Pathogenese der Erkrankung bei Puten, die oftmals mit hohen Mortalitätsraten einhergeht, ist die Histomonose bei diesen Tieren von besonderer Bedeutung.

In den letzten beiden Jahren kam es in Europa zu einem verstärkten Auftreten der Erkrankung. Hintergrund ist insbesondere das Verbot geeigneter Prophylaktika und Therapeutika, mit deren Hilfe die Erkrankung über Jahrzehnte gezielt bekämpft wurde. Während bei Puten die prophylaktische Verwendung von Nifursol als

Futterzusatzstoff bis zum 31.03.2003 noch erlaubt war (EEC1756/2002), sind hochwirksame Therapeutika (Imidazolderivate: Nitroimidazol und Dimetridazol) schon vor Jahren verboten worden (EEC1798/1995; EEC2205/2001), da die Unbedenklichkeit dieser Stoffe (Karzinogenität und Genotoxizität) für den Verbraucher nicht auszuschliessen ist (Liebhart et al. 2017). In Folge dieses absoluten Prophylaxe- und Therapienotstandes mussten in verschiedenen Ländern Europas, nach Ausbruch der Erkrankung in Putenbeständen, in den letzten beiden Jahren umfangreiche Keulungsmassnahmen durchgeführt werden. Auch in den USA wurde das letzte zur Prophylaxe eingesetzte Mittel, Nitarsone (4-Nitrophenylarsonic acid), 2016 verboten, weshalb es in Folge zu einer Zunahme der Ausbrüche, insbesondere bei Puten, kam (Clark and Kimminau, 2017). Für Hühner, insbesondere Mastelterniere liegen keine Daten vor, die Bedeutung dürfte aber nicht unerheblich sein.

Zusätzlich zu Puten kommt es in den letzten Jahren vermehrt zu Erkrankungen bei Hühnern, insbesondere Legehennen und Elterntieren (Hess et al. 2015). Experimentell konnte bei Legehühnern ein Abfall der Legeleistung induziert werden, wie er auch im Feld beobachtet wird (Liebhart et al. 2013). Die Histomonose bei Hühnern wird oftmals kompliziert, da sie häufig mit einer Kolibazillose einhergeht, die eine therapeutische Intervention mit Antibiotika erfordert. Die genetische Typisierung von *Escherichia coli* Isolaten aus dem Darm und den inneren Organen von Legehennen und Elterntieren impliziert, dass es im Zuge der Histomonose und der damit einhergehenden Zerstörung des Darmepithels zu einer Re-lokalisierung der *E. coli* Bakterien aus dem Darm kommt (Paudel et al. 2018).

Eine besondere Eigenschaft von *Histomonas meleagridis* ist die Interaktion mit Bakterien (Hauck, 2017). So ist der Erreger sowohl *in vivo* als auch *in vitro* auf die Anwesenheit bestimmter Bakterien angewiesen und eine Induktion der Erkrankung in gnotobiotischen Tieren ist nicht möglich (Doll und Franker, 1963). Diese Interaktion, die bis dato nur wenig untersucht ist, hat dazu geführt, dass die Ätiologie der Histomonose lange Zeit hinterfragt wurde (Hess, 2017). In diesem Kontext gilt es zu bedenken, dass auch der Zwischenwirt *Heterakis gallinarum* zu seiner Entwicklung im Darm auf die Ausbildung einer bestimmten Darmflora angewiesen ist. Insgesamt deutet diese komplexe Interaktion auch an, dass der Verlauf einer Infektion *in vivo* von verschiedenen Faktoren abhängig ist. Letztlich birgt diese Interaktion auch

Möglichkeiten zur Intervention und damit Krankheitsvermeidung, was allerdings bei der Pute, bedingt durch den Verlauf, eher als sehr kritisch zu sehen ist.

Obige Ausführungen unterstreichen, dass aktuell bei der Pute ein Prophylaxe- und Therapienotstand vorliegt mit erheblicher Bedeutung und grosser Relevanz für den Tierschutz und die Ökonomie eines Betriebes. Obwohl der prophylaktische Einsatz des Aminoglykosidantibiotikums Paromomycin die Konsequenzen erheblich mildern kann ist der Einsatz kritisch zu sehen, da es im Zuge der Anwendung zur Ausbildung von Resistenzen kommen kann (Kempf et al. 2013).

Prophylaxe mittels Impfung

Schon 1963 hat Clarkson gezeigt, dass die Übertragung von Serum von therapierten Tieren welche die Schwarzkopfkrankheit überlebt hatten, bei empfänglichen Tieren nicht zu einem Schutz vor der Krankheit führt. Dies impliziert, dass zirkulierende Antikörper für einen Impfschutz nicht von Bedeutung sind, was die fehlende Wirksamkeit von inaktivierten Impfstoffen erklärt (Liebhart et al. 2017)

Um einen Lebendimpfstoff zu erhalten stellt sich die grundsätzliche Frage, ob es natürlich vorkommend apathogene Stämme des Erregers gibt und/oder virulente Parasiten *in vitro* attenuiert werden können. Lund (1959) berichtet von der Nutzung eines nicht-pathogenen Histomonas-Stammes als Lebendimpfstoff, der morphologisch als *H. wenrichi* klassifiziert wurde. Es konnte nach 3maliger kloakaler Applikation ein Schutz gegen virulente Histomonaden, aber nicht gegen Histomonaden welche via Eiern von Heterakis appliziert wurden, erzielt werden. Dies wurde damit erklärt, dass *H. wenrichi* nicht zu einer Infektion und damit einem belastbaren Impfschutz führt.

Ruff und Hansen (1970) wählten einen anderen Ansatz und bestrahlten Histomonaden mit Gammastrahlen, was zu einer Attenuierung des Erregers führte. Allerdings konnte mit dermassen attenuierten Parasiten in Impfversuchen kein wirksamer Schutz erzielt werden.

Die Attenuierung virulenter Histomonaden wurde schon von Tyzzer 1934 detailliert beschrieben. Tyzzer stellte dabei fest, dass die Passagierung virulenter

Histomonaden *in vitro* zwischen den jeweiligen Isolaten variiert und das Infektionspotenzial der attenuierten Histomonaden für den Erfolg entscheidend ist. Damit konnte er zeigen, dass der Grad der Attenuierung mit der Entwicklung einer Immunität negativ korreliert. Letztlich wurde eine Passagierung attenuierter Histomonaden 5x in Hühnern und 5x in Puten durchgeführt, ohne dass es zu einer Wiederherstellung der Virulenz kam. Allerdings bezweifelte Lund (1966) später, dass eine Attenuierung von virulenten Histomonaden überhaupt möglich ist. Vielmehr stellte er die Hypothese auf, dass bei vermeintlich *in vitro* attenuierten Histomonaden schon im Ursprungsmaterial eine Mischpopulation von virulenten und attenuierten Histomonaden vorlag und es im Zuge der *in vitro* Passagierung zu einer Selektion der attenuierten und nicht mehr infektiösen Parasiten kommt, da sich die virulenten Parasiten wesentlich schlechter vermehren. Dies wäre auf den Umstand zurückzuführen, dass der Erreger im Zuge der Isolierung und Passagierung an das Milieu und das Nährmedium zu adaptieren ist.

Der vorab erwähnten Hypothese von Lund konnte durch die Etablierung klonaler Kulturen mittels Mikromanipulation widerlegt werden (Hess et al. 2006). Durch das angewandte Verfahren war es möglich, ausgehend von einer einzelnen Zelle, eine Zellpopulation herzustellen, welche wiederum *in vitro* passagiert werden konnte. Dabei wurde in verschiedenen Experimenten gezeigt, dass eine solche Kultur infektiös bleibt und sowohl Puten als auch Hühner erfolgreich schützen kann, ohne die Entwicklung der Tiere zu beeinflussen (Liebhart et al. 2017). Grundlage des Impfschutzes ist wohl massgeblich eine zelluläre Immunität, die bei Hühnern entsprechend stärker ausgeprägt ist, was den klinischen Verlauf mildert (Mitra et al. 2018).

Die Notwendigkeit, dass sich lebende Bakterien in einer Kultur befinden müssen ist ein großer Nachteil für viele Untersuchungen und die Herstellung eines definierten Impfstoffes, da diese Bakterien oftmals nicht charakterisiert sind. Durch sukzessive Behandlung mit versch. Antibiotika ist es gelungen die Wildtyp Bakterienflora mit einer einzigen Bakterienspezies zu ersetzen (Ganas et al. 2012). Damit wurde ein Shuttlesystem geschaffen, welches wiederum die Möglichkeit bietet gezielte monoxenische Kulturen herzustellen. Zusammen mit einer klonalen Parasitenkultur

liegt damit aktuell ein Lebendimpfstoff vor, der zur Anwendung im Feld weiterentwickelt werden soll.

Literatur:

- Clark, S., Kimminau, E. (2017). Critical Review: Future Control of Blackhead Disease (Histomoniasis) in Poultry. *Avian Diseases* 61, 281–288.
- Clarkson, M.J. (1963). Immunological responses to *Histomonas meleagridis* in the turkey and fowl. *Immunology* 6, 156–168.
- Doll, J.P. & Franker, C.K. (1963). Experimental histomoniasis in gnotobiotic turkeys. I. Infection and histopathology of the bacteria-free host. *Journal of Parasitology*, **49**: 411-414.
- Ganas, P., Liebhart, D., Glösmann, M., Hess, C., & Hess, M. (2012). *Escherichia coli* strongly supports the growth of *Histomonas meleagridis*, in a monoxenic culture, without influence on its pathogenicity. *International Journal of Parasitology*, 42, 893-901.
- Hauck, R. (2017). Interactions between parasites and the bacterial microbiota of chickens. *Avian Diseases*, 61, 428–436.
- Hess, M., Kolbe, T., Grabensteiner, E. & Prosl, H. (2006). Clonal cultures of *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* and a *Blastocystis* sp. established through micromanipulation. *Parasitology* 133, 547–554.
- Hess, M., Liebhart, D., Bilic, I. & Ganas, P. (2015). *Histomonas meleagridis*—new insights into an old pathogen. *Veterinary Parasitology* 208, 67–76.
- Hess, M. (2017). Commensal or pathogen - a challenge to fulfil Koch's postulates. *British Poultry Science*, 58, 1–12.
- Kempf, I., Le, R.A., Perrin-Guyomard, A., Mourand, G., Le, D.L., Bougeard, S., Richez, P., Le, P.G., & Etteradossi, N. (2013). Effect of in-feed paromomycin supplementation on antimicrobial resistance of enteric bacteria in turkeys. *The Veterinary Journal*, 198, 398-403.
- Liebhart, D., Sulejmanovic, T., Grafl, B., Tichy, A., Hess, M., Hess, & M., Hess, M. (2013). Vaccination against histomonosis prevents a drop in egg production in layers following challenge. *Avian Pathology* 42, 79–84.
- Liebhart, D., Ganas, P., Sulejmanovic, T. & Hess, M. (2017). Histomonosis in poultry: previous and current strategies for prevention and therapy. *Avian Pathol.* 46, 1–18.
- Lund, E.E., Augustine, P.C., & Ellis, D.J. (1966). Immunizing action of *in vitro*-attenuated *Histomonas meleagridis* in chickens and turkeys. *Experimental Parasitology*, 18, 403-407.
- McDougald, L.R. (2005). Blackhead disease (histomoniasis) in poultry: a critical review. *Avian Diseases* 49, 462–476.
- Mitra, T. Kidane, F.A., Hess, M. & D. Liebhart (2018). Unravelling the immunity of poultry against the extracellular protozoan parasite *Histomonas meleagridis*, is a cornerstone for vaccine development: a review. *Frontiers in Immunology* 9,2518 ID:91034
- Paudel, S., Stessl, B., Fürst, C., Jandreski-Cvetkovic, D., Hess, M. & Hess, C. (2018). Identical genetic profiles of *Escherichia coli* isolates from the gut and systemic organs of chickens indicate systemic bacterial dissemination, most likely due to intestinal destruction caused by histomonosis. *Avian Diseases*, 62, 300–306.
- Ruff, M.D. & Hansen, M.F. (1970). Effects of gamma radiation on the pathogenicity of *Histomonas meleagridis*. *Avian Diseases* 14, 646-653.
- Smith, T. (1895). An infectious disease among turkeys caused by protozoa (infectious enterohepatitis). *USDA, Bur. Anim. Ind. Bull* 8, 3–27.

- Tyzzar, E.E. (1920). The flagellate character and reclassification of the parasite producing "Blackhead" in turkeys: *Histomonas* (gen. nov.) *meleagridis* (Smith). *Journal of Parasitology* 6, 124–131.
- Tyzzar, E. E. (1934). Studies on histomoniasis, or "Blackhead" infection, in the chicken and the turkey. *Proceedings of the American Academy of Arts and Science* 69, 189-264