

# Diagnose von Histomonadose bei Trute, Huhn, Pfau und Wachtel mittels PCR

S. Albin, S. Meier, K. Linder, R. K. Hoop, B. R. Vogler

Abteilung für Geflügel- und Kaninchenkrankheiten, Institut für Veterinär bakteriologie, Universität Zürich

<https://doi.org/10.17236/sat00139>

Eingereicht: 10.03.2017  
Angenommen: 06.07.2017

*Histomonas meleagridis* (*H. meleagridis*) ist ein einzelliger begeisselter Parasit mit weltweitem Vorkommen bei Hühnervögeln (*Galliformes*). Er reichert sich über zwei Transportwirte im Boden an: der im Blinddarm von Hühnervögeln vorkommende Pfiemenschwanz *Heterakis gallinarum* (*Het. gallinarum*) nimmt *H. meleagridis* auf und lagert ihn in die Eier ein. Ausgeschiedene infizierte Eier werden von Regenwürmern aufgenommen (McDougald, 2005). Ausser über die orale Aufnahme von infizierten Pfiemenschwanz-Eiern oder Regenwürmern können sich Hühnervögel auch kloakal über retrograde Peristaltik („Kloakentrinken“) infizieren (McDougald, 2005). Die Überlebensfähigkeit im Kot ist mit ca. 9 h eher gering (Lotfi et al., 2012). Allerdings wurde *in vitro* ein Vermögen zur Zystenbildung nachgewiesen (Zaragatzki et al., 2010), womit Infektionen ohne augenscheinliche Beteiligung von *Het. gallinarum* erklärt werden können (Dolka et al., 2015).

Die durch *H. meleagridis* verursachte Histomonadose oder Schwarzkopfkrankheit ist vor allem bei Truten bekannt. Seit dem Verbot der Therapie mit wirksamen Antiparasitika bei Lebensmittel liefernden Tieren (EU, 2002) und zunehmender Freilaufhaltung von Geflügel kommt Histomonadose wieder vermehrt vor (Dolka et

al., 2015). Die Mortalität kann bei Truten 100% betragen, wobei 60% der Herden eine Mortalität unter 10% aufweisen (Callait-Cardinal et al., 2007). Erkrankte Tiere zeigen Apathie, Schwäche und schwefelgelben Kot. Andere *Galliformes* wie Huhn, Fasan und Wachtel sind empfänglich, während Ente und Strauss resistent sind (McDougald et al., 2012; Hess et al., 2015). Bei Hühnern verläuft Histomonadose subklinisch (Reservoir) oder mild mit wenig spezifischen Symptomen wie Apathie, Kümmern und gestäubten Federn. In Österreich beträgt die Seroprävalenz bei Legehennen im Alter von 60–97 Wochen in konventionellen Bodenhaltungen 29.7% und in Freilandhaltungen 46.8% (Grafl et al., 2011). In den Niederlanden liegt die Herdenseroprävalenz bei 70-wöchigen Legehennen in allen Haltungsformen bei 100% (Van der Heijden und Landman, 2011).

Die Diagnose der Histomonadose erfolgt bislang vorwiegend histologisch. Im nekrotischen und meist autolytischen Gewebe erschweren mehrere Entwicklungsstadien und die geissellose Gewebeform von *H. meleagridis* die Diagnosestellung (Hess et al., 2015). Zudem kommen andere Einzeller wie *Blastocystis* spp. und *Tetratrichomonas gallinarum* (*T. gallinarum*) in den Blinddärmen von *Galliformes* vor. *Blastocystis* spp. verfügen

Tabelle 1: Anzahl der mit PCR zum Nachweis von *Histomonas meleagridis* (*Hm*), *Tetratrichomonas gallinarum* (*Tg*) und *Blastocystis* spp. (*Bl*) positiv getesteten Hühnervögel.

PCR	Huhn <i>Gallus gallus domesticus</i>			Trute <i>Meleagris gallopavo</i> <i>forma domestica</i>		Pfau <i>Pavo cristatus</i>		Wachtel <i>Coturnix japonica</i> / <i>Colinus virginianus</i>	
	Leber	Blinddarm	<i>Heterakis gallinarum</i> (aus Blinddarm)	Leber	Blinddarm	Leber	Blinddarm	Leber	Blinddarm
<i>Hm</i> konventionell <sup>1</sup>	2/31 <sup>2</sup>	3/35 <sup>2</sup>	1/10	4/10 <sup>4</sup>	4/10 <sup>4</sup>	0/1	0/1	0/2	0/2
<i>Hm</i> real-time <sup>1</sup>	2/31 <sup>2</sup>	4/35 <sup>2</sup>	4/10	4/10 <sup>4</sup>	4/10 <sup>4</sup>	0/1	0/1	0/2	0/2
<i>Hm</i> real-time <sup>3</sup>	5/17	8/17		1/1 <sup>4</sup>	1/1 <sup>4</sup>	1/1 <sup>4</sup>	1/1 <sup>4</sup>	1/4 <sup>4</sup>	1/4 <sup>4</sup>
<i>Tg</i> konventionell <sup>1</sup>	2/31 <sup>2</sup>	12/35 <sup>2</sup>		0/10	1/10	0/1	1/1	0/2	0/2
<i>Bl</i> konventionell <sup>1</sup>	2/31 <sup>2</sup>	9/35 <sup>2</sup>		0/10	1/10	0/1	0/1	0/2	2/2

<sup>1</sup> Proben Sammelperiode 1 (36 Hühner, 10 Truten, 1 Pfau, 2 Wachteln)

<sup>2</sup> In der ersten Sammelperiode wurden Leber und Blinddarm von 30 Hühnern gesammelt, bei 1 Huhn nur Leber und bei 5 Hühnern nur Blinddarm

<sup>3</sup> Proben Sammelperiode 2 (17 Hühner, 1 Trute, 1 Pfau, 4 Wachteln)

<sup>4</sup> Truten, Pfau und Wachtel mit makroskopischem Sektionsbild verdächtig für Histomonadose waren *Hm*-PCR-positiv (*Hm*-PCR-negative Tiere hatten andere Todesursachen)

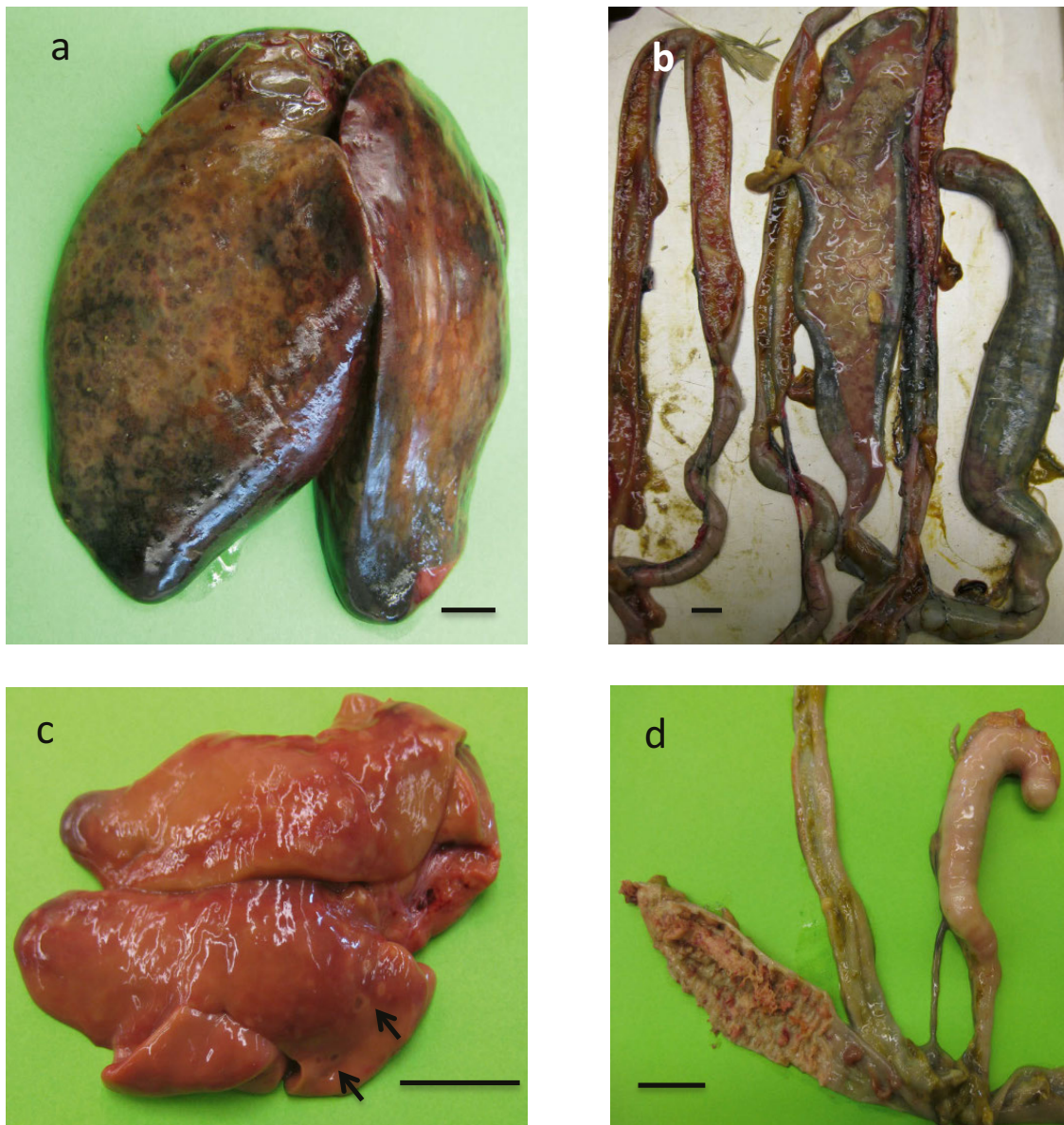
nicht über krankmachendes Potential (Landman et al., 2016). *T. gallinarum* hingegen verursacht histologisch von Histomonadose kaum unterscheidbare Typhlohepatitiden bei Rothühnern (Liebhart et al., 2014) und granulomatöse Leber- und Blinddarmveränderungen, die auch einer Mykobakteriose gleichen können, bei Legehennen (Landman et al., 2016). Der Erregernachweis mittels PCR ist deshalb für eine korrekte ätiologische Diagnose unabdingbar.

Zur Evaluierung der PCR-Diagnose wurden Gewebeproben von 53 Hühner (35 Hybriden und 18 Rassehühner), 11 Truten, 6 Zuchtwachteln (5 Japanwachteln, 1 Virgi-

niawachtel) und 2 Pfauen eingesetzt. Für Histomonadose verdächtige und unverdächtige Tiere wurden aus dem Sektionsgut (Schweiz und Liechtenstein) in 2 Sammelperioden (SP1, SP2) 2013–2015 beprobt (Tab. 1). Da der Nachweis von *H. meleagridis* am verlässlichsten aus der Leber und den Blinddärmen gelingt (Grabensteiner et al., 2006), wurden bei allen Tieren Leber- (Le) und Blinddarmproben (Cae) entnommen, ausser bei 6 Hühnern (1× nur Le, 5× nur Cae). Bei 4 Rassehühnern und 6 Legehennen wurde zusätzlich *Het. gallinarum* mittels Falcon-Röhrchen mit Nylonfilter aus dem Blinddarminhalt ausgewaschen und manuell aus dem Filterrückstand gelesen. Um die Heterakiseier aufzubrechen, wurden die

Diagnose von Histomonadose bei Trute, Huhn, Pfau und Wachtel mittels PCR

S. Albini et al.



**Abbildung 1:** Trute, ca. 14 Wochen alt (a, b), Legehenne, Hybride, 26 Wochen alt (c, d) und Japanwachtel, 15 Monate alt (e, f) mit Histomonadose. Leber: stumpfrandig, teils grünlich bis dunkel (a,e), mit unzähligen (a), oder vereinzelt teils konfluierenden (c,e) kokardenartigen Nekroseherden (Pfeile). Blinddärme: eröffneter Blinddarm mit blutigem und käsigem Inhalt (b, d) oder makroskopisch unauffällig (f). Balken: 2 cm.

Diagnose von Histomonadose bei Trute, Huhn, Pfau und Wachtel mittels PCR

S. Albini et al.

Proben 3× gefroren/getaut, homogenisiert (Precellys®24 apparatus, bertin technologies, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich) und lysiert (Mathis et al., 1996).

DNA wurde aus ca. 25 mg Le, Cae oder *Het. gallinarum* mit dem „QIAamp DNA Mini Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert (Linder, 2015). Proben aus SP1 wurden mit 3 konventionellen Simplex PCRs zum Nachweis von *H. meleagridis*, *T. gallinarum* und *Blastocystis* spp. nach Grabensteiner und Hess (2006) mit geringen Änderungen (Linder, 2015) getestet. Als interne positive Kontrolle diente eGFP (Hoffmann et al., 2005). Die Elektrophorese wurde auf einem automatisierten Kapillarsystem durchgeführt (QIAxcel Advanced System, Qiagen). Die Positivkontrollen von *H. meleagridis*, *T. gallinarum* und *Blastocystis* spp. wurden freundlicherweise von Prof. M. Hess, Universität Wien und Dr. C. Frey, Universität Bern zur Verfügung gestellt.

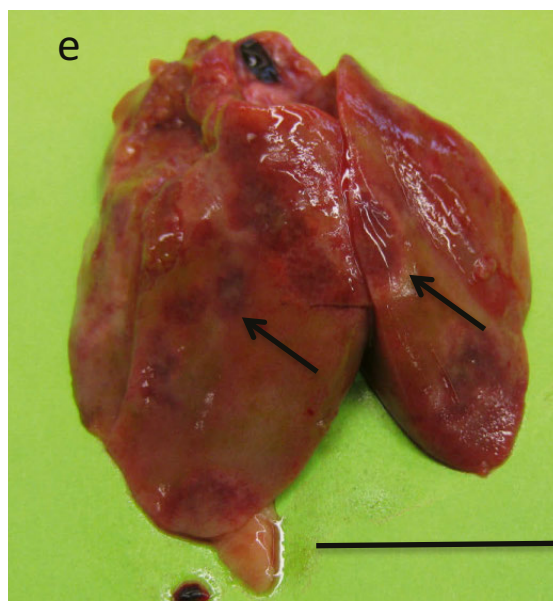
Alle Proben wurden mit der *H. meleagridis* real-time PCR (*Hm* real-time PCR) nach Landman et al. (2015) analysiert. Diese wurde modifiziert, um sie mit der internen Kontrolle (eGFP) als Duplex real-time PCR durchzuführen. Pro 25 µl Reaktionsansatz wurden 12.5 µl „TaqMan Universal PCR MasterMix (2×)“ (Applied Biosystems (AB), Foster City, USA), 600 nM Hm5.8F2 und Hm5.8R Primer (Microsynth, Balgach, Schweiz), 200 nM Hm5.P Sonde (AB), 400 nM EGFP1-F und EGFP2-R Primer (Microsynth), 200 nM EGFP1-S Sonde (Microsynth) und 5 µl DNA unverdünnt und 1:10 verdünnt verwendet.

## Resultate und Diskussion

Die an Histomonadose erkrankten Truten aus dem evaluierten Sektionsgut zeigen in Übereinstimmung mit der Literatur eine nahezu pathognomonische Typhlohepatitis mit multiplen kokardenartigen Nekrosen („bull’s eye lesions“) in der dunkel bis grünlich verfärbten Leber und verdickte Blinddärme mit käsig-blutigem Inhalt (fibrinös-ulzerative Enteritis) (Abb. 1a, b; Grabensteiner et al. 2006). Bei Huhn, Wachtel und Pfau sind die in der Literatur beschriebenen und auch bei Schweizer Hühnervögeln aufgefundenen Sektionsbilder vielfältiger. Bei Hühnern sind häufig feste gelbe Massen fokal oder auf ganzer Länge der Blinddärme vorhanden (Abb. 1d), während Leberläsionen in unterschiedlicher Ausprägung vorkommen (Abb. 1c; Dolka et al., 2015), oder gänzlich fehlen können (Homer und Butcher, 1991).

Bei einer Japanzuchtwachtel und einem 3 Wochen alten Pfauenküken wurden in der pathologischen Untersuchung ausgeprägte kokardenartige Läsionen in der Leber festgestellt (Abb. 1e), während die Blinddärme makroskopisch unauffällig waren (Abb. 1f). Diese Befunde stehen im Gegensatz zu einem Ausbruch von Histomonadose bei Virginazuchtwachteln in den USA mit einer Mortalität von 11%. Dort zeigten 55/56 Wachteln massiv veränderte Blinddärme, aber nur 3/56 Tieren Leberläsionen (McDougald et al., 2012).

Bei allen Tieren mit verdächtigem Sektionsbild konnte *H. meleagridis* mittels PCR und falls veranlasst mittels Histologie nachgewiesen werden, ausser bei einer PCR-positiven Henne, wo histologisch keine Histomonaden angesprochen werden konnten. Mehrfachinfek-



tionen wurden nur bei Hühnern festgestellt: Ein Huhn war dreifach positiv mit *H. meleagridis* (nur aus *Het. gallinarum*), *T. gallinarum* (Le, Cae) und *Blastocystis* spp. (Le, Cae), Todesursache war jedoch eine hochgradige Blutarmut infolge eines massiven Befalls mit der roten Vogelmilbe; 1 Huhn war *H. meleagridis* (nur aus *Het. gallinarum*) und *T. gallinarum* (Cae) positiv; 2 waren *H. meleagridis* (1× Le, Cae; 1× Cae) und *Blastocystis* spp. (Cae) positiv und 3 waren *T. gallinarum* (Cae) und *Blastocystis* spp. (Cae) positiv. Trotz wenigen positiven Proben ist die Verbreitung von *T. gallinarum* und *Blastocystis* spp. bei praktisch allen Hühnervögeln ersichtlich (Tab. 1). Von den *Het. gallinarum* Proben wurden 1/10 (konventionelle PCR) beziehungsweise 4/10 (realtime PCR) positiv getestet, während die Gewebeproben der entsprechenden Hühner negativ waren. Dies untermauert die Reservoirfunktion der Hühner. Für die Routinediagnostik ist der Nachweis von *H. meleagridis* in *Het. gallinarum* aber wegen des grossen Aufwands nicht geeignet. Die Resultate der konventionellen und real-time PCR waren bis auf eine Cae-Probe kongruent (Tab. 1). Es wurden keine Kreuzreaktionen in der bisher nicht mit klinischen Proben validierten *Hm* real-time PCR (Landman et al., 2015) festgestellt.

## Schlussfolgerung

Die makroskopischen Befunde bei Histomonadose sind bei Truten nahezu pathognomonisch, können aber bei Huhn, Pfau und Wachtel stark vom gewohnten Bild abweichen. Die hier beschriebenen konventionellen und real-time PCR Methoden werden daher für eine korrekte ätiologische Diagnose von Histomonadose bei möglicher Anwesenheit von morphologisch ähnlichen Parasiten in den Blinddärmen empfohlen. Huhn und Wachtel sind weniger anfällig als Truten und können daher als Reservoir für *H. meleagridis* angesehen werden, was insbesondere der Nachweis von *H. meleagridis* in *Het. gallinarum* bei vier Hühnern mit fehlendem Gewebenachweis untermauert. Truten sollten deshalb nie mit anderen Hühnervögeln zusammengehalten werden.

## Dank

Vielen Dank an: Dr. F. Grimm, Institut für Parasitologie, Universität Zürich und D. Frei und S. Scherrer, Institut für Veterinär-Bakteriologie für die Hilfsbereitschaft und fachliche Unterstützung; Prof. M. Hess, Universität Wien und Dr. C. Frey, Institut für Parasitologie, Universität Bern für die Positivkontrollen und das technische Personal der beteiligten Institute, insbesondere I. Gomez und B. Sigris, sowie Zyto-Histo-Diagnostik, Freienstein. Diese Arbeit enthält Daten (Konventionelle PCR, SP1) aus der Masterarbeit von K. Linder.

Diagnose von Histomonadose bei Trute, Huhn, Pfau und Wachtel mittels PCR

S. Albini et al.

Diagnose von Histomonadose bei Trute, Huhn, Pfau und Wachtel mittels PCR

S. Albini et al.

## Literatur

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

Dolka B., Źbikowski A., Dolka I., Szeleszczuk P.: Histomonos – an existing problem in chicken flocks in Poland. *Vet. Res. Commun.* 2015, 39: 189-195.

EU: Verordnung (EG) Nr. 1756/2002 des Rates vom 23. September 2002 zur Änderung der Richtlinie 70/524/EWG des Rates über Zusatzstoffe in der Tierernährung hinsichtlich des Widerrufs der Zulassung eines Zusatzstoffes sowie der Verordnung (EG) Nr. 2430/1999 der Kommission. 2002, L265/1: 1-2.

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

Grabensteiner E., Liebhart D., Weissenböck H., Hess M.: Broad dissemination of *Histomonas meleagridis* determined by the detection of nucleid acid in different organs after experimental infection of turkeys and specified pathogen-free chickens using a mono-eukaryotic culture of the parasite. *Parasitol. Int.* 2006, 55: 317-322.

Graf B., Liebhart D., Windisch M., Ibesich C., Hess M.: Seroprevalence of *Histomonas meleagridis* in pullets and laying hens determined by ELISA. *Vet. Rec.* 2011, 168: 160.

Hess M., Liebhart D., Bilic I., Ganas P.: *Histomonas meleagridis* – New insights into an old pathogen. *Vet. Parasitol.* 2015, 208: 67-76.

Hoffmann B., Beer M., Schelp C., Schirrmeier H., Depner K.: Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever. *J. Virol. Methods.* 2005, 130: 36-44.

Homer B.L., Butcher G.D.: Histomoniasis in leghorn pullets on a Florida farm. *Avian Dis.* 1991, 35: 621-624.

Linder K.: Detection of *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* and *Blastocystis* spp. in chickens, turkeys and other gallinaceous birds from Swiss livestock by PCR. Masterarbeit, Zürich, 2015.

Landman W.J.M., Ter Veen C., Van der Heijden H.M.J.F., Klinkenbergh D.: Quantification of parasite shedding and horizontal transmission parameters in *Histomonas meleagridis* infected turkeys determined by real-time quantitative PCR. *Avian Pathol.* 2015, 44: 358-65.

Landman W.J.M., Molenaar R.J., Cian A., Van der Heijden H.M.J.F., Viscogliosi E.: Granuloma disease in flocks of productive layers caused by *Tetratrichomonas gallinarum*. *Avian Pathol.* 2016, 45: 465-477.

Liebhart D., Neale S., Garcia-Rueda C., Wood A.M., Bilic I., Wernsdorf P., Jaskulska B., Hess M.: A single strain of *Tetratrichomonas gallinarum* causes fatal typhlohepatitis in red-legged partridges (*Alectoris rufa*) to be distinguished from histomonos. *Avian Pathol.* 2014, 43: 473-480.

Lotfi A.-R., Abdelwhab E.M., Hafez H.M.: Persistence of *Histomonas meleagridis* in or on materials used in poultry houses. *Avian Dis.* 2012, 56: 224-226.

Mathis A., Deplazes P., Eckert J.: An improved test system for PCR-based specific detection of *Echinococcus multilocularis* eggs. *J. Helminthol.* 1996, 70: 219-222.

McDougald L.R.: Blackhead disease (histomoniasis) in poultry: a critical review. *Avian Dis.* 2005, 49: 462-476.

McDougald L.R., Abraham M., Beckstead R.B.: An outbreak of blackhead disease (*Histomonas meleagridis*) in farm-reared bobwhite quail (*Colinus virginianus*). *Avian Dis.* 2012, 56: 754-756.

Van der Heijden H.M.J.F., Landman W.J.M.: High seroprevalence of *Histomonas meleagridis* in Dutch layer chickens. *Avian Dis.* 2011, 55: 324-327.

Zaragatzki E., Mehlhorn H., Abdel-Ghaffar F., Rasheid K.A.S., Grabensteiner E., Hess M.: Experiments to produce cysts in cultures of *Histomonas meleagridis* – the agent of histomonos in poultry. *Parasitol. Res.* 2010, 106: 1005-1007.

## Korrespondenz

Dr. med. vet. Sarah Albini  
Abteilung für Geflügel- und Kaninchenkrankheiten  
Institut für Veterinär-Bakteriologie  
Winterthurerstrasse 270  
8057 Zürich  
Tel: +41 44 635 86 31  
Fax: +41 44 635 89 14  
E-Mail: salbini@vetbakt.uzh.ch