

Aus dem
Institut für Parasitologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Untersuchungen zu *Toxoplasma gondii*- und *Eimeria tenella*-Koinfektionen im Huhn sowie Parasit-
Wirt-Interaktionen in *Toxoplasma gondii*-infizierten Hühnerblutzellkulturen**

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Lysanne Hiob
aus Schkeuditz

Leipzig, 2020

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Thomas Vahlenkamp

Betreuer: Prof. Dr. Arwid Dauschies

Gutachter: Prof. Dr. Arwid Dauschies, Institut für Parasitologie,
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig, Leipzig
Prof. Dr. Silke Rautenschlein, Klinik für Geflügel, Stiftung Tierärztliche
Hochschule Hannover, Hannover

Tag der Verteidigung: 21. Januar 2020

Für meine Eltern und Großeltern

“Hope is not the conviction that something will turn out well but the certainty that something makes sense, regardless of how it turns out. “

Vaclav Havel

Inhaltsverzeichnis

Inhalt

1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht.....	3
2.1	<i>Toxoplasma gondii</i>	3
2.1.1	Taxonomie	3
2.1.2	Morphologie und Entwicklungszyklus	3
2.1.3	Vorkommen und klonale Linien.....	6
2.1.4	Pathogenese und Bedeutung der <i>Toxoplasma gondii</i> -Infektion beim Huhn	7
2.1.4.1	Zielzellen von <i>Toxoplasma gondii</i> im Hühnerblut.....	7
2.2	<i>Eimeria tenella</i>	8
2.2.1	Taxonomie	8
2.2.2	Morphologie und Entwicklungszyklus	8
2.2.3	Vorkommen und Bedeutung	9
2.2.4	Pathogenese der <i>Eimeria tenella</i> -Infektion beim Huhn	10
2.2.4.1	Koinfektionen mit <i>Eimeria tenella</i> beim Huhn.....	11
2.3	Immunsystem des Huhnes.....	12
2.3.1	Struktur und Besonderheiten	12
2.3.1.1	Zelluläre Bestandteile.....	12
2.3.1.2	Humorale Bestandteile	15
2.3.1.2.1	Immunglobuline.....	15
2.3.1.2.2	Defensine.....	16
2.3.1.2.3	Zytokine	16
2.3.1.3	Primäre lymphatische Organe.....	18
2.3.1.3.1	Thymus	18
2.3.1.3.2	Bursa Fabricii	18
2.3.1.4	Sekundäre lymphatische Organe	19
2.3.1.4.1	Milz	19
2.3.1.4.2	Ösophagus- und Pylorustonsillen	20
2.3.1.4.3	Zäkaltonsillen.....	20
2.3.1.4.4	Peyer`sche Platten	20
2.3.1.4.5	Meckel-Divertikel.....	21
2.3.2	Angeborene Immunität	21
2.3.3	Erworbene Immunität.....	22
2.4	Immunologie der <i>Toxoplasma gondii</i> -Infektion.....	23
2.5	Immunologie der <i>Eimeria tenella</i> -Infektion des Huhnes	26
3	Publikation 1: Experimental <i>Toxoplasma gondii</i> and <i>Eimeria tenella</i> co-infection in chickens	30
4	Publikation 2: Host-pathogen interaction in <i>Toxoplasma gondii</i> -infected mixed chicken blood cell cultures	31
5	Diskussion.....	32

Inhaltsverzeichnis

6	Zusammenfassung.....	45
7	Summary.....	47
8	Literaturverzeichnis.....	49

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

APC	Antigenpräsentierende Zellen
BSDC	Sekretorische Dendritische Zellen der Bursa Fabricii
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation
<i>Cl. perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
CLSM	confocal laser scanning microscopy
CSF	Kolonie-stimulierender Faktor
DC	Dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. acervulina</i>	<i>Eimeria acervulina</i>
<i>E. brunetti</i>	<i>Eimeria brunetti</i>
<i>E. hagani</i>	<i>Eimeria hagani</i>
<i>E. maxima</i>	<i>Eimeria maxima</i>
<i>E. mitis</i>	<i>Eimeria mitis</i>
<i>E. mivati</i>	<i>Eimeria mivati</i>
<i>E. necatrix</i>	<i>Eimeria necatrix</i>
<i>E. praecox</i>	<i>Eimeria praecox</i>
<i>E. tenella</i>	<i>Eimeria tenella</i>
FAE	Follikel-assoziiertes Epithel
GALT	gut-associated lymphoid tissue
GBP	Guanylat-Bindungsproteine
GFP	grün fluoreszierende Protein
GTPase	Guanosintriphosphatase
h	Stunden
HBK	Hühnerblutzellmischkultur

Abkürzungsverzeichnis

IBDV	Infectious bursal disease virus
IFE	Interfollikuläres Epithel
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILC	Angeborene lymphoide Zellen
iNOS	induzierbare Stickoxidsynthase
IRG	immunity-related GTPasen
LD	letale Dosis
LPS	Lipopolysaccharide
MC-PCR	magnetic capture Polymerase-Kettenreaktion
MHC	Major Histocompatibility complex
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
nPCR	nested Polymerase-Kettenreaktion
PALS	periarteriöläre lymphatische Scheiden
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PELS	periellipsoide lymphatische Scheiden
p. i.	post infectionem
PRR	Pattern recognition receptors
PV	parasitophore Vakuole
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
TCR	T-Zell-Rezeptor
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TGF	Transforming growth factor

Abkürzungsverzeichnis

Th1	T-Helferzellen Typ 1
Th2	T-Helferzellen Typ 2
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Toxoplasma (T.) gondii und *Eimeria (E.) tenella* sind weltweit verbreitete einzellige Parasiten des Stammes Apicomplexa (MCDUGALD 1998, DUBEY 2010). *T. gondii* wurde bereits in nahezu allen Säugetieren und vielen Vogelarten einschließlich Hühnern beschrieben (DUBEY et al. 1998, TENTER et al. 2000, BANGOURA et al. 2011) und ist als Zoonoseerreger von zentraler Bedeutung. Ungefähr ein Drittel der Weltbevölkerung soll nach Schätzungen mit *T. gondii* infiziert sein, wobei die meisten Infektionen asymptomatisch verlaufen (HILL und DUBEY 2002, MONTOYA und LIESENFELD 2004, WEISS und DUBEY 2009). *T. gondii* besitzt einem fakultativ heteroxen Entwicklungszyklus, wobei ausschließlich Vertreter aus der Familie der Feliden, unter denen die Hauskatze die bedeutendste epidemiologische Rolle spielt, als Endwirt dienen (MILLER et al. 1972, TENTER et al. 2000). Das Huhn (*Gallus gallus*) gilt als empfänglich, aber relativ resistent gegenüber der klinischen Manifestation der Toxoplasmose (DUBEY 2010). Sehr hohe *T. gondii*-Seroprävalenzen bis zu 100 % wurden weltweit in Freilandhaltungen und kleinen Hinterhofhaltungen nachgewiesen (DUBEY 2010). Dies unterstreicht die Annahme, dass Hühner vor allem in diesen Haltungsformen eine bedeutende Rolle in der Epidemiologie von *T. gondii* spielen und als guter Indikator für Bodenkontaminationen mit *T. gondii* angesehen werden können (DUBEY 2010). Das Huhn stellt außerdem eine potentielle Infektionsquelle für den Menschen dar, wenn z. B. Geflügelfleisch nicht ausreichend durcherhitzt wird und die Gefahr einer Übertragung durch Gewebssystemen von *T. gondii* gegeben ist.

E. tenella zählt neben *Eimeria (E.) acervulina* zu den am häufigsten vorkommenden Eimerienspezies in Hühnerhaltungen mit Prävalenzen von 61 – 77 % im europäischen Raum (HAUG et al. 2008, GYÖRKE et al. 2013). Eimerien sind generell durch eine hohe Wirtsspezifität (JOHNSON 1923, MCDUGALD und FITZ-COY 2013) gekennzeichnet, wobei das Huhn für z. B. *E. tenella* und *E. acervulina* den einzig natürlichen Wirt darstellt. *E. tenella*-Infektionen sind durch blutige Durchfälle, verringerte Gewichtszunahmen und eine deutlich erhöhte Mortalität gekennzeichnet, wobei das Zäkum die Prädilektionsstelle des Erregers darstellt. *E. acervulina* gilt als schwach pathogen, befällt vorwiegend das Duodenum und führt zu einer schlechteren Futtermittelverwertung (MCDUGALD und FITZ-COY 2013). Als Hauptverursacher der Hühnerkokzidiose nimmt *E. tenella* eine Schlüsselrolle ein, welche geschätzt jährlich mehr als drei Milliarden US-Dollar weltweit verursacht (WILLIAMS 1999, DALLOUL und LILLEHOJ 2006, BLAKE und TOMLEY 2014). Diese sind zum Teil den hohen Einbußen infolge Produktionsverluste in der Broilerindustrie geschuldet, fließen aber auch in die Prophylaxe und Behandlung betroffener Bestände (BLAKE und TOMLEY 2014). Die Kontrolle der Kokzidiose bleibt aufgrund hoher Erregerprävalenzen, einer ausgeprägten Persistenz der Oozysten in der Umwelt sowie das zunehmende Auftreten von Antikokzidien-Resistenzen eine Herausforderung für die Pharmaindustrie und landwirtschaftliche Betriebe (PEEK und LANDMAN 2011, BLAKE und TOMLEY 2014). Es ist außerdem bekannt, dass *E. tenella* als Wegbereiter für verschiedene Sekundärinfektionen gilt (MCDUGALD 1998) und im Feld häufig mit anderen Eimerienspezies vergesellschaftet ist (WILLIAMS et al. 1996, HAUG et al. 2008, GYÖRKE et al. 2013).

Aufgrund der hohen *T. gondii*- als auch *E. tenella*-Erregerprävalenzen im Huhn, liegt die Vermutung nahe, dass Koinfektionen mit diesen beiden Pathogenen häufig im Feld vorkommen. Es ist möglich, dass es bei einer Koinfektion mit diesen beiden Kokzidien zu einer wechselseitigen Beeinflussung des

Einleitung

Immunsystems kommt, da beide Erreger verwandte Antigene und ähnliche Invasionsmechanismen besitzen. Eine spezifische Kreuzimmunität wird allerdings sehr wahrscheinlich nicht vorliegen, da diese nicht einmal zwischen verschiedenen Eimerienspezies besteht (ROSE 1987). Trotz der anzunehmenden hohen Häufigkeit im Feld sind in der bisher veröffentlichten Literatur keine Untersuchungen zu Koinfektionen mit *T. gondii* und Eimerien im Huhn beschrieben. Lediglich ein Bericht von MASON et al. (2015) stellte eine Assoziation von *T. gondii*-Infektionen mit relativ schwerwiegenden *Eimeria stiedae*-Infektionen in Wildkaninchen aus Schottland fest.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden in einer experimentellen In-vivo-Koinfektionsstudie mögliche Wechselwirkungen zwischen *T. gondii*- und *Eimeria* spp.-Infektionen auf das Immunsystem des Huhnes untersucht. Dabei wurden verschiedene klinische Parameter wie Körpergewichtszunahmen, die *E. tenella*-Oozystenausscheidung, Schwere der Darmläsionen und die Verteilung von *T. gondii* in ausgewählten Geweben erhoben. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit dienten In-vitro-Versuche zur Evaluation der *T. gondii*-Wirtszell-Interaktion und potentieller Zielzellen von *T. gondii* in einer lebensnahen Hühnerblutzellmischkultur.

2 Literaturübersicht

2.1 *Toxoplasma gondii*

2.1.1 Taxonomie

Toxoplasma (T.) gondii wurde erstmalig von NICOLLE und MANCEAUX (1908) in Gewebe eines nordafrikanischen Hamster-ähnlichen Nagetiers, dem Gundi, beschrieben. Initial glaubten die beiden Wissenschaftler, dass es sich um *Leishmania* handle, erkannten aber bald, dass sie einen neuen Organismus entdeckt hatten und benannten ihn anhand seiner Morphologie (toxoplasma = Bogen; plasma = Leben) und Wirtes (*Ctenodactylus gundi*) als *Toxoplasma gondii* (NICOLLE und MANCEAUX 1909). Nahezu zur gleichen Zeit entdeckte SPLENDRE (1908) ebenfalls den Parasiten in einem Hasen aus Brasilien, benannte ihn aber nicht.

Toxoplasmen wurden in den folgenden Jahren sowohl bei verschiedenen Tierarten als auch beim Menschen beschrieben und nach ihrer Wirtsherkunft benannt (TENTER et al. 2000). SABIN (1939) widerlegte allerdings, dass es sich um verschiedene Spezies innerhalb der Gattung *Toxoplasma* handelte. Anhand des Vorhandenseins eines Komplexes spezifischer Organellen, dem sogenannten Apikalkomplex, wird *T. gondii* zum Stamm der Apicomplexa, genauer der Unterklasse Coccidia gezählt. Innerhalb der Ordnung Eimeriida und der Familie der Sarcocystidae ist *T. gondii* die einzige Art der Gattung *Toxoplasma* (SCHNIEDER 2006).

2.1.2 Morphologie und Entwicklungszyklus

T. gondii ist ein weltweit vorkommender Einzeller mit einem fakultativ heteroxen Entwicklungszyklus, der nahezu alle Warmblüter und den Menschen infizieren kann (DUBEY et al. 1998, TENTER et al. 2000). Als Endwirt dienen ausschließlich Vertreter aus der Familie der Feliden, unter denen die Hauskatze die bedeutendste epidemiologische Rolle spielt (MILLER et al. 1972, TENTER et al. 2000). Eine Erregerübertragung kann sowohl zwischen Endwirten untereinander, von Zwischenwirt zu Zwischenwirt, vom Zwischenwirt auf den Endwirt und umgekehrt erfolgen (TENTER et al. 2000).

Im fakultativ zweiwirtigen Lebenszyklus von *T. gondii* werden anhand der Morphologie und biologischen Eigenschaften drei infektiöse Stadien des Parasiten (Tachyzoiten, Bradyzoiten und sporulierte Oozysten) unterschieden (DUBEY et al. 1998), welche nachfolgend detaillierter beschrieben werden. Diese Stadien sind sowohl für den End- als auch Zwischenwirt infektiös.

Tachyzoiten

Das Stadium des Tachyzoiten (tachy [griechisch] = schnell) wird auch als Trophozoit oder proliferative Form bezeichnet und kann grundsätzlich alle kernhaltigen Zellen warmblütiger Tiere und des Menschen aktiv befallen (DOBROWOLSKI und SIBLEY 1996, DUBEY et al. 1998). Der Begriff Tachyzoit wurde erstmals von FRENKEL (1973) geprägt und spiegelt die schnelle Replikation dieses Stadiums in Wirtszellen wider. Sie treten in der Phase der akuten Infektion und bei Reaktivierung einer bestehenden Infektion auf. Tachyzoiten haben eine halbmondförmige Gestalt, sind ca. 2 x 6 µm groß und beherbergen einen zentral gelegenen Zellkern (DUBEY et al. 1998). Der am Vorderende gelegene Apikalkomplex setzt sich aus spezifischen Organellen (Conoid, Rhoptrien, Mikronemen) zusammen, die eine bedeutende Rolle für die Anheftung an die Wirtszellmembran und Penetration der Wirtszelle

spielen (NICHOLS et al. 1983, CHIAPPINO et al. 1984, DUBEY et al. 1998). Nachdem Tachyzoiten die Wirtszelle aktiv invadiert haben, sind sie von einer parasitophoren Vakuole (PV) umgeben und beginnen mit einer schnellen asexuellen Replikation, der Endodyogenie (SHEFFIELD und MELTON 1968, DUBEY et al. 1998). Dieser Vorgang der Zweiteilung wiederholt sich mehrfach, bis die Mutterzelle rupturiert, die Tochterzellen entlässt und diese neue Zellen infizieren (DUBEY et al. 1998). Invasions- und Wachstumsraten variieren dabei in Abhängigkeit von der Art der Wirtszellen und dem *T. gondii*-Stamm (KAUFMAN und MALONEY 1962, APPLEFORD und SMITH 1997). Unter Einfluss der wirtseigenen Immunabwehr differenzieren sich Tachyzoiten zu Bradyzoiten (MONTROYA und LIESENFELD 2004, KIM und WEISS 2008).

Bradyzoiten und Gewebssystem

Der Begriff Bradyzoit (brady [griechisch] = langsam) wurde von FRENKEL (1973) geprägt und stellt das Dauerstadium oder auch die „Ruheform“ des Parasiten dar (DUBEY et al. 1998). Bradyzoiten werden auch als Cystozoiten bezeichnet, sind bogenförmig, 1,5 x 7 µm groß und besitzen im Gegensatz zu Tachyzoiten einen exzentrisch gelegenen Zellkern (DUBEY et al. 1998). Sie vermehren sich nur langsam durch Endodyogenie innerhalb von sogenannten Gewebssystemen (FERGUSON und HUTCHISON 1987a, DUBEY et al. 1998, BOHNE et al. 1999). Zwei bis hunderte von Bradyzoiten können eine Gewebssysteme formieren, die eine dünne und elastische Wand besitzt (MEHLHORN und FRENKEL 1980). Entsprechend der enthaltenen Anzahl an Bradyzoiten können Gewebssysteme sehr unterschiedliche Größen annehmen und variieren zwischen 5 µm bei sehr jungen Gewebssystemen und 70 - 100 µm Durchmesser bei reifen Gehirn- und Muskulaturzysten (DUBEY 1977, DUBEY et al. 1998). Die Entwicklung der Gewebssysteme vollzieht sich im Zytoplasma der Wirtszelle, wobei sie überwiegend im neuronalen und muskulären Gewebe vorkommen (DUBEY 1988, DUBEY et al. 1998). DUBEY und FRENKEL (1976) führten eine erste tiefgründige Studie über die Entwicklung von Gewebssystemen durch und beschrieben deren erstes Auftreten in Mäusen bereits drei bis sechs Tage nach Infektion mit Tachyzoiten. Es ist außerdem bekannt, dass dieses Parasitenstadium im Wirtsgewebe meist reaktionslos über viele Jahre und sogar lebenslang persistiert (FERGUSON und HUTCHISON 1987b, BOHNE et al. 1999, MONTROYA und LIESENFELD 2004, KIM und WEISS 2008). Darüber hinaus ist von verschiedenen Autoren beschrieben, dass beim Zerfall von Gewebssystemen Bradyzoiten sich wieder in Tachyzoiten differenzieren können, um neue Wirtszellen zu befallen (DUBEY 1998, TENTER et al. 2000).

Oozysten

Bei der sexuellen Vermehrung von *T. gondii* im Darm des Endwirtes entstehen Oozysten, die mit dem Kot in die Umwelt freigesetzt werden (MILLER et al. 1972, DUBEY 2009). Die zunächst unsporulierten rundlichen Oozysten sind ca. 10 x 12 µm groß und mit dem Sporonten nahezu vollständig ausgefüllt (DUBEY et al. 1998). Die Sporulation und damit die Entwicklung zur infektiösen Oozyste erfolgt außerhalb des Endwirtes je nach Umweltbedingungen nach eins bis fünf Tagen (DUBEY et al. 1998). Hierbei bilden sich in jeder Oozyste zwei elipsoidale, ca. 6 x 8 µm große Sporozysten, die wiederum jeweils vier Sporozoiten enthalten (DUBEY et al. 1970a, DUBEY et al. 1970b, FERGUSON et al. 1979, DUBEY et al. 1998).

Lebenszyklus

Entwicklung im Zwischenwirt

Zwischenwirte können sich über die Aufnahme von Gewebssystemen oder sporulierter Oozysten aus der Umwelt oder Nahrung infizieren. Nach Auflösung der Zysten- bzw. Oozystenwand durch proteolytische Enzyme des Gastrointestinaltraktes, penetrieren die freigesetzten Bradyzoiten bzw. Sporozoiten die Darmschleimhaut und vermehren sich in Form von Tachyzoiten ungeschlechtlich durch Endodyogenie (DUBEY et al. 1998, TENTER et al. 2000). Über lokale Lymphknoten und dem lympho-hämatogenen Weg erfolgt eine Verbreitung in weitere Organe und Gewebe des Zwischenwirtes, in denen sich die Tachyzoiten weiter durch schnelle Endodyogenie vermehren. In immunkompetenten Zwischenwirten entstehen dann unter Einwirkung des Immunsystems wieder Bradyzoiten in Gewebssystemen (DUBEY et al. 1998, MONTOYA und LIESENFELD 2004, KIM und WEISS 2008), welche jahre- oder sogar lebenslang im Ruhezustand persistieren können (FERGUSON und HUTCHISON 1987b, BOHNE et al. 1999, MONTOYA und LIESENFELD 2004, KIM und WEISS 2008). Eine Reaktivierung der Toxoplasmose kann z. B. durch Immunsuppression des Wirtes auftreten (MONTOYA und LIESENFELD 2004, KIM und WEISS 2008).

Entwicklung im Endwirt

Feliden können sich durch die orale Aufnahme von sporulierten Oozysten oder Gewebssystemen von Zwischenwirten infizieren (DUBEY und FRENKEL 1976, DUBEY 1996). Erfolgt die Infektion über Gewebssysteme, wird nach der Freisetzung der Bradyzoiten im Zuge der Magen-Darm-Passage die ungeschlechtliche Vermehrung (Endodyogenie) in den Epithelzellen des Dünndarms eingeleitet (DUBEY und FRENKEL 1972, DUBEY et al. 1998). Anschließend beginnt die sexuelle Vermehrungsphase (Gamogonie), in der sich die entstandenen Merozoiten in Makro- und Mikrogamonten differenzieren, aus denen wiederum die Makrogameten und bewegliche Mikrogameten hervorgehen (DUBEY und FRENKEL 1972, FREYRE et al. 1989). Die Oozysten entstehen dann aus der Vereinigung der Makrogameten mit den Mikrogameten und werden durch Ruptur der Darmepithelzellen ins Darmlumen freigegeben. Katzen können Millionen von Oozysten pro Gramm Kot über einen Zeitraum von bis zu 20 Tagen ausscheiden (HEYDORN 1979, TENTER et al. 2000, DUBEY 2001). Die Präpatenz beträgt nach einer Bradyzoiten-Infektion drei bis zehn Tage (FREYRE et al. 1989, DUBEY et al. 1998). Im Gegensatz dazu beträgt die Präpatenz nach einer Oozysten-Infektion mindestens 18 Tage (DUBEY 1996) und weniger als 30 % der Katzen, die sich auf diese Weise infizieren, scheiden Oozysten aus (DUBEY und FRENKEL 1976, DUBEY 1996). Es ist bekannt, dass nach der Erstinfektion keine lebenslange Immunität ausgebildet wird und z. B. eine erneute *T. gondii*-Oozystenausscheidung in Katzen durch eine experimentelle Superinfektion mit *T. gondii* oder nach Sekundärinfektionen mit anderen Kokzidien wie *Cystoisospora felis* ausgelöst werden konnte (CHESSUM 1972, DUBEY 1976, DUBEY 1995).

2.1.3 Vorkommen und klonale Linien

Die große Mehrheit (ca. 95 %) der *T. gondii*-Stämme lassen sich drei klonalen Linien, bekannt als Typ I, II und III, zuordnen (HOWE und SIBLEY 1995, SIBLEY et al. 2009), die in Nordamerika und Europa dominieren. In Südamerika treten neben den vorherrschenden Genotypen I und III auch häufiger atypische Stämme auf (PEYRON et al. 2006, SIBLEY et al. 2009). KHAN et al. (2011) beschrieben außerdem anhand der genetischen Analyse von atypischen *T. gondii*-Stämmen eine vierte klonale Linie, die in Wildtieren Nordamerikas gefunden wurde. Die klonalen Linien unterscheiden sich hinsichtlich diverser Aspekte, wie z. B. ihrer Wachstumsrate und ihrer Virulenz im Mausmodell. HOWE et al. (1996) und MORDUE et al. (2001) forschten dabei intensiv hinsichtlich Virulenzunterschiede im Mausmodell. Der Typ-I-Stamm zeichnet sich durch eine sehr hohe Virulenz in sämtlichen Mauslinien aus und führt zu letalen Infektionen (letale Dosis (LD100) ca. 1 Parasit). Im Gegensatz dazu weisen Stämme der Genotypen II und III eine deutlich geringere Virulenz (mittlere LD (LD50) $\geq 10^5$ Parasiten) auf (SIBLEY et al. 2009).

Ungefähr ein Drittel der Weltbevölkerung soll nach Schätzungen mit *T. gondii* infiziert sein, wobei die meisten Infektionen asymptomatisch verlaufen (HILL und DUBEY 2002, MONTOYA und LIESENFELD 2004, WEISS und DUBEY 2009). Innerhalb der Bevölkerung existieren allerdings in Abhängigkeit von Kontinent, Land, Region und Personengruppe deutliche Prävalenzunterschiede (TENTER et al. 2000, PAPPAS et al. 2009). Anhand einer repräsentativen serologischen Studie in Deutschland von WILKING et al. (2016) waren 55 % der Probanden seropositiv für *T. gondii*. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Seroprävalenz mit steigendem Lebensalter deutlich zunimmt (20 % bei 18 - 29-Jährigen, 77 % bei 70 - 79-Jährigen; WILKING et al. (2016)).

Aviäre Toxoplasmose

Infektionen mit *T. gondii* sind weltweit nicht nur im Menschen und vielen Säugetieren vorherrschend, sondern konnten auch in zahlreichen Wild-, Zoo- und Ziervögeln und im Nutzgeflügel nachgewiesen werden (TENTER et al. 2000, DUBEY 2002, DUBEY 2010, BANGOURA et al. 2011). Dabei kommt es bei den meisten Vogelarten in der Regel zu subklinischen oder asymptomatischen Krankheitsverläufen (DUBEY 2002), allerdings ist bei einigen Vogelspezies wie Kanarienvögel oder Tauben eine höhere Empfindlichkeit bekannt, mit zum Teil schwerwiegenden Krankheitsverläufen und auch Todesfällen (DUBEY 2002, BANGOURA et al. 2011).

Hühner gelten als empfänglich für *T. gondii*-Infektionen (DUBEY 2010). Hohe Seroprävalenzen von 30 - 50 % in Freilandhaltungen und bis zu 100 % in Hinterhofhaltungen konnten in diversen Studien nachgewiesen werden (DUBEY 2010). Dies unterstreicht die Annahme, dass Hühner vor allem in diesen Haltungsformen eine bedeutende Rolle in der Epidemiologie von *T. gondii* spielen und als guter Indikator für Bodenkontaminationen mit *T. gondii* angesehen werden können (DUBEY 2010). In Seroprävalenzstudien von Freiland- und Hinterhofhühnern in Deutschland und Österreich konnte ausschließlich der Genotyp II nachgewiesen werden (DUBEY et al. 2005, SCHARES et al. 2017).

2.1.4 Pathogenese und Bedeutung der *Toxoplasma gondii*-Infektion beim Huhn

Hühner werden als relativ resistent gegenüber einer klinischen Toxoplasmose angesehen und es gibt nur vereinzelte Berichte über eine klinische Manifestation der Infektion (BIANCIFIORI et al. 1986, KANETO et al. 1997, DUBEY 2010, BANGOURA et al. 2011). Eine bestätigte Toxoplasmose wurde erstmals von ERICHSEN und HARBOE (1953) in Legehühnern eines Bestandes aus Norwegen berichtet, in dem klinische Symptome wie Anorexie, Diarrhoe, Blindheit und plötzliche Todesfälle auftraten. In den folgenden Jahren erschienen weitere vereinzelte Berichte klinischer Toxoplasmosen aus diversen Ländern Europas, Kanada, Südamerika, USA und China (DUBEY 2010), in denen überwiegend Anorexie, Blindheit und Paralyse beschrieben wurden. Plötzliche Todesfälle, Torticollis und Stehunfähigkeit von mehreren Hühnern wurde in einer Hinterhofhaltung in Illinois beschrieben (DUBEY et al. 2007). Interessanterweise berichteten kürzlich VIELMO et al. (2019) von einem Ausbruch einer klinischen Toxoplasmose in Haushühnern und Perlhühnern auf einer kleinen Farm in Südbrasilien. Von den 47 Haushühnern des Bestandes zeigten 13 Tiere unspezifische klinische Symptome über einen Zeitraum von 24 - 72 Stunden wie Lethargie, Anorexie und Diarrhoe und 9 Hühner verstarben. Pathologische Untersuchungen zeigten eine schlechte Körperkondition von vereinzelt Tieren und histologisch konnten typische Anzeichen von entzündlichen Infiltrationen und Nekroseherde in Assoziation mit intraläsionalen *T. gondii*-Stadien in verschiedenen Geweben wie Gehirn, Lunge, Leber, Myokard und Milz nachgewiesen werden. Mit Hilfe von Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Untersuchungen wurde ein atypischer brasilianischer Genotyp (ToxoDB PCR-RFLP #280) identifiziert. In den meisten Studien mit experimentellen *T. gondii*-Infektionen (oral oder parenteral) blieben die Hühner asymptomatisch oder entwickelten lediglich milde klinische Symptome, wie z. B. einen Legeabfall (BIANCIFIORI et al. 1986, KANETO et al. 1997, DUBEY 2010). Als *T. gondii*-Prädilektionsstellen beim Huhn werden vorwiegend Herz, Gehirn und Muskelgewebe wie Bein- und Brustmuskulatur angesehen (DUBEY et al. 1993, SEDLÁK et al. 2000, DUBEY 2010), die Zystendichte wird als eher gering eingeordnet (SEDLÁK et al. 2000). Das Huhn stellt somit eine potenzielle Infektionsquelle für den Menschen dar, wenn z. B. Geflügelfleisch nicht ausreichend durcherhitzt wird und die Gefahr einer Übertragung durch Gewebssystemen von *T. gondii* gegeben ist. Das Risiko einer Erregerübertragung über rohe Eier ist gering, da *T. gondii* nur selten über Hühnereier ausgeschieden wird (DUBEY 2010). Allerdings gibt es vereinzelte Berichte, in denen *T. gondii* im Hühnerei nachgewiesen werden konnte (PANDE et al. 1961). Daher sollte der Mensch auf den Konsum roher Eier nicht nur hinsichtlich der Gefahr einer Salmonelleninfektion verzichten (DUBEY 2010).

2.1.4.1 Zielzellen von *Toxoplasma gondii* im Hühnerblut

T. gondii besitzt als obligat intrazellulärer Parasit nicht nur ein weites Wirtsspektrum, sondern kann sich auch potenziell in nahezu allen zellkernhaltigen Zellen vermehren (SIBLEY 2004, MUNOZ et al. 2011). *In vitro* konnte eine Präferenz von *T. gondii*-Tachyzoiten, sich in humanen Monozyten zu replizieren, festgestellt werden (CHANNON et al. 2000). Verschiedene Studien in Mäusen deuten auf eine Transportfunktion von Dendritischen Zellen (DC) und Monozyten/Makrophagen bei *T. gondii*-Infektion hin (COURRET et al. 2006, Lambert et al. 2006, 2009, LAMBERT und BARRAGAN 2010) und auch Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sowie T-Lymphozyten scheinen an der Verbreitung von *T. gondii* im Wirt beteiligt zu sein (PERSSON et al. 2007, 2009, LAMBERT und BARRAGAN 2010). Es ist

außerdem bereits bekannt, dass sich *T. gondii* im Huhn in Monozyten und DC vermehren kann und diese Zellen erfolgreich zur eigenen Verbreitung nutzt (MALKWITZ et al. 2013, QUÉRÉ et al. 2013). Es konnten keine substantiellen Unterschiede im Replikationsverlauf zwischen *T. gondii* Genotyp II (ME49) und III (NED) bei gleicher Infektionsdosis in Hühnermakrophagenkulturen beobachtet werden (MALKWITZ et al. 2018). Dahingegen konnte in Erythrozyten und Thrombozyten von Hühnern eine Parasitenreplikation *in vitro* nicht nachgewiesen werden (TANABE et al. 1980, MALKWITZ et al. 2017) und ein kontinuierlicher Abfall der Parasitenstadien in Primärkulturen von Hühnererythrozyten und -thrombozyten wurde registriert (MALKWITZ et al. 2017). Daher lässt sich schlussfolgern, dass Hühnererythrozyten und -thrombozyten keine Wirtszellen für *T. gondii* darstellen.

2.2 *Eimeria tenella*

2.2.1 Taxonomie

Eimeria (E.) tenella gehört wie *T. gondii* zum Stamm der Apicomplexa und der Unterklasse Coccidia. In der Ordnung Eimeriida zählt der Erreger zur Familie der Eimeriidae und der Gattung *Eimeria* (SCHNIEDER 2006). Die französischen Forscher RAILLIET und LUCET (1891a, b) entdeckten erstmalig Oozysten als Übertragungsstadium dieses Parasiten im Zäkum von Hühnern und führten erste experimentelle Infektionsversuche durch. Sie benannten ihn zunächst *Coccidium tenellum*, was später zu *E. tenella* geändert wurde (RAILLIET 1913). FANTHAM (1910) beschrieb erstmalig einen detaillierten Lebenszyklus und Schlüsselpunkte der Erregerbiologie von Eimerien in Moorschneehühnern (*Lagopus lagopus*), die er *Eimeria avium* benannte. TYZZER (1929) verfasste eine bedeutende Übersicht der frühen Literatur, die einen Meilenstein in der Geschichte der Kokzidiose-Forschung darstellt.

Bisher konnten beim Huhn neun unterschiedlich pathogene *Eimeria*-Arten (*E. tenella*, *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. acervulina*, *E. mitis*, *E. praecox*, *E. brunetti*, *E. mivati* und *E. hagani*) identifiziert werden (MCDUGALD und FITZ-COY 2013).

2.2.2 Morphologie und Entwicklungszyklus

Das Huhn stellt den einzigen natürlichen Wirt von *E. tenella* dar, was die hohe Wirtsspezifität dieses Erregers unterstreicht (JOHNSON 1923, MCDUGALD und FITZ-COY 2013). Der monoxene Lebenszyklus von *E. tenella* lässt sich in eine exogene und endogene Phase unterteilen.

Die exogene Phase findet in der Umwelt statt, wobei die mit dem Hühnerkot ausgeschiedenen unsporulierten Oozysten in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur und -feuchtigkeit innerhalb von 48 - 72 Stunden sporulieren und ihre Infektiosität erlangen (SHIRLEY et al. 2005, MCDUGALD und FITZ-COY 2013, BLAKE und TOMLEY 2014). Sporulierte Oozysten sind sehr widerstandsfähig und können als Dauerstadium lange Perioden von mehreren Monaten in der Umwelt überleben (FARR und WEHR 1949, JEURISSEN et al. 1996). Experimentell konnten unter verschiedenen Umweltbedingungen eine Überlebensdauer von bis zu 21,5 Monaten im Boden nachgewiesen werden (FARR und WEHR 1949). Die eiförmigen Oozysten sind ca. 19,5 - 26 µm lang und 16,5 - 22,8 µm breit (TYZZER 1929) und enthalten vier Sporozysten mit jeweils zwei Sporozoiten. Das Huhn infiziert sich über die orale Aufnahme von sporulierten Oozysten aus der Umgebung.

Die endogene Phase findet im Gastrointestinaltrakt des Huhnes statt, in der man eine asexuelle (Schizogonie) und sexuelle (Gametogonie) Vermehrungsphase unterscheidet, welche in die Ausscheidung von unsporulierten Oozysten mit dem Kot resultiert (SHIRLEY et al. 2005). Nach oraler Aufnahme der sporulierten Oozysten wird im Muskelmagen die Oozystenwand durch mechanische und enzymatische Einwirkung aufgebrochen und die Sporozysten mit Sporozoiten werden freigesetzt. Die Sporozoiten invadieren nun Epithelzellen der Darmzotten und werden bei *E. tenella* innerhalb von intraepithelialen Lymphozyten zu den Darmkrypten transportiert (FERNANDO et al. 1987, SHIRLEY et al. 2005). Dabei soll es sich vermutlich um Cluster of Differentiation (CD)8⁺-T-Zellen oder Makrophagen handeln (TROUT und LILLEHOJ 1993, 1995). Innerhalb der Epithelzellen der Darmkrypten beginnt nun die Schizogonie (auch Merogonie genannt), die in drei Durchgängen abläuft (CHAPMAN und SHIRLEY 2003, MCDOUGALD und FITZ-COY 2013). Bei der Ruptur der zweiten Generation der Schizonten mit nachfolgender Freisetzung der Merozoiten entstehen die schwerwiegendsten Gewebsschäden und die damit verbundenen typischen Symptome der Kokzidiose (MCDOUGALD und FITZ-COY 2013). In der anschließenden sexuellen Vermehrungsphase differenzieren sich die entstandenen Merozoiten zu Gameten. Es bilden sich weibliche Makrogameten und männliche, motile Mikrogameten, durch deren Vereinigung Zygoten entstehen, die zu Oozysten heranreifen (MCDOUGALD und FITZ-COY 2013, BLAKE und TOMLEY 2014). Die Oozysten verlassen das Epithel, gelangen in das Darmlumen und werden über den Kot ausgeschieden. Die Präpatenz beträgt ca. 5,5 Tage (CHAPMAN und SHIRLEY 2003, MCDOUGALD und FITZ-COY 2013).

Es ist bekannt, dass alle endogenen *E. tenella*-Entwicklungsstadien immunogen sind, allerdings spielen vor allem die frühen Stadien der endogenen Phase eine wichtige Rolle in der protektiven Immunitätsausbildung (MCDONALD et al. 1986, SHIRLEY et al. 2005, BLAKE und TOMLEY 2014).

2.2.3 Vorkommen und Bedeutung

E. tenella ist ein wichtiger Vertreter der bisher mehr als 1000 beschriebenen *Eimeria*-Spezies (BLAKE 2015) und gilt als weltweit verbreiteter Darmparasit der Hühner (MCDOUGALD 1998). Prävalenzstudien aus verschiedenen geographischen Regionen der Erde unterstreichen das ubiquitäre Vorkommen in Hühnerhaltungen (MCDOUGALD und FITZ-COY 2013, FATOBA und ADELEKE 2018). *E. tenella* gehört mit *E. necatrix* zu den pathogensten Eimerien der Hühner (MCDOUGALD und FITZ-COY 2013).

E. tenella zählt zu den Hauptverursachern der Kokzidiose in Hühnern, die als eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten in der Geflügelproduktion weltweit angesehen wird (MCDOUGALD und FITZ-COY 2013). Trotz vieler Fortschritte im Bereich der Chemotherapie, Vakzineentwicklung, Ernährung und Managementoptimierung verursacht die Kokzidiose der Hühner global jährliche Kosten von geschätzt mehr als drei Milliarden US-Dollar (WILLIAMS 1999, DALLOUL und LILLEHOJ 2006, BLAKE und TOMLEY 2014). Diese fließen sowohl als Investitionen in die Prophylaxe und Behandlung, sind aber auch den resultierenden teils hohen Produktionsverlusten in der Broilerindustrie geschuldet (BLAKE und TOMLEY 2014). Das zunehmende Auftreten von Resistenzen gegenüber Antikokzidien, hohe Erregerprävalenzen und eine ausgeprägte Persistenz in der Umwelt führen trotz üblicher Kokzidiosekontrolle immer wieder zu Krankheitsausbrüchen und subklinischen Infektionen, die einen signifikanten Einfluss auf die Produktivität und Lebensmittelsicherheit haben (PEEK und LANDMAN

2011, BLAKE und TOMLEY 2014). Demzufolge sind die ständige Weiterentwicklung und Verbesserung der effizienten Kontrolle der Kokzidiose unabdingbar, um der Geflügelindustrie als einem der am schnellsten wachsenden Landwirtschaftssektoren, der maßgeblich an der Ernährung des stetig wachsenden Weltbevölkerung beteiligt ist, gerecht zu werden (BLAKE und TOMLEY 2014, FATOBA und ADELEKE 2018).

2.2.4 Pathogenese der *Eimeria tenella*-Infektion beim Huhn

E. tenella kann generell Hühner aller Altersklassen und Rassen befallen, wobei es normalerweise im Alter von drei bis sechs Lebenswochen zu Krankheitsausbrüchen kommt (MCDUGALD und FITZ-COY 2013). Bereits milde Infektionen führen zur Ausbildung einer stabilen Immunität, die erneute Infektionen limitiert (JOHNSON 1923, MCDUGALD und FITZ-COY 2013). Es handelt sich um eine selbst-limitierende Erkrankung, deren Schweregrad direkt von der Anzahl der aufgenommenen sporulierten Oozysten abhängig ist (JOHNSON 1923, CHAPMAN 2014).

Als Besiedler des Zäkums führt *E. tenella* zu teils schwerwiegenden Krankheitsverläufen mit hoher Morbidität und Mortalität, hämorrhagischem Durchfall, Zerstörung der Darmzotten, einer reduzierten Futteraufnahme und geringeren Gewichtszunahmen bis hin zu Gewichtsverlusten (WILLIAMS 1996, MCDUGALD und FITZ-COY 2013, CHAPMAN 2014, BLAKE 2015). Schizonten der 2. Generation stellen aufgrund ihrer Entwicklung in der Lamina propria mucosae das pathogenste Stadium des Parasiten dar. Im Zuge ihrer Heranreifung und Freisetzung werden die Mukosa und angrenzende Blutgefäße rupturiert (MCDUGALD und FITZ-COY 2013). Die Mortalität erreicht sechs bis sieben Tage nach Infektion ihren Höhepunkt. Die anschließende Depression der Gewichtszunahme wird zwar teilweise wieder aufgeholt, aber im Allgemeinen bleibt das Wachstum immer hinter dem von uninfizierten Tieren zurück (DALLOUL und LILLEHOJ 2006, MCDUGALD und FITZ-COY 2013).

Mehrere Wissenschaftler entwickelten zwischen 1940 und 1970 unterschiedliche Ansätze für Scoringsysteme, um das Ausmaß der entstandenen Darmläsionen nach einer *E. tenella*-Infektion makroskopisch beurteilen zu können. JOHNSON und REID (1970) entwickelten basierend auf einer Übersicht der damals verfügbaren Literatur ein Beurteilungssystem von 0 (keine Läsionen) bis + 4 (schwerwiegendste Läsionen) für sechs verschiedene *Eimeria*-Spezies des Huhnes, einschließlich *E. tenella*. Dies sollte eine Standardisierung in der Bewertung der Pathogenität anhand ausgewählter Kriterien herbeiführen, und damit auch eine Hilfestellung in der Bewertung der Wirksamkeit von Antikokzidien bieten.

2.2.4.1 Koinfektionen mit *Eimeria tenella* beim Huhn

Mischinfektionen von *E. tenella* und anderen Eimerienspezies sind häufig unter Feldbedingungen anzutreffen (WILLIAMS et al. 1996, HAUG et al. 2008, GYÖRKE et al. 2013). WILLIAMS et al. (1996) beschrieben Eimerienkoinfektionen mit bis zu sechs verschiedenen Spezies in 95 % von 22 untersuchten kommerziellen Hühnerhaltungen in Frankreich. In einer Studie von HAUG et al. (2008) in Norwegen konnten in 54 % der *Eimeria*-positiv getesteten Broilerherden Koinfektionen von *E. tenella* und *E. acervulina* nachgewiesen werden. Desweiteren wurden unterschiedliche Kombinationen von Mischinfektionen von *E. tenella* und *E. acervulina* mit *E. maxima*, *E. praecox* und *E. necatrix* in 23 % der positiv-befundeten Herden detektiert. GYÖRKE et al. (2013) untersuchten Kotproben von 23 Broilerherden aus 12 Betrieben in Rumänien und konnten Mischinfektionen mit *E. tenella* in 61 % der Herden nachweisen. Dabei war die Prävalenz von Mischinfektionen signifikant höher in kleineren Betrieben verglichen zu mittleren und großen Betrieben. Die häufigste gefundene Koinfektion war *E. tenella* und *E. acervulina*. 17 % der untersuchten Herden wiesen Mischinfektionen mit *E. acervulina*, *E. tenella* und *E. maxima* auf.

Verschiedene Publikationen berichten über eine Assoziation zwischen Eimerieninfektionen und einer erhöhten intestinalen Besiedlung mit bakteriellen Pathogenen wie *Clostridium (Cl.) perfringens* und *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium und Enteritidis (BABA et al. 1982, QIN et al. 1996, COLLIER et al. 2008, BLAKE und TOMLEY 2014). Infektionen mit *E. tenella* oder anderen *Eimeria*-Spezies beim Huhn gelten unter anderem als prädisponierende Faktoren für die Entstehung der Nekrotischen Enteritis (WILLIAMS et al. 2003, WILLIAMS 2005), deren Hauptverursacher *Cl. perfringens* Typ A darstellt (BABA et al. 1997, WILLIAMS 2005). Koinfektionsstudien mit verschiedenen *Eimeria*-Spezies und *Cl. perfringens* demonstrierten massivere Darmläsionen in den mischinfizierten Hühnern als in monoinfizierten Gruppen (PARK et al. 2008, BANGOURA et al. 2014). MACDONALD et al. (2019) demonstrierten in mehreren In-vivo-Studien, dass Koinfektionen von *E. tenella* und *Campylobacter (C.) jejuni* zu einem dosisabhängigen signifikanten Anstieg der *C. jejuni*-Kolonisation im Zäkum führte.

In der Literatur sind auch vereinzelt Studien über Mischinfektionen von *E. tenella* und verschiedenen Virusinfektionen beim Huhn beschrieben. GIAMBRONE et al. (1977) untersuchten inwieweit eine vorangegangene Exposition mit dem Erreger der Infektiösen Bursitis (IBDV) die Empfänglichkeit von Küken für *E. tenella* beeinflusste. Die Autoren detektierten eine signifikant höhere Mortalität, schwerere Darmläsionen und ein früheres Auftreten von blutigem Durchfall in koinfizierten Küken. Eine erhöhte Mortalität und massivere Darmläsionen wurden bei Küken auch während Mischinfektionen mit *E. tenella* und dem Retikuloendotheliose-Virus beobachtet (MOTHA und EGERTON 1984). Desweiteren zeigte eine Studie von CUI et al. (2016) in Küken, die mit *E. tenella* und dem aviären Leukosevirus (Subtyp J) infiziert wurden, eine deutlich erhöhte Mortalität, geringere Gewichtszunahmen, signifikant schwerere Darmläsionen im Zäkum und eine deutlich erhöhte *E. tenella*-Oozystenausscheidung im Vergleich zu monoinfizierten Tieren. Es wird vermutet, dass das aviäre Leukosevirus die *E. tenella*-Pathologie forciert und damit eine Synergie zwischen beiden Erregern vorliegt.

2.3 Immunsystem des Huhnes

Forschungsschwerpunkt für das Immunsystem der Vögel stellt aufgrund seiner weltweit herausragenden ökonomischen Bedeutung das domestizierte Haushuhn (*Gallus gallus domesticus*) dar. Dank der vollständigen Sequenzierung des Hühnergenoms im Jahre 2004 (International Chicken Genome Sequencing Consortium 2004) konnte ein deutlich besseres und detailreicheres Verständnis der beteiligten Gene und der grundlegenden Biologie des aviären Immunsystems erreicht werden.

Grundsätzlich lässt sich sagen, dass das Immunsystem der Vögel im Aufbau mit dem der Säugetiere vergleichbar ist und viele Gemeinsamkeiten bestehen. Beide besitzen eine angeborene und adaptive Immunantwort, welche sich wiederum aus einer zellvermittelten und humoralen Immunantwort zusammensetzen. Bei einer genaueren Betrachtung der beteiligten Organe, Zellen und Moleküle eröffnen sich dennoch in diversen Aspekten grundlegende Unterschiede zum Immunsystem der Säuger.

Nachfolgend soll ein Überblick über die Struktur und Besonderheiten des Immunsystems des Huhnes gegeben werden, mit Fokus auf die angeborene und erworbene Immunität.

2.3.1 Struktur und Besonderheiten

2.3.1.1 Zelluläre Bestandteile

Antigenpräsentierende Zellen (APC)

Antigenpräsentierende Zellen ermöglichen die Erkennung von Erregern oder veränderten Körperzellen und induzieren die Proliferation und Differenzierung von naiven T-Lymphozyten zu immunkompetenten T-Lymphozyten zur Initiierung einer adaptiven Immunantwort. Obwohl nahezu alle Zellen des Körpers zur Präsentation von Antigenen auf ihrer Zelloberfläche fähig sind, werden unter der Bezeichnung APC meist nur die sogenannten „professionellen“ APC wie Monozyten, Makrophagen, DC und B-Lymphozyten zusammengefasst.

Makrophagen

Makrophagen sind mononukleäre Leukozyten, die ausgeprägt phagozytotisch aktiv sind und in nahezu allen Geweben im Körper anzutreffen sind. Sie gehören zu den APC und spielen daher eine bedeutende Rolle in der angeborenen als auch adaptiven Immunantwort, in der Gewebshomöostase und Entzündungsreaktionen (GORDON 2003). Sie produzieren diverse Chemokine und Zytokine und phagozytieren apoptotische und nekrotische Zellen sowie Pathogene.

Der Begriff „Makrophage“ wurde erstmals 1884 von Ilya Metchnikoff definiert. Schon hier beschrieb er Leukozyten, die in der Lage sind, Fremdstoffen und Mikroorganismen zu verdauen und zu zerstören (KARNOVSKY 1981).

Die Entwicklung zu Gewebsmakrophagen erfolgt über die Rekrutierung von zirkulierenden Monozyten aus dem Blut. Dies geschieht unter Einwirkung von diversen chemotaktischen Signalen. Die beteiligten Moleküle und Signalwege sind beim Vogel noch wenig definiert, man geht allerdings davon aus, dass

der Mechanismus im Wesentlichen mit dem der Säugetiere vergleichbar ist (KASPERS und KAISER 2014).

Eine bedeutende mikrobizide Eigenschaft von Makrophagen ist die Fähigkeit zur Produktion von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffintermediaten. Die Produktion von Stickoxiden durch Hühnermakrophagen wurde erstmals von SUNG et al. (1991) bestätigt. Der Nachweis der induzierbaren Stickoxidsynthase (iNOS) ist mittlerweile eine gebräuchliche Methode, um die Aktivierung von Hühnermakrophagen zu ermitteln (KASPERS und KAISER 2014). Diverse Studien bestätigen die Produktion von diversen pro-inflammatorischen Zytokinen wie Interleukin (IL)-1 β (WEINING et al. 1998, GYORFY et al. 2003) oder IL-6 (SCHNEIDER et al. 2001, SMITH et al. 2005) sowie anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 in Hühnermakrophagen (ROTHWELL et al. 2004).

Dendritische Zellen (DC)

DC gehören ebenfalls zu den APC, reifen im Gewebe aus Monozyten und fungieren als wichtige Verlinkung zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort. Sie bilden lange Zellfortsätze mit zytoplasmatischen Granula. Ähnlich wie bei Säugern werden auch beim Huhn verschiedene Subtypen von DC unterschieden. Sekretorische DC der Bursa Fabricii (BSDC) wurden erstmalig von OLÁH und GLICK (1978b) beschrieben und spielen durch Präsentation von Immunkomplexen an ihrer Zelloberfläche eine wichtige Rolle in der Reifung der B-Zellen nach dem Schlupf der Küken (GLICK 1991). DC des Thymus besitzen eine wichtige Funktion bei der Differenzierung von T-Vorläuferzellen über positive und negative Selektion (NAGY et al. 2016). Interdigitierende DC finden sich in den periarteriolen lymphatischen Scheiden (PALS) der Milz und stimulieren naive T-Zellen (NAGY et al. 2016). Follikuläre DC konnten beim Huhn in den Keimzentren der Milz, Ösophagus-, Pylorus- und Zäkaltonsillen sowie in der Harder'schen Drüse nachgewiesen werden (DEL CACHO et al. 1993, GALLEGRO et al. 1993, OLÁH und GLICK 1995, NAGY et al. 2005, NAGY und OLÁH 2007). Die DC im Plattenepithel der Haut werden als Langerhans-Zellen bezeichnet.

WU et al. (2010) beschrieben erstmalig die In-vitro-Generierung von DC aus Knochenmarkvorläuferzellen des Huhnes. Die Fähigkeit von DC, eine protektive Immunantwort gegenüber einer Infektion mit verschiedenen Eimerien im Huhn zu generieren, konnten von DEL CACHO et al. (2012) belegt werden. Interessanterweise können DC auch als Replikationsort von intrazellulären Parasiten wie *T. gondii* dienen und zu deren Verbreitung beitragen (QUÉRÉ et al. 2013).

B-Lymphozyten

Die Bursa Fabricii des Huhnes stellt das Organ der primären B-Zell-Lymphopoese dar. Da B-Lymphozyten befähigt sind, protektive Antikörper zu bilden, repräsentieren sie einen wichtigen Zweig der humoralen Immunabwehr. Im Gegensatz zu den meisten Säugetieren, bei denen die Antikörpervielfalt durch Neuordnung von Immunglobulingenen sichergestellt wird, findet bei Vögeln zusätzlich eine somatische Genkonversion statt (MCCORMACK et al. 1991).

Die Entwicklung der B-Lymphozyten kann in drei Phasen unterteilt werden: die prä-bursale, bursale und post-bursale Entwicklungsphase. B-Vorläuferzellen wandern zwischen dem 8. und 14. Embryonaltag über das Blut in die Bursa Fabricii ein (LE DOUARIN et al. 1975, HOUSSAINT et al. 1976).

Zunächst erfolgt eine Migration in das Mesenchym und anschließende Weiterentwicklung in den Bursafollikeln. Naive B-Lymphozyten gelangen dann nach dem Schlupf aus der Bursa in die Peripherie.

Man unterscheidet zwischen drei verschiedenen langlebigen B-Zellpopulationen (PARAMITHIOTIS und RATCLIFFE 1993, 1996) in der Peripherie, die auf unterschiedliche Wege der B-Zellreifung in der Bursa hinweisen. Funktionale Unterschiede zwischen diesen Populationen wurden allerdings bisher nicht genauer untersucht.

Die Aktivierung von B-Lymphozyten erfolgt im Rahmen der Antigenaufnahme und -präsentation an der Zelloberfläche über den B-Zellrezeptor und der direkten Interaktion mit CD4⁺-T-Helferzellen. Der B-Lymphozyt entwickelt sich zur Plasmazelle, die große Mengen von Antikörpern produzieren kann.

T-Lymphozyten

T-Lymphozyten reifen im Thymus heran und zählen zu den wichtigsten Zellen der zellulären Abwehr. Sie sind mit einem heterodimerischen T-Zell-Rezeptor (TCR) ausgestattet, der für die Antigenerkennung zuständig ist. Der TCR ist dabei aus zwei Domänen verschiedener Immunglobulinsuperfamilien aufgebaut: Einer distalen variablen Region (V) und einer proximalen konstanten Domäne (C). Die Signalübertragung des TCR wird vermittelt über einen Molekülkomplex, der als CD3-Komplex bekannt ist und aus fünf verschiedenen Proteinen aufgebaut ist (CHEN et al. 1986).

Hühner haben, wie auch Säugetiere, sowohl $\alpha\beta$ - als auch $\gamma\delta$ -TCR (CHEN et al. 1991), welche die zwei Haupt-T-Zelllinien repräsentieren. Eine weitere Unterteilung wird anhand zusätzlicher Oberflächenmoleküle vorgenommen. Hierfür werden die T-Lymphozyten, die $\alpha\beta$ -TCR exprimieren, anhand des Vorhandenseins der zwei Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 weiter unterteilt in CD4⁺-T-Helferzellen, die Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility complex, MHC)-Klasse-II-Moleküle erkennen, und in die CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen, die MHC-Klasse-I-Moleküle erkennen. CD4⁺-T-Helferzellen können außerdem weiter unterteilt werden in T-Helferzellen Typ 1 (Th1) und Typ 2 (Th2), welche unterschiedliche Funktionen in der Bekämpfung von verschiedenen Erregertypen besitzen, welche im Abschnitt „Erworbene Immunität“ näher erläutert werden.

Es ist bekannt, dass Hühner einen deutlich höheren prozentualen Anteil an $\gamma\delta$ -T-Zellen besitzen im Vergleich zur Maus und dem Menschen. Diese können bis zu 50 % der peripheren T-Lymphozyten darstellen (SOWDER et al. 1988, KASAHARA et al. 1993). Die exakte Rolle der $\gamma\delta$ -T-Zellen ist nach wie vor nicht vollständig geklärt, allerdings wird aufgrund ihrer weiten Verbreitung im Gewebe von einer bedeutenden Überwachungsfunktion des Immunsystems ausgegangen. In Infektionsversuchen mit *Salmonella enterica* Typhimurium konnte ein starker Anstieg dieser Zellpopulation verzeichnet werden (BERNDT und METHNER 2001, BERNDT et al. 2006, PIEPER et al. 2011).

T-Lymphozyten können durch Stimulierung über Antigene oder Mitogene Zytokine wie Interferon- γ (IFN- γ) produzieren (PROWSE und PALLISTER 1989, LOWENTHAL et al. 1994) und spielen daher eine Schlüsselrolle in der zellulären Immunabwehr.

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)

NK-Zellen werden als CD8⁺-Lymphozyten ohne TCR und Immunglobuline (Ig) bezeichnet und besitzen viele Ähnlichkeiten mit zytotoxischen T-Lymphozyten. Sie wurden beim Huhn in hohen Mengen im intestinalen Epithel gefunden und nur zu sehr geringen Anteilen (< 1 %) im Blut, Milz und Zäkum (GÖBEL et al. 2001). Es ist allerdings denkbar, dass ihr Anteil in der Peripherie deutlich höher ist, aber aufgrund fehlender oder ungeeigneter Marker nicht mit geeigneter Sensitivität detektiert werden kann (ROGERS et al. 2008).

Ihre Entwicklung ist im Gegensatz zu B- und T-Lymphozyten unabhängig von Thymus und Bursa Fabricii (BUCY et al. 1989). Verschiedene Infektionserreger wie z. B. *Mycoplasma gallisepticum* (GAUNSON et al. 2006) oder dass die Marek'sche Krankheit verursachende Hühner-Herpesvirus 2 (GARCIA-CAMACHO et al. 2003) induzieren eine erhöhte Anzahl und Aktivität von NK-Zellen. Andere Studien berichten von einer herabgesetzten NK-Zellen-Aktivität in intraepithelialen Lymphozytenpopulationen bei IBDV (KUMAR et al. 1998). Bisher gibt es allerdings noch keine sicheren Beweise, dass den NK-Zellen eine essentielle Bedeutung in der Immunantwort verschiedener infektiöser Erkrankungen zukommt (ROGERS et al. 2008).

Heterophile Granulozyten

Heterophile Granulozyten, auch als Heterophile bezeichnet, gehören zu den ersten Zellen der zellulären Abwehr gegenüber Pathogenen und stellen das Äquivalent zu den Neutrophilen Granulozyten der Säugetiere dar. Sie sind phagozytotisch aktiv, aber aufgrund fehlender Myeloperoxidase nur eingeschränkt zu einem oxidativen Burst fähig (HARMON 1998). Heterophile können durch verschiedene entzündliche Stimuli wie Lipopolysaccharide (LPS) oder Pathogene aktiviert und in ihrer Anzahl massiv erhöht werden, was eine Produktion diverser pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 und IL-8 zur Folge hat (KOGUT et al. 2005).

2.3.1.2 Humorale Bestandteile

2.3.1.2.1 Immunglobuline

Hühner bilden drei verschiedene Ig-Isotypen: IgM, IgA und IgY (SHARMA 1999). Das IgM der Hühner ist strukturell und funktionell sehr ähnlich zum Säuger-IgM. Es wird als erster antigenspezifischer Antikörper nach Antigenkontakt detektiert. Das Pendant zum IgG der Säugetiere wird bei den Hühnern durch IgY repräsentiert und stellt den dominierenden Isotyp im Serum da. Es wird nach IgM als Bestandteil der primären Antikörperantwort produziert und stellt gleichzeitig den Hauptisotyp in der Sekundärantwort dar. Das IgA der Vögel stellt wie bei den Säugern den dominierenden Ig-Isotyp in Körpersekreten dar. In der Literatur sind beim Huhn keine Äquivalente zum IgD und IgE der Säugetiere beschrieben.

In verschiedenen Immunisierungsstudien (VAN DER ZIJPP et al. 1982, KREUKNIET et al. 1992) in Hühnern, welche mit roten Blutzellen vom Schaf inokuliert wurden, konnte gezeigt werden, dass die Primärantwort fünf bis sieben Tage nach Infektion einen Peak erreicht und hauptsächlich IgM-Antikörper detektiert werden. In der Sekundärantwort wurden überwiegend Antikörper vom IgY-Isotyp nachgewiesen.

2.3.1.2.2 Defensine

Defensine stellen kleine, antimikrobielle Peptide dar, die in Pflanzen, Insekten, Säugetieren und Vögeln vorkommen (KAISER 2010). Ihre Hauptfunktion ist die Bindung und Penetration von Membranen mikrobieller Zellen, was zum unmittelbaren Zelltod führt. Desweiteren können sie chemotaktisch Effektorzellen der angeborenen Immunantwort anlocken, die bei der Zellzerstörung unterstützen (SORURI et al. 2007). In Vögeln ist im Gegensatz zu den Säugetieren nur eine Klasse von Defensinen, die β -Defensin-Familie, bekannt (LYNN et al. 2007). Diese werden überwiegend in Epithelzellen und Leukozyten exprimiert, wie zum Beispiel in Granula von phagozytotisch aktiven Zellen wie Heterophile Granulozyten (HARMON 1998) für eine unmittelbare Freisetzung.

2.3.1.2.3 Zytokine

Zytokine sind essentielle Botenstoffmoleküle (Messengermoleküle), die Immunzellen sowohl in der angeborenen als auch adaptiven Immunantwort kontrollieren und steuern und eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Homöostase spielen (KAISER et al. 2005). Üblicherweise wird eine Unterteilung in verschiedene Subfamilien anhand ihrer Struktur, Funktion oder zugehörigen Rezeptoren vorgenommen. Es ist mittlerweile bekannt, dass die Zytokinfamilien der Hühner in einer geringeren Anzahl von Genen kodiert sind als diejenigen der Säugetiere (KAISER et al. 2005), welches dem Minimalismus im aviären MHC entspricht (KAUFMAN et al. 1999).

KAISER et al. (2005) konnten Gene von 23 Interleukinen, acht Typ-I-Interferonen, IFN- γ , einem Koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF), drei Transformierenden Wachstumsfaktoren (Transforming growth factors, TGF), 24 Chemokinen (XCL, 14 CCL, acht CXCL, CX3XL) und zehn Mitgliedern der Tumornekrosefaktor-Superfamilie (TNFSF) nachweisen. Seitdem sind weitere Zytokine beim Huhn beschrieben worden, wie z. B. G-CSF (GIBSON et al. 2009), M-CSF (GARCEAU et al. 2010) oder IL-34 (GARCEAU et al. 2010). Eine Übersicht ist in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1: Zytokine und deren Funktion beim Huhn (*Gallus gallus*)

Zytokine	Vertreter beim Huhn	Funktionen
Interferone		
Typ I	IFN- α , IFN- β , IFN- κ , IFN- ω , IFN- τ	Anti-viral (SEKELLICK et al. 1994)
Typ II	IFN- γ	Schlüssel-Zytokin in Th1-Immunantwort, Bekämpfung intrazellulärer Pathogene (DIGBY und LOWENTHAL 1995)
Typ III	IFN- λ	Anti-viral, Induktion Nitratproduktion (KARPALA et al. 2008)
Interleukine		
IL-1 Familie	IL-1 β , IL-1RN, IL-36RN, IL-18	Pro- (IL-1 β , IL-18) und anti-inflammatorisch (IL-1RN, IL-36RN) (WEINING et al. 1998, SCHNEIDER et al. 2000, GIBSON et al. 2012a,b)
IL-10 Familie	IL-10, IL-19, IL-22, IL-26	Anti-inflammatorisch, Herunterregulierung von IFN- γ -Effekten (ROTHWELL et al. 2004)
IL-12 Familie	IL-12, IL-23	Pro-inflammatorisch, Induktion Th1-Immunantwort (DEGEN et al. 2004)
IL-17 Familie	5	Pro-inflammatorisch (MIN und LILLEHOJ 2002)
T-Zellproliferative	IL-2, IL-15, IL-21	Wachstumsstimulierung von T-Zellen, Unterstützung NK-Zellen-Aktivität (LILLEHOJ et al. 2001, ROTHWELL et al. 2012)
TH2 Familie	IL-4, IL-5, IL-13	Bekämpfung extrazellulärer Pathogene (DEGEN et al. 2005)
Andere	IL-3, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-34	Pro-inflammatorisch (SCHNEIDER et al. 2001, MIN und LILLEHOJ 2004)
TGF	TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4	v.a. anti-inflammatorisch (LI et al. 2006)
TNFSF	11	Wesentliche Rolle in angeborener und erworbener Immunität, Entzündung, Apoptose, Zellproliferation (KAISER und STÄHELI 2014)
CSF	GM-CSF, G-CSF, M-CSF	Stimulierung der Entwicklung von Knochenmarkszellen, myelomonocytyischen Zellen und Makrophagen (AVERY et al. 2004, GIBSON et al. 2009, GARCEAU et al. 2010)
Chemokine		
XCL	1	Chemoattraktion von B-Lymphozyten in Milz (ROSSI et al. 1999)
CCL	14	Pro-inflammatorisch, Homöostase (KAISER und STÄHELI 2014)
CXCL	8	Pro-inflammatorisch, Homöostase (KAISER und STÄHELI 2014)
CX3CL	1	Unbekannt

Vereinfacht lässt sich ableiten, dass die Interleukine vor allem Kommunikationsvermittler zwischen verschiedenen Leukozyten sowie in Entzündungsreaktionen involviert sind, wohingegen die Interferone vorwiegend antivirale Effekte erzielen. TGF- β nimmt eine Schlüsselrolle in der Regulation von Entzündungsreaktionen ein und die TNF-Superfamilie zeigt eine Vielzahl an immunregulatorischen Funktionen (KAISER et al. 2005). Die primäre Funktion von Chemokinen besteht in der Regulierung der Leukozytenmigration (MOSER et al. 2004). Weitere Beispiele für spezifische Funktionen der verschiedenen Zytokine können Tabelle 1 entnommen werden.

2.3.1.1 Primäre lymphatische Organe

Die primären lymphatischen Organe Thymus und Bursa Fabricii entwickeln sich aus epithelialen Anlagen und werden von Stammzellen hämatopoetischen Ursprungs besiedelt, welche zu immunologisch kompetenten T- und B-Lymphozyten heranreifen. Diese ausgereiften T- und B-Lymphozyten treten wieder in die Blutzirkulation ein und wandern in sekundäre lymphatische Gewebe ein.

2.3.1.1.1 Thymus

Der Thymus des Huhnes liegt im Halsbereich parallel zum Vagusnerv und der inneren Jugularvene und erstreckt sich insgesamt vom dritten Zervikalwirbelkörper bis oberen Thorakalwirbelkörper (KENDALL 1980). Seine maximale Größe erreicht er im Alter von ca. drei bis vier Monaten und bildet sich anschließend zurück (CIRIACO et al. 2003). Der gelappte Thymus besteht aus dem zentral gelegenen Thymusmark und der peripheren Thymusrinde. Die subkapsuläre Zone der Thymusrinde stellt die Hauptproliferationszone für T-Lymphozyten dar. Im Zuge der T-Zell-Reifung wandern die Zellen zur Grenze zwischen Rinde und Mark. Sie werden dort von Makrophagen und DC des Thymus selektiert, bevor sie über das Mark in die Blutzirkulation eingeschleust werden (OLÁH et al. 1991, GUILLEMOT et al. 1984).

2.3.1.1.2 Bursa Fabricii

Die Bursa Fabricii stellt ein kastaniengroßes Divertikel der Kloake dar und wurde erstmalig von Hieronymus Fabricius of Aquapendente beschrieben, Professor der Chirurgie an der Universität von Padua, Italien (1595-1613). Fabricius vermutete, dass es sich aufgrund der anatomischen Lage um eine Art Behälter zur Speicherung des Samens handeln müsse (ADELMANN 1942). Die Rolle der Bursa Fabricii blieb allerdings auch in den folgenden 350 Jahren ein Rätsel. Der Durchbruch gelang schließlich einem jungen Forscher namens Bruce Glick der Ohio State Universität, der durch Zufall herausfand, dass nach chirurgischer Entfernung der Bursa Fabricii bei jungen Hühnern keine Antikörperbildung nach Injektion von *Salmonella* spp. O Antigen erfolgte (GLICK 1987). Diese Beobachtungen konnten in weiteren Experimenten bestätigt werden (GLICK et al. 1956).

Die Bursa Fabricii erreicht ihre maximale Größe mit ca. acht bis zehn Lebenswochen und bildet sich anschließend ähnlich dem Thymus bis zum etwa sechsten bis siebten Lebensmonat zurück (CIRIACO et al. 2003). Sie besteht aus mehreren Längsfalten, welche zahlreiche Follikel enthalten und aus einem Rinden- und Markbereich aufgebaut sind. Das oberflächliche Epithel jeder Falte setzt sich aus Follikel-assoziierten Epithel (FAE) und interfollikulären Epithel (IFE) zusammen (BOCKMAN und COOPER 1973).

Das IFE produziert eine Mucin-ähnliche Substanz, die ins Lumen der Bursa freigesetzt wird und die Oberfläche der Längsfalten befeuchtet. Das FAE stellt dahingegen eine direkte Verbindung zwischen dem Bursalumenum und dem Follikelmark dar und ist in der Lage, z. B. Antigene vom Lumen aufzunehmen (BOCKMAN und COOPER 1973, OLÁH und GLICK 1978a) oder auch produzierte Stoffe der BSDC abzugeben (NAGY et al. 2001). BSDC wurden erstmals von OLÁH und GLICK (1978b) beschrieben und spielen wahrscheinlich eine Rolle für die Kontrolle der Interaktion zwischen Antigenen und B-Zellen.

Ca. 98 % der Lymphozyten in der Bursa stellen B-Lymphozyten dar, welche in Mark und Rinde heranreifen. Makrophagen sowie vereinzelte T-Lymphozyten sind ebenfalls im Rindenbereich der Bursa anzutreffen.

2.3.1.2 Sekundäre lymphatische Organe

Aus mesenchymalen Anlagen entstehen die sekundären lymphatischen Gewebe, die ausgereifte T- und B-Lymphozyten beherbergen. Zu den sekundär lymphatischen Geweben beim Huhn zählen die Milz und zahlreiche verschiedene schleimhautassoziierte Gewebe wie das darmassoziierte lymphatische Gewebe (gut-associated lymphoid tissue, GALT) bestehend aus Ösophagus- und Pylorustonsillen, Zäkaltonsillen, Peyer'schen Platten und dem Meckel-Divertikel, dem augenassoziierten lymphatischen Gewebe (Harder'sche Drüse) sowie weiteren bronchus-, nasal-, haut- und reproduktionsassoziierten lymphatischen Geweben. Im Zusammenhang mit dem Fokus meiner eigenen Studien werde ich mich in dieser Literaturübersicht auf die Milz und das GALT beschränken.

2.3.1.2.1 Milz

Die Milz als größtes lymphatisches Organ spielt bei Vögeln vermutlich eine noch bedeutendere Rolle für das Immunsystem als bei Säugetieren, da Lymphgefäße und Lymphknoten bei Vögeln nur sehr schwach ausgebildet sind. Darüber hinaus hat sie eine große Bedeutung für die embryonale Lymphopoese, bei der Ig-Gene in B-Vorläuferzellen neu angeordnet werden, bevor diese die Bursa Fabricii kolonisieren (MASTELLER und THOMPSON 1994). Im Gegensatz zum Säuger fungiert die Milz beim Vogel nicht als Erythrozytenreservoir für die schnelle Freisetzung in die Blutzirkulation (STURKIE 1943) und besitzt ein geschlossenes Zirkulationssystem (OLÁH und GLICK 1982).

Die rund bis oval geformte Milz liegt beim Huhn dorsal zur linken Seite des Drüsenmagens und ist wie bei den Säugern aus roter und weißer Pulpa aufgebaut. Die rote Pulpa enthält lymphoide und nicht-lymphoide Zellen, wie zahlreiche $CD8^+TCR\gamma\delta^+$ -T-Zellen, vereinzelte $CD4^+TCR\alpha\beta1-$ und $CD4^+TCR\alpha\beta2-$ -Zellen, Plasmazellen und Saure-Phosphatase-positive Makrophagen. Die weiße Pulpe setzt sich aus morphologisch unterschiedlichen Arealen zusammen, in denen vor allem Lymphozyten anzutreffen sind. PALS umschließen die zentralen Arterien und bestehen hauptsächlich aus $CD4^+TCR\alpha\beta1$ -T-Zellen. Ebenfalls sind hier Vorläuferzellen von follikulären dendritischen Zellen anzutreffen (OLÁH und GLICK 1982, IGYÁRTÓ et al. 2007). Analog zu der Marginalzone der Säuger existieren beim Vogel periellipsoide lymphatische Scheiden (PELS), welche die Kapillaren ummanteln und phagozytierende ellipsoide Zellen beherbergen, die für die Freigabe von Antigenen aus der Blutzirkulation verantwortlich sind (OLÁH und GLICK 1982).

Nach dem Vorhandensein verschiedener Immunzellen lässt sich rückschließen, dass die PALS vorzugsweise in der adaptiven Immunantwort involviert ist, wohingegen die PELS sowohl in der angeborenen als auch adaptiven Immunantwort beteiligt ist.

2.3.1.2.2 Ösophagus- und Pylorustonsillen

Die Ösophagus- und Pylorustonsillen sind lymphatische Strukturen, die an der Verbindungsstelle zwischen Ösophagus und Drüsenmagen bzw. zwischen Muskelmagen und Duodenum lokalisiert sind und detailliert von OLÁH et al. (2003) und NAGY et al. (2005) beschrieben wurden. Ca. sechs bis acht isolierte Ösophagustonsillen sind in der Lamina propria der distalen Enden der Ösophagusfalten angesiedelt und bestehen aus Krypten mit Lymphoepithel umgeben von dichtem lymphatischem Gewebe (OLÁH et al. 2003). Sie stellen die einzigen akkumulierten lymphatischen Strukturen des Gastrointestinaltraktes kranial des Drüsenmagens dar und nehmen daher eine bedeutende Funktion als „Tor“ für Umweltantigene ein, durch die das Immunsystem kontinuierlich stimuliert wird (OLÁH et al. 2003).

2.3.1.2.3 Zäkaltonsillen

Die Zäkaltonsillen sind jeweils am Zäkumkopf nahe der ileozäkalen Verbindung lokalisiert und bestehen aus einem spezialisierten Lymphoepithel, einer subepithelialen Zone, Keimzentren und interfollikulären Bereichen. Die subepitheliale Zone beherbergt hauptsächlich IgM⁺-B-Zellen, wenige CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen sowie phagozytische Zellen. Die interfollikulären Bereiche bestehen vorwiegend aus CD4⁺TCRαβ1-T-Zellen (OLÁH und GLICK 1987, BUCY et al. 1988). Das spezialisierte Lymphoepithel ist reich an M-Zellen, die vermutlich eine Rolle bei der Antigenaufnahme und dem aktiven Transport von luminalen Substanzen spielen (KITAGAWA et al. 2000).

2.3.1.2.4 Peyer'sche Platten

Die Peyer'schen Platten stellen lymphoide Aggregate entlang des Darmtraktes dar und sind mit geweiteten Zotten, spezialisiertem Lymphoepithel mit M-Zellen und follikulären Strukturen vergleichbar zu ihrem Äquivalent im Säuger (BEFUS et al. 1980, BURNS 1982). Die Anzahl steigt bis zur 16. Lebenswoche und nimmt anschließend im Rahmen der altersabhängigen Involution wieder ab, bis nur noch eine Platte nahe der ileozäkalen Verbindung übrig bleibt (BEFUS et al. 1980). Ihr Grundaufbau entspricht dem der Zäkaltonsillen (siehe oben). Die B-Zell-abhängige subepitheliale Zone ist reich an Makrophagen, wohingegen die T-Zell-abhängige interfollikuläre Zone zum überwiegenden Teil TCRαβ1-T-Zellen beherbergt, die hauptsächlich CD4⁺ sind (BUCY et al. 1988). In den Keimzentren und interfollikulären Bereichen sind zum größten Teil IgY⁺-, weniger IgA⁺- und IgM⁺-Plasmazellen zu finden.

2.3.1.2.5 Meckel-Divertikel

Das Meckel-Divertikel stellt ein Relikt des embryonalen Dottergangs dar und befindet sich als Anhang des Dünndarms im mittleren Jejunumbereich. Vier unterschiedliche Gewebsschichten bilden die Divertikelwand: eine Serosa gefolgt von einer breiten Bindegewebsschicht, eine Muskelschicht und eine luminale Bindegewebsschicht mit Blutgefäßen und Ganglien.

Lymphopoetisches Gewebe ist im Meckel-Divertikel beim Schlupf noch nicht vorhanden und entwickelt sich erst im Rahmen der Rückbildung des Dottersacks nach ca. zwei Wochen. Mononukleäre phagozytische Zellen sowie IgY- und IgA-Plasmazellen sind in allen Gewebsschichten anzutreffen. Zahlreiche Keimzentren entstehen ca. zwei bis drei Monate nach Schlupf (OLÁH und GLICK 1984) und später lässt sich zwischen B- und T-Zell-Bereichen unterscheiden.

Bisher ist allerdings die genaue Rolle des Meckel-Divertikels in der Immunantwort der Hühner ungeklärt.

2.3.2 Angeborene Immunität

Die angeborene Immunantwort ist auch bei Vögeln von großer Bedeutung für die initiale Reaktion auf Pathogene, also um Infektionen zu limitieren oder abzuwehren. Außerdem stellt sie die Grundlage der adaptiven Immunantwort dar und unterstützt die immunologische Gedächtnisbildung (KAISER 2010, JUUL-MADSEN et al. 2014).

Anfänglich wurde das angeborene Immunsystem lediglich als unspezifisches System mit immunologischer Barrierefunktion angesehen. Heute ist allerdings bekannt, dass es durchaus spezifische Immunantworten zu bestimmten Erregerklassen generieren kann und gezielte adaptive Immunantworten in Gang setzt (KAISER 2010, JUUL-MADSEN et al. 2014).

Intakte Schleimhäute, Fettsäuren der Haut, Peristaltik des Darms, Mukusekretion, Ziliarbewegungen und antimikrobielle Peptide sind Beispiele für hocheffektive Barrieren gegenüber Infektionen. Die Produktion von Akut-Phase-Proteinen in der Leber wird durch verschiedene Stimuli wie Verletzungen, Infektionen und Entzündungsprozesse ausgelöst. Akut-Phase-Proteine tragen zur Abwehr oder Adaption des Wirtes bei (KAISER 2010, JUUL-MADSEN et al. 2014). Defensine und Cathelicidin-ähnliche Proteine stellen bei Hühnern antimikrobielle Peptide dar. Sie weisen ein weites Spektrum antimikrobieller und immunmodulatorischer Aktivitäten auf (HANCOCK und SAHL 2006) und induzieren eine Porenbildung in Membranen verschiedener Pathogene, was zum Zelltod führen kann (KAGAN et al. 1990).

Das Serum-Komplementsystem stellt einen weiteren wichtigen Grundstein der angeborenen Immunabwehr dar und agiert über drei verschiedene Wege in einer Serie aus Kaskaden: dem klassischen Weg, dem Lektin-Weg und einem Alternativen Weg. Der Komplementfaktor C3 besitzt dabei eine Schlüsselrolle. Typische biologische Effekte der Komplementaktivierung sind Phagozytose, Entzündung, Verstärkung von B- und T-Zellantworten und direkte Lyse von Zielzellen (JUUL-MADSEN et al. 2014).

Das angeborene Immunsystem ist mit eigenen Rezeptoren (Pattern recognition receptors, PRR) ausgestattet und besitzt Effektorzellen wie z. B. NK-Zellen, Heterophile, DC und verschiedene Lymphozytenpopulationen wie die $\gamma\delta$ -T-Zellen, die bereits oben beschrieben sind. Dadurch ist es in der Lage, Antigene von Pathogenen zu erkennen und über APC zu präsentieren, verschiedene Zytokine zu produzieren und damit direkten Einfluss auf den Kurs der adaptiven Immunantwort zu nehmen (KAISER 2010).

PPR sind befähigt, Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP) wie zum Beispiel LPS zu erkennen und können in Klassen unterteilt werden: nach ihrer Funktion in signalgebende und endozytische PRR und nach ihrer Lokalisation in membrangebundene und zytoplasmatische PRR (KAISER 2010).

Die am besten charakterisierte Familie der PRR sind die Toll-like-Rezeptoren (TLR), die auf Zelloberflächen (Erkennung von PAMP) oder in endozytischen Vesikeln (Erkennung von Pathogennukleinsäuren) exprimiert sind. Eine Aktivierung der TLR führt über eine Induktion von verschiedenen Signalkaskaden zur Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, antimikrobiellen Peptiden und zur Zellreifung, was wiederum zur Aktivierung und Rekrutierung verschiedener Zellen der angeborenen und adaptiven Immunantwort führt (KAISER 2010). Beim Huhn sind bisher 10 verschiedene TLR beschrieben: TLR1LA und TLR1LB (IQBAL et al. 2005a, YILMAZ et al. 2005, TEMPERLEY et al. 2008), TLR2A und TLR2B (FUKUI et al. 2001, TEMPERLEY et al. 2008), TLR3 (IQBAL et al. 2005a), TLR4 (LEVEQUE et al. 2003), TLR5 (IQBAL et al. 2005b), TLR7 (PHILBIN et al. 2005) sowie die nach derzeitigem Kenntnisstand hühnerspezifischen TLR15 und TLR21 (ROACH et al. 2005, HIGGS et al. 2006).

2.3.3 Erworbene Immunität

Ergänzend zur angeborenen Immunität besitzt der aviäre Organismus über die erworbene (adaptive) Immunität die Fähigkeit, gezielt Pathogene zu eliminieren und eine antigenspezifische immunologische Gedächtnisbildung zu vollziehen. Dies kann sowohl im Rahmen des Erstkontaktes mit einem bestimmten Antigen geschehen oder als Reaktion auf eine Impfung (KAISER 2010).

Generell unterscheidet man zwei Untergruppen der adaptiven Immunität: die zellvermittelte Immunantwort, welche die Immunabwehr von Viren, intrazellulären Bakterien und Protozoen dominiert, sowie die humorale Immunantwort, welche ausschlaggebend zur Eliminierung von extrazellulären Bakterien, Protozoen oder Helminthen ist. Die zellvermittelte Immunantwort wird auch als inflammatorische Antwort bezeichnet und die humorale als allergische oder antihelminthische Antwort (KAISER 2010). Diese Unterscheidung kann in Verbindung gesetzt werden mit dem Vorhandensein des Th1/Th2-Musters, wonach Th1-Zellen als Effektorzellen der zellvermittelten Immunantwort fungieren und Th2-Zellen im Rahmen der humoralen Immunantwort agieren.

Eine Unterscheidung zwischen Th1- und Th2-Zellen wurde bereits von MOSMANN et al. (1986) im Mausmodell beschrieben. Für Säugetiere ist das Vorhandensein des Th1/Th2-Musters schon längere Zeit bekannt und klassifiziert (MOSMANN et al. 1986, MOSMANN und COFFMAN 1989, SCHIJNS und HORZINEK 1997). In verschiedenen Infektionsstudien bei Hühnern konnte später bestätigt werden, dass auch das Huhn zu einer typischen Th1/Th2-Zytokinantwort nach experimenteller Infektion mit z.

B. dem Newcastle Disease Virus, *Ascaridia galli* oder *Histomonas meleagridis* fähig ist (DEGEN et al. 2005, POWELL et al. 2009).

Die adaptive Immunantwort wird in Gang gesetzt durch die Präsentation von Antigenen durch APC, insbesondere DC, gegenüber T-Lymphozyten. Diese erkennen Antigene über MHC und es kommt zur Stimulation von CD4⁺- oder CD8⁺-T-Lymphozyten mit anschließender Aktivierung. Dabei führen CD8⁺-T-Lymphozyten zu zytotoxischen Effekten und direkter Tötung von infizierten Zellen. CD4⁺-T-Lymphozyten können in verschiedene Untergruppen eingeteilt werden und besitzen sowohl regulatorische als auch Effektorfunktionen. Regulatorische Funktionen stellen in der Regel eine Abschwächung von entzündlichen Th1-Antworten dar (KAISER 2010). Typische Beispiele für Effektorfunktionen sind Hilfestellungen für NK-Zellen, zytotoxische T-Lymphozyten oder Makrophagen, die vor allem durch Th1-Zellen realisiert werden. Diese produzieren typischerweise IFN- γ , angetrieben durch die Wirkung von IL-12 und IL-18, und tragen somit wesentlich zu inflammatorischen Prozessen bei. Th2-Zellen unterstützen mit der Produktion von IL-13, IL-4, IL-5 oder IL-19 die Antikörperproduktion von B-Lymphozyten (DEGEN et al. 2005). B-Lymphozyten nehmen über ihren Rezeptor Antigene auf und präsentieren davon Peptide im Zusammenhang mit MHC-Klasse-II an ihrer Oberfläche. Diese werden von Th2-Zellen erkannt, was zu einer Aktivierung der B-Lymphozyten mit anschließender Reifung zu antikörperproduzierenden Plasmazellen führt.

2.4 Immunologie der *Toxoplasma gondii*-Infektion

Die Anfänge der Forschung über die Immunantwort auf *T. gondii*-Infektionen gehen in die vierziger Jahre des 20. Jahrhunderts zurück, als die ersten Berichte über *T. gondii* als Abortursache und Auslöser von Erbkrankheiten in Menschen erschienen (WOLF et al. 1939). Da die Maus einen natürlichen Wirt für *T. gondii* darstellt, wurden Studien zur Untersuchung der angeborenen und adaptiven Immunantwort vorwiegend im Mausmodell durchgeführt. *T. gondii* wurde zum Modellorganismus für prinzipielle Untersuchungen zur zellvermittelten Immunität, um intrazelluläre Pathogene zu kontrollieren. Dazu gehören z. B. Studien zur Rolle von IFN- γ (REMYNGTON und MERIGAN 1968) oder IL-12 zur Aktivierung von NK-Zellen und nachfolgender Produktion von IFN- γ (GAZZINELLI et al. 1993c). Über die Immunantwort des Huhnes nach einer *T. gondii*-Infektion ist bisher allerdings wenig bekannt. Die nachfolgenden Ausführungen beziehen sich daher vornehmlich auf den Modellorganismus Maus.

Die erste Abwehrlinie gegenüber *T. gondii* bildet die Darmmukosa mit ihren Epithelzellen, die sowohl eine physikalische Barriere gegen eindringende Pathogene darstellt (SHAO et al. 2001) als auch Chemokine produziert, um Immunzellen anzulocken (JU et al. 2009). Die angeborene Immunantwort gilt auch bei *T. gondii*-Infektion als erste Abwehrreaktion des Wirtes gegenüber eindringende Pathogene. Hierfür ist die Erkennung des Parasiten über PAMP durch TLR des Wirtes unerlässlich, um anschließend die Aktivierung der Immunzellen und die Produktion von Antikörpern, Zytokinen und Chemokinen in Gang zu setzen. Die Induktion einer starken Th1-Antwort und damit einer pro-inflammatorischen Immunantwort ist eine essentielle Reaktion auf die *T. gondii*-Infektion, die über Immunzellen wie Granulozyten, Makrophagen, NK-Zellen, DC und Lymphozyten realisiert wird (MUNOZ et al. 2011). Granulozyten sind hierbei als phagozytotisch aktive Zellen früh nach Infektion am Ort des Geschehens. Aktivierte Makrophagen tragen über die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und Stickstoffintermediaten (GAZZINELLI et al. 1993a) ebenfalls wesentlich zur

Erregerabwehr bei. Inflammatorische Monozyten sind zentrale Effektorzellen für die Immunität der Darmschleimhaut gegen eine *T. gondii*-Infektion (DUNAY und SIBLEY 2010). Monozyten bzw. Makrophagen sind mit ihrer mikrobiziden Aktivität in der Lage, nach oraler Infektion mit *T. gondii* die Infektion durch direktes Töten des Erregers an der Darmschleimhaut infolge der Auflösung der parasitophoren Vakuole zu kontrollieren (DUNAY et al. 2008). CD8⁺-DC stellen den wichtigsten Zelltyp für die Induktion der IL-12-Produktion dar (REIS E SOUSA et al. 1997, SCANGA et al. 2002, YAROVINSKY et al. 2005) und spielen eine Rolle in der akuten Phase der *T. gondii*-Infektion (MASHAYEKHI et al. 2011). ALIBERTI et al. (2000) und SCANGA et al. (2002) beschrieben, dass die *T. gondii*-induzierte Produktion von IL-12 in DC von Mäusen ohne das Adaptermolekül MyD88 oder CCR5 signifikant reduziert war. Profilin-ähnliche Proteine konnten als Liganden des TLR11 identifiziert werden (YAROVINSKY et al. 2005), welche wiederum die Produktion von IL-12 stimulieren (PLATTNER et al. 2008). Neben TLR11 ist auch TLR12 in der Lage, Profilin-ähnliche Proteine zu erkennen und die IL-12-Produktion vor allem in plasmazytoiden DC zu stimulieren, welches eine entscheidende Rolle für die Resistenzbildung gegenüber *T. gondii* darstellen soll (KOBLOANSKY et al. 2013). Desweiteren zählen auch neutrophile Granulozyten, inflammatorische Monozyten und Makrophagen zu den Produzenten von IL-12, welches wiederum NK-Zellen und T-Lymphozyten stimuliert, IFN- γ zu bilden (GAZZINELLI et al. 1993c, 1994, HUNTER et al. 1994). IFN- γ gilt als Hauptmediator für Resistenz gegenüber *T. gondii*. Angeborene lymphoide Zellen (ILC) sind eine relativ neu erforschte Untergruppe vom Lymphozyten, die an der angeborenen Immunantwort beteiligt sind und in drei Gruppen klassifiziert werden (SPITS et al. 2013): Gruppe ILC1 besteht aus ILC1- und NK-Zellen, die Th1-Zytokine wie IFN- γ und TNF- α produzieren (SPITS et al. 2016), Gruppe ILC2 produziert Th2-Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13, und Gruppe ILC3, die IL-17A und IL-22 produzieren und den Transkriptionsfaktor ROR γ t exprimieren (KLOSE und ARTIS 2016). Die Gruppe ILC1 wurde im Dünndarm als Hauptproduzent von IFN- γ und TNF- α nach oraler Infektion von Mäusen mit *T. gondii* detektiert (KLOSE et al. 2014) und nimmt damit entscheidend Einfluss im Rahmen der angeborenen Immunantwort. Ihre Rolle in der spezifischen Antikörperproduktion ist allerdings noch nicht geklärt.

Im Zuge der adaptiven Immunantwort kommt es zur Bildung und Interaktion von zahlreichen Zytokinen (DECKERT-SCHLÜTER et al. 1995). IFN- γ , TNF- α und IL-12 gelten als wichtige Zytokine im Rahmen der *T. gondii*-induzierten Immunabwehr (SUZUKI et al. 1988, GAZZINELLI et al. 1993b). Die Gabe von IL-1 α oder IL-1 β mit TNF- α unterstützte die Abwehr von Mäusen gegen *T. gondii* *in vivo* (CHANG et al. 1990). Die IL-12-Produktion triggert das Wachstum von NK-Zellen, CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen und vermittelt somit sowohl Zytotoxizität als auch Stimulation der IFN- γ -Produktion (GAZZINELLI et al. 1993c, HUNTER et al. 1994). Die Gabe von anti-IL-12 an B- und T-lymphozytendepletierte SCID-Mäuse induzierte eine frühere Mortalität und spiegelt somit die Bedeutung von IL-12 in der Immunabwehr von *T. gondii* wider (HUNTER et al. 1994). SCHARTON-KERSTEN et al. (1998) stellten fest, dass die IFN- γ -Produktion von CD4⁺-T-Zellen in der akuten Phase der *T. gondii*-Infektion eine entscheidende Rolle spielt und Zytokin- γ -chain-defiziente Mäuse, die keine NK-Zellen und T-Lymphozyten besitzen, dennoch eine ausreichende Kontrolle der *T. gondii*-Infektion etablieren konnten. Eine erhöhte Letalität und schwere Pathologien im Zentralen Nervensystem wurden bei iNOS-defizienten Mäusen drei bis vier Wochen nach Infektion mit *T. gondii*, aber nicht in der akuten Phase der Infektion festgestellt (SCHARTON-KERSTEN et al. 1997). Dies lässt rückschließen, dass die protektive Wirkung von Stickoxiden nur lokal,

aber nicht systemisch gegeben ist. CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen sind essentielle Komponenten der Immunabwehr gegenüber *T. gondii* im Wirt, produzieren diverse pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-1 und IL-6 (SIBLEY et al. 1991, LANGERMANS et al. 1992) und gelten als Hauptproduzenten von IFN- γ (YAROVINSKY 2014). Ebenso können Neutrophile Granulozyten IFN- γ produzieren, das als wichtige primäre TLR-unabhängige IFN- γ -Quelle gilt, wobei hier die regulierenden Mechanismen noch nicht vollständig bekannt sind (STURGE et al. 2013). Die IFN- γ -Produktion durch NK-Zellen ist abhängig von der TLR11-Erkennung von *T. gondii*-Profilin über DC und wird über IL-12 reguliert (GAZZINELLI et al. 1993c, 1994, YAROVINSKY 2014).

T. gondii triggert außerdem gegenregulierende Immunmechanismen wie die Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen wie z. B. IL-10 und TGF- β (GAZZINELLI et al. 1992, 1996), was die Inhibition der IFN- γ -Produktion zur Folge hat (KHAN et al. 1995). Die Bedeutung dieser gegensteuernden Mechanismen zeigt sich unter anderem darin, dass IL-10-defiziente Mäuse in der akuten Phase der *T. gondii*-Infektion eine erhöhte Mortalität zeigten (GAZZINELLI et al. 1996). Die zellautonome Immunität basiert auf IFN-induzierbaren Guanosintriphosphatasen (GTPasen) wie Guanylat-Bindungsproteinen (GBP) und immunity-related GTPasen (IRG). Sie spielt eine wichtige Rolle sowohl in der Attackierung von bakterienhaltigen Vakuolen als auch in der Immunabwehr gegen *T. gondii* durch ihre Fähigkeit zur Zerstörung der PV durch GBP und IRG (MARTENS et al. 2005, HUNN et al. 2008, YAMAMOTO et al. 2012, SELLECK et al. 2013). Es ist lange bekannt, dass *T. gondii* die Antikörperbildung fördert und diese in der Lage sind, den Erreger direkt zu töten (SABIN und FELDMAN 1948). In-vitro-Studien zeigten, dass Antikörper *T. gondii* für die Phagozytose opsonieren und den klassischen Komplementweg aktivieren können (SCHREIBER und FELDMAN 1980, VERCAMMEN et al. 1999). *T. gondii*-spezifisches IgM kann die zelluläre Invasion und damit die systemische Verbreitung von *T. gondii*-Tachyzoiten limitieren (COUPER et al. 2005). Anzumerken ist hierbei, dass auf diese Weise lediglich extrazelluläre Stadien von *T. gondii* erreicht werden können, nicht aber intrazelluläre Stadien bzw. bereits existierende Zysten.

Aus der Literatur ist bekannt, dass sowohl die lokale als auch systemische Immunantwort nach *T. gondii*-Infektion im Menschen deutlich zwischen verschiedenen Individuen variieren kann und von der Genetik sowie des Immunstatus des Wirts abhängt (SUZUKI und REMINGTON 1993). Desweiteren ist die Ausprägung der Immunantwort in Tieren von diversen Faktoren wie dem Parasitenstamm, Infektionsdosis und -route, den Parasitenstadien und dem genetischen Hintergrund des Wirtes abhängig (MUNOZ et al. 2011). *T. gondii* gilt weltweit als erfolgreichster Parasit mit derzeit mehr als 10⁹ aktiven asymptomatischen Infektionen von Menschen, was seinen molekularen Strategien geschuldet ist, eine optimale Balance zwischen Aktivierung der Wirtsimmunität und gleichzeitiger Immunevasion zu kreieren (DENKERS et al. 2012).

T. gondii macht sich zahlreiche Strategien und Mechanismen zunutze, um der Immunabwehr des Wirtes auszuweichen und dessen Zellen zur eigenen Ausbreitung im Wirt zu nutzen (WEIDNER und BARRAGAN 2014, HARKER et al. 2015). Dabei gilt es, eine präzise Balance zwischen der effizienten Verbreitung im Wirt und der Aufrechterhaltung einer asymptomatischen lebenslangen Infektion zu ermöglichen (LAMBERT und BARRAGAN 2010). *T. gondii* ist in der Lage, zum einen die zelluläre Immunabwehr des Wirtes zu umgehen und gleichzeitig die zellvermittelte Zytotoxizität zum eigenen

Vorteil zu nutzen. So kann *T. gondii* über die Ligation von Todesrezeptoren oder Perforin-vermittelter Zytotoxizität aktiv aus infizierten DC austreten (PERSSON et al. 2007, 2009), um direkt benachbarte NK-Zellen zu befallen. Somit umgeht der Parasit die direkte Zerstörung der befallenen DC durch NK-Zellen. Außerdem können DC als Reservoir und „Trojanisches Pferd“ für *T. gondii* fungieren und mit einem gesteigerten Migrationsverhalten maßgeblich an der Verbreitung von *T. gondii* im Wirt beteiligt sein (LAMBERT et al. 2006, 2009, QUÉRÉ et al. 2013). Eine ähnliche Shuttlefunktion für *T. gondii* wurde für Monozyten (COURRET et al. 2006), NK-Zellen und T-Lymphozyten (PERSSON et al. 2007, 2009, CHTANOVA et al. 2009) beschrieben.

Es wird außerdem spekuliert, dass die von *T. gondii* induzierte starke Th1-Antwort dazu dient, eine hohe Mortalität von Zwischenwirten zu vermeiden und damit den Lebenszyklus von *T. gondii* weiterhin aufrecht zu erhalten (ALIBERTI et al. 2003). Ebenfalls kann die von *T. gondii* verursachte IL-12-Antwort über die Förderung der zellvermittelten Zytotoxizität als Vorteil für die Verbreitung des Erregers im Wirt angesehen werden (PERSSON et al. 2007, 2009). Ein Gleichgewicht dazu wird über die Antikörperproduktion via B-Lymphozyten und der Induktion anti-inflammatorischer Faktoren wie IL-10 oder TGF- β hergestellt, um die Pathologie der Infektion im Wirt zu limitieren (LAMBERT und BARRAGAN 2010).

2.5 Immunologie der *Eimeria tenella*-Infektion des Huhnes

Infektionen mit intrazellulären protozoären Parasiten der Gattung *Eimeria* stellen in der Geflügelindustrie eine der ökonomisch bedeutendsten Infektionen dar. Die kontinuierliche Weiterentwicklung von Prophylaxemaßnahmen und alternativen Strategien ist von essentieller Bedeutung. Ausführliche Kenntnisse über grundlegende immunologische Vorgänge infolge einer Eimerieninfektion sind dafür unabkömmlich.

Die Grundprinzipien der Immunität gegenüber *Eimeria* spp.-Infektionen im Geflügel wurden maßgeblich von ROSE und Kollegen erforscht. Hierzu zählt zum Beispiel die Erkenntnis, dass die Infektion mit einer Eimerienspezies nur einen sehr geringen Schutz vor Neuinfektion mit einer anderen Eimerienspezies vermittelt (ROSE und LONG 1962), also eine mangelnde Kreuzimmunität vorliegt. Die Eimerien des Huhnes sind hoch immunogen, sodass Erstinfektionen eine protektive Immunantwort auf nachfolgende Infektionen der gleichen Spezies auslösen können (LILLEHOJ und LILLEHOJ 2000, ALLEN und FETTERER 2002). Dabei ist allerdings bekannt, dass *E. maxima*, *E. brunetti* und *E. praecox* am meisten immunogen sind, während *E. tenella* und *E. necatrix* das Schlusslicht bilden (ROSE und LONG 1962, ROSE 1976, 1987). Das Wechselspiel zwischen dem Immunsystem des Wirtes und *Eimeria* ist komplex und wird durch zahlreiche Faktoren beeinflusst, wie z. B. die Genetik des Wirtes (LILLEHOJ und RUFF 1987, LILLEHOJ et al. 1989), die Eimerienspezies und die Infektionshistorie des Wirtes (ROSE und LONG 1962, JOYNER und NORTON 1976; SMITH et al. 2002). *Eimeria*-Infektionen beim Huhn führen zu einer Vielfalt an angeborenen und adaptiven Immunreaktionen wie z. B. Infiltration mit Heterophilen, NK-Zellen-Aktivierung, Antikörperproduktion, T-Zell-Aktivierung und Anstieg von zahlreichen Zytokinen, die in diversen Reviews zusammengefasst beschrieben sind (z. B. LILLEHOJ und LILLEHOJ 2000, SHIRLEY et al. 2005, DALLOUL und LILLEHOJ 2006, MIN et al. 2013).

Die angeborene Immunantwort gegenüber *Eimeria*-Infektionen im Huhn repräsentiert die initiale Abwehreinheit und wird aktiviert, wenn PAMP von entsprechenden PRR wie zum Beispiel TLR erkannt werden, die auf verschiedensten Zelltypen wie Heterophilen, Makrophagen oder DC ausgeprägt sind. ZHOU et al. (2013) demonstrierten, dass TLR4 und TLR15 von Heterophilen beim Huhn eine Rolle in der angeborenen Immunantwort gegenüber *E. tenella*-Infektionen spielen. Physikalische Barrieren, Phagozytose, Chemokine und die Aktivierung des Komplementsystems stellen typische unspezifische Abwehrfaktoren gegen Eimerien dar. DEL CACHO et al. (2011, 2012) berichteten, dass auch DC in der angeborenen Immunantwort gegenüber *Eimeria* involviert und in der Lage sind, eine protektive Immunität gegen *E. tenella*, *E. maxima* und *E. acervulina* zu induzieren. Hühner, die mit Antigen-beladenen Exosomen, isoliert aus DC, immunisiert wurden, zeigten nach Infektion mit *Eimeria*-Oozysten höhere Gewichtszunahmen, eine geringere Oozystenausscheidung, schwächere Darmläsionen und eine reduzierte Mortalität gegenüber den nicht-immunisierten infizierten Kontrollhühnern. Diese Ergebnisse lassen auf eine mögliche Eignung von Exosomen aus mit *Eimeria*-Antigen inkubierten DC als Feldvakzine schlussfolgern. Die Bedeutung von NK-Zellen bei *Eimeria*-Infektionen wurde von LILLEHOJ (1989) beschrieben, indem zunächst eine reduzierte NK-Zellen-Aktivität in Milz und Darm in der frühen Phase nach Erstinfektion detektiert wurde, die sich allerdings nach ca. einer Woche wieder normalisierte und bei erneuter Infektion mit *Eimeria* in einer signifikant erhöhten NK-Zellaktivität resultierte. Zusätzlich konnte von HONG et al. (2006a) ein von NK-Zellen produziertes antiparasitäres Peptid, welches dem NK-Zellen-Lysin der Säuger ähnelt, bei *Eimeria*-infizierten Hühnern festgestellt werden. Makrophagen sind weitere Immunzellen, welche eine wichtige Rolle in verschiedenen Phasen der Immunantwort gegenüber *Eimeria* spielen (LILLEHOJ et al. 2004).

Das adaptive Immunsystem setzt sich aus hoch spezialisierten Immunzellen wie B- und T-Lymphozyten zusammen, die mit ihren Rezeptoren spezifisch Antigene erkennen und im Zusammenspiel mit anderen Immunzellen über verschiedene Signalkaskaden Pathogene bekämpfen. Die zellvermittelte Immunität ist bei der Infektion mit Eimerien von zentraler Bedeutung und schließt die Aktivierung von T-Lymphozyten, NK-Zellen und Makrophagen ein. Die Rolle von T-Lymphozyten in der Limitierung von Erstinfektionen und der Immunitätsausbildung gegenüber Eimerieninfektionen ist hierbei besonders hervorzuheben (ROSE und LONG 1970, ROSE und HESKETH 1982, TROUT und LILLEHOJ 1996). Gleichzeitig konnte demonstriert werden, dass Hühner, die mit Cyclosporin A, einem T-Zell-Immunsuppressivum, behandelt wurden, keine effektive Immunität gegen eine Reinfektion mit *E. tenella* ausbilden konnten (LILLEHOJ 1987). Ähnliches zeigten Studien, in denen mit Dexamethason behandelte infizierte Hühner eine längere Patenz und eine höhere Oozystenausscheidung zeigten als unbehandelte Kontrolltiere (ROSE und LONG 1970). Dies unterstützt die Aussage, dass vor allem die zelluläre Immunantwort eine Schlüsselrolle einnimmt.

Sowohl CD4⁺-T-Helferzellen als auch CD8⁺-zytotoxische T-Zellen sind an der Immunantwort nach einer *Eimeria*-Infektion beteiligt (ROSE et al. 1992, ROTHWELL et al. 1995, TROUT und LILLEHOJ 1996). VERVELDE et al. (1996) berichteten von einer erhöhten Anzahl von CD8⁺-T-Zellen in intraepithelialen Lymphozyten des Darms nach Infektion mit *E. acervulina*. Außerdem wurden zwei Tage nach *E. tenella*-Infektion erhöhte Mengen an CD4⁺-T-Zellen im Zäkum und eine Infiltration der Lamina Propria mit zahlreichen CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen detektiert (VERVELDE et al. 1996). Hühner, die mit anti-CD4

Antikörpern behandelt wurden, schieden signifikant mehr Oozysten nach Erstinfektion mit *E. tenella*, allerdings nicht mit *E. acervulina*, aus, was auf unterschiedliche Abwehrmechanismen zwischen den verschiedenen Eimerienspezies hindeutet (TROUT und LILLEHOJ 1996). Im Gegensatz dazu führte eine Depletion von CD8⁺-T-Zellen zu einer geringen Oozystenproduktion durch *E. tenella*- und *E. acervulina*-infizierte Hühner (TROUT und LILLEHOJ 1996), welches die Aussage unterstützt, dass CD8⁺-T-Zellen am Transport der Sporozoiten beteiligt sind (TROUT und LILLEHOJ 1993). Im Huhn konnte ebenfalls eine Veränderung der Zusammensetzung der intraepithelialen Leukozyten des Darmes, z. B. ein Anstieg der $\gamma\delta^+$ -T-Zellen, nach *Eimeria*-Infektion beobachtet werden (LILLEHOJ 1994, BESSAY et al. 1996, HONG et al. 2006c). Die Rolle der B-Lymphozyten und Antikörperproduktion im Rahmen der adaptiven Immunantwort nach *Eimeria*-Infektion wurde anfänglich als eher vernachlässigbar eingeordnet (LILLEHOJ 1987). Andere Studien zeigen dahingegen, dass junge Hühner gegenüber einer Challenge-Infektion geschützt waren, wenn ihnen Antikörper von mit *E. maxima* hyperimmunisierten Hennen verabreicht wurden (WALLACH et al. 1992). Auch die passive Immunisierung von frisch geschlüpften Küken mit Dottersack IgY-Antikörpern von Hennen, die mit *E. acervulina*, *E. tenella* und *E. maxima* immunisiert wurden, führte zu einem effektiven Schutz gegenüber einer Challenge-Infektion mit den gleichen *Eimeria*-Spezies (LEE et al. 2009a, b). Einen protektiven Schutz des Kükens durch Übertragung von mütterlichen Antikörpern, vor allem IgY, über das Eidotter konnte experimentell bestätigt werden. Dabei handelt es sich allerdings nur um einen transienten Schutz über ca. drei bis vier Wochen nach Schlupf, wie z. B. bei *E. maxima*-Infektionen (ROSE 1972, SMITH et al. 1994).

Eine Balance der Th1/Th2-Zytokine als Immunantwort auf intrazelluläre Pathogene wie *Eimeria* ist von großer Bedeutung (CORNELISSEN et al. 2009, HARITOVA und STANILOVA 2012). Eine umfangreiche Genexpressionsanalyse von Zytokinen nach *E. acervulina*- und *E. tenella*-Infektion im Huhn wurde von HONG et al. (2006b) veröffentlicht. 28 Zytokine wurden in intestinalen Lymphozyten nach Erst- und Zweitinfektion mit beiden Pathogenen quantifiziert und die Ergebnisse spiegeln die Komplexität der Immunantwort gegenüber *Eimeria* wider. Th1- und Th2-messenger Ribonukleinsäure (mRNA)-Level (IFN- γ , IL-2, IL-10, IL-12, IL-15, IL-16, IL-18) waren nach Erstinfektion mit *E. acervulina* deutlich hochreguliert (14- bis 2471-fach), allerdings nach Erstinfektion mit *E. tenella* entweder unverändert (IL-15, IL-16, IL-18), erhöht (IFN- γ , IL-10, IL-12) oder erniedrigt (IL-2) (HONG et al. 2006b). Hohe Anstiege der IFN- γ -Expressionslevel konnten sieben Tage nach *E. tenella*-Infektion in Hühnern mittels quantitativer PCR (qPCR) detektiert werden (LAURENT et al. 2001). IFN- γ hemmt die intrazelluläre Entwicklung von *E. tenella in vitro*, ohne auf das Eindringen der Sporozoiten in die Wirtszelle Einfluss zu nehmen (LILLEHOJ und CHOI 1998). Darüber hinaus zeigten Hühner, die mit rekombinantem Hühner-IFN- γ behandelt wurden, eine deutliche reduzierte Oozystenausscheidung nach *E. acervulina*-Infektion und bessere Gewichtszunahmen (LILLEHOJ und CHOI 1998). Diese Erkenntnisse führten zum Vorschlag für den Einsatz von IFN- γ als Vakzinezusatz gegen *Eimeria* (LILLEHOJ et al. 2005). Erhöhte IL-2-Level in Milz und Darm konnten sowohl nach Erst- als auch Zweitinfektion mit *E. acervulina* detektiert werden (CHOI und LILLEHOJ 2000, LILLEHOJ et al. 2001). LYNAGH et al. (2000) beschrieben erhöhte IL-6-Werte bereits wenige Stunden nach *E. tenella*-Infektion und mutmaßten über eine mögliche Induktionsfunktion der protektiven Immunantwort gegenüber *Eimeria*. Eine biphasische TNF- α -Produktion konnte in Makrophagenkulturen, die aus mit *E. maxima*- oder *E. tenella*-infizierten Hühnern gewonnen wurden, nachgewiesen werden (BYRNES et al. 1993). ZHANG et al. (1995)

Literaturübersicht

berichteten von einer zeit- und dosisabhängigen Produktion eines TNF-ähnlichen Faktors I in einer aviären Makrophagenkultur, die mit Sporozoiten und Merozoiten von *E. tenella* inkubiert wurde. Auch die Beteiligung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-16 (MIN und LILLEHOJ 2004) und IL-17 (MIN und LILLEHOJ 2002) an der Immunantwort gegenüber *Eimeria* konnte im Huhn bestätigt werden.

Im Rahmen des Entzündungsgeschehens nach *Eimeria*-Infektion kann auch ein Anstieg von Akut-Phase-Proteinen im Blutplasma vermerkt werden. So sind z. B. erhöhte Werte für Ceruloplasmin, Fibrinogen oder dem C-reaktiven Protein in verschiedenen Studien beim Huhn nach Infektion mit z. B. *E. tenella* nachgewiesen wurden (CHAMANZA et al. 1999, GEORGIEVA et al. 2010).

3 Publikation 1: Experimental *Toxoplasma gondii* and *Eimeria tenella* co-infection in chickens

Lysanne Hiob, Martin Köthe, Gereon Schares, Tina Goroll, Arwid Dauschies, Berit Bangoura

Publiziert in: Parasitology Research 2017; 116(11):3189-3203.

verfügbar unter folgendem DOI: 10.1007/s00436-017-5636-2

15 Seiten, 5 Abbildungen, 6 Tabellen, 59 Literaturangaben, Anhang: electronic supplementary material

Tierversuch: TVV 59/13, Landesdirektion Sachsen, Dienststelle Leipzig, 11.03.2014

Eigenanteil der Arbeit:

- Studiendesign: Die Studienidee und der Tierversuchsantrag stammen von Berit Bangoura.
- Durchführung: Lysanne Hiob ist eigenverantwortlich für die Durchführung beider Tierversuche und der damit einhergehenden Laborarbeiten, ausgenommen der Tötung der Hühner, der Durchführung des Immunoblots (Gereon Schares), der Durchführung der magnetic capture (MC)-PCR (Martin Köthe) und der mikroskopischen Beurteilung der Darmschleimhautabstriche (Berit Bangoura).
- Analyse und Interpretation: Lysanne Hiob ist eigenverantwortlich für die Auswertung der Ergebnisse, ausgenommen der Resultate bezüglich *T. gondii*-spezifischer Antikörper (Gereon Schares), des direkten *T. gondii*-Nachweises mittels MC-PCR (Martin Köthe) sowie die statistische Auswertung der Zytokinmessungen (Berit Bangoura).
- Schreiben der Publikation: Lysanne Hiob ist eigenverantwortlich für das Schreiben der Publikation, ausgenommen der Material- und Methodikbeschreibung bezüglich des Nachweises *T. gondii*-spezifischer Antikörper mittels Immunoblot (Gereon Schares) und einer kritischen Begutachtung zum fachlichen Inhalt (Martin Köthe, Gereon Schares, Arwid Dauschies, Berit Bangoura).

4 Publikation 2: Host-pathogen interaction in *Toxoplasma gondii*-infected mixed chicken blood cell

Lysanne Hiob, Angela Berndt, Arwid Dauschies, Berit Bangoura

Publiziert in: Parasitology Research 2019; 118(5):1479-1491.

verfügbar unter folgendem DOI: 10.1007/s00436-019-06265-2

13 Seiten, 8 Abbildungen, 2 Tabellen, 63 Literaturangaben

Tierversuch: V 10/14, Landesdirektion Sachsen, Dienststelle Leipzig, 23.07.2014

Eigenanteil der Arbeit:

- Studiendesign: Die Studienidee und Versuchsplanung wurden in Zusammenarbeit mit Berit Bangoura und Angela Berndt erarbeitet.
- Durchführung: Lysanne Hiob ist eigenverantwortlich für die Blutentnahmen, die *T. gondii*-Kultivierung, die Durchführung beider Zellkulturversuche, die Probenaufbereitung für die Durchflusszytometrie und Konfokalmikroskopie, ausgenommen der vorzunehmenden Einstellungen am Durchflusszytometer und der Konfokalmikroskopie (Angela Berndt).
- Analyse und Interpretation: Lysanne Hiob ist eigenverantwortlich für die Auswertung der Ergebnisse, ausgenommen der Resultate bezüglich Durchflusszytometrie (Angela Berndt) und Konfokalmikroskopie (Angela Berndt).
- Schreiben der Publikation: Lysanne Hiob ist eigenverantwortlich für das Schreiben der Publikation, ausgenommen der Material- und Methodikbeschreibung bezüglich der Durchflusszytometrie (Lebend-Tod-Analyse und Einstellungen am Durchflusszytometer, Angela Berndt), Konfokalmikroskopie (Antikörperfärbungen, Angela Berndt) und Lichtmikroskopie (Angela Berndt) und einer kritischen Begutachtung zum fachlichen Inhalt (Angela Berndt, Arwid Dauschies, Berit Bangoura).

5 Diskussion

Die ubiquitär verbreiteten Parasiten *T. gondii* und *E. tenella* des Stammes Apicomplexa sind bedeutende Pathogene mit hohen Prävalenzen in Hühnern. In Freilandhaltungen und kleinen Hinterhofhaltungen konnten in verschiedenen Studien weltweit sehr hohe *T. gondii*-Seroprävalenzen bis zu 100 % nachgewiesen werden (DUBEY 2010). Aufgrund ihres Nahrungsaufnahmeverhaltens werden Freilandhühner als gute Indikatoren für Bodenkontaminationen mit *T. gondii*-Oozysten angesehen. Gewebe von infizierten Tieren stellt gleichzeitig eine potentielle Infektionsquelle für Katzen und andere Tiere sowie auch den Menschen dar, der sich über den Verzehr von nicht ausreichend durcherhitzten Hühnerfleischprodukten infizieren kann (DUBEY 2010). Es ist daher davon auszugehen, dass Hühner vor allem in diesen Haltungsformen eine wichtige Rolle in der Epidemiologie von *T. gondii* spielen.

E. tenella zählt neben *E. acervulina* zu den am häufigsten vorkommenden Eimerienspezies in Hühnerhaltungen mit Prävalenzen von 61 - 77 % im europäischen Raum (HAUG et al. 2008, GYÖRKE et al. 2013) und gilt als Hauptverursacher der Hühnerkokzidiose (MCDUGALD und FITZ-COY 2013). Da diese eine erhebliche ökonomische Bedeutung besitzt (WILLIAMS 1999, DALLOUL und LILLEHOJ 2006, BLAKE und TOMLEY 2014) und Koinfektionen mit anderen Pathogenen häufig beobachtet werden (WILLIAMS et al. 1996, MCDUGALD 1998, HAUG et al. 2008, ALNASSAN et al. 2013, GYÖRKE et al. 2013), sind Untersuchungen zu Parasit-Wirt-Interaktionen unter lebensnahen Koinfektionsbedingungen essentiell zur Weiterentwicklung von effizienten Kontrollmaßnahmen. Hinsichtlich relevanter Parasiteninfektionen, welche mit *Eimeria* vergesellschaftet vorkommen, liegt aufgrund der hohen Erregerprävalenz eine große Bedeutung von *T. gondii*-Infektionen nahe. Aufgrund verwandter Antigene und ähnlichen Invasionsmechanismen von *T. gondii* und *E. tenella* ist es möglich, dass es bei einer Koinfektion mit diesen beiden Kokzidien zu einer wechselseitigen Beeinflussung des Immunsystems kommt. Trotz der anzunehmenden hohen Häufigkeit im Feld sind Untersuchungen zu Koinfektionen mit *T. gondii* und Eimerien im Huhn in der bisher zugänglichen Literatur nicht beschrieben. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, mögliche Wechselwirkungen auf das Immunsystem des Huhnes in einer experimentellen In-vivo-Koinfektionsstudie zu evaluieren. Gleichzeitig fanden klinische Parameter, die *E. tenella*-Oozystenausscheidung und die Verteilung von *T. gondii* in ausgewählten Geweben Berücksichtigung (PUBLIKATION 1). Darüber hinaus wurden vertiefende In-vitro-Versuche durchgeführt, um *T. gondii*-Wirtszell-Interaktionen zu untersuchen sowie in einer lebensnahen Mischkultur die Eignung verschiedener Hühnerblutzellen als Wirtszellen von *T. gondii* zu beschreiben (PUBLIKATION 2).

Die In-vivo-Koinfektionsstudie setzte sich aus zwei Versuchen mit jeweils 4 Studiengruppen (uninfizierte Kontrollgruppe, Koinfektionsgruppe, *T. gondii*-Infektionsgruppe, *Eimeria*-Infektionsgruppe) zusammen. Hinsichtlich der *T. gondii*-Infektion wurden im Versuch 1 die Hühner oral mit $1,0 \times 10^4$ *T. gondii*-Oozysten des Typ-III-Stammes NED (HOWE und SIBLEY 1995) inokuliert. Die gewählte Infektionsdosis ist vergleichbar mit den in früheren Studien verwendeten Dosen für experimentelle Infektionen von Hühnern (KANETO et al. 1997, DUBEY et al. 1993). Eine Oozysten-Infektion stellt den wahrscheinlichsten Infektionsweg für Hühner vor allem in Freilandhaltungen dar, da sie üblicherweise ihre Nahrung direkt vom Boden aufnehmen, welcher potentiell mit *T. gondii*-

Oozysten aus Katzenkot kontaminiert sein kann. Die Verwendung des *T. gondii* Typ-III-Stammes NED für die experimentelle Infektion von Mastküken wurde bereits in der Literatur beschrieben (GEUTHNER et al. 2014), auch wenn dieser im Gegensatz zum Genotyp II nicht zu den gewöhnlich in Europa nachgewiesenen Genotypen im Feld zählt. Die Verwendung des in Europa häufig beschriebenen Genotyp II (DUBEY et al. 2005, PEYRON et al. 2006, SCHARES et al. 2017) wurde im Versuch 2 mit $2,5 \times 10^4$ ME49-Tachyzoiten realisiert, wobei hier der intramuskuläre Infektionsweg gewählt wurde. Die Infektion mit Tachyzoiten ist schon in verschiedenen Studien beschrieben (KANETO et al. 1997, ZÖLLER et al. 2013, GEUTHNER et al. 2014), auch wenn sie nicht dem natürlichen Infektionsweg entspricht. Der größte Vorteil der Tachyzoiteninfektion ist die Möglichkeit ihrer Vermehrung in der Zellkultur unter standardisierten Bedingungen. Dies ermöglicht die Einsparung eines kompletten Tierversuchs im Sinne des 3R-Prinzips (Replace, Reduce, Refine), der für die Passagierung der Oozysten in Katzen oder von bradyzoitenhaltigen Zysten in Mäusen notwendig wäre und ist gleichzeitig weniger arbeitsintensiv. Die Infektionsdosis wurde hier kleiner als in der Literatur beschrieben (KANETO et al. 1997, GEUTHNER et al. 2014) gewählt, da es sich zum Infektionszeitpunkt um sehr junge Küken (10. Lebenstag) handelte und in der doppelt belasteten Koinfektionsgruppe Mortalität weitestgehend vermieden werden sollte.

Bezüglich der Eimerieninfektion unterscheiden sich die beiden Versuche dahingehend, dass im Versuch 1 die Hühner mit *E. tenella*-Oozysten des Houghton-Stammes infiziert wurden und im Versuch 2 das Inokulum nach einer In-vivo-Passage aus *E. tenella*- und *E. acervulina*-Oozysten zusammengesetzt war. Da der Fokus der Arbeit auf der *E. tenella*-Infektion lag, wurde in beiden Versuchen die gleiche Infektionsdosis für *E. tenella* mit $2,5 \times 10^4$ eingestellt, um eine subklinische bis milde klinische Kokzidiose auszulösen. Die *E. acervulina*-Dosis von $1,87 \times 10^4$ Oozysten im Versuch 2 wurde in der Literatur als geeignet beschrieben, um milde klinische Symptome hervorzurufen (MCDUGALD und FITZ-COY 2013) und wurde auch in anderen experimentellen Infektionsstudien in Masthühnern mit verschiedenen Eimerienspezies verwendet (POP et al. 2015). Darüber hinaus stellt das gleichzeitige Vorhandensein von zwei oder mehr Eimerienspezies wie schon eingangs erwähnt eine häufige Situation unter Feldbedingungen dar (WILLIAMS et al. 1996, HAUG et al. 2008, GYÖRKE et al. 2013). Eine Wechselwirkung beider Erreger im Zäkum ist nicht zu erwarten, da beide Eimerienarten unterschiedliche Prädilektionsstellen im Darm besitzen. *E. acervulina*-Läsionen sind vorwiegend im Duodenum anzutreffen (TYZZER 1929, MCDUGALD und FITZ-COY 2013), während *E. tenella* nahezu ausschließlich das Zäkum besiedelt (TYZZER 1929, MCDUGALD und FITZ-COY 2013).

Die Validierung der erfolgreichen *T. gondii*-Infektion erfolgte in beiden Versuchen indirekt über den Nachweis von *T. gondii*-spezifischen Antikörpern (IgY) mittels Immunoblot und direkt über Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Nachweis mittels nested PCR (nPCR) und MC-PCR. Die Detektion *T. gondii*-spezifischer Antikörper war frühestens 4 Tage nach Infektion (p. i.) möglich und lag bei den meisten seropositiven Hühnern zwischen 11 und 19 Tagen p. i. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit Studien von DUBEY et al. (1993) und YAN et al. (2010), in denen innerhalb von 2 Wochen p. i. *T. gondii*-spezifische Antikörper mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay und Mikroagglutinationstest nachgewiesen werden konnten. Nach OPSTEEGH et al. (2016) sind *T. gondii*-Antikörper zwischen zwei und drei Wochen p. i. detektierbar. Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Antigenbanden lagen überwiegend bei 20 kDa (SAG2 (P22); PRINCE et al. 1990), 30 kDa (SAG1 (P30); BURG et al. 1988), 35 kDa (P35; AUBERT et al. 2000) und 43 kDa (SAG3 (P43); CESBRON-DELAUW et al. 1994)

Molekulargewicht. Der direkte *T. gondii*-DNA-Nachweis war allerdings nur in 55 % der seropositiven Hühner möglich, was in Übereinstimmung ist mit Werten von 53,4 % und 33,3 % aus Untersuchungen von OPSTEEGH et al. (2016) und GEUTHNER et al. (2014).

Für den direkten *T. gondii*-DNA-Nachweis wurden an zwei unterschiedlichen Sektionszeitpunkten (vier Tage und 21 bzw. 22 Tage p. i.) Proben von Gehirn, Herz, Oberschenkel- und Brustmuskulatur von Tieren aller Versuchsgruppen entnommen, welche bereits aus der Literatur als typische Prädelektionsstellen für *T. gondii* bekannt sind (DUBEY 2010, YAN et al. 2010, OPSTEEGH et al. 2016). Es konnten insgesamt 22,1 % von allen Gewebeproben *T. gondii*-infizierter Versuchshühner ca. drei Wochen p. i. als *T. gondii*-positiv detektiert werden, unter gemeinsamer Berücksichtigung der Ergebnisse aus nPCR und MC-PCR. GEUTHNER et al. (2014) berichten von geringeren Detektionsraten von 2,1 % aller Gewebeproben mittels nPCR bei experimentell infizierten Hühnern. Eine mögliche Ursache für diese geringen Nachweisraten in Hühnergewebeproben ist die inhomogene Verteilung der *T. gondii*-Zysten sowie eine geringe Zystendichte im Gewebe (SEDLÁK et al. 2000). OPSTEEGH et al. (2016) bestätigten in einem extensiven Literaturreview, dass der direkte Erregernachweis in seropositiven Tieren oft misslingt und das man von einer geringen Zystenkonzentration von nur einer Zyste pro 50 g Gewebe ausgeht. Zusammen mit der inhomogenen Verteilung sind diese Faktoren besonders kritisch für die Detektion mittels nPCR, da hierfür üblicherweise nur eine sehr limitierte Probenmenge (25 mg) für die DNA Extraktion eingesetzt werden kann und davon wieder nur ein Bruchteil an Probe für die anschließende PCR. Desweiteren muss berücksichtigt werden, dass die Zystenlast sich über die Zeit verändert und ein positiver Nachweis in kürzlich infizierten Tieren schwieriger ist (OPSTEEGH et al. 2016). Diese Aussage konnte auch in der Studie von YAN et al. (2010) bestätigt werden, die *T. gondii*-DNA in Hühnern frühestens 21 Tage p. i. detektieren konnten. In der vorliegenden Studie war das am häufigsten positiv nachgewiesene Gewebe die Herzmuskulatur, gefolgt von Brustmuskel, Gehirn und Oberschenkelmuskulatur. Diese Daten sind in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungsergebnissen in Hühnern (DUBEY 2010, YAN et al. 2010, OPSTEEGH et al. 2016). Falsch-negative Ergebnisse können aufgrund des frühen Beprobungszeitpunktes von nur 21 bzw. 22 Tagen p. i. nicht ausgeschlossen werden, auch wenn hoch-sensitive Verfahren wie die MC-PCR angewendet wurden. Dennoch lässt sich feststellen, dass die Kombination aus serologischen und molekularbiologischen Ergebnissen aus beiden Versuchen geeignet ist, die erfolgreiche *T. gondii*-Infektion in den entsprechenden Versuchsgruppen zu bestätigen (PUBLIKATION 1).

Die erfolgreiche Eimerieninfektion wurde in den entsprechenden Versuchsgruppen anhand der Oozystenausscheidung, der Beurteilung von Darmläsionen zu den Sektionszeitpunkten (Lesion scoring) und der mikroskopischen Untersuchung von Darmschleimhautabstrichen auf Parasitenstadien validiert. Im Versuch 1 konnte interessanterweise über den gesamten Versuchszeitraum eine signifikant höhere Oozystenausscheidung in der nur mit Eimerien infizierten Gruppe im Vergleich zur Koinfektionsgruppe festgestellt werden. Ein später Ausscheidungspeak von 16 Tagen p. i. deutet auf eine Reinfektion der Hühner über Kotreste vom Käfigboden hin. Im Gegensatz dazu zeigte die Eimerienexkretionskurve im Versuch 2 einen typischen Verlauf mit einem Ausscheidungspeak sechs Tage p. i. und einem vergleichbaren Verlauf in der Koinfektionsgruppe und Eimerieninfektionsgruppe. Anhand dieser zwischen Versuch 1 (*T. gondii*-Infektion via Oozysten) und Versuch 2 (*T. gondii*-Infektion via Tachyzoiten) unterschiedlichen Ergebnisse lässt sich mutmaßen, dass der Effekt von *T. gondii* auf

die Eimerienoozystenausscheidung von der *T. gondii*-Infektionsroute abhängig ist. Es scheint, dass die orale *T. gondii*-Infektion die Eimerienreplikation negativ beeinflusst (Versuch 1), wohingegen dies nach parenteraler Infektion nicht der Fall war (Versuch 2). *T. gondii*-Stadien, die oral vom Zwischenwirt aufgenommen werden und sich im Darmlumen befinden, könnten mit *Eimeria*-Sporozoitien in Wechselwirkung treten. Demgegenüber berichten andere Autoren von einer gesteigerten *E. tenella*-Oozystenausscheidung bei Koinfektionen mit dem aviären Leukosevirus Subtyp J (CUI et al. 2016) im Vergleich zur *Eimeria*-Monoinfektion. Hierbei spielt vermutlich die immunsupprimierende Wirkung des aviären Leukosevirus eine entscheidende Rolle, der die Vermehrung von Sekundärerregern wie *E. tenella* steigert (CUI et al. 2016). Synergistische Effekte bezüglich der Pathogenität wurden ebenfalls bei Koinfektionen mit *Cl. perfringens* berichtet (ALNASSAN et al. 2014), wobei hier das Vorliegen einer Kokzidiose als prädisponierend für die Entwicklung der Nekrotischen Enteritis angesehen wird (WILLIAMS et al. 2003, WILLIAMS 2005).

Hinsichtlich der *E. tenella*-spezifischen Darmläsionen konnten in beiden Versuchen keine signifikanten Unterschiede zwischen Koinfektion- und *Eimeria*-Infektionsgruppe festgestellt werden (PUBLIKATION 1). Allerdings wurden im mikroskopischen Scoring der Darmschleimhautabstriche mehr Meronten in der Koinfektionsgruppe als in der *Eimeria*-Infektionsgruppe detektiert ($P > 0.05$). Es wäre möglich, dass die *T. gondii*-Infektion einen begünstigenden oder fördernden Einfluss auf die asexuelle *E. tenella*-Vermehrung hat, jedoch ohne dabei schwerwiegendere Darmläsionen im Zäkum oder eine gesteigerte Oozystenausscheidung zu verursachen. Im Gegensatz dazu konnten in *Eimeria* spp. – und *Cl. perfringens*-Koinfektionsstudien von PARK et al. (2008) und BANGOURA et al. (2014) schwerwiegendere Darmläsionen in mischinfizierten Hühnern detektiert werden als bei alleiniger Eimerieninfektion. GIAMBRONE et al. (1977) beschrieben massivere *Eimeria*-spezifische Darmläsionen in Hühnern, die mit IBDV koinfiziert waren. Ähnliche Ergebnisse werden von CUI et al. (2016) berichtet für Hühner mit aviären Leukosevirus und *E. tenella*-Mischinfektion. Es lässt sich vermuten, dass in der vorliegenden Studie das Level der gesteigerten Merontenanzahl in den koinfizierten Hühnern nicht ausgereicht hat, um sichtbar schwerwiegendere Darmläsionen zu induzieren. Darüber hinaus könnte man spekulieren, dass die gesteigerte Merontenanzahl nur die 1. Merontengeneration betraf, da erst die 2. Generation an Meronten schwerwiegende Gewebsschäden und die damit verbundenen typischen Darmläsionen verursacht (MCDUGALD und FITZ-COY 2013).

Um die Immunantwort und Entzündungsreaktionen anhand der Expression ausgewählter Zytokine zu evaluieren, wurden an den zwei Sektionszeitpunkten Proben von Zäkum und Milz entnommen. Im Versuch 2 wurde aufgrund der zusätzlichen *E. acervulina*-Infektionsdosis auch das Duodenum beprobt. Zytokinexpressionsmessungen werden als geeignetes Werkzeug zur Untersuchung der Immunantwort nach protozoären Infektionen angesehen (OVINGTON et al. 1995). Aus der verfügbaren Literatur ist bekannt, dass die *Eimeria*-Infektion im Huhn zu einem Anstieg von zahlreichen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen führt und dass eine Balance der Th1- und Th2-bezogenen Zytokine hierbei von großer Bedeutung ist (LILLEHOJ und LILLEHOJ 2000, DALLOUL und LILLEHOJ 2006, CORNELISSEN et al. 2009, HARITOVA und STANILOVA 2012). Eine umfangreiche Genexpressionsanalyse von Zytokinen nach *E. acervulina*- und *E. tenella*-Erstinfektion im Huhn demonstrierte eine deutliche Hochregulierung von z. B. IFN- γ , IL-12 und IL-10 innerhalb intestinaler Lymphozyten (HONG et al. 2006b). Erhöhte IL-10-Level als Repräsentant der Th2-Antwort wurden auch

nach experimenteller Infektion mit *E. tenella* (HARITOVA und STANILOVA 2012) oder *E. maxima* (ROTHWELL et al. 2004) beschrieben. Eine deutliche Hochregulierung von IFN- γ wurde nach *E. tenella*-Infektion im Zäkum und Milzgewebe (ROTHWELL et al. 2000) und nach *E. maxima*-Infektion im Jejunum (LAURENT et al. 2001) detektiert. Eine erhöhte Zytokinexpression in peripheren Organen außerhalb der jeweiligen Darmprädilektionsstelle von Eimerien repräsentiert die Aktivierung sowohl der lokalen als auch systemischen Immunantwort nach Infektion.

In der In-vivo-Koinfektionsstudie konnte ein statistisch signifikanter Anstieg der Th1- (IFN- γ , IL-12 und TNF- α) und Th2-bezogenen Zytokine (IL-10) im Zäkum, Milz und Duodenum (Versuch 2) der Koinfektions- und Eimerieninfektionsgruppe detektiert werden (PUBLIKATION 1). Somit bestätigt sich sowohl die Aktivierung der zellvermittelten (Th1) als auch humoralen Immunantwort (Th2). Th1-Zellen realisieren dabei typische Effektorfunktionen wie Hilfestellung für NK-Zellen, zytotoxische T-Lymphozyten oder Makrophagen, was wiederum mit der Produktion von inflammatorischen Zytokinen (z. B. IFN- γ) einhergeht und das Entzündungsgeschehen fördert. Die Balance dazu wird durch die Th2-Antwort gebildet, die z. B. über die Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen (IL-10) von Th2-Zellen und Monozyten bewerkstelligt wird und gleichzeitig zur Stimulation von B-Lymphozyten zur antikörperproduzierenden Plasmazelle beitragen. Die Induktion der Th1- und Th2-bezogenen Zytokine ist in Übereinstimmung mit den eingangs beschriebenen Ergebnissen diverser Studien nach experimenteller Infektion von Hühnern mit verschiedenen Eimerienspezies (ROTHWELL et al. 2000, HONG et al. 2006b, HARITOVA und STANILOVA 2012). Ähnliche Ergebnisse konnten auch in Koinfektionsstudien mit *Eimeria* spp. und *Cl. perfringens* in Hühnern generiert werden (PARK et al. 2008, BANGOURA et al. 2014). PARK et al. (2008) untersuchten im Tiermodell für die nekrotische Enteritis die Immunpathologie und intestinale Expression verschiedener Zytokine in Masthühnern. Die Tiere wurden im Alter von drei Wochen mit *E. maxima*-Oozysten und fünf Tage später mit *Cl. perfringens* infiziert. Jejunumproben wurden ein und zwei Tage nach *Cl. perfringens*-Infektion im Rahmen einer Sektion konserviert. Im Zuge der Expressionsanalyse konnte eine gemischte Antwort abhängig vom jeweiligen Transkript und Zeitpunkt in den koinfizierten Tieren festgestellt werden. Einige Zytokine waren in der Koinfektionsgruppe erniedrigt (IFN- γ , IL-12, IL-1 β , IL-2) während andere gegenüber einer Monoinfektion mit *E. maxima* oder *Cl. perfringens* erhöht (IL-10, IL-8, IL-15) waren. Im Gegensatz dazu konnten in der eigenen *T. gondii*-*Eimeria* spp.-Koinfektionsstudie keine wesentlichen Unterschiede in der Zytokinexpression zwischen koinfizierten und *Eimeria*-monoinfizierten Tieren festgestellt werden (PUBLIKATION 1). BANGOURA et al. (2014) untersuchten die Wirksamkeit einer kommerziell erhältlichen Lebendvakzine gegen Hühnerkokzidien zur Vorbeugung der nekrotischen Enteritis im Huhn, welche attenuierte Stämme von *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* und *E. tenella* enthielt. Die Autoren bestätigten signifikant erhöhte IFN- γ - und IL-10-Level im Jejunum nicht-vakzinierter koinfizierter Tiere im Vergleich zur vakzinierter Koinfektionsgruppe und erhöhte IL-12-Werte gegenüber nicht-infizierter Tiere.

Bei einer vergleichenden Betrachtung der Versuche 1 und 2 in der vorliegenden Studie fällt auf, dass die erhöhten Zytokinlevel im Versuch 2 der eimerieninfizierten Gruppen insbesondere zum frühen Sektionszeitpunkt in ihrer Anzahl häufiger waren und eine stärkere Ausprägung (bis teils 57-facher Erhöhung im Vergleich zur uninfizierten Kontrollgruppe) aufwiesen (PUBLIKATION 1). Eine

naheliegende Erklärung stellt die zusätzliche *E. acervulina*-Infektion im Versuch 2 dar, die vermutlich zu einer stärkeren Th1-vermittelten Entzündungsreaktion über das GALT auch im Zäkum beiträgt und damit auch die *E. tenella*-Pathologie in Form schwerwiegender Darmläsionen verstärkt. Ähnliche Effekte einer verstärkten Entzündungsreaktion bzw. *Eimeria*-Pathologie im Darm wird bei Vorliegen von Koinfektionen mit anderen Darmpathogenen wie *Cl. perfringens* (PARK et al. 2008, BANGOURA et al. 2014) berichtet. Darüber hinaus lässt sich generell sagen, dass die Immunreaktion im Zäkum als Prädilektionsstelle von *E. tenella* am deutlichsten ausgeprägt war im Vergleich zur Zytokinexpression in Milz und Duodenum. Diese Daten passen zu den vorgefundenen deutlichen Darmläsionen (bis Lesion score 3) im Versuch 2, die auch auf lokale Entzündungsreaktionen im Rahmen der Eimerieninfektion zurückzuführen sind (LILLEHOJ und TROUT 1996). Zu diesem Sektionszeitpunkt wurden auch die massivsten Erhöhungen von IFN- γ , IL-12 und IL-10 detektiert. Vergleichbare Beobachtungen einer stärkeren Zytokinexpression und deutlicheren Gruppenunterschieden im Zäkum gegenüber der Milz werden von BANGOURA et al. (2014) im Rahmen der *Eimeria* spp.- und *Cl. perfringens*-Koinfektion berichtet. HARITOVA und STANILOVA (2012) untersuchten die IL-10- und IL-12b-mRNA-Expression in Duodenum, Zäkum und Leber von Hühnern nach experimenteller Infektion mit *E. tenella*. Während die IL-12b-Werte in allen Geweben nahezu unbeeinflusst waren, zeigte sich eine signifikante Erhöhung der IL-10-Werte, die im Zäkum deutlicher ausgeprägt war als in der Leber, was die Autoren dem Gewebestropismus von *E. tenella* zuschreiben. Weiterhin vermuten die Autoren, dass der fehlende Anstieg der IL-12b-Werte über den negativen Feedback-Mechanismus von IL-10 zu erklären ist. Im Gegensatz dazu berichteten ROTHWELL et al. (2004) von einem signifikanten Anstieg der IL-10-Expression im Dünndarm und Milzgewebe von *E. maxima*-infizierten empfänglichen Hühnerlinien (151) ohne statistisch signifikante Unterschiede in den Zäkaltonsillen. Die IFN- γ -mRNA-Expression war wiederum nur im Dünndarm signifikant erhöht und zeigte im Milzgewebe keine Alterationen im Vergleich zu uninfizierten Hühnern.

Bei isolierter Betrachtung der *T. gondii*-Infektionsgruppe konnten in beiden Versuchen nur vereinzelt Effekte hinsichtlich der untersuchten Zytokine festgestellt werden, die sich auf eine signifikante Erhöhung von IFN- γ im Zäkum (TV 1, ST 13) und Milz (TV 2, ST 13) beschränken (PUBLIKATION 1). Ich schliesse daher, dass die beobachteten Alterationen der Zytokin-mRNA-Expressionslevel in der Koinfektionsgruppe überwiegend der Eimerieninfektion geschuldet sind. Die Immunantwort nach *T. gondii*-Infektion im Mausmodell ist gut erforscht und bereits in zahlreichen Studien beschrieben. Man weiß, dass die Induktion einer starken Th1-Antwort und damit einer pro-inflammatorischen Immunantwort eine Schlüsselfunktion darstellt, die über verschiedene Immunzellen realisiert wird (MUNOZ et al. 2011). Dabei gelten im Zuge der Wirtsabwehr IFN- γ , TNF- α und IL-12 als wichtige beteiligte Zytokine (SUZUKI et al. 1988, GAZZINELLI et al. 1993b). In Balance dazu steht die *T. gondii*-induzierte Produktion anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 und TGF- β , die als gegenregulierende Immunmechanismen fungieren (GAZZINELLI et al. 1992, 1996) und die Pathologie im Wirt limitieren (LAMBERT und BARRAGAN 2010). Hinsichtlich *T. gondii*-Koinfektionen wurde von SANTIAGO et al. (1999) berichtet, dass *T. gondii* die Antigen-spezifische Th2-Immunantwort und das Entzündungsgeschehen in BALB/C Mäusen hemmte, die mit *Leishmania major* koinfiziert waren. Ähnliche Ergebnisse einer Reduktion der Th2-Antwort beschreiben LIESENFELD et al. (2004) im Rahmen von *T. gondii*-*Nippostrongylus brasiliensis*-Koinfektionen in C57BL/6 Mäusen. STOICOV et al.

(2004) stellten in BALB/C Mäusen, die experimentell mit *T. gondii* und *Helicobacter felis* infiziert wurden, eine deutliche Modulation der Immunantwort und des klinischen Bildes im Gegensatz zur alleinigen *T. gondii*-Infektion fest. Die Überlebensraten sanken in koinfizierten Mäusen drastisch und die unkontrollierte Tachyzoitenreplikation führte zu schweren Organschäden. Darüber hinaus waren IFN- γ und IL-12 in der Magenschleimhaut signifikant erhöht und die IL-10-Werte in den mischinfizierten Mäusen deutlich reduziert. Diese Befunde demonstrieren beeindruckend tiefgreifende Wechselwirkungen der Immunantwort zwischen Pathogenen ohne jegliche Verwandtschaft. Es ist allerdings noch unklar, inwieweit die Kenntnisse zum Immunologiegesehen nach *T. gondii*-Infektion aus dem Säugetierbereich auch auf das Huhn zutreffen. Bisher ist lediglich bekannt, dass Makrophagen, Monozyten und DC nicht nur eine wichtige Rolle für die Abwehr von *T. gondii* im Huhn spielen, sondern auch maßgeblich an der Verbreitung des Parasiten im Wirt und an der Parasitenreplikation unterstützend beteiligt sind (MALKWITZ et al. 2013, QUÉRÉ et al. 2013).

Um das Wissen über die Immunologie der *T. gondii*-Infektion im Huhn weiter auszubauen und zu vertiefen, wurde eine weitere Studie zur Untersuchung der Immunreaktion und Parasitenreplikation nach alleiniger *T. gondii*-Infektion in Form einer In-vitro-Studie zur Vermeidung eines invasiven Tierversuches in Sinne des 3R-Prinzips durchgeführt (PUBLIKATION 2). Im Gegensatz zu der bisher veröffentlichten Literatur, die ausschließlich experimentelle *T. gondii*-Infektionen von Zellmonokulturen berücksichtigt, wurde in der vorliegenden Studie eine Hühnerblutzellmischkultur (HBK) etabliert, um eine möglichst lebensnahe Abbildung der In-vivo-Situation im Huhn zu kreieren. Die Studie war aus zwei separaten Experimenten aufgebaut. Es wurden Blutentnahmen bei acht (Experiment 1) bzw. sechs (Experiment 2) braunen Leghorn Hühnern durchgeführt und das gewonnene Blut mittels eines Isolationsprotokolls bearbeitet. Dabei wurde eine Zellkultur überwiegend bestehend aus Lymphozyten, Monozyten, Thrombozyten und vereinzelt Erythrozyten geschaffen. Im Experiment 1 erfolgte die Infektion der gewonnenen HBK unmittelbar nach deren Aussaat mit $1,25 \times 10^6$ *T. gondii*-Tachyzoiten des Genotyp II (ME49), was einer Infektionsrate von einem Tachyzoit je Blutzelle entsprach. Diese Infektionsdosis befindet sich in dem üblich verwendeten *T. gondii*-Dosisbereich pro Wirtszelle (BOUCHOT et al. 2001, SEABRA et al. 2002, GUILLERMO und DAMATTA 2004, ONG et al. 2011, MALKWITZ et al. 2017). Der *T. gondii*-Stamm ME49 wurde stellvertretend für Genotyp-II-Infektionen gewählt, da dieser Genotyp üblicherweise in Hühnern und anderen Tierarten in Europa unter Feldbedingungen vorkommt (DUBEY et al. 2005, SCHLÜTER et al. 2014). Die HBK wurde 48 h lang bei 41 °C inkubiert, um die physiologische Körpertemperatur des Huhnes nachzuahmen. Nach 1 h, 12 h, 24 h und 48 h p. i. wurden Proben der infizierten und uninfizierten Kontrollwells gewonnen, um die Parasitenreplikation und die mRNA-Expression von iNOS und diversen Zytokinen (IFN- γ , TNF- α , IL-10) mittels qPCR zu untersuchen. Um die zellspezifische Empfänglichkeit für *T. gondii* in der HBK zu evaluieren und visualisieren, wurden für die Infektion in Experiment 2 bei gleicher Infektionsdosis *T. gondii*-Tachyzoiten des Genotyp I (RH) verwendet, die das grün fluoreszierende Protein (GFP) exprimieren. GFP wurde erstmalig 1961 von dem japanischen Biochemiker Osamu Shimomura als Protein der Qualle *Aequorea victoria* entdeckt, das bei Anregung mit blauen oder ultravioletten Licht grün fluoresziert (SHIMOMURA 2005). GFP eignet sich aufgrund seiner nicht-toxischen Eigenschaften für eukaryotische Zellen gut als Marker für Genexpressionen (CHALFIE et al. 1994) oder zur Untersuchung biologischer Prozesse *in vitro* und *in vivo*. Die Auswertung der Zellzusammensetzung der

HBK erfolgte 24 h p. i. mittels Durchflusszytometrie und die Visualisierung der infizierten Kulturen mit Hilfe der Konfokalmikroskopie.

Hinsichtlich der *T. gondii*-Vermehrung im Experiment 1 konnten während der ersten 24 h p. i. ein massiver Abfall der Anzahl an Parasitenstadien auf 36,7 % der initialen Menge (1 h p. i.) detektiert werden. Daran schloss sich eine annähernde Plateauphase bis zum Zeitpunkt 48 h p. i. (PUBLIKATION 2). Diese Ergebnisse sind im Einklang mit einer Studie von MALKWITZ et al. (2017), in der Untersuchungen zur *T. gondii*-Replikation in Erythrozyten- und Thrombozytenmonokulturen von Hühnern im Vergleich zu Makrophagenkulturen im Fokus standen. In der Erythrozytenmonokultur wurde ein signifikanter Abfall der Anzahl an *T. gondii*-Stadien 8 h p. i. auf 25 % der initialen Dosis registriert. Dieser setzte sich auf bis zu 10 % nach 12 h p. i. fort ohne weitere Veränderungen bis zum Untersuchungsende (24 h p. i.). Ähnliche Beobachtungen treffen auf die untersuchten Thrombozytenmonokulturen zu, in denen es innerhalb von 12 h p. i. zu einem massiven Abfall der *T. gondii*-Stadien auf 3 % der initialen Dosis kam. Zwar schloss sich ein nachfolgender Anstieg bis zu 50 % der Initialdosis bis 48 h p. i. an, allerdings schreiben die Autoren diesen den in der Thrombozytenkultur enthaltenen Makrophagenanteil von ca. 13 % zu. Nach Extrapolation der *T. gondii*-Replikationskurve ergab sich somit ein stetiger Abfall der Parasitenstadien in einer hypothetisch reinen Thrombozytenkultur. Obwohl *T. gondii* sich potentiell in nahezu allen zellkernhaltigen Zellen vermehren (SIBLEY 2004, MUNOZ et al. 2011) kann, demonstrieren diese Ergebnisse, dass *T. gondii* scheinbar nicht in der Lage ist, Erythrozyten und Thrombozyten von Hühnern zur eigenen Replikation zu nutzen. Ein komplett anderes Bild zeigt sich bei der Infektion von Makrophagenmonokulturen. Hier konnte ein signifikanter Anstieg der *T. gondii*-Replikation zwischen 12 h und 48 h p. i. bis zu 300 % der initialen Infektionsdosis festgestellt werden (MALKWITZ et al. 2017). Diese Resultate unterstreichen die Aussage, dass Makrophagen ein Replikationsreservoir für *T. gondii* darstellen (MALKWITZ et al. 2013, QUÉRÉ et al. 2013).

Nach dem kontinuierlichen Abfall der *T. gondii*-Stadien bis 24 h p. i. konnte in der HBK zum Zeitpunkt 48 h p. i. ein Anstieg der Replikation um 19 - 63,3 % verglichen zu 24 h p. i. in der Hälfte der Zellkulturproben festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung könnte eine variierende Zusammensetzung der aus verschiedenen Hühnern isolierten HBK sein sowie eine über den Kultivierungsverlauf (48 h) veränderte Zusammensetzung der HBK. Dies könnte wiederum einen Einfluss haben auf die Interaktionen zwischen verschiedenen Blutzellpopulationen im Rahmen der angeborenen und adaptiven Immunantwort zur Kontrolle der Parasitenvermehrung in Abhängigkeit von deren Verfügbarkeit 48 h p. i. Variationen in der Zusammensetzung von Kulturen mononukleärer Zellen des peripheren Blutes individueller Hühner wurden bereits von FAIR et al. (2008) berichtet. Dafür wurden Blutproben von 284 adulten Hühnern mittels Durchflusszytometrie untersucht und eine große Bandbreite an Variation der Anteile diverser Lymphozytensubpopulationen wie z. B. CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ entdeckt. Die Autoren vermuten, dass diese Variabilität vermutlich durch den individuellen Gesundheitsstatus, Körperkondition oder Stress infolge Umweltfaktoren erklärbar ist. Außerdem ist in Betracht zu ziehen, dass Makrophagen sich erst 48 - 72 h nach der Blutzellaufreinigung in der Zellkultur aus den Monozyten formieren (WIGLEY et al. 2002). Da die Infektion der HBK unmittelbar nach Isolation erfolgte, waren zu Beginn noch keine ausgereiften Makrophagen als potentielle Wirtszellen

vorhanden, was eine zusätzliche Erklärung für den starken Abfall der Parasitenstadien innerhalb der ersten 24 h p. i. darstellen könnte.

MALKWITZ et al. (2018) untersuchten die Vermehrung von *T. gondii* des Genotyp II (ME49) im Vergleich zu Genotyp III (NED) in einer reinen Hühnermakrophagenkultur und konnten einen Abfall an Parasitenstadien bis 12 h p. i. gefolgt von einem Anstieg bis 36 h (ME49) oder 48 h p. i. (NED) feststellen. Es folgte ein deutlicher Abfall bis 72 h p. i. Generell unterschieden sich die Replikationskurven beider Genotypen bei gleicher Infektionsdosis nur unwesentlich. Die dezent längere Replikationsdauer von NED gegenüber ME49 ist in Übereinstimmung mit vorherigen Berichten (SAEIJ et al. 2005). Untersuchungen zur Replikation von *T. gondii* des Genotyp I (RH) in zwei unterschiedlichen Infektionsdosen ($2,5 \times 10^5$ bzw. 5×10^5 Tachyzoiten) und in Kombination mit einer *E. tenella*-Koinfektion wurden von ZHANG et al. (2018) in reinen Makrophagenkulturen durchgeführt. Die niedrig-infizierte *T. gondii*-Infektionsgruppe und die Koinfektionsgruppe zeigten einen vergleichbaren kontinuierlichen Anstieg der *T. gondii*-Replikation ab 48 h p. i. bis 72 h p. i. Die hoch-infizierte *T. gondii*-Infektionsgruppe erreichte den Replikationspeak bereits 48 h p. i. mit einem nachfolgenden Abfall 72 h p. i. vermutlich aufgrund der schnelleren Zerstörung von Wirtszellen. Mögliche Gründe für Unterschiede zu den eigenen Ergebnissen könnten die gleichzeitige Kultivierung von verschiedenen Blutzellen gegenüber von Makrophagenmonokulturen sein, unterschiedliche Infektionsdosen je Blutzelle und Abweichungen im Kultivierungsprotokoll. Hervorzuheben ist hier, dass es sich bei der vorliegenden Studie um eine nach besten Wissen erstmalige Untersuchung einer gemischten Wirtszellkultur aus Hühnervollblut handelt und somit realistische, lebensnahe Zell-Zell-Interaktionen darstellbar waren, welche wertvolle Hinweise für den Ablauf der natürlichen Immunantwort *in vivo* liefern. Da in der vorliegenden HBK ein deutlicher Abfall der Anzahl an Parasitenstadien im Kultivierungsverlauf beobachtet wurde, lässt sich schlussfolgern, dass Hühnerblut nicht den Hauptort der Parasitenreplikation darstellt und vermutlich primär zum *T. gondii*-Transport in andere Gewebe und Organe dient. Darüber hinaus werden Monozyten-abgeleitete Makrophagen als „Trojanische Pferde“ für *T. gondii* angesehen, um Eintritt und Replikation in Geweben zu ermöglichen (DA GAMA et al. 2004, COURRET et al. 2006, UNNO et al. 2008).

Im eigenen Experiment wurde die mRNA-Expression verschiedener Zytokine stellvertretend für die Th1- (IFN- γ , TNF- α) und Th2- (IL-10) Immunantwort und iNOS als Produkt von Monozyten bzw. Makrophagen untersucht. Dabei konnten vornehmlich eine signifikant erhöhte iNOS-mRNA-Expression von 12 h bis 48 h p. i. in den *T. gondii*-infizierten Zellen gegenüber nicht-infizierten Kontrollzellen detektiert werden (PUBLIKATION 2). Zum Zeitpunkt 48 h p. i. waren die iNOS-Level ca. 10-fach erhöht im Vergleich zum Zeitpunkt 1 h p. i. Eine Hochregulierung der iNOS-mRNA-Expression zwischen 8 h und 24 h p. i. wurde bereits von MALKWITZ et al. (2018) in *T. gondii*-infizierten primären Makrophagenkulturen beschrieben. Auch ZHANG et al. (2018) berichteten von einem moderaten Anstieg der iNOS-Level in reinen primären Hühnermakrophagenkulturen nach *T. gondii*-Infektion. Im Gegensatz dazu konnte DAMATTA et al. (2000) keine Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion in Hühnermakrophagen nach *T. gondii*-Infektion nachweisen. GUILLERMO und DAMATTA (2004) berichteten von einer Hemmung der NO-Produktion in *T. gondii*-infizierten Hühnermakrophagenlinien MQ-NCSU und HD11. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in Makrophagen von Mäusen beschrieben (SEABRA et al. 2002, LÜDER et al. 2003). An dieser Stelle ist zu berücksichtigen, dass bei den zuletzt

genannten Referenzen ausschließlich mit immortalisierten Zelllinien gearbeitet wurde und nicht mit primären Zellen wie in der vorliegenden Arbeit. Dies könnte die unterschiedlichen Ergebnisse erklären und erschwert einen direkten Vergleich zu den eigenen Resultaten. Die Unterschiede könnten auch der Verwendung verschiedener *T. gondii*-Genotypen geschuldet sein, da in den meisten Studien der Genotyp I (RH) und im vorliegenden Experiment der Genotyp II (ME49) zum Einsatz kam. LÜDER et al. (2003) benutzten ebenfalls einen Vertreter des Genotyp II (NTE) und stellten eine Herabregulation der iNOS-mRNA-Level nach *T. gondii*-Infektion in einer IFN- γ - und IFN- γ /LPS-behandelten Monozyten/Makrophagen-Zelllinie (RAW264.7) von Mäusen fest. Gleichzeitig war die NO-Produktion nur marginal detektierbar oder dosisabhängig reduziert. Allerdings muss an dieser Stelle berücksichtigt werden, dass nicht zwangsläufig von einer direkten Korrelation der iNOS-mRNA-Expression mit der NO-Produktion ausgegangen werden kann. Man könnte spekulieren, dass *T. gondii* die NO-Produktion zu einem späteren Zeitpunkt nach initialer iNOS-mRNA-Expression hemmt. Andere Autoren berichten über eine wichtige Rolle von NO im Rahmen der Hemmung der *T. gondii*-Replikation (ADAMS et al. 1990, ZHAO et al. 2009).

Bezüglich der Th1-Immunantwort konnten signifikant erhöhte TNF- α -Level 48 h p. i. in den *T. gondii*-infizierten Kulturen gegenüber den nicht-infizierten Kontrollkulturen detektiert werden. Beim Vergleich der Beprobungszeitpunkte folgte dem initialen Abfall der TNF- α -mRNA-Expression bis 24 h p. i. ein signifikanter Anstieg bis 48 h p. i. (PUBLIKATION 2). ROBBEN et al. (2004) stellten signifikant erhöhte TNF- α -Level 24 h nach Infektion mit *T. gondii* des Genotyp II in Makrophagenkulturen von Mäusen fest. Ähnliche Ergebnisse wurden im Serum von *T. gondii*-infizierten Mäusen (DIAS et al. 2014) und in der Milz von Dickschwänzigen Schmalfußbeutelmäusen (*Sminthopsis crassicaudata*) nach experimenteller *T. gondii*-Infektion gefunden (DONAHOE et al. 2017). Im Kontrast dazu beschreiben BUTCHER und DENKERS (2002) eine Hemmung der TNF- α -Produktion in Makrophagen von Mäusen bei Verwendung eines *T. gondii*-Genotyp I (RH). Diese Ergebnisse illustrieren die Aussage, dass Parameter wie z. B. der verwendete *T. gondii*-Genotyp, Infektionsdosis und die Wirtsspezies einen Einfluss auf den Verlauf immunologischer Prozesse haben, wie bereits KIM et al. (2006) hinsichtlich des Einflusses des *T. gondii*-Genotyps auf die IL-12-Produktion beschrieben. Überraschenderweise konnte ich keine erhöhte IFN- γ -mRNA-Expression in den infizierten Zellkulturen feststellen. Ich vermute daher, dass entweder eine geringe Menge an IFN- γ -produzierenden Zellen wie T-Lymphozyten und NK-Zellen (HUNTER et al. 1994, DUPONT et al. 2012) in der HBK präsent war oder dass es zu einer effektiven Hemmung über die Th2-Immunantwort kam. Höhere IL-10-Werte (1 h und 24 h p. i.) als Vertreter der Th2-Antwort in den infizierten Zellkulturen verdeutlichen die Initiation von gegenregulierenden Mechanismen in den eigenen Versuchen. ZHANG et al. (2018) konnten ebenfalls eine leichte Erhöhung der IL-10-mRNA-Expression in den *T. gondii*-infizierten Makrophagenkulturen von Hühnern im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollkulturen feststellen. Ein Anstieg der IL-10-Level wurde auch in *T. gondii*-infizierten Makrophagen von Mäusen detektiert (ROBBEN et al. 2004). Ähnliche Ergebnisse berichten KHAN et al. (1995) in Splenozyten von Mäusen nach intraperitonealer Infektion mit *T. gondii*-Tachyzoiten. Es ist bekannt, dass *T. gondii* in der Lage ist, die Produktion antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 oder TGF- β (GAZZINELLI et al. 1992, 1996) zu triggern, um eine adäquate Balance zwischen der Th1- und Th2-Immunantwort zu erreichen.

Im Experiment 2 der vorliegenden Studie wurde die Zusammensetzung der isolierten HBK sowie *T. gondii*-positive Zellpopulationen mithilfe der Durchflusszytometrie zum Zeitpunkt 24 h p. i. untersucht. Die Differenzierung aviärer Leukozyten mittels Durchflusszytometrie ist bereits für Thrombozyten (VIERTLBOECK und GÖBEL 2007), Lymphozytensubpopulationen (FAIR et al. 2008) sowie Monozyten/Makrophagen (MAST et al. 1998) beschrieben. Durch die Verwendung von *T. gondii*-Tachyzoiten, die GFP exprimieren, konnten Monozyten/Makrophagen auch mittels Durchflusszytometrie als Hauptzielzellen für *T. gondii* in der HBK bestätigt werden. Desweiteren waren 11,2 % der BU1-positiven Zellen mit *T. gondii* infiziert (PUBLIKATION 2). Das BU1-Oberflächenantigen wird im peripheren Blut hauptsächlich von B-Lymphozyten (HOUSSAINT et al. 1989, ROTHWELL et al. 1996) und einer Untergruppe von Monozyten/Makrophagen exprimiert (HOUSSAINT et al. 1989), wobei die letztere Aussage von anderen Autoren (PINK und RIJNBEEK 1983) nicht bestätigt werden konnte. B-Lymphozyten sind anhand der vorliegenden Daten als Wirtszellen von *T. gondii* anzusehen, auch wenn die Möglichkeit einer Markierung von Monozyten/Makrophagen mit BU1 nicht endgültig auszuschließen ist. Die durchflusszytometrischen Daten deuten außerdem darauf hin, dass verschiedene T-Lymphozytensubpopulationen wie CD8 α^+ -, CD4 $^+$ - und $\gamma\delta$ -T-Zellen zu einem sehr geringen Ausmaß ($\leq 3,13$ %) von *T. gondii* befallen werden. Bei dem quantitativen Vergleich verschiedener Zellsubpopulationen innerhalb der CD45 $^+$ -Leukozyten zwischen *T. gondii*-infizierten und Kontrollkulturen waren keine statistisch signifikanten Unterschiede feststellbar. Der Anteil der CD4 $^+$ -T-Lymphozyten war in den infizierten Zellkulturen gegenüber den Kontrollkulturen leicht erhöht, wohingegen der Anteil an B-Lymphozyten sowie Monozyten/Makrophagen dezent erniedrigt war. Es lässt sich vermuten, dass neben der Wirtszell- und Shuttlefunktion (COURRET et al. 2006, UNNO et al. 2008, MALKWITZ et al. 2013, 2017, QUÉRÉ et al. 2013) sowie dem direkten Phagozytieren von Parasiten (ANDERSON und REMINGTON 1974, JONES et al. 1975) durch Monozyten/Makrophagen ein Teil dieser *T. gondii*-infizierten Zellen durch Apoptose oder Nekrose untergeht. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die geringen Anteile dieser Zellpopulation in den infizierten Kulturen sein.

Es ist bekannt, dass *T. gondii* die Apoptose von infizierten und uninfizierten Wirtszellen erheblich regulieren kann (LÜDER und GROSS 2005). *T. gondii* ist damit in der Lage, strategisch über das Triggern (KHAN et al. 1996, GAVRILESCU und DENKERS 2001, MORDUE et al. 2001) als auch die Hemmung des Zelltodprogramms (NASH et al. 1998, GOEBEL et al. 1999, PAYNE et al. 2003) die eigene intrazelluläre Entwicklung und Persistenz im Wirt zu ermöglichen. Dabei unterstützt die Induktion der Apoptose verschiedener Zellen wie T- und B-Lymphozyten, NK-Zellen und Makrophagen die Evasion der wirtseigenen Immunabwehr während der akuten Infektion (GAVRILESCU und DENKERS 2001, MORDUE et al. 2001, LÜDER et al. 2009). Dahingegen erleichtert die Hemmung der Apoptose das intrazelluläre Überleben und die Persistenz von *T. gondii* (NASH et al. 1998, GOEBEL et al. 1999, PAYNE et al. 2003, LÜDER et al. 2009), was sowohl in der akuten als auch chronischen Phase der Infektion von Bedeutung ist (HEUSSLER et al. 2001).

Mittels Konfokalmikroskopie der infizierten HBK-Ausstriche konnten ebenfalls Monozyten/Makrophagen als Zielzellen von *T. gondii* bestätigt werden (PUBLIKATION 2). Eine zusätzliche BU1-Färbung ließ *T. gondii*-positive B-Lymphozyten erkennen, was im Einklang mit den durchflusszytometrischen Ergebnissen ist. Mit Hilfe einer CD8 α -Färbung konnten vereinzelt *T. gondii*-positive zytotoxische T-Lymphozyten detektiert werden. Obwohl eine rein zufällige Ko-Lokalisation von

T. gondii und zytotoxischen T-Lymphozyten denkbar wäre, deuten die durchflusszytometrischen Daten auf eine geringe Infektionsrate dieser T-Lymphozytenpopulation hin (1,12 %). Im Gegensatz zu der von MALKWITZ et al. (2017) beschriebenen *T. gondii*-Replikation in reinen Monozyten/Makrophagenkulturen, konnte in der gewonnenen HBK 24 h p. i. keine Parasitenreplikation in Wirtszellen visualisiert werden. An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass die visuelle Untersuchung mittels Konfokalmikroskopie lediglich zum Zeitpunkt 24 h p. i. durchgeführt wurde, was hinsichtlich der Replikationsbeurteilung eine Schwäche des Experiments darstellt. Zusätzliche spätere Untersuchungszeitpunkte wie z. B. 48 h p. i. würden vermutlich weiteren Aufschluss geben.

Zusammenfassend konnte in der In-vivo-Koinfektionsstudie die erfolgreiche *T. gondii*- und *Eimeria* spp.-Infektion in den entsprechenden Versuchshühnern mittels verschiedener Parameter validiert werden. Dass der direkte *T. gondii*-DNA Nachweis mit nPCR bzw. MC-PCR nur in etwa der Hälfte der seropositiven Hühner möglich war, lässt auf eine geringe *T. gondii*-Dichte in den untersuchten Geweben schließen. Zu beachten ist die generell inhomogene Verteilung der *T. gondii*-Zysten sowie eine geringe Zystendichte im Gewebe. Eine klinische Toxoplasmose trat bei keinem Versuchstier auf. Die *Eimeria*-Merogonie scheint in koinfizierten Hühnern stärker ausgeprägt zu sein, allerdings ohne zu wesentlichen Unterschieden in der Oozystenausscheidung im Vergleich zur alleinigen Eimerieninfektion zu führen. Es waren Anstiege der mRNA-Expression von Th1- (IFN- γ , IL-12, TNF- α) und Th2- (IL-10) bezogenen Zytokinen bei alleiniger Infektion mit *Eimeria* spp. und Koinfektion feststellbar. Die Pathologie und Immunantwort des Wirtes unterschieden sich bei Vorliegen einer Koinfektion nur unwesentlich von einer Eimerienmonoinfektion. Umgekehrt betrachtet ließen sich keine Effekte von *Eimeria* auf die Quantität der *T. gondii*-positiven Gewebeproben beobachten. Auch wenn in dieser nach meinem Wissen ersten In-vivo-Koinfektionsstudie von *T. gondii* und *Eimeria* spp. im Huhn keine erheblichen Wechselwirkungen zwischen den Erregern festgestellt werden konnten, halte ich es für sinnvoll, mögliche Interaktionen dieser weltweit häufig vorkommenden Parasiten in zukünftigen experimentellen Studien zu untersuchen. Dabei finde ich es insbesondere interessant, ein Studiensetup zu kreieren, was die Feldsituation besonders realistisch widerspiegelt, wie z. B. die *T. gondii*-Infektion via Oozysten in Kombination mit der Verwendung eines gemischten *Eimeria*-Isolats.

Mit Hilfe des In-vitro-*T. gondii*-Infektionsversuches unter Verwendung von gemischten Hühnerblutzellkulturen konnte ich Monozyten/Makrophagen als Hauptzielzellen von *T. gondii* bestätigen und folgern, dass diese Zellen eine Schlüsselrolle im Huhn nach *T. gondii*-Infektion nicht nur als Wirtszellen, sondern auch als Trigger der Immunantwort und in der Aktivierung der Wirtsabwehr spielen. Dies unterstützen die Ergebnisse aus der mRNA-Expressionsanalyse, in der vornehmlich signifikant erhöhte iNOS-Level detektiert werden konnten, was für eine Aktivierung der Monozyten/Makrophagen und damit der angeborenen zellulären Immunantwort spricht. Darüber hinaus zeigten Durchflusszytometrie und Konfokalmikroskopie konkrete Anhaltspunkte, dass auch B-Lymphozyten und in einem geringen Maße zytotoxische T-Lymphozyten als Wirtszellen von *T. gondii* in Betracht gezogen werden müssen. Der Abfall an Parasitenstadien bis 48 h p. i. zeigt, dass Hühnerblut vermutlich kein bevorzugtes Replikationsmedium für *T. gondii* darstellt und primär zur Verbreitung des Parasiten im Wirt genutzt wird. Da diese Studie ebenfalls als Pilotprojekt für Untersuchungen von Mischinfektionen mit verschiedenen Apicomplexa-Gattungen einzustufen ist, ist eine weiterführende

Diskussion

Untersuchung des Themas durchaus sinnvoll. Die Wechselwirkungen zwischen Parasitenreplikation, Zytokinexpression und Zusammensetzung der Blutzellkultur verdienen in Folgestudien Beachtung.

6 Zusammenfassung

Lysanne Hiob

Untersuchungen zu *Toxoplasma gondii*- und *Eimeria tenella*-Koinfektionen im Huhn sowie Parasit-Wirt-Interaktionen in *Toxoplasma gondii*-infizierten Hühnerblutzellkulturen

Institut für Parasitologie der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im September 2019

48 Seiten, 1 Tabelle, 365 Literaturangaben

Schlüsselwörter: *T. gondii*, *E. tenella*, Koinfektionen, Huhn, Zytokine

Einleitung

Die apikomplexen Parasiten *Toxoplasma (T.) gondii* und *Eimeria (E.) tenella* sind weit verbreitete und wichtige Krankheitserreger mit hoher Prävalenz bei Geflügel. Es ist davon auszugehen, dass Koinfektionen mit diesen beiden Parasiten bei Hühnern im Feld häufig vorkommen.

Ziele der Untersuchungen

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, *in vivo* die gegenseitigen Einflüsse bei *T. gondii*- und *Eimeria* spp.-koinfizierten Hühnern zu untersuchen, wobei der Schwerpunkt auf der Immunantwort und dem Infektionsverlauf lag. In einer anschließenden In-vitro-Studie wurden die Wechselwirkungen zwischen Parasiten und Wirtszellen in einer gemischten Hühnerblutzellkultur nach Infektion mit *T. gondii*-Tachyzoiten untersucht und potenzielle Wirtszellen für *T. gondii* nachgewiesen.

Tiere, Material und Methoden

Zwei separate In-vivo-Versuche wurden mit insgesamt 96 Eintagsküken durchgeführt, die in vier Studiengruppen unterteilt waren: Gruppe NC (nicht infizierte Negativkontrolle), Gruppe PC-T (orale oder intramuskuläre Infektion mit *T. gondii*-Oozysten (Versuch 1) bzw. Tachyzoiten (Versuch 2)), Gruppe PC-E (orale Infektion mit *E. tenella* (Versuch 1) oder *E. tenella* plus *E. acervulina*-Oozysten (Versuch 2)) und Koinfektionsgruppe TE (*T. gondii* + *Eimeria* spp.). Die *T. gondii*-Infektion wurde durch direkten DNA-Nachweis in verschiedenen Geweben unter Verwendung von nPCR (nested Polymerase-Kettenreaktion) und MC-PCR (magnetic capture PCR) und indirekt durch Immunoblot zum Nachweis von *T. gondii*-spezifischen Antikörpern validiert. Der klinische Verlauf der *Eimeria*-Infektion wurde hinsichtlich Oozystenausscheidung, Körpergewichtszunahme, Beurteilung von Darmveränderungen (Lesion scoring) und mikroskopischer Auswertung von Darmschleimhautabstrichen auf parasitäre Stadien untersucht. Zusätzlich wurde die Expression von Zytokin-mRNA in Darm- und Milzgewebe zu zwei verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion mittels qPCR (quantitative PCR) untersucht.

Die In-vitro-Studie bestand aus zwei aufeinanderfolgenden Experimenten mit acht (Experiment 1) und sechs (Experiment 2) Hühnern zur individuellen Blutentnahme. In Experiment 1 wurde die erhaltene Hühnerblutzellmischkultur mit *T. gondii*-Tachyzoiten (ME49) zu einer MOI (Multiplizität der Infektion) von 1 Tachyzoit pro Blutzelle infiziert und die Parasitenreplikation sowie iNOS (induzierbare Stickoxidsynthase) und die Zytokin-mRNA-Expression zwischen 1 h und 48 h p. i. (post infectionem)

Zusammenfassung

untersucht. Durch Verwendung von *T. gondii* RH-GFP-Tachyzoiten, die ein grün fluoreszierendes Protein exprimieren, konzentrierte sich Experiment 2 auf die Visualisierung infizierter Zellen mittels Konfokalmikroskopie (CLSM) und die Detektion möglicher Unterschiede zwischen Infektions- und Kontrollkultur hinsichtlich der Zellzusammensetzung 24 h p. i. mittels Durchflusszytometrie.

Ergebnisse

Der Nachweis *T. gondii*-spezifischer Antikörper war ab 4 Tage p. i. möglich und 22,1 % aller Gewebeproben von infizierten Hühnern waren *T. gondii*-positiv. Die Merogonien von *Eimeria* spp. schienen durch Koinfektion mit *T. gondii* stimuliert zu werden, ohne dass deutliche Unterschiede in der Oozystenausscheidung zwischen koinfizierten und *Eimeria* spp.-monoinfizierten Hühnern auftraten. Im Versuch 2 traten schwere Darmläsionen auf, als das Inokulum zusätzlich *E. acervulina*-Oozysten enthielt. Das mikroskopische Scoring offenbarte mehr *Eimeria*-Meronten in Gruppe TE im Vergleich zu PC-E, obwohl dieser Unterschied statistisch nicht signifikant war. Ein Anstieg der mRNA-Expression von Th1- (IFN- γ , IL-12, TNF- α) und Th2-bezogenen Zytokinen (IL-10) wurde hauptsächlich in *Eimeria* spp.-infizierten Hühnern beobachtet, jedoch ohne statistisch signifikante Unterschiede zwischen Koinfektion und Einzelinfektion mit *Eimeria* spp. Die *T. gondii*-Immunantwort war lediglich marginal.

Im In-vitro-Experiment zeigte die *T. gondii*-Replikationskurve einen massiven Rückgang der Parasitenstadien bis 24 h p. i., gefolgt von einer annähernden Plateauphase. Es wurden hauptsächlich signifikant erhöhte iNOS-mRNA-Expressionswerte in der *T. gondii*-infizierten Kultur im Vergleich zu nicht infizierten Zellen beobachtet. Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Infektions- und Kontrollkultur in Bezug auf die Zellzusammensetzung festgestellt. Die CLSM- und Durchflusszytometrie-Daten bestätigten Monozyten/Makrophagen als Hauptzielzellen für *T. gondii*. B-Zellen und zytotoxische T-Zellen waren in geringem Maße befallen.

Schlussfolgerungen

Die In-vivo-Pilotstudie zeigte, dass der größte Teil der Immunantwort auf die *Eimeria*-Infektion zurückzuführen ist. *Eimeria* zeigte keinen Einfluss auf die Menge der *T. gondii*-positiven Gewebeproben. Obwohl diese erste Koinfektionsstudie nur begrenzte gegenseitige Effekte zeigte, ist es aufgrund der hohen Prävalenz und Bedeutung beider Erreger sinnvoll, Wechselwirkungen in weiteren Studien zu untersuchen. Daten aus der In-vitro-Studie belegen, dass Monozyten/Makrophagen eine Schlüsselrolle bei der *T. gondii*-Infektion im Huhn spielen, sowohl als Wirtszellen als auch bei der Auslösung der Immunantwort. B-Zellen und zytotoxische T-Zellen könnten potentielle Wirtszellen für *T. gondii* sein. Da in der Hühnerblutzellmischkultur vor allem ein Abfall der *T. gondii*-Replikation bis 48 h p. i. beobachtet wurde, ist davon auszugehen, dass Hühnerblut kein bevorzugtes Replikationsmedium für *T. gondii* ist und überwiegend nur dem Parasitentransport im Wirt dient.

7 Summary

Lysanne Hiob

Studies on *Toxoplasma gondii* and *Eimeria tenella* co-infections in chicken and parasite-host interactions in *Toxoplasma gondii*-infected chicken blood cell cultures

Institute of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Leipzig University

Submitted in September 2019

48 pages, 1 table, 365 references

Keywords: *T. gondii*, *E. tenella*, co-infection, chicken, cytokines

Introduction

The apicomplexan parasites *Toxoplasma (T.) gondii* and *Eimeria (E.) tenella* are widespread and important pathogens with high prevalence in poultry. It can be assumed that co-infections with these two parasites in chicken occur frequently in the field.

Aims of investigations

The aim of the present work was to investigate *in vivo* mutual influences in *T. gondii* and *Eimeria* spp. co-infected chickens, focusing on immune response and course of infection. In a subsequent *in vitro* study, parasite-host cell interactions in a mixed chicken blood cell culture after infection with *T. gondii* tachyzoites were evaluated and potential host cells for *T. gondii* were examined.

Animals, Material and Methods

Two separate *in vivo* trials were performed using a total of 96 1-day-old chicken, divided into four study groups: group NC (uninfected negative control), group PC-T (oral or intramuscular infection with *T. gondii* oocysts (trial 1) or tachyzoites (trial 2) respectively), group PC-E (oral infection with *E. tenella* (trial 1) or *E. tenella* and *E. acervulina* oocysts (trial 2)) and co-infection group TE (*T. gondii* + *Eimeria* spp.). *T. gondii* infection was validated by direct DNA detection in different tissues using nPCR (nested polymerase chain reaction) and MC-PCR (magnetic capture PCR) and indirectly by immunoblot for detection of *T. gondii*-specific antibodies. The clinical course of *Eimeria* infection was examined in terms of oocyst excretion, body weight gains, determination of gut lesions (lesion scoring) and microscopic evaluation of gut mucosa smears for parasitic stages. Additionally, cytokine mRNA expression in gut and spleen tissue was investigated at two different time points after infection by qPCR (quantitative PCR).

The *in vitro* study consisted of two subsequent experiments using eight (experiment 1) and six (experiment 2) chicken for individual blood sampling. In Experiment 1 the obtained mixed chicken blood cell culture was infected with *T. gondii* tachyzoites (ME49) at a MOI (multiplicity of infection) of 1 tachyzoite per blood cell and parasite replication as well as iNOS (inducible nitric oxide synthase) and cytokine mRNA expression between 1 h and 48 h p. i. (post infection) were examined. By using *T. gondii* RH-GFP tachyzoites expressing a green fluorescent protein in experiment 2, the experiment focused

Summary

on visualizing infected cells by CLSM (confocal laser scanning microscopy) and possible differences between infected and control culture regarding cellular composition at 24 h p. i. by means of flow cytometry.

Results

Detection of *T. gondii*-specific antibodies was possible earliest 4 days p. i. and 22.1 % of all tissue samples were *T. gondii*-positive from infected chicken. *Eimeria* spp. merogonies seemed to be enhanced by co-infection with *T. gondii*, interestingly without marked differences in oocyst excretion between co-infected and *Eimeria* spp. mono-infected chickens. High intestinal lesion scores occurred in trial 2, when the inoculum additionally contained *E. acervulina* oocysts. More *Eimeria* meronts were detected in microscopical scoring in the co-infected group as compared to PC-E, although this was not statistically evident. An increase of mRNA expression of Th1- (IFN- γ , IL-12, TNF- α) and Th2-related cytokines (IL-10) were observed mainly in *Eimeria* spp.-infected chickens of groups PC-E and TE, however, without statistically significant differences between co-infection and single infection with *Eimeria* spp. Immune response to *T. gondii* infection turned out to be marginal only.

In the *in vitro* experiment, the parasite replication curve showed a massive decrease of parasite stages until 24 h p. i. followed by an approximate plateau phase. Significantly increased iNOS mRNA expression levels in *T. gondii*-infected culture compared to uninfected cells were observed. No statistically significant differences were detected between infected and control culture in respect to cellular composition. CLSM and flow cytometry data confirmed monocytes/macrophages as main target cells for *T. gondii*. Additionally, different lymphocytes subpopulations like B cells and cytotoxic T cells seem to be targeted to a low extent.

Conclusions

The *in vivo* pilot study demonstrated that most of the measurable immune response could be attributed to *Eimeria* infection. *Eimeria* displayed no effect on the quantity of *T. gondii*-positive tissue samples. Although this first study about co-infection did not reveal major mutual effects, due to the high prevalence and importance of both pathogens it appears reasonable to consider such interactions in further experimental setups. Data of the *in vitro* study indicate that monocytes/macrophages play a key role during *T. gondii* infection in chickens both as host cells and in triggering of immune response. B cells and cytotoxic T cells seem to be potential host cells for *T. gondii*. As a decrease in *T. gondii* replication until 48 h p. i. was observed in the mixed chicken blood cell culture, it can be assumed that chicken blood is not a preferred replication medium for *T. gondii* and may serve predominantly for parasite transport in the host.

8 Literaturverzeichnis

Adams LB, Hibbs JB Jr, Taintor RR, Krahenbuhl JL. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. J Immunol. 1990; 144(7):2725-2729.

Adelmann HB. The Embryological Treatises of Hieronymus Fabricius of Aquapendente. Ithaca, New York: Cornell University Press; 1942.

Aliberti J, Reis e Sousa C, Schito M, Hieny S, Wells T, Huffnagle GB, Sher A. CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. Nat Immunol. 2000; 1(1):83-87.

Aliberti J, Valenzuela JG, Carruthers VB, Hieny S, Andersen J, Charest H, Reis e Sousa C, Fairlamb A, Ribeiro JM, Sher A. Molecular mimicry of a CCR5 binding-domain in the microbial activation of dendritic cells. Nat Immunol. 2003; 4(5):485-490.

Allen PC, Fetterer RH. Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. Clin Microbiol Rev. 2002; 15(1):58-65.

Alnassan AA, Kotsch M, Shehata AA, Krüger M, Dauschies A, Bangoura B. Necrotic enteritis in chickens: development of a straightforward disease model system. Vet Rec. 2014; 174(22):555.

Alnassan AA, Shehata AA, Kotsch M, Schrödl W, Krüger M, Dauschies A, Bangoura B. Efficacy of early treatment with toltrazuril in prevention of coccidiosis and necrotic enteritis in chickens. Avian Pathol. 2013; 42(5):482-490.

Anderson SE Jr, Remington JS. Effect of normal and activated human macrophages on *Toxoplasma gondii*. J Exp Med. 1974; 139(5):1154-1174.

Appleford PJ, Smith JE. *Toxoplasma gondii*: the growth characteristics of three virulent strains. Acta Trop. 1997; 65(2):97-104.

Aubert D, Maine GT, Villena I, Hunt JC, Howard L, Sheu M, Brojanac S, Chovan LE, Nowlan SF, Pinon JM. Recombinant antigens to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G and immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay. J Clin Microbiol. 2000; 38:1144-1150.

Avery S, Rothwell L, Degen WD, Schijns VE, Young J, Kaufman J, Kaiser P. Characterization of the first nonmammalian T2 cytokine gene cluster: the cluster contains functional single-copy genes for IL-3, IL-4, IL-13, and GM-CSF, a gene for IL-5 that appears to be a pseudogene, and a gene encoding another cytokinelike transcript, KK34. J Interferon Cytokine Res. 2004; 24(10):600-610.

Baba E, Fukata T, Arakawa A. Establishment and persistence of *Salmonella typhimurium* infection stimulated by *Eimeria tenella* in chickens. Res Vet Sci. 1982; 33(1):95-98.

Baba E, Ikemoto T, Fukata T, Sasai K, Arakawa A, McDougald LR. Clostridial population and the intestinal lesions in chickens infected with *Clostridium perfringens* and *Eimeria necatrix*. Vet Microbiol. 1997; 54(3-4):301-308.

Literaturverzeichnis

- Bangoura B, Alnassan AA, Lendner M, Shehata AA, Krüger M, Dausgschies A. Efficacy of an anticoccidial live vaccine in prevention of necrotic enteritis in chickens. *Exp Parasitol*. 2014; 145:125-134.
- Bangoura B, Zöller B, Dausgschies A. Vorkommen und Bedeutung der aviären *Toxoplasma gondii*-Infektionen in Europa. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr*. 2011; 124:485-496.
- Befus AD, Johnston N, Leslie GA, Bienenstock J. Gut-associated lymphoid tissue in the chicken. I. Morphology, ontogeny, and some functional characteristics of Peyer's patches. *J Immunol*. 1980; 125(6):2626-2632.
- Berndt A, Methner U. Gamma/delta T cell response of chickens after oral administration of attenuated and non-attenuated *Salmonella typhimurium* strains. *Vet Immunol Immunopathol*. 2001; 78(2):143-161.
- Berndt A, Pieper J, Methner U. Circulating gamma delta T cells in response to *Salmonella enterica* serovar enteritidis exposure in chickens. *Infect Immun*. 2006; 74(7):3967-3978.
- Bessay M, Le Vern Y, Kerboeuf D, Yvoré P, Quéré P. Changes in intestinal intra-epithelial and systemic T-cell subpopulations after an *Eimeria* infection in chickens: comparative study between *E. acervulina* and *E. tenella*. *Vet Res*. 1996; 27(4-5):503-514.
- Biancifiori F, Rondini C, Grelloni V, Frescura T. Avian toxoplasmosis: experimental infection of chicken and pigeon. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 1986; 9(4):337-346.
- Blake DP. *Eimeria* genomics: Where are we now and where are we going? *Vet Parasitol*. 2015; 212(1-2):68-74.
- Blake DP, Tomley FM. Securing poultry production from the ever-present *Eimeria* challenge. *Trends Parasitol*. 2014; 30(1):12-19.
- Bockman DE, Cooper MD. Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the bursa of Fabricius, appendix, and Peyer's patches. An electron microscopic study. *Am J Anat*. 1973; 136(4):455-477.
- Bohne W, Holpert M, Gross U. Stage differentiation of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Immunobiology*. 1999; 201:248-254.
- Bouchot A, Millot JM, Charpentier S, Bonhomme A, Villena I, Aubert D, Pinon JM. Membrane potential changes after infection of monocytes by *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol*. 2001; 31(10):1114-1120.
- Bucy RP, Chen CL, Cihak J, Lösch U, Cooper MD. Avian T cells expressing gamma delta receptors localize in the splenic sinusoids and the intestinal epithelium. *J Immunol*. 1988; 141(7):2200-2205.
- Bucy RP, Coltey M, Chen CI, Char D, Le Douarin NM, Cooper MD. Cytoplasmic CD3+ surface CD8+ lymphocytes develop as a thymus-independent lineage in chick-quail chimeras. *Eur J Immunol*. 1989; 19(8):1449-1455.
- Burg JL, Perelman D, Kasper LH, Ware PL, Boothroyd JC. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*. 1988; 141:3584-3591.

Literaturverzeichnis

- Burns RB. Histology and immunology of Peyer's patches in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). Res Vet Sci. 1982; 32(3):359-367.
- Butcher BA, Denkers EY. Mechanism of entry determines the ability of *Toxoplasma gondii* to inhibit macrophage proinflammatory cytokine production. Infect Immun. 2002; 70(9):5216-5224.
- Byrnes S, Eaton R, Kogut M. *In vitro* interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha production by macrophages from chickens infected with either *Eimeria maxima* or *Eimeria tenella*. Int J Parasitol. 1993; 23(5):639-645.
- Cesbron-Delauw MF, Tomavo S, Beauchamps P, Fourmaux MP, Camus D, Capron A, Dubremetz JF. Similarities between the primary structures of two distinct major surface proteins of *Toxoplasma gondii*. J Biol Chem. 1994; 269(23):16217-16222.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science. 1994; 263(5148):802-805.
- Chamanza R, van Veen L, Tivapasi MT, Toussaint MJM. Acute phase proteins in the domestic fowl. Wld. Poultry Sci. 1999; 55:61-70.
- Chang HR, Grau GE, Pechère JC. Role of TNF and IL-1 in infections with *Toxoplasma gondii*. Immunology. 1990; 69(1):33-37.
- Channon JY, Seguin RM, Kasper LH. Differential infectivity and division of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood leukocytes. Infect Immun. 2000; 68(8):4822-4826.
- Chapman HD. Milestones in avian coccidiosis research: a review. Poult Sci. 2014; 93(3):501-511.
- Chapman HD, Shirley MW. The Houghton strain of *Eimeria tenella*: a review of the type strain selected for genome sequencing. Avian Pathol. 2003; 32(2):115-127.
- Chen CL, Ager LL, Gartland GL, Cooper MD. Identification of a T3/T cell receptor complex in chickens. J Exp Med. 1986; 164(1):375-380.
- Chen CLH, Pickel JM, Lahti JM, Cooper MD. Surface markers on avian immune cells. In: Sharma JM, Hrsg. Avian Cellular Immunology. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1991. p. 1-22.
- Chessum BS. Reactivation of *Toxoplasma* oocyst production in the cat by infection with *Isospora felis*. Br Vet J. 1972; 128:33-36.
- Chiappino ML, Nichols BA, O'Connor GR. Scanning electron microscopy of *Toxoplasma gondii*: parasite torsion and host-cell responses during invasion. J Protozool. 1984; 31(2):288-292.
- Choi KD, Lillehoj HS. Role of chicken IL-2 on gammadelta T-cells and *Eimeria acervulina*-induced changes in intestinal IL-2 mRNA expression and gammadelta T-cells. Vet Immunol Immunopathol. 2000; 73(3-4):309-321.
- Chtanova T, Han SJ, Schaeffer M, van Dooren GG, Herzmark P, Striepen B, Robey EA. Dynamics of T cell, antigen-presenting cell, and pathogen interactions during recall responses in the lymph node. Immunity. 2009; 31(2):342-355.

Ciriaco E, Píñera PP, Díaz-Esnal B, Laurà R. Age-related changes in the avian primary lymphoid organs (thymus and bursa of Fabricius). *Microsc Res Tech.* 2003; 62(6):482-487.

Collier CT, Hofacre CL, Payne AM, Anderson DB, Kaiser P, Mackie RI, Gaskins HR. Coccidia-induced mucogenesis promotes the onset of necrotic enteritis by supporting *Clostridium perfringens* growth. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008; 122(1-2):104-115.

Cornelissen JB, Swinkels WJ, Boersma WA, Rebel JM. Host response to simultaneous infections with *Eimeria acervulina*, *maxima* and *tenella*: a cumulation of single responses. *Vet Parasitol.* 2009; 162(1-2):58-66.

Couper KN, Roberts CW, Brombacher F, Alexander J, Johnson LL. *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin M limits parasite dissemination by preventing host cell invasion. *Infect Immun.* 2005; 73(12):8060-8068.

Courret N, Darche S, Sonigo P, Milon G, Buzoni-Gâtel D, Tardieux I. CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. *Blood.* 2006; 107(1):309-316.

Cui N, Wang Q, Shi W, Han L, Wang J, Ma X, Li H, Wang F, Su S, Zhao X. Synergy of subgroup J avian leukosis virus and *Eimeria tenella* to increase pathogenesis in specific-pathogen-free chickens. *Vet Immunol Immunopathol.* 2016; 177:42-47.

Da Gama LM, Ribeiro-Gomes FL, Guimarães U Jr, Arnholdt AC. Reduction in adhesiveness to extracellular matrix components, modulation of adhesion molecules and *in vivo* migration of murine macrophages infected with *Toxoplasma gondii*. *Microbes Infect.* 2004; 6(14):1287-1296.

Dalloul RA, Lillehoj HS. Poultry coccidiosis: recent advancements in control measures and vaccine development. *Expert Rev Vaccines.* 2006; 5(1):143-163.

DaMatta RA, Seabra SH, Manhães L, de Souza W. Nitric oxide is not involved in the killing of *Trypanosoma cruzi* by chicken macrophages. *Parasitol Res.* 2000; 86(3):239-243.

Deckert-Schlüter M, Albrecht S, Hof H, Wiestler OD, Schlüter D. Dynamics of the intracerebral and splenic cytokine mRNA production in *Toxoplasma gondii*-resistant and -susceptible congenic strains of mice. *Immunology.* 1995; 85(3):408-418.

Degen WG, van Daal N, Rothwell L, Kaiser P, Schijns VE. Th1/Th2 polarization by viral and helminth infection in birds. *Vet Microbiol.* 2005; 105(3-4):163-167.

Degen WG, van Daal N, van Zuilekom HI, Burnside J, Schijns VE. Identification and molecular cloning of functional chicken IL-12. *J Immunol.* 2004; 172(7):4371-4380.

del Cacho E, Gallego M, Lee SH, Lillehoj HS, Quilez J, Lillehoj EP, Sánchez-Acedo C. Induction of protective immunity against *Eimeria tenella* infection using antigen-loaded dendritic cells (DC) and DC-derived exosomes. *Vaccine.* 2011; 29(21):3818-3825.

del Cacho E, Gallego M, Lee SH, Lillehoj HS, Quilez J, Lillehoj EP, Sánchez-Acedo C. Induction of protective immunity against *Eimeria tenella*, *Eimeria maxima*, and *Eimeria acervulina* infections using dendritic cell-derived exosomes. *Infect Immun.* 2012; 80(5):1909-1916.

- del Cacho E, Gallego M, Marcotegui MA, Bascuas JA. Follicular dendritic cell activation in the harderian gland of the chicken. *Vet Immunol Immunopathol.* 1993; 35(3-4):339-351.
- Denkers EY, Schneider AG, Cohen SB, Butcher BA. Phagocyte responses to protozoan infection and how *Toxoplasma gondii* meets the challenge. *PLoS Pathog.* 2012; 8(8):e1002794.
- Dias RR, Carvalho EC, Leite CC, Tedesco RC, Calabrese Kda S, Silva AC, DaMatta RA, de Fatima Sarro-Silva M. *Toxoplasma gondii* oral infection induces intestinal inflammation and retinochoroiditis in mice genetically selected for immune oral tolerance resistance. *PLoS One.* 2014; 9(12):e113374.
- Digby MR, Lowenthal JW. Cloning and expression of the chicken interferon-gamma gene. *J Interferon Cytokine Res.* 1995; 15(11):939-945.
- Dobrowolski JM, Sibley LD. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by actin cytoskeleton of the parasite. *Cell.* 1996; 84:933-939.
- Donahoe SL, Phalen DN, McAllan BM, O'Meally D, McAllister MM, Ellis J, Šlapeta J. Differential Gamma Interferon- and Tumor Necrosis Factor Alpha-Driven Cytokine Response Distinguishes Acute Infection of a Metatherian Host with *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. *Infect Immun.* 2017; 85(6). pii: e00173-17.
- Dubey JP. Reshedding of *Toxoplasma* oocysts by chronically infected cats. *Nature.* 1976; 262:213-214.
- Dubey JP. *Toxoplasma*, *Hammondia*, *Besnoitia*, *Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidia of man and animals. In: Kreier JP, Hrsg. *Parasitic protozoa*. 3. Aufl. New York, N.Y: Academic Press, Inc.; 1977. p. 101–237.
- Dubey JP. Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T. gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. *Am J Vet Res.* 1988; 49(6):910-913.
- Dubey JP. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. *J Parasitol.* 1995; 81:410-415.
- Dubey JP. Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. *J Parasitol.* 1996; 82:957-961.
- Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 1998; 28(7):1019-1024.
- Dubey JP. Oocyst shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. *J Parasitol.* 2001; 87(1):215-219.
- Dubey JP. A review of toxoplasmosis in wild birds. *Vet Parasitol.* 2002; 106:121-153.
- Dubey JP. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 2009; 39:877-882.
- Dubey JP. *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): prevalence, clinical disease, diagnosis and public health significance. *Zoonoses Public Health.* 2010; 57:60-73.

Literaturverzeichnis

- Dubey JP, Edelhofer R, Marcet P, Vianna MC, Kwok OC, Lehmann T. Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* infections in free-range chickens from Austria. *Vet Parasitol.* 2005; 133(4):299-306.
- Dubey JP, Frenkel JK. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J Protozool.* 1972; 19:155-177.
- Dubey JP, Frenkel JK. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. *J Protozool.* 1976; 23:537-546.
- Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK. Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol.* 1970a; 56:447-456.
- Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J Exp Med.* 1970b; 132:636-662.
- Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11:267-299.
- Dubey JP, Ruff MD, Camargo ME, Shen SK, Wilkins GL, Kwok OC, Thulliez P. Serologic and parasitologic responses of domestic chickens after oral inoculation with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Am J Vet Res.* 1993; 54(10):1668-1672.
- Dubey JP, Webb DM, Sundar N, Velmurugan GV, Bandini LA, Kwok OC, Su C. Endemic avian toxoplasmosis on a farm in Illinois: clinical disease, diagnosis, biologic and genetic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*), and a goose (*Anser anser*). *Vet Parasitol.* 2007; 148(3-4):207-212.
- Dunay IR, Damatta RA, Fux B, Presti R, Greco S, Colonna M, Sibley LD. Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity.* 2008; 29(2):306-317.
- Dunay IR, Sibley LD. Monocytes mediate mucosal immunity to *Toxoplasma gondii*. *Curr Opin Immunol.* 2010; 22(4):461-466.
- Dupont CD, Christian DA, Hunter CA. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. *Semin Immunopathol.* 2012; 34(6):793-813.
- Erichsen S, Harboe A. Toxoplasmosis in chickens. I. An epidemic outbreak of toxoplasmosis in a chicken flock in South-Eastern Norway. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1953; 33(1):56-71.
- Fair JM, Taylor-McCabe KJ, Shou Y, Marrone BL. Immunophenotyping of chicken peripheral blood lymphocyte subpopulations: individual variability and repeatability. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008; 125(3-4):268-273.
- Fantham HB. The morphology and life-history of *Eimeria (coccidium) avium*: A sporozoön causing a fatal disease among young grouse. *Proc. Zool. Soc. Lond.* 1910; 3:672-691.
- Farr MM, Wehr EE. Survival of *Eimeria acervulina*, *E. tenella*, and *E. maxima* oocysts on soil under various field conditions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1949; 52:468-472.

Literaturverzeichnis

- Fatoba AJ, Adeleke MA. Diagnosis and control of chicken coccidiosis: a recent update. *J Parasit Dis.* 2018; 42(4):483-493.
- Ferguson DJ, Birch-Andersen A, Siim JC, Hutchison WM. Ultrastructural studies on the sporulation of oocysts of *Toxoplasma gondii*. III. Formation of the sporozoites within the sporocysts. *Acta Pathol Microbiol Scand B.* 1979; 87:253-260.
- Ferguson DJ, Hutchison WM. An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. *Parasitol Res.* 1987a; 73:483-491.
- Ferguson DJ, Hutchison WM. The host-parasite relationship of *Toxoplasma gondii* in the brains of chronically infected mice. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1987b; 411:39-43.
- Fernando MA, Rose ME, Millard BJ. *Eimeria* spp. of domestic fowl: the migration of sporozoites intra- and extra-enterically. *J Parasitol.* 1987; 73(3):561-567.
- Frenkel JK. *Toxoplasma* in and around Us. *BioScience.* 1973; 23(6):343-352.
- Freyre A, Dubey JP, Smith DD, Frenkel JK. Oocyst-induced *Toxoplasma gondii* infections in cats. *J Parasitol.* 1989; 75:750-755.
- Fukui A, Inoue N, Matsumoto M, Nomura M, Yamada K, Matsuda Y, Toyoshima K, Seya T. Molecular cloning and functional characterization of chicken toll-like receptors. A single chicken toll covers multiple molecular patterns. *J Biol Chem.* 2001; 276(50):47143-47149.
- Gallego M, Olah I, Del Cacho E, Glick B. Anti-S-100 antibody recognizes ellipsoid-associated cells and other dendritic cells in the chicken spleen. *Dev Comp Immunol.* 1993; 17(1):77-83.
- Garceau V, Smith J, Paton IR, Davey M, Fares MA, Sester DP, Burt DW, Hume DA. Pivotal Advance: Avian colony-stimulating factor 1 (CSF-1), interleukin-34 (IL-34), and CSF-1 receptor genes and gene products. *J Leukoc Biol.* 2010; 87(5):753-764.
- Garcia-Camacho L, Schat KA, Brooks R Jr, Bounous DI. Early cell-mediated immune responses to Marek's disease virus in two chicken lines with defined major histocompatibility complex antigens. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003; 95(3-4):145-153.
- Gaunson JE, Philip CJ, Whithear KG, Browning GF. The cellular immune response in the tracheal mucosa to *Mycoplasma gallisepticum* in vaccinated and unvaccinated chickens in the acute and chronic stages of disease. *Vaccine.* 2006; 24(14):2627-2633.
- Gavrilescu LC, Denkers EY. IFN-gamma overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol.* 2001; 167(2):902-909.
- Gazzinelli RT, Amichay D, Sharton-Kersten T, Grunwald E, Farber JM, Sher A. Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996; 219:127-139.
- Gazzinelli RT, Denkers EY, Sher A. Host resistance to *Toxoplasma gondii*: model for studying the selective induction of cell-mediated immunity by intracellular parasites. *Infect Agents Dis.* 1993a; 2(3):139-149.

Literaturverzeichnis

- Gazzinelli RT, Eltoun I, Wynn TA, Sher A. Acute cerebral toxoplasmosis is induced by *in vivo* neutralization of TNF-alpha and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. *J Immunol.* 1993b; 151(7):3672-3681.
- Gazzinelli RT, Hieny S, Wynn TA, Wolf S, Sher A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993c; 90(13):6115-6119.
- Gazzinelli RT, Oswald IP, James SL, Sher A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *J Immunol.* 1992; 148(6):1792-1796.
- Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, Denkers EY, Hieny S, Caspar P, Trinchieri G, Sher A. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 1994; 153(6):2533-2543.
- Georgieva T M, Koinarski VN, Urumova VS, Marutsovis T, Christov TT, Nikolov J, Chaprazov T, Walshe Kovar RS, Georgiev IP, Koinarski ZV. Effects of *Escherichia coli* infection and *Eimeria tenella* invasion on blood concentration of some positive acute phase proteins (haptoglobin (PIT54), fibrinogen and ceruloplasmin) in chickens. *Rev. Med. Vet.* 2010; 161:84-89.
- Geuthner AC, Koethe M, Ludewig M, Pott S, Schares G, Dauschies A, Bangoura B. Persistence of *Toxoplasma gondii* tissue stages in poultry over a conventional fattening cycle. *Parasitology.* 2014; 141(11):1359-1364.
- Giambone JJ, Anderson WI, Reid WM, Eidson CS. Effect of infectious bursal disease on the severity of *Eimeria tenella* infections in broiler chicks. *Poult Sci.* 1977; 56(1):243-246.
- Gibson MS, Fife M, Bird S, Salmon N, Kaiser P. Identification, cloning, and functional characterization of the IL-1 receptor antagonist in the chicken reveal important differences between the chicken and mammals. *J Immunol.* 2012a; 189(2):539-550.
- Gibson MS, Kaiser P, Fife M. Identification of chicken granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF/CSF3): the previously described myelomonocytic growth factor is actually CSF3. *J Interferon Cytokine Res.* 2009; 29(6):339-343.
- Gibson MS, Salmon N, Bird S, Kaiser P, Fife M. Identification, cloning and characterisation of interleukin-1F5 (IL-36RN) in the chicken. *Dev Comp Immunol.* 2012b; 38(1):136-147.
- Glick B. How it all began: the continuing story of the bursa of Fabricius. In: Toivanen A. and Toivanen P, Hrsg. *Avian Immunology: Basis and Practice.* 1. Aufl. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1987. pp. 17.
- Glick B. Historical perspective: the bursa of Fabricius and its influence on B-cell development, past and present. *Vet Immunol Immunopathol.* 1991; 30(1):3-12.
- Glick B, Chang TS and Jaap RG. The bursa of Fabricius and antibody production. *Poultry Sci.* 1956; 35: 224-225.
- Göbel TW, Kaspers B, Stangassinger M. NK and T cells constitute two major, functionally distinct intestinal epithelial lymphocyte subsets in the chicken. *Int Immunol.* 2001; 13(6):757-762.

Literaturverzeichnis

- Goebel S, Lüder CG, Gross U. Invasion by *Toxoplasma gondii* protects human-derived HL-60 cells from actinomycin D-induced apoptosis. *Med Microbiol Immunol*. 1999; 187(4):221-226.
- Gordon S. Macrophages and the immune response. In: Paul W, Hrsg. *Fundamental Immunology*. Philadelphia: Lippincott Raven; 2003. p. 481-495.
- Guillemot FP, Oliver PD, Peault BM, Le Douarin NM. Cells expressing Ia antigens in the avian thymus. *J Exp Med*. 1984; 160(6):1803-1819.
- Guillermo LV, DaMatta RA. Nitric oxide inhibition after *Toxoplasma gondii* infection of chicken macrophage cell lines. *Poult Sci*. 2004; 83(5):776-782.
- Gyorfy Z, Ohnemus A, Kaspers B, Duda E, Staeheli P. Truncated chicken interleukin-1beta with increased biologic activity. *J Interferon Cytokine Res*. 2003; 23(5):223-228.
- Györke A, Pop L, Cozma V. Prevalence and distribution of *Eimeria* species in broiler chicken farms of different capacities. *Parasite*. 2013; 20:50.
- Hancock RE, Sahl HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol*. 2006; 24(12):1551-1557.
- Haritova AM, Stanilova SA. Enhanced expression of IL-10 in contrast to IL-12B mRNA in poultry with experimental coccidiosis. *Exp Parasitol*. 2012; 132(3):378-382.
- Harker KS, Ueno N, Lodoen MB. *Toxoplasma gondii* dissemination: a parasite's journey through the infected host. *Parasite Immunol*. 2015; 37(3):141-149.
- Harmon BG. Avian heterophils in inflammation and disease resistance. *Poult Sci*. 1998; 77(7):972-927.
- Haug A, Gjevre AG, Thebo P, Mattsson JG, Kaldhusdal M. Coccidial infections in commercial broilers: epidemiological aspects and comparison of *Eimeria* species identification by morphometric and polymerase chain reaction techniques. *Avian Pathol*. 2008; 37(2):161-170.
- Heussler VT, Küenzi P, Rottenberg S. Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *Int J Parasitol*. 2001; 31(11):1166-1176.
- Heydorn AO. Die Katze als Überträger zystenbildender Kokzidien. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr*. 1979; 92:214-220.
- Higgs R, Cormican P, Cahalane S, Allan B, Lloyd AT, Meade K, James T, Lynn DJ, Babiuk LA, O'farrelly C. Induction of a novel chicken Toll-like receptor following *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun*. 2006; 74(3):1692-1698.
- Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect*. 2002; 8:634-640.
- Hong YH, Lillehoj HS, Dalloul RA, Min W, Miska KB, Tuo W, Lee SH, Han JY, Lillehoj EP. Molecular cloning and characterization of chicken NK-lysin. *Vet Immunol Immunopathol*. 2006a; 110(3-4):339-347.

Literaturverzeichnis

- Hong YH, Lillehoj HS, Lee SH, Dalloul RA, Lillehoj EP. Analysis of chicken cytokine and chemokine gene expression following *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006b; 114(3-4):209-223.
- Hong YH, Lillehoj HS, Lillehoj EP, Lee SH. Changes in immune-related gene expression and intestinal lymphocyte subpopulations following *Eimeria maxima* infection of chickens. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006c; 114(3-4):259-272.
- Houssaint E, Belo M, Le Douarin NM. Investigations on cell lineage and tissue interactions in the developing bursa of Fabricius through interspecific chimeras. *Dev Biol.* 1976; 53(2):250-264.
- Houssaint E, Lassila O, Vainio O. Bu-1 antigen expression as a marker for B cell precursors in chicken embryos. *Eur J Immunol.* 1989; 19(2):239-243.
- Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis.* 1995; 172(6):1561-1566.
- Howe DK, Summers BC, Sibley LD. Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun.* 1996; 64:5193-5198.
- Hunn JP, Koenen-Waisman S, Papic N, Schroeder N, Pawlowski N, Lange R, Kaiser F, Zerrahn J, Martens S, Howard JC. Regulatory interactions between IRG resistance GTPases in the cellular response to *Toxoplasma gondii*. *EMBO J.* 2008; 27(19):2495-2509.
- Hunter CA, Subauste CS, Van Cleave VH, Remington JS. Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun.* 1994; 62(7):2818-2824.
- Igyártó BZ, Magyar A, Oláh I. Origin of follicular dendritic cell in the chicken spleen. *Cell Tissue Res.* 2007; 327(1):83-92.
- Iqbal M, Philbin VJ, Smith AL. Expression patterns of chicken Toll-like receptor mRNA in tissues, immune cell subsets and cell lines. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005a; 104(1-2):117-127.
- Iqbal M, Philbin VJ, Withanage GS, Wigley P, Beal RK, Goodchild MJ, Barrow P, McConnell I, Maskell DJ, Young J, Bumstead N, Boyd Y, Smith AL. Identification and functional characterization of chicken toll-like receptor 5 reveals a fundamental role in the biology of infection with *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infect Immun.* 2005b; 73(4):2344-2350.
- Jeurissen SH, Janse EM, Vermeulen AN, Vervelde L. *Eimeria tenella* infections in chickens: aspects of host-parasite: interaction. *Vet Immunol Immunopathol.* 1996; 54(1-4):231-238.
- Johnson WT. Avian coccidiosis. *Poult. Sci.* 1923; 2:146-163.
- Johnson J, Reid WM. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Exp Parasitol.* 1970; 28:30-36
- Jones TC, Len L, Hirsch JG. Assessment in vitro of immunity against *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med.* 1975; 141(2):466-482.

- Joyner LP, Norton CC. The immunity arising from continuous low-level infection with *Eimeria maxima* and *Eimeria acervulina*. *Parasitology*. 1976; 72(1):115-125.
- Ju CH, Chockalingam A, Leifer CA. Early response of mucosal epithelial cells during *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol*. 2009; 183(11):7420-7427.
- Juul-Madsen HR, Viertlböeck B, Härtle S, Smith AL, Göbel TW. Innate immune response. In: Schatt KA, Kaspers B, Kaiser P, Hrsg. *Avian Immunology*. 2. Aufl. San Diego: Academic Press; 2014. p. 121-147.
- Kagan BL, Selsted ME, Ganz T, Lehrer RI. Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87(1):210-214.
- Kaiser P. Advances in avian immunology--prospects for disease control: a review. *Avian Pathol*. 2010; 39(5):309-324.
- Kaiser P, Poh TY, Rothwell L, Avery S, Balu S, Pathania US, Hughes S, Goodchild M, Morrell S, Watson M, Bumstead N, Kaufman J, Young JR. A genomic analysis of chicken cytokines and chemokines. *J Interferon Cytokine Res*. 2005; 25(8):467-484.
- Kaiser P, Stäheli P. Avian cytokines and chemokines. In: Schatt KA, Kaspers B, Kaiser P, Hrsg. *Avian Immunology*. 2. Aufl. San Diego: Academic Press; 2014. p. 189-204.
- Kaneto CN, Costa AJ, Paulillo AC, Moraes FR, Murakami TO, Meireles MV. Experimental toxoplasmosis in broiler chicks. *Vet Parasitol*. 1997; 69(3-4):203-210.
- Karnovsky ML. Metchnikoff in Messina: a century of studies on phagocytosis. *N Engl J Med*. 1981; 304(19):1178-1180.
- Karpala AJ, Morris KR, Broadway MM, McWaters PG, O'Neil TE, Goossens KE, Lowenthal JW, Bean AG. Molecular cloning, expression, and characterization of chicken IFN- λ . *J Interferon Cytokine Res*. 2008; 28(6):341-350.
- Kasahara Y, Chen CH, Cooper MD. Growth requirements for avian gamma delta T cells include exogenous cytokines, receptor ligation and *in vivo* priming. *Eur J Immunol*. 1993; 23(9):2230-2236.
- Kaspers B, Kaiser P. Avian antigen-presenting cells. In: Schatt KA, Kaspers B, Kaiser P, Hrsg. *Avian Immunology*. 2. Aufl. San Diego: Academic Press; 2014. p. 169-188.
- Kaufman HE, Maloney ED. Multiplication of three strains of *Toxoplasma gondii* in tissue culture. *J Parasitol*. 1962; 48:358-361.
- Kaufman J, Milne S, Göbel TW, Walker BA, Jacob JP, Auffray C, Zoorob R, Beck S. The chicken B locus is a minimal essential major histocompatibility complex. *Nature*. 1999; 401(6756):923-925.
- Kendall MD. Avian thymus glands: A review. *Dev Comp Immunol*. 1980; 4(2):191-209.
- Khan IA, Matsuura T, Kasper LH. IL-10 mediates immunosuppression following primary infection with *Toxoplasma gondii* in mice. *Parasite Immunol*. 1995; 17(4):185-195.
- Khan IA, Matsuura T, Kasper LH. Activation-mediated CD4+ T cell unresponsiveness during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Int Immunol*. 1996; 8(6):887-896.

Literaturverzeichnis

- Khan A, Dubey JP, Su C, Ajioka JW, Rosenthal BM, Sibley LD. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. *Int J Parasitol.* 2011; 41(6):645-655.
- Kim L, Butcher BA, Lee CW, Uematsu S, Akira S, Denkers EY. *Toxoplasma gondii* genotype determines MyD88-dependent signaling in infected macrophages. *J Immunol.* 2006; 177(4):2584-2591.
- Kim K, Weiss LM. *Toxoplasma*: the next 100 years. *Microbes Infect.* 2008; 10:978-984.
- Kitagawa H, Shiraishi S, Imagawa T, Uehara M. Ultrastructural characteristics and lectin-binding properties of M cells in the follicle-associated epithelium of chicken caecal tonsils. *J Anat.* 2000; 197 Pt 4:607-616.
- Klose CS, Artis D. Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nat Immunol.* 2016; 17(7):765-774.
- Klose CSN, Flach M, Möhle L, Rogell L, Hoyler T, Ebert K, Fabiunke C, Pfeifer D, Sexl V, Fonseca-Pereira D, Domingues RG, Veiga-Fernandes H, Arnold SJ, Busslinger M, Dunay IR, Tanriver Y, Diefenbach A. Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. *Cell.* 2014; 157(2):340-356.
- Koblansky AA, Jankovic D, Oh H, Hieny S, Sungnak W, Mathur R, Hayden MS, Akira S, Sher A, Ghosh S. Recognition of profilin by Toll-like receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Immunity.* 2013; 38(1):119-130.
- Kogut MH, Rothwell L, Kaiser P. IFN-gamma priming of chicken heterophils upregulates the expression of proinflammatory and Th1 cytokine mRNA following receptor-mediated phagocytosis of *Salmonella enterica* serovar enteritidis. *J Interferon Cytokine Res.* 2005; 25(2):73-81.
- Kreukniet MB, van der Zijpp AJ, Nieuwland MG. Effects of route of immunization, adjuvant and unrelated antigens on the humoral immune response in lines of chickens selected for antibody production against sheep erythrocytes. *Vet Immunol Immunopathol.* 1992; 33(1-2):115-127.
- Kumar PA, Das SK, Rao JR. Effect of immunostimulation on cytotoxic activity of intestinal intraepithelial lymphocytes of chickens in infectious bursal disease and *Eimeria tenella* infections. *Acta Vet Hung.* 1998; 46(1):1-11.
- Lambert H, Barragan A. Modelling parasite dissemination: host cell subversion and immune evasion by *Toxoplasma gondii*. *Cell Microbiol.* 2010; 12(3):292-300.
- Lambert H, Hitziger N, Dellacasa I, Svensson M, Barragan A. Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. *Cell Microbiol.* 2006; 8(10):1611-1623.
- Lambert H, Vutova PP, Adams WC, Loré K, Barragan A. The *Toxoplasma gondii*-shuttling function of dendritic cells is linked to the parasite genotype. *Infect Immun.* 2009; 77(4):1679-1688.
- Langermans JA, Van der Hulst ME, Nibbering PH, Hiemstra PS, Fransen L, Van Furth R. IFN-gamma-induced L-arginine-dependent toxoplasmatatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol.* 1992; 148(2):568-574.

Literaturverzeichnis

- Laurent F, Mancassola R, Lacroix S, Menezes R, Naciri M. Analysis of chicken mucosal immune response to *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima* infection by quantitative reverse transcription-PCR. *Infect Immun*. 2001; 69(4):2527-2534.
- Le Douarin NM, Houssaint E, Jotereau FV, Belo M. Origin of hemopoietic stem cells in embryonic bursa of Fabricius and bone marrow studied through interspecific chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975; 72(7):2701-2705.
- Lee SH, Lillehoj HS, Park DW, Jang SI, Morales A, García D, Lucio E, Larios R, Victoria G, Marrufo D, Lillehoj EP. Induction of passive immunity in broiler chickens against *Eimeria acervulina* by hyperimmune egg yolk immunoglobulin Y. *Poult Sci*. 2009a; 88(3):562-566.
- Lee SH, Lillehoj HS, Park DW, Jang SI, Morales A, García D, Lucio E, Larios R, Victoria G, Marrufo D, Lillehoj EP. Protective effect of hyperimmune egg yolk IgY antibodies against *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima* infections. *Vet Parasitol*. 2009b; 163(1-2):123-126.
- Leveque G, Forgetta V, Morroll S, Smith AL, Bumstead N, Barrow P, Loredó-Osti JC, Morgan K, Malo D. Allelic variation in TLR4 is linked to susceptibility to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in chickens. *Infect Immun*. 2003; 71(3):1116-1124.
- Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2006; 24:99-146.
- Liesenfeld O, Dunay IR, Erb KJ. Infection with *Toxoplasma gondii* reduces established and developing Th2 responses induced by *Nippostrongylus brasiliensis* infection. *Infect Immun*. 2004; 72(7):3812-3822.
- Lillehoj HS. Effects of immunosuppression on avian coccidiosis: cyclosporin A but not hormonal bursectomy abrogates host protective immunity. *Infect Immun*. 1987; 55(7):1616-1621.
- Lillehoj HS. Intestinal intraepithelial and splenic natural killer cell responses to eimerian infections in inbred chickens. *Infect Immun*. 1989; 57(7):1879-1884.
- Lillehoj HS. Analysis of *Eimeria acervulina*-induced changes in the intestinal T lymphocyte subpopulations in two chicken strains showing different levels of susceptibility to coccidiosis. *Res Vet Sci*. 1994; 56(1):1-7.
- Lillehoj HS, Choi KD. Recombinant chicken interferon-gamma-mediated inhibition of *Eimeria tenella* development in vitro and reduction of oocyst production and body weight loss following *Eimeria acervulina* challenge infection. *Avian Dis*. 1998; 42(2):307-314.
- Lillehoj HS, Ding X, Quiroz MA, Bevenssee E, Lillehoj EP. Resistance to intestinal coccidiosis following DNA immunization with the cloned 3-1E *Eimeria* gene plus IL-2, IL-15, and IFN-gamma. *Avian Dis*. 2005; 49(1):112-117.
- Lillehoj HS, Lillehoj EP. Avian coccidiosis. A review of acquired intestinal immunity and vaccination strategies. *Avian Dis*. 2000; 44(2):408-425.
- Lillehoj HS, Min W, Choi KD, Babu US, Burnside J, Miyamoto T, Rosenthal BM, Lillehoj EP. Molecular, cellular, and functional characterization of chicken cytokines homologous to mammalian IL-15 and IL-2. *Vet Immunol Immunopathol*. 2001; 82(3-4):229-244.

Literaturverzeichnis

- Lillehoj HS, Min W, Dalloul RA. Recent progress on the cytokine regulation of intestinal immune responses to *Eimeria*. *Poult Sci*. 2004; 83(4):611-623.
- Lillehoj HS, Ruff MD. Comparison of disease susceptibility and subclass-specific antibody response in SC and FP chickens experimentally inoculated with *Eimeria tenella*, *E. acervulina*, or *E. maxima*. *Avian Dis*. 1987; 31(1):112-119.
- Lillehoj HS, Ruff MD, Bacon LD, Lamont SJ, Jeffers TK. Genetic control of immunity to *Eimeria tenella*. Interaction of MHC genes and non-MHC linked genes influences levels of disease susceptibility in chickens. *Vet Immunol Immunopathol*. 1989; 20(2):135-148.
- Lillehoj HS, Trout JM. Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to *Eimeria* parasites. *Clin Microbiol Rev*. 1996; 9(3):349-360.
- Lowenthal JW, Connick TE, McWaters PG, York JJ. Development of T cell immune responsiveness in the chicken. *Immunol Cell Biol*. 1994; 72(2):115-122.
- Lüder CG, Algner M, Lang C, Bleicher N, Gross U. Reduced expression of the inducible nitric oxide synthase after infection with *Toxoplasma gondii* facilitates parasite replication in activated murine macrophages. *Int J Parasitol*. 2003; 33(8):833-844.
- Lüder CG, Gross U. Apoptosis and its modulation during infection with *Toxoplasma gondii*: molecular mechanisms and role in pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005; 289:219-237.
- Lüder CG, Stanway RR, Chaussepied M, Langsley G, Heussler VT. Intracellular survival of apicomplexan parasites and host cell modification. *Int J Parasitol*. 2009; 39(2):163-173.
- Lynagh GR, Bailey M, Kaiser P. Interleukin-6 is produced during both murine and avian *Eimeria* infections. *Vet Immunol Immunopathol*. 2000; 76(1-2):89-102.
- Lynn DJ, Higgs R, Lloyd AT, O'Farrelly C, Hervé-Grépinet V, Nys Y, Brinkman FS, Yu PL, Soulier A, Kaiser P, Zhang G, Lehrer RI. Avian beta-defensin nomenclature: a community proposed update. *Immunol Lett*. 2007; 110(1):86-89.
- Macdonald SE, van Diemen PM, Martineau H, Stevens MP, Tomley FM, Stabler RA, Blake DP. Impact of *Eimeria tenella* Coinfection on *Campylobacter jejuni* Colonization of the Chicken. *Infect Immun*. 2019; 87(2). pii: e00772-18.
- Malkwitz I, Berndt A, Dauschies A, Bangoura B. Long-term investigations on *Toxoplasma gondii*-infected primary chicken macrophages. *Parasitol Res*. 2013; 112(9):3115-3122.
- Malkwitz I, Berndt A, Dauschies A, Bangoura B. Characterisation of susceptibility of chicken macrophages to infection with *Toxoplasma gondii* of type II and III strains. *Exp Parasitol*. 2018; 187:22-29.
- Malkwitz I, Berndt A, Zhang R, Dauschies A, Bangoura B. Replication of *Toxoplasma gondii* in chicken erythrocytes and thrombocytes compared to macrophages. *Parasitol Res*. 2017; 116(1):123-131.

Literaturverzeichnis

- Martens S, Parvanova I, Zerrahn J, Griffiths G, Schell G, Reichmann G, Howard JC. Disruption of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuoles by the mouse p47-resistance GTPases. *PLoS Pathog.* 2005; 1(3):e24.
- Mashayekhi M, Sandau MM, Dunay IR, Frickel EM, Khan A, Goldszmid RS, Sher A, Ploegh HL, Murphy TL, Sibley LD, Murphy KM. CD8 α (+) dendritic cells are the critical source of interleukin-12 that controls acute infection by *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Immunity.* 2011; 35(2):249-259.
- Mason S, Dubey JP, Smith JE, Boag B. *Toxoplasma gondii* coinfection with diseases and parasites in wild rabbits in Scotland. *Parasitology.* 2015; 142(11):1415-1421.
- Mast J, Goddeeris BM, Peeters K, Vandesande F, Berghman LR. Characterisation of chicken monocytes, macrophages and interdigitating cells by the monoclonal antibody KUL01. *Vet Immunol Immunopathol.* 1998; 61(2-4):343-357.
- Masteller EL, Thompson CB. B cell development in the chicken. *Poult Sci.* 1994; 73(7):998-1011.
- McCormack WT, Tjoelker LW, Thompson CB. Avian B-cell development: generation of an immunoglobulin repertoire by gene conversion. *Annu Rev Immunol.* 1991; 9:219-241.
- McDonald V, Rose ME, Jeffers TK. *Eimeria tenella*: immunogenicity of the first generation of schizogony. *Parasitology.* 1986; 93(Pt 1):1-7.
- McDougald LR. Intestinal protozoa important to poultry. *Poult Sci.* 1998; 77:1156–1158
- McDougald LR, Fitz-Coy S. Coccidiosis: protozoal infections. In: Swayne DE, Hrsg. *Diseases of poultry.* 13. Aufl. New York: Blackwell; 2013. p. 1148–1166.
- Mehlhorn H, Frenkel JK. Ultrastructural comparison of cysts and zoites of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis muris*, and *Hammondia hammondi* in skeletal muscle of mice. *J Parasitol.* 1980; 66(1):59-67.
- Miller NL, Frenkel JK, Dubey JP. Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals, and in birds. *J Parasitol.* 1972; 58:928-937.
- Min W, Kim WH, Lillehoj EP, Lillehoj HS. Recent progress in host immunity to avian coccidiosis: IL-17 family cytokines as sentinels of the intestinal mucosa. *Dev Comp Immunol.* 2013; 41(3):418-428.
- Min W, Lillehoj HS. Isolation and characterization of chicken interleukin-17 cDNA. *J Interferon Cytokine Res.* 2002; 22(11):1123-1128.
- Min W, Lillehoj HS. Identification and characterization of chicken interleukin-16 cDNA. *Dev Comp Immunol.* 2004; 28(2):153-162.
- Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet.* 2004; 363(9425):1965-1976.
- Mordue DG, Monroy F, La Regina M, Dinarello CA, Sibley LD. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *J Immunol.* 2001; 167:4574-4584.
- Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol.* 2004; 25(2):75-84.

Literaturverzeichnis

- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986; 136(7):2348-2357.
- Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989; 7:145-173.
- Motha MX, Egerton JR. Influence of reticuloendotheliosis on the severity of *Eimeria tenella* infection in broiler chickens. *Vet Microbiol.* 1984; 9(2):121-129.
- Munoz M, Liesenfeld O, Heimesaat MM. Immunology of *Toxoplasma gondii*. *Immunol Rev.* 2011; 240(1):269-285.
- Nagy N, Bódi I, Oláh I. Avian dendritic cells: Phenotype and ontogeny in lymphoid organs. *Dev Comp Immunol.* 2016; 58:47-59.
- Nagy N, Igyártó B, Magyar A, Gazdag E, Palya V, Oláh I. Oesophageal tonsil of the chicken. *Acta Vet Hung.* 2005; 53(2):173-188.
- Nagy N, Magyar A, Dávid C, Gumati MK, Oláh I. Development of the follicle-associated epithelium and the secretory dendritic cell in the bursa of fabricius of the guinea fowl (*Numida meleagris*) studied by novel monoclonal antibodies. *Anat Rec.* 2001; 262(3):279-292.
- Nagy N, Oláh I. Pyloric tonsil as a novel gut-associated lymphoepithelial organ of the chicken. *J Anat.* 2007; 211(3):407-411.
- Nash PB, Purner MB, Leon RP, Clarke P, Duke RC, Curiel TJ. *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. *J Immunol.* 1998; 160(4):1824-1830.
- Nichols BA, Chiappino ML, O'Connor GR. Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion. *J Ultrastruct Res.* 1983; 83(1):85-98.
- Nicolle C, Manceaux L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C R Seances Acad Sci.* 1908; 147:763-766.
- Nicolle C, Manceaux L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. *C R Seances Acad Sci.* 1909; 148:369-372.
- Oláh I, Glick B. The number and size of the follicular epithelium (FE) and follicles in the bursa of Fabricius. *Poult Sci.* 1978a; 57(5):1445-1450.
- Oláh I, Glick B. Secretory cell in the medulla of the bursa of Fabricius. *Experientia.* 1978b; 34(12):1642-1643.
- Oláh, I, Glick B. Splenic white pulp and associated vascular channels in chicken spleen. *Am. J. Anat.* 1982; 165, 445-480.
- Oláh I, Glick B. Meckel's diverticulum. I. Extramedullary myelopoiesis in the yolk sac of hatched chickens (*Gallus domesticus*). *Anat Rec.* 1984; 208(2):243-252.
- Oláh I, Glick B. Bursal secretory cells: an electron microscope study. *Anat Rec.* 1987; 219(3):268-274.

Literaturverzeichnis

- Oláh I, Glick B. Dendritic cells in the bursal follicles and germinal centers of the chicken's caecal tonsil express vimentin but not desmin. *Anat Rec.* 1995; 243(3):384-389.
- Oláh I, Kendall C, Glick B. Endogenous peroxidase- and vimentin-positive cells accumulate at the corticomedullary border of the chicken thymus. *Poult Sci.* 1991; 70(5):1144-1152.
- Oláh I, Nagy N, Magyar A, Palya V. Esophageal tonsil: a novel gut-associated lymphoid organ. *Poult Sci.* 2003; 82(5):767-770.
- Ong YC, Boyle JP, Boothroyd JC. Strain-dependent host transcriptional responses to *Toxoplasma* infection are largely conserved in mammalian and avian hosts. *PLoS One.* 2011; 6(10):e26369.
- Opsteegh M, Schares G, Blaga R, van der Giessen J, on behalf of the consortium. Experimental studies of *Toxoplasma gondii* in the main livestock species (GP/EFSA/BIOHAZ/2013/01) Final report. EFSA Support Public 2016; EN-995:161
- Ovington KS, Alleva LM, Kerr EA. Cytokines and immunological control of *Eimeria* spp. *Int J Parasitol.* 1995; 25(11):1331-1351.
- Pande PG, Shukla RR, Sekariah PC. *Toxoplasma* from the eggs of the domestic fowl (*Gallus gallus*). *Science.* 1961; 133(3453):648.
- Pappas G, Roussos N, Falagas ME. Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int J Parasitol.* 2009; 39:1385-1394.
- Paramithiotis E, Ratcliffe MJ. Bursa-dependent subpopulations of peripheral B lymphocytes in chicken blood. *Eur J Immunol.* 1993; 23(1):96-102.
- Paramithiotis E, Ratcliffe MJ. Evidence for phenotypic heterogeneity among B cells emigrating from the bursa of fabricius: a reflection of functional diversity? *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996; 212:29-36.
- Park SS, Lillehoj HS, Allen PC, Park DW, FitzCoy S, Bautista DA, Lillehoje EP. Immunopathology and cytokine responses in broiler chickens coinfecting with *Eimeria maxima* and *Clostridium perfringens* with the use of an animal model of necrotic enteritis. *Avian Dis.* 2008; 52(1):14-22.
- Payne TM, Molestina RE, Sinai AP. Inhibition of caspase activation and a requirement for NF-kappaB function in the *Toxoplasma gondii*-mediated blockade of host apoptosis. *J Cell Sci.* 2003; 116(Pt 21):4345-4358.
- Peek HW, Landman WJ. Coccidiosis in poultry: anticoccidial products, vaccines and other prevention strategies. *Vet Q.* 2011; 31(3):143-161.
- Persson EK, Agnarson AM, Lambert H, Hitziger N, Yagita H, Chambers BJ, Barragan A, Grandien A. Death receptor ligation or exposure to perforin trigger rapid egress of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 2007; 179(12):8357-8365.
- Persson CM, Lambert H, Vutova PP, Dellacasa-Lindberg I, Nederby J, Yagita H, Ljunggren HG, Grandien A, Barragan A, Chambers BJ. Transmission of *Toxoplasma gondii* from infected dendritic cells to natural killer cells. *Infect Immun.* 2009; 77(3):970-976.

- Peyron F, Lobry JR, Musset K, Ferrandiz J, Gomez-Marin JE, Petersen E, Meroni V, Rausher B, Mercier C, Picot S, Cesbron-Delauw MF. Serotyping of *Toxoplasma gondii* in chronically infected pregnant women: predominance of type II in Europe and types I and III in Colombia (South America). *Microbes Infect.* 2006; 8(9-10):330-340.
- Philbin VJ, Iqbal M, Boyd Y, Goodchild MJ, Beal RK, Bumstead N, Young J, Smith AL. Identification and characterization of a functional, alternatively spliced Toll-like receptor 7 (TLR7) and genomic disruption of TLR8 in chickens. *Immunology.* 2005; 114(4):507-521.
- Pieper J, Methner U, Berndt A. Characterization of avian $\gamma\delta$ T-cell subsets after *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection of chicks. *Infect Immun.* 2011; 79(2):822-829.
- Pink JR, Rijnbeek AM. Monoclonal antibodies against chicken lymphocyte surface antigens. *Hybridoma.* 1983; 2(3):287-296.
- Plattner F, Yarovinsky F, Romero S, Didry D, Carlier MF, Sher A, Soldati-Favre D. *Toxoplasma* profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response. *Cell Host Microbe.* 2008; 3(2):77-87.
- Pop L, Györke A, Tăbăran AF, Dumitrache MO, Kalmár Z, Magdaş C, Mircean V, Zagon D, Balea A, Cozma V. Effects of artemisinin in broiler chickens challenged with *Eimeria acervulina*, *E. maxima* and *E. tenella* in battery trials. *Vet Parasitol.* 2015; 214(3-4):264-271.
- Powell FL, Rothwell L, Clarkson MJ, Kaiser P. The turkey, compared to the chicken, fails to mount an effective early immune response to *Histomonas meleagridis* in the gut. *Parasite Immunol.* 2009; 31(6):312-327.
- Prince JB, Auer KL, Huskinson JF, Parmley SF, Araujo FG, Remington JS. Cloning, expression and cDNA sequence of surface antigen p22 from *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol.* 1990; 43:97-106.
- Prowse SJ, Pallister J. Interferon release as a measure of the T-cell response to coccidial antigens in chickens. *Avian Pathol.* 1989; 18(4):619-630.
- Qin Z, Arakawa A, Baba E, Fukata T, Sasai K. Effect of *Eimeria tenella* infection on the production of *Salmonella enteritidis*-contaminated eggs and susceptibility of laying hens to *S. enteritidis* infection. *Avian Dis.* 1996; 40(2):361-367.
- Quéré P, Pierre J, Hoang MD, Esnault E, Domenech J, Sibille P, Dimier-Poisson I. Presence of dendritic cells in chicken spleen cell preparations and their functional interaction with the parasite *Toxoplasma gondii*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2013; 153(1-2):57-69.
- Railliet A. Quel nom doit-on donner à la coccidie intestinale de la poule? *Arch. Parasitol.* 1913; 16:147-148.
- Railliet A, Lucet A. Développement expérimental des coccidies de l'épithélium intestinal du lapin et de la poule. *C. R. Soc. Biol.* 1891a; 36:820-823.
- Railliet A, Lucet A. Note sur quelques especes de coccidies encore peu étudiées. *Bull. Soc. Zool.* 1891b; 16:246-250.

Literaturverzeichnis

- Reis e Sousa C, Hieny S, Schariton-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain RN, Sher A. *In vivo* microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med*. 1997; 186(11):1819-1829.
- Remington JS, Merigan TC. Interferon: protection of cells infected with an intracellular protozoan (*Toxoplasma gondii*). *Science*. 1968; 161(3843):804-806.
- Roach JC, Glusman G, Rowen L, Kaur A, Purcell MK, Smith KD, Hood LE, Aderem A. The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(27):9577-9582.
- Robben PM, Mordue DG, Truscott SM, Takeda K, Akira S, Sibley LD. Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. *J Immunol*. 2004; 172(6):3686-3694.
- Rogers SL, Viertlboeck BC, Göbel TW, Kaufman J. Avian NK activities, cells and receptors. *Semin Immunol*. 2008; 20(6):353-360.
- Rose ME. Immunity to coccidiosis: maternal transfer in *Eimeria maxima* infections. *Parasitology*. 1972; 65: 73-282.
- Rose ME. Coccidiosis: immunity and the prospects for prophylactic immunisation. *Vet Rec*. 1976; 98(24):481-484.
- Rose ME. Immunity to *Eimeria* infections. *Vet Immunol Immunopathol*. 1987; 17(1-4):333-343.
- Rose ME, Hesketh P. Immunity to coccidia in chickens: adoptive transfer with peripheral blood lymphocytes and spleen cells. *Parasite Immunol*. 1982; 4(3):171-185.
- Rose ME, Hesketh P, Wakelin D. Immune control of murine coccidiosis: CD4+ and CD8+ T lymphocytes contribute differentially in resistance to primary and secondary infections. *Parasitology*. 1992; 105(3):349-354.
- Rose ME, Long PL. Immunity to four species of *Eimeria* in fowls. *Immunology*. 1962; 5:79-92.
- Rose ME, Long PL. Resistance to *Eimeria* infections in the chicken: the effects of thymectomy, bursectomy, whole body irradiation and cortisone treatment. *Parasitology*. 1970; 60(2):291-299.
- Rossi D, Sanchez-García J, McCormack WT, Bazan JF, Zlotnik A. Identification of a chicken "C" chemokine related to lymphotactin. *J Leukoc Biol*. 1999; 65(1):87-93.
- Rothwell L, Gramzinski RA, Rose ME, Kaiser P. Avian coccidiosis: changes in intestinal lymphocyte populations associated with the development of immunity to *Eimeria maxima*. *Parasite Immunol*. 1995; 17(10):525-533.
- Rothwell L, Hu T, Wu Z, Kaiser P. Chicken interleukin-21 is costimulatory for T cells and blocks maturation of dendritic cells. *Dev Comp Immunol*. 2012; 36(2):475-482.
- Rothwell L, Muir W, Kaiser P. Interferon-gamma is expressed in both gut and spleen during *Eimeria tenella* infection. *Avian Pathol*. 2000; 29(4):333-342.

- Rothwell CJ, Vervelde L, Davison TF. Identification of chicken Bu-1 alloantigens using the monoclonal antibody AV20. *Vet Immunol Immunopathol.* 1996; 55(1-3):225-234.
- Rothwell L, Young JR, Zoorob R, Whittaker CA, Hesketh P, Archer A, Smith AL, Kaiser P. Cloning and characterization of chicken IL-10 and its role in the immune response to *Eimeria maxima*. *J Immunol.* 2004; 173(4):2675-2682.
- Sabin AB. Biological and immunological identity of *Toxoplasma* of animal and human origin. *Proc Soc Exp Biol.* 1939; 41:75–80.
- Sabin AB, Feldman HA. Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (*Toxoplasma*). *Science.* 1948; 108(2815):660-663.
- Saeij JP, Boyle JP, Boothroyd JC. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends Parasitol.* 2005; 21(10):476-481.
- Santiago HC, Oliveira MA, Bambirra EA, Faria AM, Afonso LC, Vieira LQ, Gazzinelli RT. Coinfection with *Toxoplasma gondii* inhibits antigen-specific Th2 immune responses, tissue inflammation, and parasitism in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *Infect Immun.* 1999; 67(9):4939-4944.
- Scanga CA, Aliberti J, Jankovic D, Tilloy F, Bennouna S, Denkers EY, Medzhitov R, Sher A. Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J Immunol.* 2002; 168(12):5997-6001.
- Schares G, Bangoura B, Randau F, Goroll T, Ludewig M, Maksimov P, Matzkeit B, Sens M, Bärwald A, Conraths FJ, Opsteegh M, Van der Giessen J. High seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and probability of detecting tissue cysts in backyard laying hens compared with hens from large free-range farms. *Int J Parasitol.* 2017; 47(12):765-777.
- Scharton-Kersten T, Nakajima H, Yap G, Sher A, Leonard WJ. Infection of mice lacking the common cytokine receptor gamma-chain (gamma(c)) reveals an unexpected role for CD4+ T lymphocytes in early IFN-gamma-dependent resistance to *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 1998; 160(6):2565-2569.
- Scharton-Kersten TM, Yap G, Magram J, Sher A. Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med.* 1997; 185(7):1261-1273.
- Schijns VEJC, Horzinek MC. Cytokines in Veterinary Medicine. Wallingford: CAB International; 1997.
- Schlüter D, Däubener W, Schares G, Groß U, Pleyer U, Lüder C. Animals are key to human toxoplasmosis. *Int J Med Microbiol.* 2014; 304(7):917-929.
- Schneider K, Klaas R, Kaspers B, Staeheli P. Chicken interleukin-6. cDNA structure and biological properties. *Eur J Biochem.* 2001; 268(15):4200-4206.
- Schneider K, Puehler F, Baeuerle D, Elvers S, Staeheli P, Kaspers B, Weining KC. cDNA cloning of biologically active chicken interleukin-18. *J Interferon Cytokine Res.* 2000; 20(10):879-883.
- Schnieder T. Veterinärmedizinische Parasitologie. 6. Aufl. Stuttgart: Parey; 2006.

Literaturverzeichnis

- Schreiber RD, Feldman HA. Identification of the activator system for antibody to *Toxoplasma* as the classical complement pathway. *J Infect Dis.* 1980; 141(3):366-369.
- Seabra SH, de Souza W, DaMatta RA. *Toxoplasma gondii* partially inhibits nitric oxide production of activated murine macrophages. *Exp Parasitol.* 2002; 100(1):62-70.
- Sedlák K, Literák I, Vitula F, Benák J. High susceptibility of partridges (*Perdix perdix*) to toxoplasmosis compared with other gallinaceous birds. *Avian Pathol.* 2000; 29(6):563-569.
- Sekellick MJ, Ferrandino AF, Hopkins DA, Marcus PI. Chicken interferon gene: cloning, expression, and analysis. *J Interferon Res.* 1994; 14(2):71-79.
- Selleck EM, Fentress SJ, Beatty WL, Degrandi D, Pfeffer K, Virgin HW 4th, Macmicking JD, Sibley LD. Guanylate-binding protein 1 (Gbp1) contributes to cell-autonomous immunity against *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* 2013; 9(4):e1003320.
- Shao L, Serrano D, Mayer L. The role of epithelial cells in immune regulation in the gut. *Semin Immunol.* 2001; 13(3):163-176.
- Sharma JM. Introduction to poultry vaccines and immunity. *Adv Vet Med.* 1999; 41:481-494.
- Sheffield HG, Melton ML. The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol.* 1968; 54(2):209-226.
- Shimomura O. The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *J Microsc.* 2005; 217(Pt 1):1-15.
- Shirley MW, Smith AL, Tomley FM. The biology of avian *Eimeria* with an emphasis on their control by vaccination. *Adv Parasitol.* 2005; 60:285-330.
- Sibley LD. Intracellular parasite invasion strategies. *Science.* 2004; 304(5668):248-253.
- Sibley LD, Adams LB, Fukutomi Y, Krahenbuhl JL. Tumor necrosis factor-alpha triggers antitoxoplasmal activity of IFN-gamma primed macrophages. *J Immunol.* 1991; 147(7):2340-2345.
- Sibley LD, Khan A, Ajioka JW, Rosenthal BM. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Phil Trans R Soc B.* 2009; 364(1530):2749-2761.
- Smith AL, Hesketh P, Archer A, Shirley MW. Antigenic diversity in *Eimeria maxima* and the influence of host genetics and immunization schedule on cross-protective immunity. *Infect Immun.* 2002; 70(5):2472-2479.
- Smith CK, Kaiser P, Rothwell L, Humphrey T, Barrow PA, Jones MA. *Campylobacter jejuni*-induced cytokine responses in avian cells. *Infect Immun.* 2005; 73(4):2094-2100.
- Smith NC, Wallach M, Miller CM, Braun R, Eckert J. Maternal transmission of immunity to *Eimeria maxima*: western blot analysis of protective antibodies induced by infection. *Infect Immun.* 1994; 62(11):4811-4817.

Literaturverzeichnis

- Soruri A, Grigat J, Forssmann U, Riggert J, Zwirner J. beta-Defensins chemoattract macrophages and mast cells but not lymphocytes and dendritic cells: CCR6 is not involved. *Eur J Immunol.* 2007; 37(9):2474-2486.
- Sowder JT, Chen CL, Ager LL, Chan MM, Cooper MD. A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T gamma/delta receptor. *J Exp Med.* 1988; 167(2):315-322.
- Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, Koyasu S, Locksley RM, McKenzie AN, Mebius RE, Powrie F, Vivier E. Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol.* 2013; 13(2):145-149.
- Spits H, Bernink JH, Lanier L. NK cells and type 1 innate lymphoid cells: partners in host defense. *Nat Immunol.* 2016; 17(7):758-764.
- Splendore A. Un nuovo protozoa parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uomo. Nota preliminare pel. *Rev Soc Sci Sao Paulo* 1908; 3:109-112.
- Stoicov C, Whary M, Rogers AB, Lee FS, Klucsevsek K, Li H, Cai X, Saffari R, Ge Z, Khan IA, Combe C, Luster A, Fox JG, Houghton J. Coinfection modulates inflammatory responses and clinical outcome of *Helicobacter felis* and *Toxoplasma gondii* infections. *J Immunol.* 2004; 173(5):3329-3336.
- Sturge CR, Benson A, Raetz M, Wilhelm CL, Mirpuri J, Vitetta ES, Yarovinsky F. TLR-independent neutrophil-derived IFN- γ is important for host resistance to intracellular pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110(26):10711-10716.
- Sturkie PD. The reputed reservoir function of the spleen of the domestic fowl. *Am. J. Physiol.* 1943; 138, 599-602.
- Sung YJ, Hotchkiss JH, Austic RE, Dietert RR. L-arginine-dependent production of a reactive nitrogen intermediate by macrophages of a uricotelic species. *J Leukoc Biol.* 1991; 50(1):49-56.
- Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, Remington JS. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science.* 1988; 240(4851):516-518.
- Suzuki Y, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS patients and experimental models for study of the disease and its treatment. *Res Immunol.* 1993; 144(1):66-67.
- Tanabe K, Kimata I, Takada S. Penetration of chick embryo erythrocytes by *Toxoplasma gondii* tachyzoites in simplified incubation media. *J Parasitol.* 1980; 66(2):240-244.
- Temperley ND, Berlin S, Paton IR, Griffin DK, Burt DW. Evolution of the chicken Toll-like receptor gene family: a story of gene gain and gene loss. *BMC Genomics.* 2008; 9:62.
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.* 2000; 30(12-13):1217-1258.
- Trout JM, Lillehoi HS. Evidence of a role for intestinal CD8+ lymphocytes and macrophages in transport of *Eimeria acervulina* sporozoites. *J Parasitol.* 1993; 79(5):790-792.

Literaturverzeichnis

- Trout JM, Lillehoj HS. *Eimeria acervulina* infection: evidence for the involvement of CD8+ T lymphocytes in sporozoite transport and host protection. *Poult Sci.* 1995; 74:1117–1125.
- Trout JM, Lillehoj HS. T lymphocyte roles during *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections. *Vet Immunol Immunopathol.* 1996; 53(1-2):163-172.
- Tyzzer EE. Coccidiosis in gallinaceous birds. *Am. J. Hyg.* 1929; 10:269–383.
- Unno A, Suzuki K, Xuan X, Nishikawa Y, Kitoh K, Takashima Y. Dissemination of extracellular and intracellular *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the blood flow. *Parasitol Int.* 2008; 57(4):515-518.
- van der Zijpp AJ, Rooyakkers JM, Kouwenhoven B. The immune response of the chick following viral vaccinations and immunization with sheep red blood cells. *Avian Dis.* 1982; 26(1):97-106.
- Vercammen M, Scorza T, El Bouhdidi A, Van Beeck K, Carlier Y, Dubremetz JF, Verschueren H. Opsonization of *Toxoplasma gondii* tachyzoites with nonspecific immunoglobulins promotes their phagocytosis by macrophages and inhibits their proliferation in nonphagocytic cells in tissue culture. *Parasite Immunol.* 1999; 21(11):555-563.
- Vervelde L, Vermeulen AN, Jeurissen SH. In situ characterization of leucocyte subpopulations after infection with *Eimeria tenella* in chickens. *Parasite Immunol.* 1996; 18(5):247-256.
- Vielmo A, Pena HFJ, Panziera W, Bianchi RM, De Lorenzo C, Oliveira S, Alves BF, Gennari SM, Pavarini SP, de Barros CSL, Driemeier D. Outbreak of toxoplasmosis in a flock of domestic chickens (*Gallus gallus domesticus*) and guinea fowl (*Numida meleagris*). *Parasitol Res.* 2019; 118(3):991-997.
- Viertlboeck BC, Göbel TW. Chicken thrombocytes express the CD51/CD61 integrin. *Vet Immunol Immunopathol.* 2007; 119(1-2):137-141.
- Wallach M, Halabi A, Pillemer G, Sar-Shalom O, Mencher D, Gilad M, Bendheim U, Danforth HD, Augustine PC. Maternal immunization with gametocyte antigens as a means of providing protective immunity against *Eimeria maxima* in chickens. *Infect Immun.* 1992; 60(5):2036-2039.
- Weidner JM, Barragan A. Tightly regulated migratory subversion of immune cells promotes the dissemination of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 2014; 44(2):85-90.
- Weining KC, Sick C, Kaspers B, Staeheli P. A chicken homolog of mammalian interleukin-1 beta: cDNA cloning and purification of active recombinant protein. *Eur J Biochem.* 1998; 258(3):994-1000.
- Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int J Parasitol.* 2009; 39:895-901.
- Wigley P, Hulme SD, Bumstead N, Barrow PA. *In vivo* and *in vitro* studies of genetic resistance to systemic salmonellosis in the chicken encoded by the SAL1 locus. *Microbes Infect.* 2002; 4(11):1111-1120.
- Wilking H, Thamm M, Stark K, Aebischer T, Seeber F. Prevalence, incidence estimations, and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in Germany: a representative, cross-sectional, serological study. *Sci Rep.* 2016; 6:22551.

- Williams RB. The ratio of the water and food consumption of chickens and its significance in the chemotherapy of coccidiosis. *Vet Res Commun*. 1996; 20(5):437-447.
- Williams RB. A compartmentalised model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry. *Int J Parasitol*. 1999; 29(8):1209-1229.
- Williams RB. Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. *Avian Pathol*. 2005; 34(3):159-180.
- Williams RB, Bushell AC, Reperant JM, Doy TG, Morgan JH, Shirley MW, Yvore P, Carr MM, Fremont Y. A survey of *Eimeria* species in commercially-reared chickens in France during 1994. *Avian Pathol*. 1996; 25(1):113-130.
- Williams RB, Marshall RN, La Ragione RM, Catchpole J. A new method for the experimental production of necrotic enteritis and its use for studies on the relationships between necrotic enteritis, coccidiosis and anticoccidial vaccination of chickens. *Parasitol Res*. 2003; 90(1):19-26.
- Wolf A, Cowen D, Paige B. Human Toxoplasmosis: Occurrence in infants as an encephalomyelitis verification by transmission to animals. *Science*. 1939; 89(2306):226-227.
- Wu Z, Rothwell L, Young JR, Kaufman J, Butter C, Kaiser P. Generation and characterization of chicken bone marrow-derived dendritic cells. *Immunology*. 2010; 129(1):133-145.
- Yamamoto M, Okuyama M, Ma JS, Kimura T, Kamiyama N, Saiga H, Ohshima J, Sasai M, Kayama H, Okamoto T, Huang DC, Soldati-Favre D, Horie K, Takeda J, Takeda K. A cluster of interferon- γ -inducible p65 GTPases plays a critical role in host defense against *Toxoplasma gondii*. *Immunity*. 2012; 37(2):302-313.
- Yan C, Yue CL, Yuan ZG, Lin RQ, He Y, Yin CC, Xu MJ, Song HQ, Zhu XQ. Molecular and serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in experimentally infected chickens. *Vet Parasitol*. 2010; 29:173(3-4):179-183.
- Yarovinsky F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *Nat Rev Immunol*. 2014; 14(2):109-121.
- Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, Hieny S, Sutterwala FS, Flavell RA, Ghosh S, Sher A. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science*. 2005; 308(5728):1626-1629.
- Yilmaz A, Shen S, Adelson DL, Xavier S, Zhu JJ. Identification and sequence analysis of chicken Toll-like receptors. *Immunogenetics*. 2005; 56(10):743-753.
- Zhang S, Lillehoj HS, Ruff MD. Chicken tumor necrosis-like factor. I. *In vitro* production by macrophages stimulated with *Eimeria tenella* or bacterial lipopolysaccharide. *Poult Sci*. 1995; 74(8):1304-1310.
- Zhang R, Thabet A, Hiob L, Zheng W, Dauschies A, Bangoura B. Mutual interactions of the apicomplexan parasites *Toxoplasma gondii* and *Eimeria tenella* with cultured poultry macrophages. *Parasit Vectors*. 2018; 11(1):453.

Literaturverzeichnis

Zhao Y, Ferguson DJ, Wilson DC, Howard JC, Sibley LD, Yap GS. Virulent *Toxoplasma gondii* evade immunity-related GTPase-mediated parasite vacuole disruption within primed macrophages. *J Immunol.* 2009; 182(6):3775-3781.

Zhou Z, Wang Z, Cao L, Hu S, Zhang Z, Qin B, Guo Z, Nie K. Upregulation of chicken TLR4, TLR15 and MyD88 in heterophils and monocyte-derived macrophages stimulated with *Eimeria tenella in vitro*. *Exp Parasitol.* 2013; 133(4):427-433.

Zöller B, Koethe M, Ludewig M, Pott S, Dauschies A, Straubinger RK, Fehlhaber K, Bangoura B. Tissue tropism of *Toxoplasma gondii* in turkeys (*Meleagris gallopavo*) after parenteral infection. *Parasitol Res.* 2013; 112(5):1841-1847.

Danksagung

Ich möchte mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. Arwid Dauschies für die Überlassung des Themas, die gute Betreuung und die stetige Unterstützung hinsichtlich Problemlösung bedanken.

Insbesondere danke ich Frau Dr. med. vet. habil. Berit Bangoura für die sehr gute Betreuung bei fachspezifischen Fragestellungen, Labormethoden und Versuchsplanungen. Ihre immerwährende Unterstützung und Motivation erleichterten auch schwierige Situationen.

Ich danke Frau PD Dr. rer. nat. habil. Angela Berndt und Frau Katrin Schlehahn des Instituts für molekulare Pathogenese am Friedrich-Löffler-Institut in Jena für die gute Zusammenarbeit und tatkräftige Unterstützung bei diversen Labormethoden.

Des Weiteren sende ich ein herzliches Dankeschön allen aktiven und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Parasitologie für Ihre organisatorische, fachliche und auch persönliche Unterstützung. Hierbei danke ich insbesondere Herrn Dr. Ronald Schmäschke, Frau Janet Reichenbach, Frau Nadine Roßner, Herrn Dr. Alaa Alnassan, Herrn Dr. Ahmed Thabet, Frau Cora Delling und Frau Tina Goroll.

Ein besonderer Dank gilt Frau Ivette Holzhausen, meiner Kollegin und Freundin, die mir immer hilfsbereit und motiviert zur Seite stand, sowohl in fachlicher als auch privater Hinsicht.

Ich danke von Herzen meiner Familie, die stets ein offenes Ohr für gute und schlechte Nachrichten haben und immer für mich da sind, wenn ich Sie brauche.

Vielen herzlichen Dank an meinen Freund Joaquín und allen Freunden, die immer an meiner Seite stehen und über emotionale Tiefpunkte mit meiner großen Leidenschaft- dem Tanzen- hinweggeholfen haben.