



Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät

Bachelorarbeit

Malaria-Erreger in Zoo-Vögeln

angefertigt an dem Institut für Zoomorphologie,
Zellbiologie und Parasitologie

vorgelegt von

Silja Heller

Univ.-Prof. Dr. Heinz Mehlhorn

Univ.-Prof. Dr. Hartmut Greven

Düsseldorf 2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
1. Einleitung.....	1
1.1 Die Situation der Vogelmalaria weltweit.....	1
1.2 Infizierungsvorgänge der verschiedenen Erreger und Auswirkungen auf den Wirt ..	2
1.3 Der Befall von Pinguinen.....	5
1.4 Der Befall von Haussperlingen.....	6
1.5 Alternative Blutabnahme mit Hilfe der südamerikanischen Raubwanze <i>Dipetalogaster maxima</i> und Nachweis von Parasiten.....	7
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	8
2. Material und Methoden.....	10
2.1 Gewinnung der Blutproben von Brillenpinguinen und Haushühnern.....	10
2.1.1. Gewinnung mittels Raubwanzen.....	10
2.1.2. Kontrollen.....	12
2.2 Gewinnung der Blutproben von Haussperlingen.....	12
2.3 Lichtmikroskopische Untersuchungen der Proben auf Malariaparasiten.....	13
2.3.1. Blutausstrich.....	13
2.3.2. Dicker Tropfen.....	14
3. Ergebnisse.....	15
3.1 Ergebnisse des Blutausstriches.....	15
3.1.1. Malariaparasiten infizierter Brillenpinguine.....	15
3.1.2. Malariaparasiten infizierter Haushühner.....	15
3.1.3. Malariaparasiten infizierter Haussperlinge.....	17
3.2 Ergebnisse des Dicken Tropfens.....	18
3.3 Blutabnahme mit Hilfe von Raubwanzen.....	18
3.4 Kontrollergebnisse.....	18
4. Diskussion.....	20

4.1	Identifizierung der Malariaerreger mittels lichtmikroskopischer Untersuchung	20
4.1.1.	<i>Plasmodium relictum</i>	21
4.1.2.	<i>Plasmodium cathemerium</i>	24
4.1.3.	<i>Plasmodium elongatum</i>	25
4.2	Unterschiede des Befalls zwischen männlichen und weiblichen Vögeln	27
4.3	Vergleich der Malariaerreger von Brillenpinguinen und Haussperlingen.....	28
4.4	Blutabnahme mit Raubwanzen.....	29
4.4.1.	Nachweis von Parasiten.....	29
4.4.2.	Eignung der Methode	30
4.4.3.	Darstellung wichtiger Parameter im Blut.....	31
5.	Zusammenfassung.....	33
6.	Literaturverzeichnis	34

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Anwendung des Pinguinrucksackes.....	11
Abbildung 2.2: saugende Raubwanze mit Bindfaden an einem Hühnerfuß.....	11
Abbildung 3.1: Lichtmikroskopische Aufnahme von zwei Blutausstrichen.....	15
Abbildung 3.2: Diagramm mit Darstellung der infizierten und nicht-infizierten Hennen und Hähne	16
Abbildung 3.3: Tabellarische Darstellung der Infizierung der Haushühner	17
Abbildung 3.4: Diagramm der Darstellung infizierter und nicht-infizierter Haussperlinge.....	17
Abbildung 3.5: Lichtmikroskopische Aufnahme des Dicken Tropfens mit übereinander gelagerten Zellkernen	18
Abbildung 3.6: Tabellarische Darstellung des Vergleiches der Kontrollproben mit den mit Hilfe von Raubwanzen entnommenen Blutproben	19
Abbildung 4.1: <i>Plasmodium relictum</i> aus dem Blut des Drosselrohrsängers <i>Acrocephalus arundinaceus</i>	22
Abbildung 4.2: Lichtmikroskopische Aufnahme von Blutausstrichen, vermutlicher Befall von <i>Plasmodium relictum</i>	23
Abbildung 4.3: Lichtmikroskopische Aufnahme von Ringstadien	25
Abbildung 4.4: <i>Plasmodium elongatum</i> aus dem Blut des Drosselrohrsängers <i>Acrocephalus arundinaceus</i>	26
Abbildung 4.5: Lichtmikroskopische Aufnahme der parasitierten Erythrozyten von Brillenpinguinen	27
Abbildung 4.6: Erregervergleich der infizierten Brillenpinguine, Haushühner und Haussperlinge.....	29

1. Einleitung

1.1 Die Situation der Vogelmalaria weltweit

Die Vogelmalaria ist fast über den gesamten Globus verbreitet (Smyth 1976; Seed und Manwell 1977; Krone et al. 2001; Schrenzel et al. 2003). Für die Verbreitung der Vogelmalaria sind Mücken der Gattungen *Culex*, *Aedes*, *Anopheles* und *Culiseta* verantwortlich (Piekarski 1954; Mehlhorn et al. 1993; Borchert 1970). In Australien tritt sie sehr selten auf (Benett et al. 1993), und in Neuseeland wurden bei umfassenden Studien überhaupt keine Blutparasiten festgestellt (Benett et al. 1993). Ein möglicher Grund für die weltweite Verbreitung der Vogelmalaria könnte das Wanderverhalten der Vögel sein (Manwell und Rossi 1975). Die Verbreitung der Vogelmalaria in Gebieten, in denen sie bisher nicht vorkam, ist eine Folge der Klimaerwärmung und der daraus resultierenden zunehmenden Verschleppung infizierter Vögel und Mückenvektoren. Nicht adaptierte Vogelpopulationen sind deswegen von der Ausrottung bedroht (Feldmann et al. 1995; Benning et al. 2002).

Die Erreger der Vogelmalaria sind folgendermaßen in der Systematik eingeordnet:

„ System: PROTOZOA (EINZELLER)
Stamm: SPOROZOA (Apicomplexa)*

[...]

2. Klasse Sporozoea

[...]

2. Unterklasse: Coccidia

[...]

2. Uord.: Haemosporina

A. Haemosporidea

Gattung: *Plasmodium*

Gattung: *Leucocytozoon*

Gattung: *Haemoproteus*

[...]

* Hierbei handelt es sich um einen Auszug; die übergreifende Systematisierung ist noch umstritten; nur wichtige Gattungen sind genannt.“ (Mehlhorn et al. 1993)

Als Malaria werden Erreger betitelt, die intraerythrozytäre Stadien besitzen. Die Gattungen *Plasmodium* und *Haemoproteus* besitzen intraerythrozytäre Stadien. Im Gegensatz zu diesen entwickeln sich die Gamonten der Gattung *Leucocytozoon* nur äußerst selten in den Erythrozyten, aus diesem Grunde gehört die Gattung nicht zu denen der Malariaerreger (Mehlhorn et al. 1993).

Der Vollständigkeit halber wird in der folgenden Arbeit die Infizierung und die Auswirkungen von *Leucocytozoon* auf den Wirt erklärt. Die Erkrankung an der Gattung *Haemoproteus* wird Pseudo-Malaria genannt, sodass die Erkrankung der Gattung *Plasmodium* als einzige als Malaria betitelt wird (Mehlhorn et al. 1993). Zurzeit sind 34 gültige Spezies der Gattung *Plasmodium* mit unterschiedlich ausgeprägten Wirtsspektren bekannt (Garnham 1966). Bishop und Bennett (1992 a,b) stellten die umfangreichste Auflistung aller Erreger der Vogel malaria und deren Wirte auf.

1.2 Infizierungsvorgänge der verschiedenen Erreger und Auswirkungen auf den Wirt

Die Infizierung eines Vogels mit Arten der Gattung *Plasmodium* wird durch die Übertragung von Sporozoiten durch weibliche Mücken der Gattungen *Aedes*, *Culex*, *Anopheles* und *Culiseta* eingeleitet (Piekarski 1954; Mehlhorn et al. 1993). Diese Sporozoiten dringen in Endothelzellen der Lunge und Leber ein und wachsen innerhalb von Stunden zu Schizonten heran (Mehlhorn et al. 1993). Die Schizonten produzieren Tausende von Merozoiten (exoerythrozytäre Phase der Schizogenie), welche sich in Endothelzellen zu Schizonten entwickeln können, aber auch bereits nach fünf bis sieben Tagen Erythrozyten befallen können (Mehlhorn et al. 1993). In den Erythrozyten entwickeln sich die Merozoiten zu Schizonten, die eine kugelige bis polymorphe Gestalt haben und drängen den Wirtszellkern an die Peripherie (Mehlhorn et al. 1993). Je nach Parasitenstamm produzieren sie in 12 bis 36 Stunden 8 bis 32 Merozoiten. Der Prozess der Merozoitenbildung mit nachfolgendem Zerfall der Erythrozyten (bei gleichzeitiger Freisetzung des fieberauslösenden Pigments = abgebautes Hämoglobin) ist nur bei manchen Stämmen von *Plasmodium relictum* vorzufinden. In den Erythrozyten entstehen nach einiger Zeit kugelige männliche, beziehungsweise weibliche Gamonten, die beim nächsten Saugakt von der Mücke aufgenommen werden und sich im Mitteldarm zu den jeweiligen Gameten differenzieren (Mehlhorn et al. 1993). Nach der Befruchtung der weiblichen Gameten wird die Zygote beweglich (Ookinete). Der Ookinete durchwandert das Darmepithel und siedelt sich zwischen Basalmembran und Epithelzelle an. Dort wächst er unter vielfacher Kernteilung zur Oozyste heran, in der Sporozoiten gebildet werden. Nach Platzen der Oozyste gelangen die Sporozoiten passiv in die Speicheldrüse (Mehlhorn et al. 1993). Bei dem nächsten Stich der Mücke werden die Sporozoiten auf einen neuen Vogel übertragen (Mehlhorn und Piekarski 2002).

Die ständige Aufrechterhaltung der Blutinfektion wird, neben den geschlechtlich differenzierten Parasitenformen in den Erythrozyten des Wirtes, durch die ungeschlechtlich heranwachsenden Schizonten und die von diesen gebildeten Merozoiten gewährleistet, die nach dem Platzen der roten Blutkörperchen neue Erythrozyten befallen. Bei dem Wirt setzen nach einigen Generationen der Malariaerreger immunologische Abwehrmechanismen ein, die die im Blut befindliche Anzahl von Erregern vorübergehend limitiert oder auch völlig verschwinden lässt, sodass die akute Phase der Infektion dadurch beendet wird (Mehlhorn et al. 1993). Dahingegen wird die exoerythrozytäre Phase nicht durch das Immunsystem beeinflusst, sodass die persistierende Gewebsinfektion eine Quelle von Rezidiven ist, die stressbedingt besonders in der Brutsaison auftreten können (Applegate 1970; Hiepe und Jungmann 1983).

Im Normalfall sind in natürlichen Wirten die Vogelplasmodien nicht krankheitserregend (Hiepe und Jungmann 1983). Bei einigen inadäquaten Zwischenwirten jedoch können, je nach Verlauf der Infektion, verschiedene Symptome auftreten (Hayworth et al. 1987). Diese können in schweren Fällen zu Hämolyse, Apathie, Koma, Gewichtsverlust und Lethargie bis hin zur Ausbildung einer schweren Anämie sowie aufgrund eines Organversagens der stark vergrößerten Milz und Leber zum Tode führen (Seed und Manwell 1977; Mehlhorn et al. 1993). Weiterhin sind ein aufgeplustertes oder zerzaustes Aussehen des Vogels Symptome der Vogel malaria. Stirbt ein Vogel an Malaria, so liegen zwischen dem Auftreten klinischer Symptome und dem Tod durchschnittlich 24 Stunden (Viner et al 2004). Wenn ein Tier die akute Phase überlebt, kann es immer noch aufgrund der Rezidiven an einer Malariaerkrankung versterben. Durch eine stressauslösende Situation, zum Beispiel einem Kälteeinbruch, welche einen klinisch apparenten Rückfall auslöst, ist es möglich, dass sich die Überlebenschancen des Tieres verringern (Borchert 1970). Die Morbidität und Mortalität an Wildvögeln, die durch die Erreger der Gattung Plasmodium verursacht werden, ist nicht genau bekannt (Garnham 1966), allerdings sind sie wahrscheinlich bei Vogelpopulationen, die nicht an den Erregerstamm adaptiert sind, hoch.

Die Pathogenität der Erreger *Leucocytozoon* ist bei domestizierten Vögeln sehr hoch. Es wird vermutet, dass durch den Prozess der Domestizierung die natürliche Resistenz der Tiere gegenüber der parasitären Infektion erniedrigt wurde (Desser und Benett 1993). Die Erkrankung verursacht Bewegungsstörungen, auffällige Schwäche und hochgradige Anämie. Bei jungen Tieren führt die akut verlaufende Infektion infolge von inneren Blutungen und intravaskulärer Hämolyse oft zur Mortalität (Mehlhorn et al. 1993).

Die Infizierung mit den Erregern der Gattung *Leucocytozoon* beginnt mit dem Stich von Kriebelmücken der Gattung *Simulium* oder von Gnitzen (*Culicoides*). Die dabei übertragenen Sporozoitien gelangen in die Blutbahn des Vogels und in zahlreiche Gewebetypen, wo sie dann Schizonten bilden (Olsen 1974). Zuerst treten kleinere Schizonten in der Leber und dann größere in Lunge, Leber, Gehirn, Herz, Niere, Darm und Lymphknoten auf. Erst nach einer Woche, meist nach zehn bis zwölf Tagen, sind Gamonten in den Leukozyten zu finden. Durch die Vergrößerung der Gamonten auf mehr als 20 µm erscheinen die parasitierten Wirtszellen häufig spindelförmig (Mehlhorn et al. 1993). Darüber hinaus treten auch zahlreiche kugelige Gamonten in den Leukozyten auf. Durch den Stich des Vektors werden die Gamonten aufgenommen, und es entstehen nach der Gametenbildung im Magen der Kriebelmücke bis zu 30 µm lange Ookineten. Diese differenzieren sich in der Magenwand zu Oozysten von etwa 10 bis 13 µm Durchmesser, aus welchen dann - im Vergleich zu der Vermehrung bei Plasmodium wenige - Sporozoitien hervorgehen (Mehlhorn et al. 1993).

Erreger der Gattung *Haemoproteus* sind weit verbreitet, verursachen in der Regel aber keine relevante Erkrankung ihrer Vogelwirte (Levine 1961). Gelegentlich sind Fressunlust, Ruhelosigkeit und Anämie zu beobachten (Mehlhorn et al. 1993). Es können bis zu 95% der roten Blutkörperchen der Vögel betroffen sein, ohne dass diese heftige Symptome zeigen (Desser und Bennett 1993). Die Entwicklung der Erreger der Gattung *Haemoproteus* beginnt mit dem Stich von Lausfliegen (*Hippoboscidae*) oder Gnitzen (*Culicoides*), indem die Sporozoitien aus dem Speichel in die Blutbahn des Vogels gelangen und diverse innere Organe, wie Lunge, Milz und Leber befallen (Mehlhorn et al. 1993). Sie dringen in die Endothelzellen der Organe ein und wachsen schnell zu Schizonten heran, wobei ein Schizont 12 bis 15 Zytomere bildet, die aus Zytoplasma umgebenen Tochnuklei bestehen (Olsen 1974). Die Wirtszelle vergrößert sich, und es kommt zu einer vielfachen Teilung des Nukleus jedes Zytomers, die nun die Oozyste darstellen. Die Wirtszelle wächst während der weiteren Größenzunahme der Zytomere und bildet entlang der sich verzweigenden Kapillaren eine so große Masse, dass sie die Blutgefäße verschließt (Olsen 1974). Die Nuklei wandern während der nächsten Wochen an die Oberfläche der Zytomere, umgeben sich mit Zytoplasma und werden so zu Merozoiten (Wiersch 2006).

Es treten zwei Sorten von Schizonten auf: Die Mikroschizonten, welche häufig keine Zytomere entwickeln und die Makroschizonten, welche sehr große Zytomere ausbilden und doppelt so groß wie die Mikroschizonten werden (Olsen 1974).

Durch das Platzen der Schizonten gelangt eine große Zahl von Merozoiten in den Blutstrom. Die meisten differenzieren sich in Erythrozyten zu weiblichen und männlichen Gametozyten, einige jedoch dringen wieder in Endothelzellen ein und wiederholen den Schizogeniezyklus (Wiersch 2006). Die weiblichen und männlichen Gametozyten werden relativ groß und umschließen letztendlich wurst-beziehungsweise hantelförmig den Zellkern (Mehlhorn et al. 1993). Während des Saugaktes des Vektors gelangen die Gametozyten in dessen Verdauungstrakt, wo sich die Parasiten entsprechend der Gattungen *Leucocytozoon* und *Plasmodium* zu Sporozoiten entwickeln (Wiersch 2006).

1.3 Der Befall von Pinguinen

Die Vogel malaria bei Pinguinen wird unter anderem durch die Erreger *Plasmodium relictum* und *Plasmodium elongatum* verursacht. Da die Pinguine unter natürlichen Bedingungen in der Regel nicht mit Malariaerregern in Kontakt kommen, ist die Pathogenität der Erreger bei den Pinguinen extrem hoch (Lindt und Hörning 1966; Mehlhorn et al. 1993). Zwergpinguine, die aus Australien und Neuseeland stammen und importiert werden, haben unter Umständen noch nie eine Malariainfektion durchgemacht, da der Erreger in ihrem ursprünglichen Herkunftsland nicht vorkommt. Deshalb haben sich Pinguine als hochanfällig für Malaria erwiesen (Kronenberger und Schüppel 1977; Lindt und Hörning 1966). Die Todesrate von 50% bei ausgewachsenen Pinguinen liegt bei Jungtieren noch höher, da diese bislang noch keinen Kontakt mit den Parasiten hatten, was im Übrigen die Haupttodesursache bei Pinguinen ist (Cranfield et al. 1990; Redrobe 2000). Dies verdeutlichen die Zahlen des Zoos in Baltimore, der in den Jahren 1983 bis 1990 108 Pinguine groß zog, und von denen 32 an Malaria verstarben (Cranfield et al. 1994). Durch eine Studie, die europaweit durchgeführt wurde, konnte festgestellt werden, dass Vogel malaria in ganz Europa anzutreffen ist, und dass sämtliche Altersgruppen von Pinguinen betroffen sind (Petit 1997). Ein anderes wichtiges Ergebnis dieser Studie war, dass Vogel malariaerreger in Pinguinen nur schwer zu diagnostizieren sind, da Pinguine keine adäquaten Wirte sind und die endothelialen Entwicklungsphasen sehr viel schwerwiegender verlaufen als bei anderen Vogelwirten. Außerdem sind im Blut der Wirte die Entwicklungsstadien der Parasiten fast nie zu finden (Reichenow 1947; Cranfield et al. 1990). Die Infektion wird meist erst spät entdeckt, weil initial klinische Symptome bei den Tieren normalerweise fehlen (Seed und Manwell 1977; Graczyk et al. 1993).

Wenn dann die Erkrankung klinisch festgestellt wird, ist es häufig zu spät, um das Leben des Tieres mit therapeutischen Maßnahmen retten zu können (Cranfield et al. 1990). Als ein weiteres Problem hat sich herausgestellt, dass Pinguine, die keine erythrozytären (und damit auch keine routinemäßig nachweisbaren) Entwicklungsstadien mehr aufweisen, aufgrund persistierender Gewebsinfektionen Rezidive erleiden und wieder infektiös für Mücken werden können. Diese können dann wiederum andere im Zoo lebende Tiere infizieren (Waldenström et al. 2004). Um die Malariaparasiten so früh wie möglich im lebenden Tier erkennen zu können, werden verschiedene Verfahren angewendet. Dazu zählen das ELISA-Testverfahren und eine Aufstellung von serologischen Referenzwerten (Graczyk et al. 1993, 1994, 1995). Durch regelmäßig durchgeführte Blutabnahmen sollen die Pinguine überwacht werden, damit eine wirksame Behandlung durchgeführt werden kann (Graczyk et al. 1993, 1994, 1995).

Aufgrund der hohen Sterblichkeitsrate, der Luftverschmutzung und der Temperaturen werden viele Pinguine weltweit in geschlossenen Gehegen ohne Außenbereich gezeigt, um eine Infektion zu vermeiden. In Tiergärten, wo dies nicht möglich oder gewollt ist, werden die Tiere im Sommer mit einer Malariaphylaxe, wie Chloroquin oder Paraquin behandelt (Cranfield et al. 1994).

1.4 Der Befall von Haussperlingen

In einer Studie wurden 893 in Deutschland gefangene Sperlingsvögel (Passeriformes) von 44 Arten aus 14 unterschiedlichen Familien untersucht (Haberkorn 1984). Dabei stellte sich heraus, dass 14% der untersuchten Vögel mit Malariaerregern infiziert waren, davon 1,1% mit Plasmodien. Von den einheimischen Haussperlingen (*Passer domesticus*) sind rund 3% mit dem Vogelmalariaerreger befallen. Einer der am häufigsten auftretenden Erreger der Malaria bei Haussperlingen ist *Plasmodium relictum* (Applegate 1971; Mehlhorn et al. 1993). Da die Tiere eine Koevolution mit dem Erreger der Vogelmalaria durchlebt haben, schadet der Parasit den Haussperlingen nicht, sodass diese weitestgehend symptomfrei leben. Der Erreger *Plasmodium cathemerium* tritt ebenfalls bei Haussperlingen auf, führt allerdings häufig zum Tode des Tieres (Mehlhorn und Piekarski 2002).

Von 1149 in Deutschland untersuchten Eulen und Greifvögeln hatten 11% eine Infektion mit den Vogelmalariaerregern (Krone et al. 2001). Die hohe Infektionsrate der in Deutschland einheimischen Vögel verdeutlicht die Problematik nicht-einheimischer Vögel, wie am Beispiel importierte Pinguine, die keine Koevolution mit

dem Erreger der Vogelmalaria durchlebt haben und mit hoher Wahrscheinlichkeit durch einen Stich einer infizierten Mücke erkranken und daran zugrunde gehen (Kroneneberger und Schüppel 1977).

1.5 Alternative Blutabnahme mit Hilfe der südamerikanischen Raubwanze *Dipetalogaster maxima* und Nachweis von Parasiten

Um über das Allgemeinbefinden eines Tieres urteilen zu können, ist es in vielen Fällen unabdingbar, das Blut des entsprechenden Tieres zu untersuchen (Stadler et al. 2007). Eine Blutprobenentnahme gestaltet sich bei Haustieren aufgrund ihrer Zutraulichkeit relativ einfach, wohingegen die Entnahme von Blut bei wildlebenden Tieren oder Tieren in Zoologischen Gärten eine Problematik darstellt (Stadler et al. 2009). Die wenigsten Tiere sind so zutraulich, beziehungsweise so fixierbar, dass eine Blutentnahme durchgeführt werden kann. Meist müssen die Tiere in Narkose gelegt werden, welche jedoch immer ein hohes Risiko mit sich bringt. Da die Gefahr einer Narkose bei bestimmten Tieren und ab einem gewissen Alter zu hoch ist, kann es durchaus sein, dass keine Blutentnahme möglich ist (Stadler et al. 2007). Eine weniger risikante Alternative ist die Blutentnahme mit mittel- und südamerikanischen Raubwanzen (Stadler et al. 2009). Mehr als 130 Arten der Unterfamilie *Triatominae* aus der Familie der *Reduviidae* ernähren sich in den postembryonalen Stadien ausschließlich von Blut, welches sie zur Häutung benötigen. Nach der Blutmahlzeit findet die Häutung statt (Lent und Wygodzinsky 1979; Schofield 1994). Der Anstich wird von dem Wirt nicht wahrgenommen, da der Speichel der Wanzen Komponenten enthält, die die Reizweiterleitung unterbinden. Die Abnahme kann bis zu 20 Minuten andauern und insgesamt wird eine bis zu 3,8 ml große Menge Blut aufgenommen (Schaub und Posposchil 1995; Dan et al. 1999). Die Wanzen können das sechs- bis zwölffache ihres Körpergewichtes an Blut aufnehmen, welches zunächst in den großen, erweiterbaren Abschnitt des Mitteldarmes, den Magen, gelangt. Der Mageninhalt wird durch eine rasche Entnahme der wässrigen Blutbestandteile aufkonzentriert und, abgesehen von der Hämolyse der Blutzellen, erst nach drei bis vier Tagen unverändert gelagert. Dann gelangt der Mageninhalt portionsweise in den verdauenden Dünndarm (Schaub 2001). Nach einer Blutmahlzeit ist das Abdomen vollgesogener Larven fast kugelförmig. Aufgrund dessen könnten sie sich schlecht fortbewegen, wenn ihnen nicht ihr überaus effektives Exkretionssystem zu Gute kommen würde.

So wird oft schon zum Ende der Blutabnahme mit der Ausscheidung der wässrigen Blutbestandteile begonnen, sodass sich die Wanzen kurz nach dem Blutsaugen wieder fortbewegen können (Madrell 1969).

Triatominen kommen überwiegend in Lateinamerika vor und können dort den Erreger der Chagas-Krankheit übertragen (Schaub 1996). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzte Art *Diptelogaster maxima* kommt nur in der Nebelwüste auf der niederkalifornischen Halbinsel Baja California in Mexiko vor und ist mit 33 bis 42 mm die größte bekannte Triatominenart (Ryckman und Ryckman 1963; Lent und Wygodzinsky 1979). Durch die lebensfeindlichen klimatischen Bedingungen sind diese Raubwanzen sehr aggressiv und stechen ihre Wirte schnell an. Sie sind im Gegensatz zu den meisten nachtaktiven Triatominen auch tagaktiv und saugen an allen warmblütigen Vertebraten, an Reptilien und kleinen Säugetieren sowie Vögeln (Ryckman und Ryckman 1963; Lent und Wygodzinsky 1979).

Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurden die Raubwanzen für die Xenodiagnose bei Menschen benutzt (Marsden et al. 1979; Schaub und Meiser 2011), um die Chagas-Krankheit (Erreger: *Trypanosoma cruzi*) nachzuweisen. Hierbei werden bis heute Raubwanzen aus Laborzuchten eingesetzt. Wenn das Blut Trypanosomen enthält, vermehren diese sich in der Wanze und sind so leichter mikroskopisch nachzuweisen als die geringe Anzahl an Trypanosomen, die im Blut des Menschen zu finden sind (Brumpt 1914; Mehlhorn und Piekarski 2002). Darüber hinaus werden die Raubwanzen aus der Laborzucht bei Tieren, die sehr klein sind und durch eine Kanüle verletzt würden, als lebendige Spritzen benutzt. Durch Studien an Fledermäusen (*Microchiroptera*), Flussseseschwalben (*Sterna hirundo*), Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) und Primaten konnten Untersuchungen bezüglich des Energieaufwandes und der Hormonanalytik erfolgreich durchgeführt werden (Von Helvesen und Reyer 1984; Von Helsen et al. 1986; Voigt et al. 2004, 2006; Becker et al. 2005; Thomsen und Voigt 2006; Stadler et al. 2007).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll das Blut von Brillenpinguinen (*Spheniscus demersus*), Haushühnern (*Gallus gallus domesticus*) und Haussperlingen (*Passer domesticus*) auf Vogel malaria untersucht werden. Hierbei ist es wichtig zu verdeutlichen, wie viele der freilebenden Tiere befallen sind und ob der mit Vogel malaria befallende Haussperling als Ursache für die Infektionen der Brillenpinguine zu sehen ist.

Dafür werden die Malariaerregerspektren aller Tiere lichtmikroskopisch bestimmt. Die Stadien der Vogel malaria in den befallenen Erythrozyten werden ebenfalls erfasst, um das Stadium des Krankheitsverlaufes besser analysieren zu können.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, herauszufinden, ob mit den von Raubwanzen gewonnenen Blutproben ein Parasitennachweis möglich ist. Unter Einbeziehung aller bisher bekannten Einsatztechniken der Raubwanzen soll versucht werden herauszufinden, wie es bei den Brillenpinguinen und Haushühnern am besten möglich ist, die Wanzen ohne Stress auf die Tiere zu setzen.

2. Material und Methoden

2.1 Gewinnung der Blutproben von Brillenpinguinen und Haushühnern

2.1.1. Gewinnung mittels Raubwanzen

Für die Gewinnung der Blutproben von Brillenpinguinen (*Spheniscus demersus*) und Haushühnern (*Gallus gallus domesticus*) wurden Raubwanzen der Art *Diptelogaster maxima* eingesetzt. Diese wurden unter standardisierten Bedingungen bei 26 °C (+/- 1), 70-80% relativer Feuchte und einem 16/8 Hell- Dunkel- Rhythmus mit Hühnern (*Gallus gallus f. dom.*) als Wirt im Labor gezüchtet (Schaub 1989). In der vorliegenden Arbeit wurden die vierten oder fünften Larvenstadien (L4 und L5) des Entwicklungszyklusses verwendet.

Zwölf Brillenpinguinen des Wuppertaler Zoos wurde Blut entnommen und untersucht. Dabei konnte die für Xenodiagnosen übliche Methode, bei der ein mit Gaze verschlossenes Gefäß an das zu beprobende Tier angehalten wird, nicht verwendet werden. Die Tiere waren zu unruhig und versuchten, nach der Hand des Pflegers zu picken. Auch die zweite Variante, bei der die Raubwanzen frei auf dem Tier laufen gelassen werden, funktionierte nicht, da sich die Pinguine durch die Unruhe stark bewegten und die Wanzen abfielen. Schließlich bewährte sich ein auf dem Rücken des Pinguins befestigtes durchsichtiges Plastikdöschen, welches mit zwei ca. einen Meter langen Hosenbundgummibändchen über Kreuz verklebt wurde (siehe Abbildung 2.1.). Die Plastikbecher waren durch kleine Pappwände unterteilt, an denen sich die Raubwanzen frei bewegen konnten. Dies bewirkte ein schnelleres Anstechen, als die Verwendung eines Gefäßes ohne Karton (Schaub 2009). Vor dem Anbringen der Plastikdosen wurde mehrmals kräftig in die Gläser gehaucht, da sich die Saugbereitschaft der Wanzen durch den so erhöhten CO₂-Gehalt verstärkt. Um das Gleichgewicht der Tiere nicht zu stören, wurden die Gefäße mittig auf den Rücken angesetzt und die Bänder unter- und oberhalb der Flügel entlanggeführt und auf der Brust verknötet (Bannasch 1995).



Abbildung 2.1: Anwendung des Pinguinrucksackes. **a:** Bestückter Pinguinrucksack mit 2 vollgesogenen und einer nicht-vollgesogenen Raubwanze, **b:** Pinguinrucksack an einem Brillenpinguin.

Insgesamt wurden 40 Haushühner untersucht, von denen 27 aus dem Zoologischen Garten in Wuppertal stammten und 13 aus einer privaten Geflügelfreihaltung in Aprath an der Stadtgrenze Wuppertals. Bei den Haushühnern bewährte sich die für die Brillenpinguine neu entwickelte Methode nicht, da die Hühner zu stark mit ihren Flügeln schlugen und so die Dose vom Rücken abfiel.



Abbildung 2.2: saugende Raubwanze mit Bindfaden an einem Hühnerfuß

Dahingegen funktionierte es bei ihnen besonders gut, die Raubwanzen einfach frei auf dem Gefieder laufen zu lassen. Um die Wanzen nach dem Saugakt besser finden zu können, wurde ihnen ein ca. 20 cm langer Faden um den Thorax gebunden.

Direkt nach der Blutaufnahme wurde das Blut analog zu vorherigen Studien mit einer 21G-Kanüle aus dem Magen der Raubwanze in eine Spritze aufgenommen und direkt in ein Lithium-Heparin-Gefäß überführt, welches bis zur Weiterverwendung im Kühlschrank gelagert wurde (Von Helversen 1986). Am Ende eines jeden Tages wurden die Ausstriche angefertigt.

2.1.2. Kontrollen

Da in der vorliegenden Arbeit überprüft werden soll, ob das durch die Wanzen erhaltene Blut als Parasitennachweis dienen kann, müssen Kontrollproben genommen werden. Diese Kontrollproben wurden von dem Tierarzt des Wuppertaler Zoos mit einer 21G-Kanüle genommen und ebenfalls direkt in Lithium-Heparin-Gefäße überführt. Sowohl bei den Brillenpinguinen, als auch bei den Hühnern befand sich in der Kanüle ein Tropfen Heparin, das die Gerinnung des Blutes in der Kanüle verhindern sollte.

Bei den Brillenpinguinen wurde das Blut mittig zwischen den Hüftknochen aus dem Blutgefäß entnommen, bei den Haushühnern wurde die Flügelvene (*Vena ulnaris*) oder die Halsvene (*Vena jugularis externa*) angestochen und so die Blutproben gewonnen. Verschloss sich die Anstichwunde nicht direkt, wurde die Blutung mit Claudenwatte gestillt. Die Ausstriche wurden zeitig nach der Entnahme angefertigt und die Blutproben im Kühlschrank gelagert.

2.2 Gewinnung der Blutproben von Haussperlingen

Im September 2011 wurden zehn Haussperlinge mit Hilfe von Japannetzen auf dem Gelände des Wuppertaler Zoologischen Gartens gefangen. Dafür wurden die Tiere zunächst über eine Woche hinweg mit Sonnenblumenkernen an bestimmten Stellen in der Nähe von Gebüsch angefüttert. Das Netz wurde nur an den Fangtagen um die Futterstelle herum aufgebaut. Da das Netz sehr feinmaschig war, konnten die Vögel es beim Anflug auf die Futterstelle nicht erkennen, verfangen sich darin und wurden sofort aus dem Netz herausgeholt. Verfangen sich mehrere Haussperlinge gleichzeitig im Netz, wurden sie befreit und bis zur Blutabnahme in einem kleinen Baumwollsäckchen aufbewahrt. Dies ist in der Ornithologie eine gängige Methode, um die Verletzungsgefahr der Tiere möglichst gering und um sie ruhig zu halten. Um einen Doppelfang auszuschließen, wurden den Haussperlingen, in Absprache mit der Vogelwarte Helgoland, die zweite Schwanzfeder von links gekürzt. Dies beeinträchtigt die Tiere nicht, da das Fliegen nicht erschwert wird. Zudem verlieren die Tiere nach spätestens einem halben Jahr in der Mauser die gekürzte Feder. Das Blut wurde bei den Haussperlingen aus der Flügelvene (*Vena ulnaris*) entnommen. Vor der Blutentnahme wurden die Flügel an der Entnahmestelle mit 70% Ethanol desinfiziert. Dann erfolgte die Entnahme des Bluttröpfens durch eine Punktierung mit einer sterilen Mikrokanüle.

Der austretende Blutstropfen wurde sofort mit einer nicht heparinisierten Hämatokritkapillare aufgenommen, und es wurde schnellstmöglich ein Ausstrich angefertigt, bevor das Blut agglutinierte. Hörte die Wunde nicht sofort auf zu bluten, wurde die Blutung mit Claudenwatte gestillt. Danach wurden die Haussperlinge wieder in die Freiheit entlassen.

Für den Fang, die Blutentnahme und die Kürzung der 2. Schwanzfeder liegen alle erforderlichen Ausnahmegenehmigungen gemäß § 45 Abs. 7, Nr. 3 BNatSchG vor.

2.3 Lichtmikroskopische Untersuchungen der Proben auf Malariaparasiten

2.3.1. Blutausstrich

Die Blutausstriche wurden nach Mehlhorn (1993) angefertigt. Bei dieser Vorgehensweise wird ein „kleiner (!) Blutstropfen [...] mit einem Deckglas (Objektträger) auf einem sauberen Objektträger ausgezogen und an der Luft getrocknet“ (Mehlhorn 1993). Danach wurde der Ausstrich mit der Diff-Quik-Schnellfärbung der Firma Medion Diagnostiks gefärbt. Der Diff-Quik-Färbetest ist eine Schnellfärbemethode, deren Ergebnisse mit denen der Pappenheim- Methode (Giemsa-May-Grünwald) gut vergleichbar sind.

Gemäß der Anleitung wurden zuerst die Objektträger fünfmal für eine Sekunde in die „Diff-Quik Fix: Fixerlösung“ getaucht, die aus Fast Green (002g/l) in Methanol bestand. Danach wurden sie fünfmal eine Sekunde in die „Diff-Quik I: Färbelösung I“ getaucht, die Eosin Y (1,22g/l) in Phosphatpuffer (pH 6,6) und 0,1% (g/v) Natriumazid als Konservierungsmittel enthielt. Nun wurden die Objektträger ein drittes Mal fünfmal für eine Sekunde in die „Diff-Quik II: Färbelösung II“ getaucht, die Thiazin-Farbstoff (1,1g/l) in Phosphatpuffer (pH 6,6) enthält. Im Anschluss wurden die Objektträger mit Leitungswasser abgespült und erneut luftgetrocknet.

Bei einer 1000-fachen Vergrößerung waren im Mikroskop durch die Färbung die Strukturen der Blutzellen und die der Malariaerreger gut sichtbar und unterscheidbar. Im Blutausstrich wurde von jeweils 2000 Erythrozyten die Parasitierung mit Malariaerregern erfasst (Godfrey et al. 1987). Herr Professor Dr. Mehlhorn überprüfte die von den Erregern gemachten Fotos, so dass ausschließlich Malariaerreger erfasst wurden. Die Identifizierung des genauen Malariaerregers mittels eines Blutausstriches erweist sich als schwierig, da sich die Gametozyten zum Teil sehr ähneln (Seed und Manwell 1977).

Aus diesem Grund kommen in der vorliegenden Arbeit Vergleiche mit den wichtigsten Malariaerregern der Haussperlinge, Brillenpinguine und Haushühnern in Deutschland: *Plasmodium relictum*, *Plasmodium cathemerium* und *Plasmodium elongatum* vor. Auf weitere Verifizierungen der Ausstriche und die Bestimmung mit Hilfe der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) wurde aus zeitlichen und finanziellen Gründen verzichtet, sodass ein genaues Erregerspektrum nicht ermittelt wurde. Durch die Auswertung der Blutausstriche konnte der Erreger nur in akuten Stadien gesehen werden.

2.3.2. Dicker Tropfen

Der dicke Tropfen wurde zuerst gemäß Mehlhorn et al. (1993) angefertigt. Der Vorgang lief folgendermaßen ab: „Ein Blutstropfen wird auf einem entfetteten Objektträger auf etwa 1,5 cm² mit einem [...] [Zahnstocher] verrührt, um Koagulation zu verhindern und das Fibrin zu entfernen. Nach der Lufttrocknung wird der Objektträger (**ohne Fixierung!**) in Wasser gelegt, bis die rote Farbe völlig verschwunden ist.“ (Mehlhorn et al. 1993). Dann wurden die dicken Tropfen mit der Diff-Quick-Färbelösung, wie oben bei den Blutausstrichen erklärt, gefärbt. Der dicke Tropfen dient dem Nachweis von Parasiten bei einer geringen Parasitendichte: Die Erythrozyten platzen dabei auf, und so werden die Zellkerne und mögliche Parasiten freigelegt. Da die Erythrozyten der Vögel jedoch Kerne besitzen und so nur Kerne zu sehen waren, wurde die Vorgehensweise abgeändert. Der Blutstropfen wurde mit einem Zahnstocher dünn verrührt, sodass die Erythrozyten möglichst nebeneinander lagen und dann, wie zuvor erklärt, lysiert und gefärbt.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse des Blutausstriches

3.1.1. Malariaparasiten infizierter Brillenpinguine

Insgesamt wurden zehn Brillenpinguine untersucht. Bei vier Tieren konnten Vogelmalariaerreger in den Blutausstrichen nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 3.1). Dies bedeutet, dass 40% der untersuchten Brillenpinguine an Vogelmalaria erkrankt sind. Unter 2000 Erythrozyten wurde bei jedem Tier nur ein Erreger gefunden, was heißt, dass nur 0,05% aller Erythrozyten befallen waren. Da die Geschlechter der Brillenpinguine nicht bekannt sind, kann der Unterschied zwischen männlichen und weiblichen infizierten Pinguinen nicht dargestellt werden.

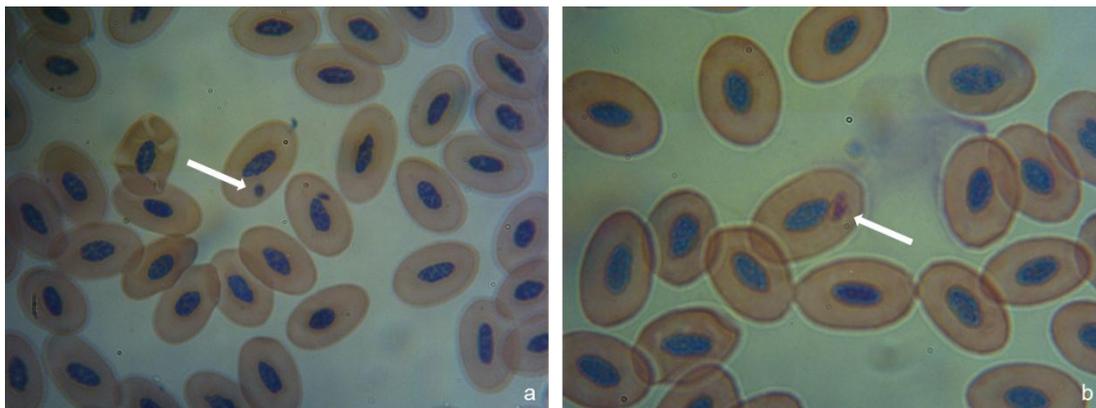


Abbildung 3.1: Lichtmikroskopische Aufnahme von zwei Blutausstrichen (a,b) mit Malariaerregern in Erythrozyten von Brillenpinguinen. Pfeile: Malariaerreger, bei 1000-facher Vergrößerung.

3.1.2. Malariaparasiten infizierter Haushühner

Von den 40 untersuchten Haushühnern wiesen acht Vogelmalariaerreger auf. Dies entspricht 20% der untersuchten Tiere. Unter den 40 Hühnern befanden sich 14 Hähne, von denen vier Tiere (28,7%) Malariaparasiten in ihrem Blut hatten. Bei den Hennen wurden ebenfalls bei vier (15,4%) Tieren Malariaerreger nachgewiesen. Die Anzahl infizierter männlicher Tiere ist fast doppelt so groß, wie die Anzahl erkrankter weiblicher Tiere.

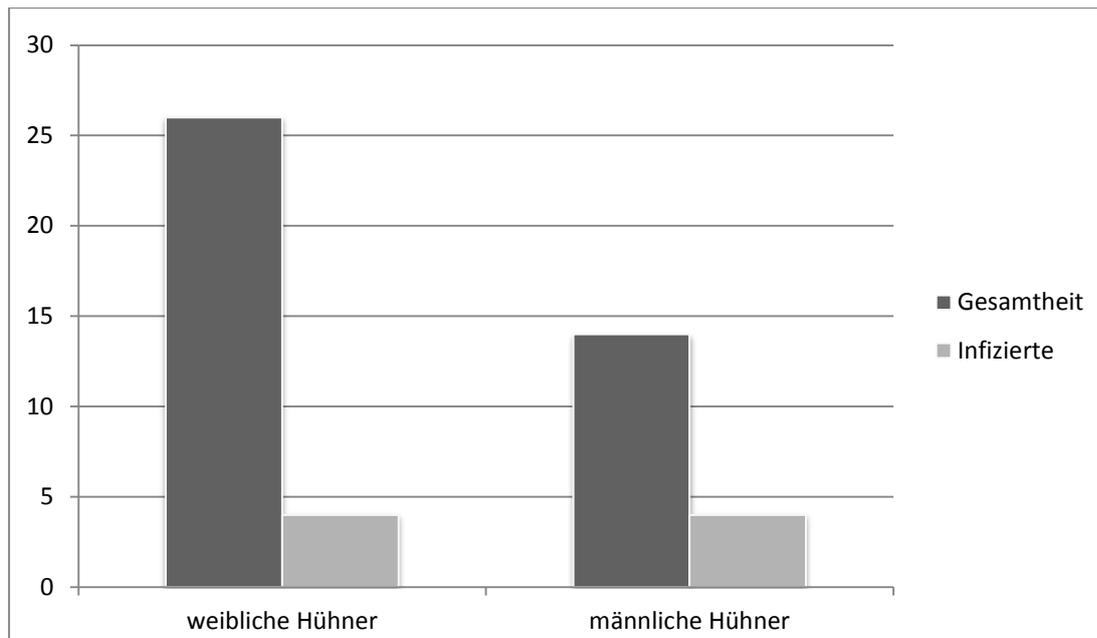


Abbildung 3.2: Diagramm mit Darstellung der infizierten und nicht-infizierten Hennen und Hähne

Bei nur einem Tier wurden zwei Malariaerreger in 2000 Erythrozyten gefunden, was 0,1% ausmacht. Bei den übrigen Tieren waren 0,05% der Erythrozyten befallen.

Nummer des Tieres	Geschlecht	Anzahl der Malariaerreger pro 2000 Erythrozyten	Nummer des Tieres	Geschlecht	Anzahl der Malariaerreger pro 2000 Erythrozyten
I	W	-	XXI	W	-
II	W	-	XXII	M	-
III	W	-	XXIII	M	-
IV	W	-	XXIV	W	-
V	W	-	XXV	W	1
VI	W	-	XXVI	M	-
VII	M	-	XXVII	M	-
VIII	M	-	XXVIII	M	1
IX	M	-	XXIX	M	1
X	M	-	XXX	M	-
XI	M	-	XXXI	W	-
XII	M	1	XXXII	W	-

XIII	W	-	XXXIII	W	-
XIV	W	-	XXXIV	W	-
XV	W	1	XXXV	W	-
XVI	W	-	XXXVI	W	-
XVII	W	1	XXXVII	W	-
XVIII	W	2	XXXVIII	W	-
XIX	W	-	XXXIX	W	1
XX	W	-	XXXX	M	-

Abbildung 3.3: Tabellarische Darstellung der Infizierung der Haushühner

3.1.3. Malariaparasiten infizierter Haussperlinge

In der vorliegenden Arbeit wurden zehn Haussperlinge gefangen, von denen ein männlicher und ein weiblicher Vogelmalariaparasiten in ihrem Blut aufwiesen. Das entspricht einer Infizierungsrate von 33,3% bei den männlichen und 14,3% bei den weiblichen Haussperlingen. Insgesamt waren 20% der untersuchten Tiere von Malariaparasiten befallen.

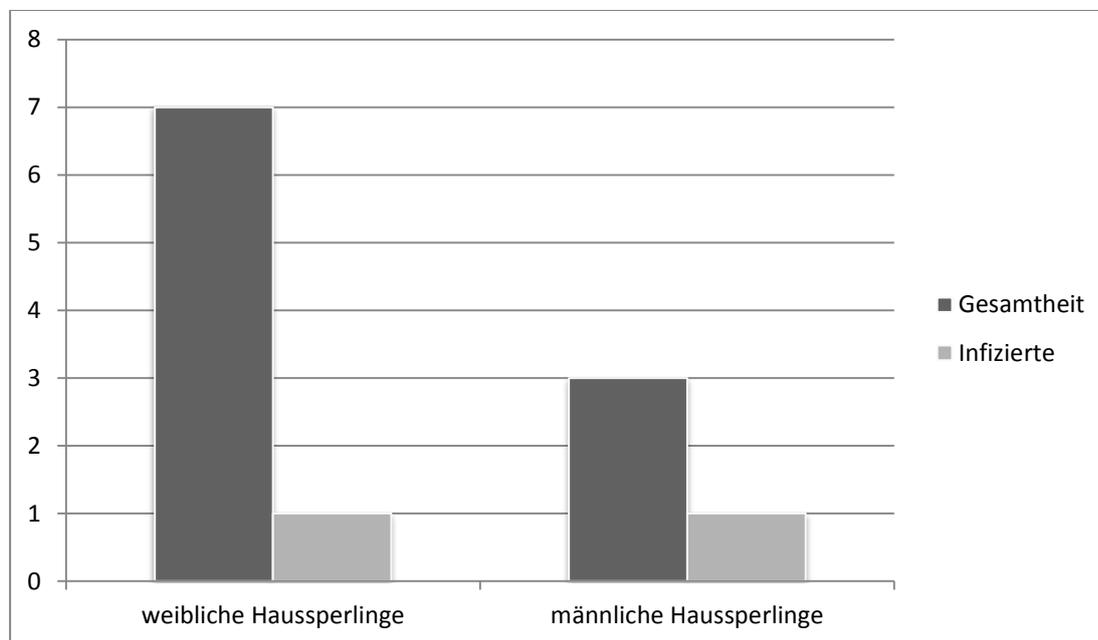


Abbildung 3.4: Diagramm der Darstellung infizierter und nicht-infizierter Haussperlinge

3.2 Ergebnisse des Dicken Tropfens

Da die Erythrozyten der Vögel Kerne enthalten, war es leider nicht möglich, einen auswertbaren Dicken Tropfen anzufertigen. Die Zellkerne verdeckten jegliche Erreger. Aus diesem Grund wurde nur mit dem Blutausstrich gearbeitet.

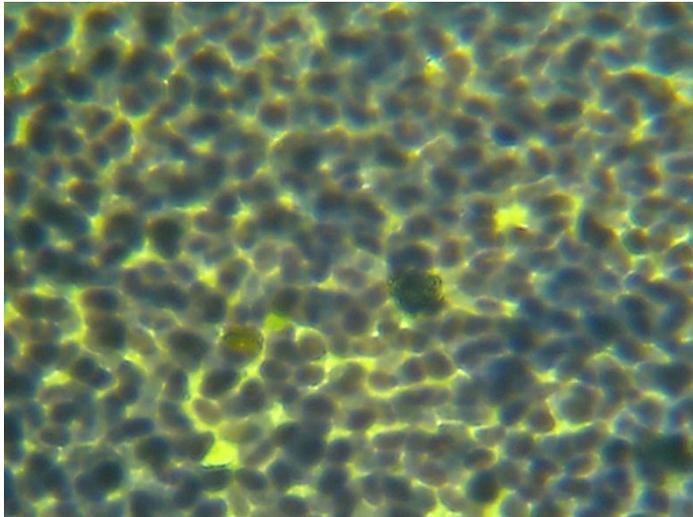


Abbildung 3.5: Lichtmikroskopische Aufnahme des Dicken Tropfens mit übereinander gelagerten Zellkernen; bei 500-facher Vergrößerung

3.3 Blutabnahme mit Hilfe von Raubwanzen

Die Blutabnahme mit Hilfe von Raubwanzen funktionierte gut. Die dadurch erhaltenen Blutproben ließen sich einwandfrei austreichen, und die Blutausstriche hatten eine hohe Qualität. Lediglich bei 2 Proben waren viele Artefakte im Blutausstrich zu sehen, was daran liegen könnte, dass Verdauungssekrete der Wanze und verdautes Blut mit der Spritze aufgenommen wurden.

3.4 Kontrollergebnisse

Durch den Heparintropfen in der Kanüle ließen sich die Blutproben besonders gut austreichen, da sie etwas flüssiger waren, als die Blutproben ohne Heparin. Das Heparin hatte keinerlei Einfluss auf die Malariaerreger. In der Abbildung 3.6 wird das Kontrollergebnis mit denen der mit Hilfe von Raubwanzen gewonnenen Ergebnisse verglichen. In der linken Hälfte der Tabelle wurden die Haussperlinge mit den Nummern 1 bis 10 und die Haushühner mit den Nummern I bis X aufgelistet. In der rechten Hälfte werden die Ergebnisse der Kontrollproben dargestellt. Es gab keinerlei falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse (siehe Abbildung 3.6), sodass die Kontrollen exakt mit denen der mit Raubwanzen gewonnenen Proben übereinstimmen.

Nummer des Tieres	Anzahl der Malariaerreger pro 2000 Erythrozyten	Nummer des Tieres Kontrollen	Anzahl der Malariaerreger pro 2000 Erythrozyten
1	2	1	2
2	-	2	-
9	1	9	1
10	-	10	-
I	-	I	-
III	-	III	-
IV	-	IV	-
V	-	V	-
X	-	X	-

Abbildung 3.6: Tabellarische Darstellung des Vergleiches der Kontrollproben mit den mit Hilfe von Raubwanzen entnommenen Blutproben; Nummerierungen 1-10 gehören zu Haussperlingen; Nummerierungen I-X gehören zu Haushühnern

4. Diskussion

4.1 Identifizierung der Malariaerreger mittels lichtmikroskopischer Untersuchung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Blutproben ausschließlich mit Hilfe eines Mikroskops untersucht. Da die Blutausstriche eine recht hohe Qualität hatten, konnten die angefärbten Malariaerreger gut in den Erythrozyten erkannt werden. Die Identifizierung des genauen Malariaerregers mittels eines Blutausstriches erweist sich als schwierig, da sich die Gametozyten zum Teil sehr ähneln (Seed und Manwell 1977). Aus diesem Grund werden in der vorliegenden Arbeit Vergleiche mit den wichtigsten Malariaerregern der Haussperlinge, Brillenpinguine und Haushühner in Deutschland gezogen: *Plasmodium relictum*, *Plasmodium cathemerium* und *Plasmodium elongatum*. Die Vogelmalariaerreger der Gattung *Plasmodium* sind aufgrund der Morphologie der Schizonten und Gametozyten sowie des Verhaltens ausgewachsener Parasiten gegenüber des Kerns der Wirtszelle in die Untergattungen *Huffia*, *Giovannolaia*, *Haemamoeba*, *Novyella* und *Bennettinia* eingeteilt (Garnham 1966). Da in der vorliegenden Arbeit allerdings weder Schizonten, noch Gametozyten gefunden wurden, war die Bestimmung der genauen Malariaerreger äußerst schwierig.

Das Vorkommen der Malariaerreger wird bei der lichtmikroskopischen Untersuchung oft unterschätzt, denn die Erreger werden nicht nur wegen der in den Blutausstrichen meist geringen Parasitämie übersehen, sondern auch, weil befallene Erythrozyten die Eigenschaft haben, zu aggregieren und daher nur an einzelnen Stellen im Präparat vorkommen (Garnham 1966; Barker et al 1989; Valkiunas und Iezhova 2001). Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass die Ergebnisse bei erneuter Zählung variieren können. Um ein genaueres Ergebnis zu erhalten, hätten die Blutproben mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ausgewertet werden müssen. Hierdurch hätte man genaue Infektionsprävalenzen und Erregerspektren erhalten. Auf dieses Verfahren wurde aus Zeit- und Kostengründen verzichtet.

Die Blutausstriche sollten im Frühjahr angefertigt werden, da es in der Brutsaison stressbedingt häufiger zu Rezidiven kommt, und es somit wahrscheinlicher ist, in diesem Zeitraum Parasiten zu finden (Garnham 1966). Da die vorliegende Bachelorarbeit jedoch erst im August erstellt wurde, konnte dieser Empfehlung nicht nachgegangen werden.

Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Parasitämie jahreszeitlich bedingt im Frühjahr wieder ansteigt und die Ergebnisse dieser Bachelorarbeit demnach eine geringere Ausprägung suggerieren.

4.1.1. *Plasmodium relictum*

1898 entdeckte Ronald Ross, dass die graue Stechmücke (im Nachhinein identifiziert als *Culex pipiens fatigans*) der Invertebraten-Wirt von *Plasmodium relictum* ist (Garnham 1966). Später stellte sich heraus, dass neben der Gattung *Culex* auch Tiere der Gattungen *Aedes*, *Anopheles* und *Culiseta* als Überträger dienen. Da in Deutschland Erreger der Hühnermalaria *P. juxtannucleare* und *P. gallinaceum* fehlen, verursacht dort hauptsächlich *P. relictum* Erkrankungen (Mehlhorn et al. 1993). Die Hauptzeit der Malariainfektion reicht vorwiegend von Juli bis September, da dies der Flugzeit der Mücken entspricht (Mehlhorn et al. 1993). *Plasmodium relictum* gehört zu der Untergattung *Haemamoeba*, welche sich durch rundlich-ovale Gametozyten auszeichnet, und durch die Verschiebung des Zellkerns der Wirtszelle Richtung Pol (Garnham 1966).

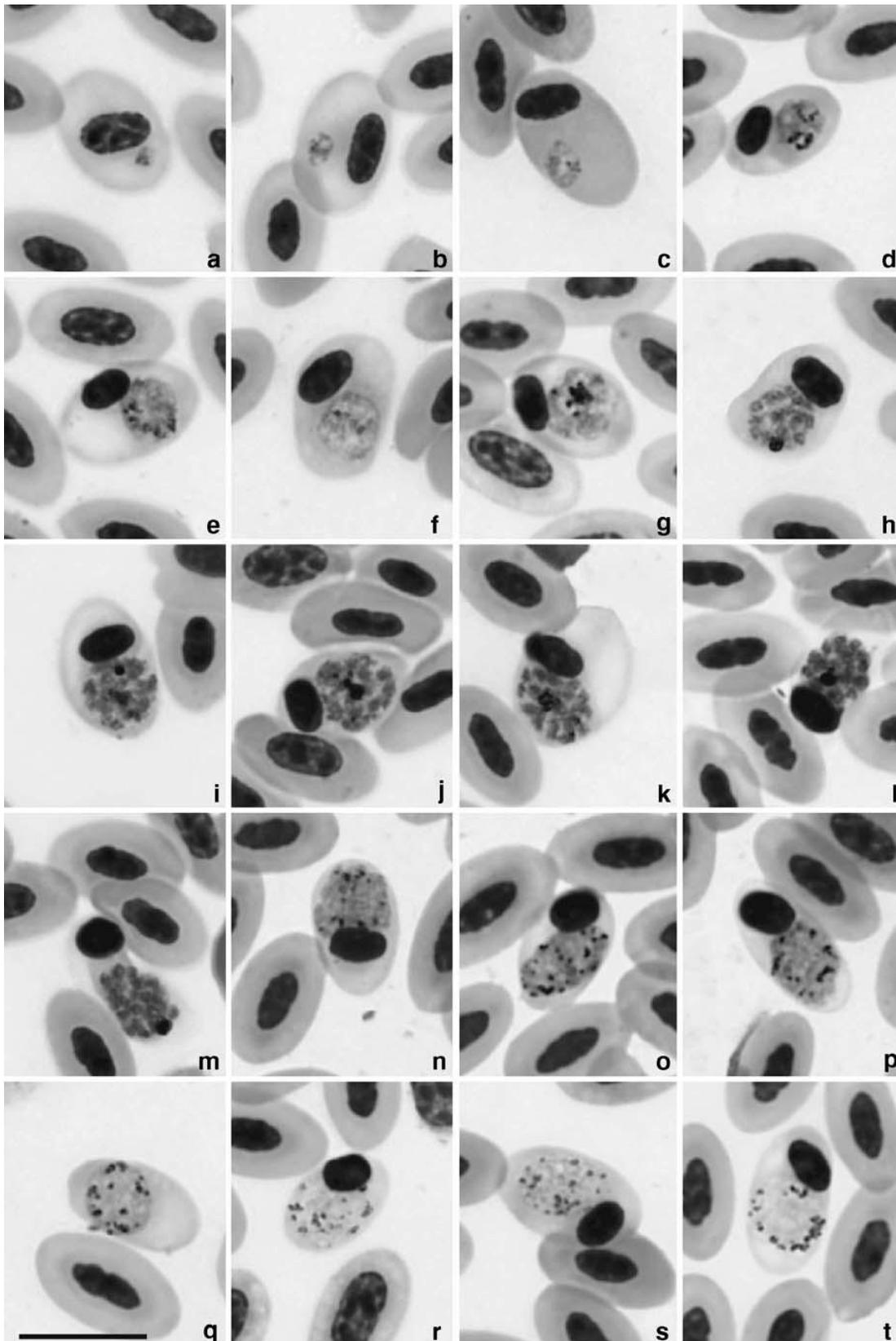


Abbildung 4.1: *Plasmodium relictum* aus dem Blut des Drosselrohrsängers *Acrocephalus arundinaceus*; **a,b** Trophozoiten; **c-m** Merozoiten; **n-q** Makrogameten; **r-t** Mikrogameten; Skala: 10 µm (Abbildung Valkiūnas et al. 2007)

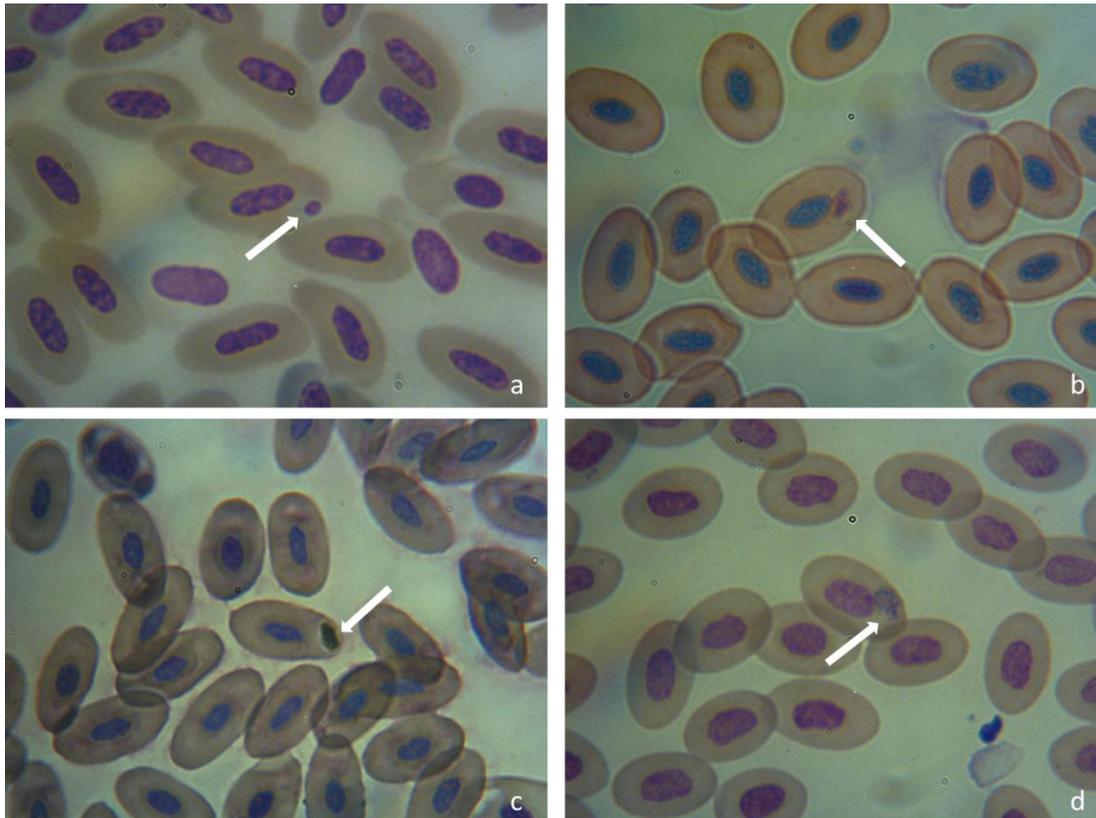


Abbildung 4.2: Lichtmikroskopische Aufnahme von Blutausstrichen, vermutlicher Befall von *Plasmodium relictum*. **a** Trophozoit im Blut eines Haussperlings; **b** und **c** Trophozoit und Merozoit im Blut von Brillenpinguinen, **d** Merozoit im Blut eines Haushuhns; bei 1000-facher Vergrößerung

Typisch für die Merozoiten des Erregers *Plasmodium relictum* ist die ovale Form sowie die Tatsache, dass die Merozoiten keine Ringform bilden (Garnham 1966). Wie in Abbildung 4.2 ersichtlich, handelt es sich bei den Fotos b, c und d nicht um eine Ringform. Aus diesem Grund könnte es sich dabei um Merozoiten des Erregers *Plasmodium relictum* handeln. Die Trophozoiten sehen ebenfalls kugelig bis oval aus, weswegen es sich bei Abbildung 4.2, Foto a um einen Trophozoit des Erregers *Plasmodium relictum* handeln kann. Die Schizonten werden mit zunehmendem Wachstum oft kugelförmig, sie können aber auch oval neben dem Zellkern der Erythrozyten liegen. Dieser Zellkern wird nach und nach an die Peripherie gedrängt und kann sogar aus den Erythrozyten ausgestoßen werden (Garnham 1966). Leider konnte in der vorliegenden Arbeit keine Zellkernverschiebung beobachtet werden. Der Zellkern des Parasiten vergrößert sich und teilt sich mehrmals. Das Pigment verklumpt zu ein oder auch zwei Zentren aus komprimierten Körnern. Wenn der Parasit heranreift, wird das Zytoplasma von der großen Masse an Chromatin ersetzt, welches wichtig für die Bildung des Zellkerns ist. Die Farbe des Chromatins wechselt von Blau nach Rot (Garnham 1966). Die durchschnittliche Anzahl von den gebildeten Merozoiten liegt bei zwölf, sie kann aber stark variieren. So kann es vorkommen, dass 8 bis 32 Merozoiten vorzufinden sind (Mehlhorn et al 1993). Die Gametozyten entstehen oft genauso schnell wie die asexuellen Stadien im Blut.

Die Gametozyten haben große, langgezogene oder auch kugelförmige Körper, welche den Zellkern der Wirtszelle immer verschieben. Der Mikrogametozyt hat farbloses Zytoplasma und einen zentralen Nucleus, auf welchem verstreut schwarze Pigmentgranuli zu finden sind. Der Makrogametozyt hat ein gröberes Zytoplasma mit runden Punkten, von denen einige verschmolzen sein können. Der Kern ist recht groß und kann mehr als ein Fünftel des Parasiten ausmachen (Garnham 1966).

4.1.2. *Plasmodium cathemerium*

1924 entdeckte Ernest Hartman eine bisher neue Art der Vogel malaria, *Plasmodium cathemerium*. Diese Art gehört ebenfalls zu der Untergattung der *Haemamoeba*. Die Ähnlichkeit des *P. cathemerium*-Parasiten zu anderen Mitgliedern der Untergattung *Haemamoeba* ist enorm groß, sodass es immer wieder zu Verwechslungen der Erreger kam und auch noch heute kommt (Garnham 1966). Mücken der Gattungen *Aedes*, *Culiseta* und *Culex* sind Überträger dieser Plasmodienart. Im Gegensatz zu dem Erreger *Plasmodium relictum* bilden die Merozoiten des Erregers *Plasmodium cathemerium* Siegelringformen aus (Garnham 1966). In der Abbildung 4.3 sind Ringformen der Merozoiten zu erkennen, die eventuell von *Plasmodium cathemerium* stammen.

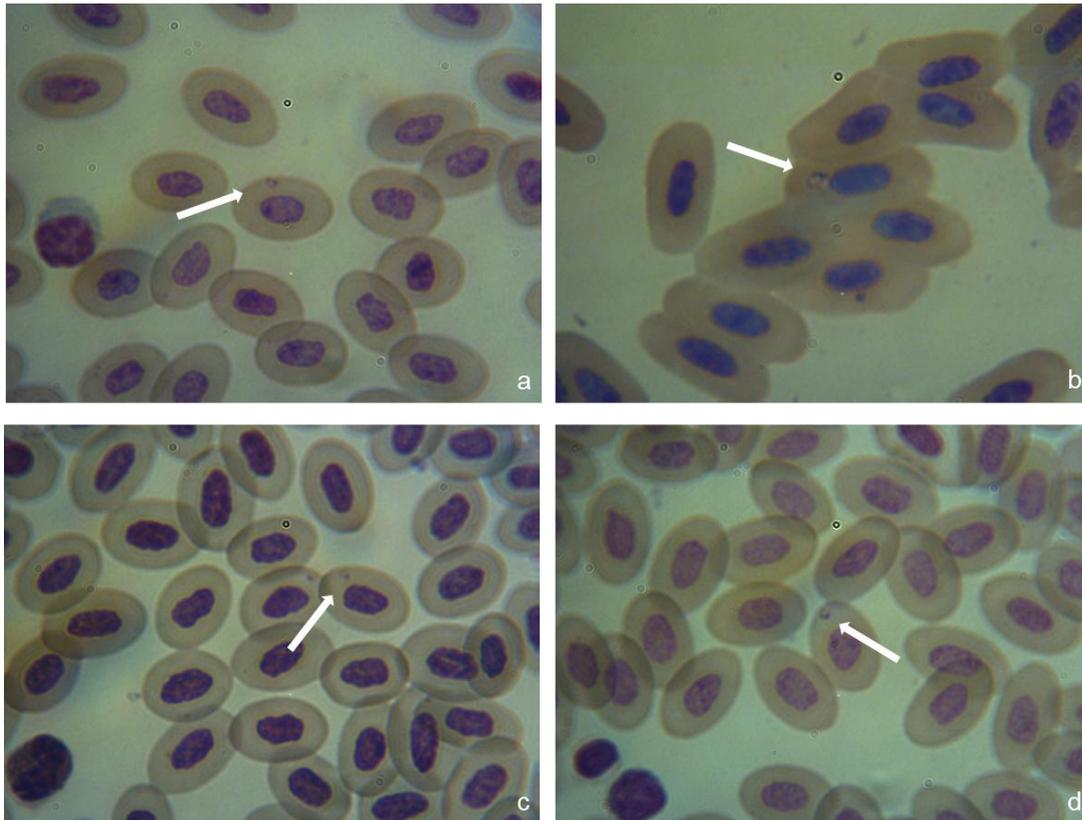


Abbildung 4.3: Lichtmikroskopische Aufnahme von Ringstadien aus **a,d** Haushühnern; **b** Haussperling; **c** Brillenpinguin; bei 1000-facher Vergrößerung

Junge Trophozoiten sind meistens kleine dichte Körper, die keine Vergrößerung der Vakuolen aufweisen. Die Pigmente sammeln sich in ein oder zwei formlosen Massen, die nahe beieinander liegen.

Es ist schwierig, die Gametozyten von *P. cathemerium* von denen von *P. relictum* zu unterscheiden, da sie sich sehr ähnlich sehen. Ein wichtiges Kriterium ist die Form des Granulas in den Mikrogameten (Garnham 1966). Bei *P. cathemerium* ist es lang gestreckt und bildet eine Art Stab mit gepunkteten Enden, wohingegen das Granula von *P. relictum* kugelförmig aussieht (siehe Abbildung 4.2).

4.1.3. *Plasmodium elongatum*

1927 entdeckte Ernest Hartman die Art *Plasmodium elongatum*. Sie gehört zu der Untergattung *Huffia*, die durch längliche Gametozyten und Schizonten in jungen roten Blutkörperchen (Retikulozyten) zu erkennen ist. Darüber hinaus hat der ausgewachsene Parasit oft keinen Einfluss auf die Lage des Zellkerns (Garnham 1966). Die Parasiten werden durch die Überträgergattungen *Culex*, *Aedes* und *Anopheles* weitergegeben.

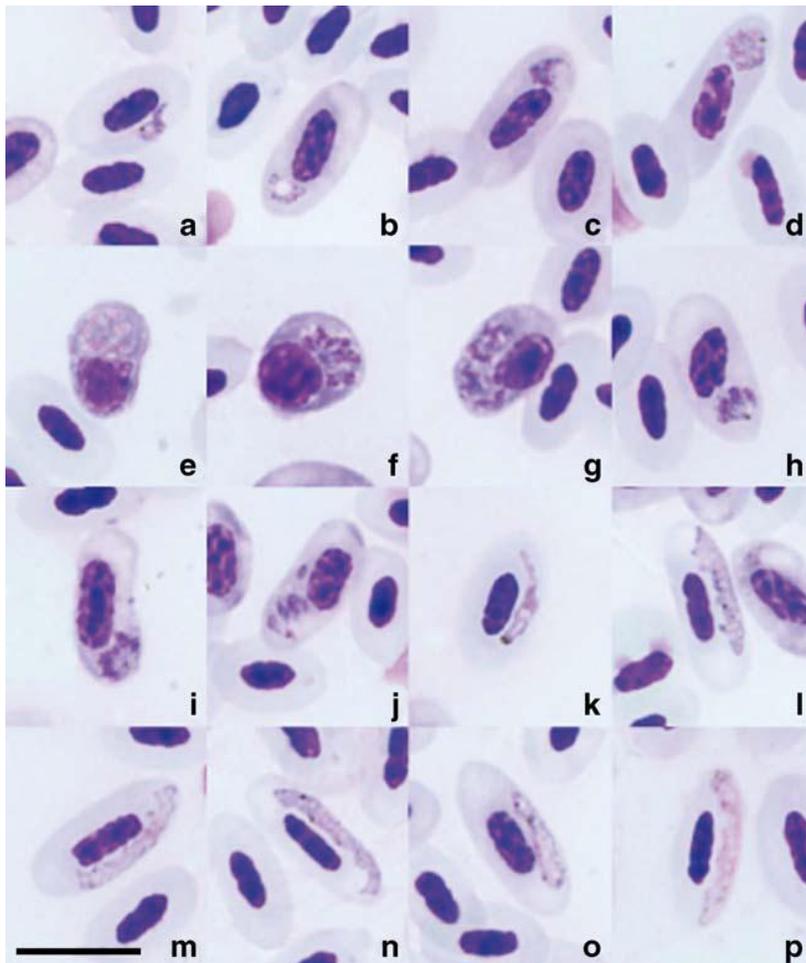


Abbildung 4.4: *Plasmodium elongatum* aus dem Blut des Drosselrohrsängers *Acrocephalus arundinaceus*: **a, b** Trophozoiten; **c-j** Merozoiten; **k-n** Makrogametozyten; **o-p** Mikrogametozyten; Skala: 10 μ m; (Abbildung Valkūnas et al. 2008)

Die Trophozoiten dieses Malariaerregers haben die Eigenschaft, dass sie oft eine Vakuolenvergrößerung aufweisen, sodass ein rundlicher, heller Kreis zu sehen ist (siehe Abbildung 4.4). Aus diesem Grund könnte es sich bei Abbildung 4.5 um Trophozoiten des Erregers *Plasmodium elongatum* handeln, welche nur im Blut der Brillenpinguine gefunden wurden. Junge Merozoiten sind rundlich, mit zunehmendem Wachstum umgeben sie große Teile des Wirtszellkerns und drängen diesen in den meisten Fällen an die Peripherie (siehe Abbildung 4.4). Die Gametozyten sind länglich und liegen entlang des Zellkerns, verschieben diesen aber nicht. Schizonten sind oft in Retikulozyten zu finden (Garnham 1966).

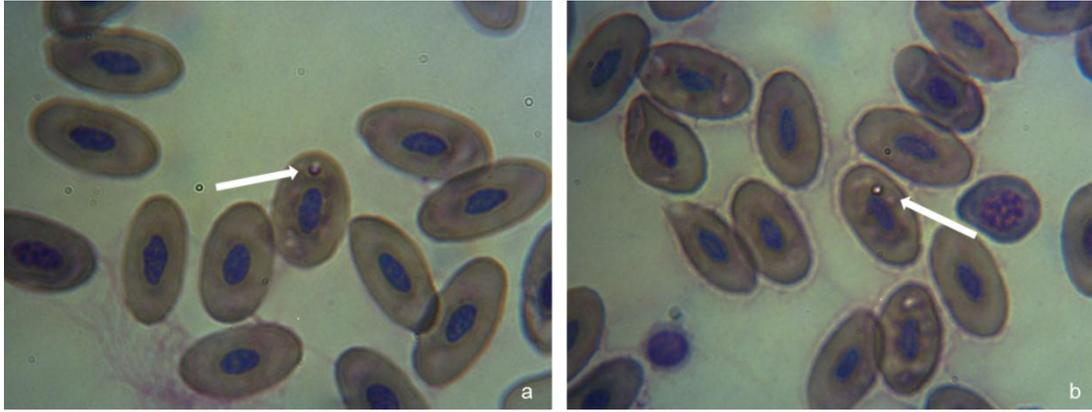


Abbildung 4.5: Lichtmikroskopische Aufnahme der parasitierten Erythrozyten von Brillenpinguinen; **a**, **b** eventuell Trophozoiten des Malariaerregers *Plasmodium elongatum*; bei 1000-facher Vergrößerung

4.2 Unterschiede des Befalls zwischen männlichen und weiblichen Vögeln

Verschiedene Faktoren, wie zum Beispiel Brutzeit, Nestsuche und Jungenaufzucht, wirken sich auf die Parasitenprävalenz aus (Poulin und Vickery 1993). Der Befall mit Parasiten wird durch Stressfaktoren so beeinflusst, dass die Parasitämie gefördert oder gehemmt wird. Der *Plasmodium*-Befall korreliert mit der Fütterungsrate der Jungtiere und der Brutgröße (Richner et al. 1995). Bei einer großen Brut suchen die Männchen, nicht aber die Weibchen, signifikant mehr Futter, was den Stressfaktor erhöht. Aus diesem Grund verdoppelt sich die Parasitämie bei den Männchen zum Teil (Richner et al. 1995). Bei einem Vergleich des Parasitenbefalls der beiden Geschlechter scheinen weibliche Tiere weniger empfindlich zu sein, als männliche Tiere (Roberts et al. 1996). Das liegt am unterschiedlich ausgeprägten Immunsystem und an den Geschlechtshormonen (Araneo et al. 1991, Roberts et al. 2001). Dieses Phänomen ist bei Protozoen (zum Beispiel *Plasmodium*) und anderen Parasiten (zum Beispiel *Trichinella spiralis*) in mehreren Studien detailliert erfasst worden (Barnard et al. 1996, Lourenco et al. 1999, Schuster und Schaub 2001). Es wurde nachgewiesen, dass die Höhe der Testosteronkonzentration im direkten Zusammenhang mit dem Parasitenbefall steht. Je höher die Testosteronkonzentration, desto stärker, beziehungsweise wahrscheinlicher, ist auch ein Parasitenbefall (Schuster und Schaub 2001). In der vorliegenden Bachelorarbeit sind starke Unterschiede des Vogelmalariabefalls zwischen männlichen und weiblichen Haussperlingen und Haushühnern aufgefallen. Bei 28,7% der männlichen und 15,4% der weiblichen Haushühner wurde der Parasit nachgewiesen. Die Männchen sind also fast doppelt so oft befallen wie die Weibchen (siehe Abbildung 3.2).

Bei den Haussperlingen war der Unterschied noch größer. 33,3% aller männlichen und 14,3% aller weiblichen Haussperlinge hatten einen Malariaparasitenbefall (siehe Abbildung 3.4).

Es ist zu beachten, dass aufgrund des Zeitraumes, indem die vorliegende Arbeit angefertigt wurde, die Zahl der untersuchten Tiere recht klein war. Bei einer größeren Stichprobe würden die Zahlen noch genauer werden und die Anzahl der befallenen Tiere sich vermutlich reduzieren.

4.3 Vergleich der Malariaerreger von Brillenpinguinen und Haussperlingen

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, herauszufinden, ob aufgrund der bereits infizierten Haussperlinge die Vogel malaria durch die, in natürlichen Verhältnissen nicht gegebene räumliche Nähe der Tiere, auch auf die Brillenpinguine übertragen wurde. Hiermit wird noch einmal darauf hingewiesen, dass die Bestimmung der Malariaerreger mittels lichtmikroskopischer Untersuchung geschah und deswegen nur eine Vermutung darstellt, jedoch keine sichere Aussage bezüglich der Erreger getroffen werden konnte. Aus diesem Grund basiert der Vergleich der Erreger auf nicht durch PCR bestätigte Vermutungen. Um den restlichen Teil dieser Diskussion besser zu verstehen, werden im kommenden Abschnitt die Vergleiche so beschrieben, als seien es gesicherte Erkenntnisse.

Wie in der Abbildung 4.6 ersichtlich wird, wiesen alle infizierten Tiere den Erreger *Plasmodium relictum* auf. Da dieser der am häufigsten vorkommende Erreger ist, entspricht das Ergebnis den Erwartungen. *Plasmodium cathemerium* wurde ebenfalls bei allen drei Tierarten nachgewiesen. Lediglich der Erreger *Plasmodium elongatum* war nur bei einem Brillenpinguin nachweisbar. Da die Zahl der mit *Plasmodium relictum* und *Plasmodium cathemerium* infizierten Haussperlinge in der vorliegenden Arbeit sehr hoch ist, ist davon auszugehen, dass die Haussperlinge als Wirt dieser Parasiten fungieren und aus diesem Grund andere Vögel, wie zum Beispiel Haushühner und Brillenpinguine, angesteckt werden. Da nur bei einem einzigen Brillenpinguin der Erreger *Plasmodium elongatum* gefunden wurde, ist davon auszugehen, dass dieser Erreger zwar auch bei freilebenden Wildvögeln zu finden, dort jedoch nicht allzu weit verbreitet ist.

	Anzahl der gefundenen Erreger der Art <i>Plasmodium relictum</i>	Anzahl der gefundenen Erreger der Art <i>Plasmodium cathemerium</i>	Anzahl der gefundenen Erreger der Art <i>Plasmodium elongatum</i>
Haussperling	2	2	-
Haushuhn	3	2	-
Brillenpinguin	2	1	1

Abbildung 4.6: Erregervergleich der infizierten Brillenpinguine, Haushühner und Haussperlinge

4.4 Blutabnahme mit Raubwanzen

4.4.1. Nachweis von Parasiten

Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurden die Raubwanzen für die Xenodiagnose bei Menschen benutzt (Marsden et al. 1979), um die Chagas-Krankheit (Erreger: *Trypanosoma cruzi*) nachzuweisen. Zuerst wurden *Triatoma infestans* des dritten Larvenstadiums benutzt, danach jedoch recht schnell die des ersten Larvenstadiums von *Dipetalogaster maxima*, da 20 Larven der L3 Generation von *T. infestans* dieselbe Menge an Blut entnehmen, wie 10 Larven der L1 Generation von *D. maxima* (Cuba 1979). Die Raubwanzen sind allesamt aus sterilen Laborzuchten und tragen keine Krankheiten in sich. Wenn das Blut Trypanosomen enthält, vermehren diese sich in der Wanze und sind so leichter mikroskopisch nachzuweisen, als die geringe Anzahl an Trypanosomen, die im Blut des Menschen zu finden sind (Brumpt 1914).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit veranschaulichen, dass Malariaerreger innerhalb der Erythrozyten in Blutproben gefunden werden konnten, die durch Raubwanzen *Dipetalogaster maxima* entnommen wurden. Anhand der Kontrollproben kann man sehen, dass es kein falsch-positives, wie auch kein falsch-negatives Ergebnis gibt. Aufgrund dessen ist ein Nachweis von Malariaparasiten innerhalb der Erythrozyten in der vorliegenden Arbeit gelungen. Es müssen jedoch noch mehr Studien diesbezüglich durchgeführt werden, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, da die Untersuchungen im Rahmen einer Bachelorarbeit durchgeführt wurden und der zeitliche Rahmen begrenzt war.

4.4.2. Eignung der Methode

Bei vielen wildlebenden und in zoologischen Gärten lebenden Tieren hat sich die alternative Blutabnahme mit Raubwanzen als hilfreiche Methode herausgestellt, da sie das Fangen und die Ruhigstellung oder sogar eine Narkose des Tieres verhindern kann.

Es zeigte sich schnell, dass es bei den Brillenpinguinen nicht mit herkömmlichen Methoden gelingen würde, die Wanzen auf den Wirt zu setzen. Das Anbringen des neu entwickelten Plastikdöschens beinhaltete immer ein Fangen und kurzes Festhalten der Tiere, und anschließend das Lösen der Konstruktion, sodass in diesem Fall nicht von einer stressfreien Methode des Blutabnehmens gesprochen werden kann. Die jungen Pinguine lebten in einem separaten Innengehege; von den Adulten getrennt. Eine Stunde bevor die Untersuchungen durchgeführt wurden, musste das kleine Wasserbecken des Innengeheges entleert werden, um zu verhindern, dass die Tiere ein nasses Gefieder hatten. Auf diese Weise konnten die Pinguine trocknen und die damit verbundene Erhöhung der Wärmeabgabe nach außen bewirkte bei den Raubwanzen eine verbesserte Wahrnehmung des Wirtes. Die im Außengehege lebenden Adulten wurden mit einem Netz gefangen. Dabei konnte jedoch nur ein Tier pro Tag gefangen werden, da die anderen Pinguine ins schützende Wasser flüchteten. Auch hier kann nicht von einer stressfreien Methode gesprochen werden. Eine mögliche Verbesserung der Vorgehensweise wäre ein doppelter Boden unterhalb der Höhlen der Pinguine. In diesem Hohlraum könnten Gefäße für Raubwanzen befestigt werden, welche die sich ausruhenden Pinguine durch kleine Löcher im Boden stechen könnten. Jedoch wäre so eine differenzierte Auswertung hinsichtlich der Geschlechter der Pinguine nicht möglich, da die Paare zusammen eine Höhle als Ruhezone nutzen.

Im Gegensatz dazu verlief die Blutabnahme mit den Raubwanzen bei den Haushühnern um einiges unkomplizierter. Vor allem brütenden oder ruhenden Hühnern konnte ohne großen Stress eine Raubwanze, an der ein Faden befestigt war, ins Gefieder gesetzt werden. Jedoch bestand bei den Hühnern eine erhöhte Gefahr, dass, sobald die Raubwanzen von anderen Hühnern entdeckt wurden, diese gepickt und aufgefressen wurden, wie es in der Natur von Hühnern liegt. Lediglich einige Hähne mussten festgehalten werden, da diese besonders schnell die Wanzen in ihrem Gefieder bemerkten und nach ihnen pickten.

Die durch die Raubwanzen gewonnenen Blutproben waren qualitativ hochwertig, und es war keinerlei Zersetzung der Zellen zu sehen, was an der raschen Entnahme des Blutes aus dem Wanzenmagen lag. Die Blutmengen unterschieden sich zum Teil extrem, da auch einige Wanzen der L4 Generation benutzt wurden. Darüber hinaus variierte die Menge des so erhaltenen Blutes aufgrund der Zeit, die die Raubwanzen hatten, um sich vollzusaugen. Manche Saugvorgänge wurden durch Picken oder heftiges Flügelschlagen des Wirtes unterbrochen, und die Wanzen versuchten zu fliehen. In wenigen Fällen war die Menge des Blutes so gering, dass nur ein Blutausschlag durchgeführt werden konnte. Bei der Mehrzahl der Raubwanzen konnten allerdings so große Mengen Blut entnommen werden, dass ein Teil des Blutes in den Lithium- Heparin- Gefäßen übrig blieb.

Die Handhabung der Raubwanzen gestaltete sich recht einfach, da die Larven sehr schnell den Wirt anstachen, wenn dieser trocken und warm war. Lediglich ein nahendes Gewitter veranlasste die Wanzen zur Flucht.

Durch die Tatsache, dass bei Vogelarten, die eine Koevolution mit dem Malariaerreger gemacht haben, die Parasitämie zuerst ansteigt und dann wieder abnimmt, bevor für den Wirt lebensbedrohliche Werte erreicht werden und der Erreger auch ganz aus dem Blut verschwinden kann, muss darauf geachtet werden, dass die Kontrollproben an demselben Tag genommen werden, wie die Proben mit Hilfe der Wanzen (Wiersch, 2006). Andernfalls können die Ergebnisse gravierende Unterschiede aufweisen.

4.4.3. Darstellung wichtiger Parameter im Blut

In Studien wurde nachgewiesen, dass einige Blutparameter wie Natrium, Chlorid, Hämoglobin, Harnstoff und der pH-Wert gut durch die Blutabnahme mit Hilfe der Raubwanzen bestimmt werden können (Stadler et al. 2007). Andere Blutparameter jedoch, wie die Leukozytenzahl und der Kaliumwert, unterliegen noch einigen Schwankungen. Um den Fehlerquotienten so gering wie möglich zu halten, ist es notwendig, die weißen Blutkörperchen so schnell wie möglich zu zählen, um der Auflösung der Leukozyten entgegen zu arbeiten. Die Reproduzierbarkeit der Werte nimmt mit der Hämolyse des mit Enzymen versetzten Blutes im Magen der Wanzen ab, und es ist deshalb ratsam, die Proben so schnell wie möglich aus der Wanze zu entnehmen und in Gefäße mit gerinnungshemmendem Medium zu überführen (Stadler et al. 2007). Die Hämolyse kann gut durch den Anstieg des Kaliumwertes beobachtet werden.

Kurze Saugzeiten der Wanzen erhöhen die Genauigkeit der gewonnenen Parameter aus dem Kapillarblut deutlich, da Triatome bereits zum Ende der Blutaufnahme mit der Ausscheidung der wässrigen Blutbestandteile beginnen und es durch Aufkonzentrierung und gleichzeitiger Hämolyse zu einem Anstieg des Hämokrits und somit zu stärkeren Schwankungen in der Bestimmung kommen kann (Madrell 1969; Stadler et al. 2009). Zudem stimmten die Parameter mit herkömmlich gewonnenem Blut besser überein, wenn die Wanze die maximale Menge an Kapillarblut aufgenommen hatte. Diese Tatsache lässt sich durch die geringere Versetzung mit Wanzenenzym erklären. Die Abweichungen der Blutparameter lagen in der Regel immer noch im Normbereich der einzelnen Tierart. Die Blutparameter müssen jedoch durchgängig sehr individuell betrachtet werden, da es schon analysebedingt zu äußerst starken Schwankungen kommen kann (Stadler et al. 2009).

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Haussperlinge natürliche Wirte der Vogelmalaria sind und deshalb ein Grund für die Infizierung nicht einheimischer Vögel, wie zum Beispiel Brillenpinguinen sein können. So wurden in den Haussperlingen, Haushühnern und Brillenpinguinen Vogelmalariaerreger vermutlich gleicher Arten gefunden. Der am häufigsten vorgekommene Erreger war *Plasmodium relictum*. In allen befallenen Erythrozyten waren lediglich Merozoiten und Trophozoiten zu sehen. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass keines der untersuchten Tiere stark erkrankt war.

Der Parasitennachweis mittels von Raubwanzen gewonnener Blutproben ist in der Arbeit gelungen. Es ist davon auszugehen, dass der Nachweis von anderen im Blut vorkommenden Parasiten ebenfalls möglich ist, jedoch müssen erst umfassende Studien durchgeführt werden. Das neu entwickelte Verfahren der Blutabnahme bei den Brillenpinguinen hat sich bewährt, allerdings ist diese Vorgehensweise nicht weniger stressvoll als die Blutabnahme mit einer Spritze.

6. Literaturverzeichnis

- Araneo BA, Dowell T, Diegel M, Daynes RA (1991) Dihydrotestosterone exerts a depressive influence on production of interleukin-4 (IL-4), IL-5 and γ -interferon, but not IL-2 by activated murine T-cells. *Blood* 78:688-699
- Applegate JE (1970) Spring Relapse of *Plasmodium relictum* Infections in an Experimental Field Population of English Sparrows (*Passer domesticus*). *J Wildl Dis* 7:37-42
- Bannasch R (1995) Hydrodynamics of penguins – an experimental approach. In: Dann P, Norman I, Reilly P (eds) *The Penguins: Ecology and Management*. Surrey Beatty & Sons, Melbourne, Australia, SS 141-176
- Barnard CJ, Behnke JM, Sewell J (1996) Social status and resistance to disease in house mice (*Mus musculus*): status-related modulation of hormonal responses in relation to immunity costs in different social and physical environments. *Ethology* 102:63-84
- Barcker RH, Suebsang L, Rooney W, Wirth DF (1989) Detection of *Plasmodium falciparum* infection in human patients: A comparison of the DNA probe method to microscopic diagnosis. *Am J Trop Med Hyg* 41:266-272
- Becker H, Voigt C, Arnold J, Nagel R (2005) A non-invasive technique to bleed incubating birds without trapping: a blood sucking bug in a hollow egg. *J Ornithol* 147:115-118
- Benett GF, Bishop MA, Peirce MA (1993) Checklist of the avian species of *Plasmodium* Marchiafava & Celli, 1885 (Apicomplexa) and their distribution by avian family and Wallacean life zones. *Syst Parasitol* 26:171-179
- Benning T, LaPointe D, Atkinson CT, Vitousek P (2002) Interactions of climate change with biological invasions and land use in the Hawaiian Islands: Modeling the fate of endemic birds using a geographic information system. *Proc Natl Acad Sci* 99:14246-14249
- Bensch S, Perez-Tris J, Waldenström J, Hellgren O (2004) Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites: multiple cases of cryptic speciation? *Evolution* 58:1617-1621

- Bensch S, Stjernman M, Hasselquist D, Östman Ö, Hansson B, Wester Dahl H (2000) Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified birds. Proc R Soc Lond B 267:1583-1589
- Bishop MA, Bennett GF (1992a) Host-parasite catalogue of the avian haematozoa: supplement 1. Mem Univ Newfoundland Occas Pap Biol 15:1-211
- Bishop MA, Bennett GF (1992 b) Bibliography of the avian blood-inhabiting haematozoa: supplement 2. Mem Univ Newfoundland Occas Pap Biol 15:212-244
- Borchert A (1970) Lehrbuch der Parasitologie für Tierärzte. S. Hirzel Verlag, Leipzig:547-550
- Brumpt PE (1914) Le Xénodiagnostic. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier à la Trypanosome de Chagas. Bull Soc Path Exot 7:706-710
- Cranfield MR, Shaw M, Beall F, Skjoldager M, Ialeggio D (1990) A review and update of avian malaria in African penguin (*Spheniscus demersus*). Proceedings of the Meeting of American Association of Zoo Veterinarians (AAZV), South Padre Islands, Texas 243-248
- Cranfield M, Graczyk T, McCutchan T, Shaw M, Beall F, Skjoldager M (1994) Avian Malaria in African Penguins (*Spheniscus demersus*). J Parasitol 79:375-379
- Cuba CC, Alvarenga NJ, Barreto AC, Marsden PD, Macedo V, Gama MP (1979) *Dipetelogaster maximus* (Hemiptera, Triatominae) for xenodiagnosis of patients with serologically detectable *Trypanosoma cruzi* infection. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 73:524-527
- Dan A, Pereira M, Pesquero JL, Diotaiuti L, Beiroa PSL (1999) Action of the saliva of *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) on sodium channels. J Med Entomol 36:875-879
- Desser SS, Bennett GF (1993) The genera *Leucocytozoon*, *Haemoproteus* and *Hepatocystis*. In: Kreier JP, Parasitic Protozoa, 2 nd ed. Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich, San Diego, 4:273-305
- Eckert J, Friedhoff KT, Zahner H, Deplazes P (2008) Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. Medizinverlage Stuttgart, SS 90-94

- Feldman RA, Freed LA, Cann RL (1995) A PCR test for avian malaria in Hawaiian birds. *Mol Ecol* 4:663-673
- Garnham PC (1966) *Malaria Parasites and other Haemosporidia*. Blackwell, Oxford
- Godfrey RD, Fedynich AM, Pence DB (1987) Quantification of hematozoa in blood smears. *J Wildl Dis* 23:558-565
- Grazyk T, Cranfield MR, Shiff CJ (1993) ELISA method for detecting anti-*Plasmodium relictum* and anti-*Plasmodium elongatum* antibody in infected duckling sera using *Plasmodium falciparum* antigens. *J Parasitol* 76:879-885
- Grazyk T, Cranfield MR, Skjoldager ML, Shaw ML (1994) An ELISA for detecting anti-*Plasmodium* spp. antibodies in African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). *J Parasitol* 80:60-66
- Grazyk T, Cranfield MR, Bicknese EJ (1995) Evaluation of serum chemistry values associated with avian malaria infections in African black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). *Parasitol Res* 81:316-319
- Greiner EC, Bennett GF, White EM, Coombs RF (1975) Distribution of the avian hematozoa of North America. *Can J Zool* 53:1762-1787
- Haberkorn A (1984) Observations on malaria in European perching birds (passeriformes). *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg* 256:288-295
- Hayworth AM, van Riper C, Weathers WW (1987) Effects of *Plasmodium relictum* on the metabolic rate and body temperature in canaries (*Serinus canaria*). *J Parasitol* 73:850-853
- Hellgren O, Waldenström J, Bensch S (2004) A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *J Parasitol* 90:797-802
- Hiepe T, Jungmann R (1983) *Lehrbuch der Parasitologie, Band 2: Veterinärmedizinische Protozoologie*. Gustav Fischer Verlag, Jena, SS 177-178
- Huff CG (1965) Susceptibility of mosquitoes to avian malaria. *Exp Parasitol* 16:107-132
- Ippen R, Schröder HD (1972) Ein Beitrag zu den Erkrankungen der Zoovögel. *Int Symp Erkrank Zootiere* 14:11-27

- Kronberger H, Schüppel KF (1977) Zwanzig Jahre post-mortale Untersuchung von Vögeln. Int Symp Erkrank Zootiere 19:153-196
- Krone O, Priemer J, Streich J, Sömmer J, Langgemach T, Lessow O (2001) Haemosporidia of birds of prey and owls from Germany. Acta Protozool 40:281-289
- Kucera J (1981 a) Blood parasites of central Europe. 1. Survey of literature. The incidence in domestic birds and general remarks to the incidence in wild birds. Folia Parasitol 28:13-22
- Kucera J (1981 b) Blood parasites of birds in central Europe. 2. Leucocytozoon. Folia Parasitol 28:193-203
- Kucera J (1981 c) Blood parasites of birds in central Europe. 3. Plasmodium and Haemoproteus. Folia Parasitol 28:303-312
- Lent H, Wygodzinsky P (1979) Revision of the Triatominae (Hemiptera Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas disease. Bull Am Museum Nat Hist 163:123-520
- Levine ND (1961) Protozoa Parasites of Domestic Animals and of Man. Burgess Publishing Company, Minneapolis, SS 1-412
- Levine ND, Corliss JO, Cox FEG, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, Leedale GF, Loeblich AR, Lom JIII, Lynn D, Merinfeld EG, Page FC, Poljansky G, Sprague V, Vavra J, Wallace FG (1980) A new classification of the protozoa. J Protozool 27:37-58
- Lindt S, Hörning B (1966) Über Malaria und Pinguine. Verh. ber. Erkrank. Zootiere 8:223-231
- Lourenco LB, Recco-Pimentel SM, Cardoso AJ (1999) Two karyotypes, heteromorphic sex chromosomes and C-band variability in *Physalameus petersi* (Anura, Leptodactylidae). Can J Zool 27:18-21
- Madrell SHP (1969) Secretion by the Malpighian tubules of *Rhodnius*. The movements of ions and water. J Exp Biol 51:71- 97
- Manwell RD, Rossi GS (Feb 1975) Blood protozoa of imported birds. J. Protozool. 22:124-127

- Marino S, Potti J (1995) Louse loads of pied flycatchers Effects of host's sex, age, condition and relatedness. *J Avian Biol* 26:58-63
- Marsden PD, Barreto AC, Cuba CC, Gama MB, Ackers J (1979) Improvements in routine xenodiagnosis with first instar *Diptellogaster maximus* (Uhler, 1894) (Triatominae). *Am J Trop Med Hyg* 28:649-652
- McClure HE, Poonswad P, Greiner EC, Laird M (1993). Haematozoa in the Birds of Eastern and Southern Asia. *Mem Univ Newfoundland Occas Pap Biol* 34:234-237
- Mehlhorn H, Düwel D, Raether W (1993) Diagnose und Therapie der Parasitosen von Haus-, Nutz-, und Heimtieren. Gustav Fischer, Stuttgart, Jena, New York SS 340-345
- Mehlhorn H, Piekarski G (2002) Grundriß der Parasitenkunde. Heidelberg: Spektrum, Akademischer Verlag. SS 1-455
- Olsen O W (1974) *Animal Parasites Their Life Cycles and Ecology*. Baltimore: University Park Press.
- Petit T (1997) Penguin malaria survey. EEP (Europäisches Erhaltungszucht-Programm) Yearbook 1996/1997, inkl. Proceedings of the 14 th Conference of European Association of Zoos and Aquarions (EAZA), SS 481-482
- Perez- Tris J, Waldenström J, Hellgren O (2004) Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites: multiple cases of cryptic speciation? *Evolution* 58:1617-1621
- Piekarski G (1954) *Lehrbuch der Parasitologie*. Springer Verlag, Berlin, SS. 1-760
- Perez- Tris J, Waldenström J, Hellgren O (2004) Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites: multiple cases of cryptic speciation? *Evolution* 58:1617-1621
- Poulin R, Vickery WL (1993) Parasite distribution and virulence: implications for parasite mediated sexual selection. *Behav Ecol So* 33:429-436
- Redrobe S (2000) *Plasmodium* infection in a group of captive penguins including rockhopper penguins (*Eudyptes crestatus moseleyi*), king penguins (*Aptenodytes patagonica*), gentoo penguin (*Pygoscelis papua papua*), macaaroni penguin (*Eudyptes chrysolophus*). Proceedings of the Meeting of

- ther European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians (EAZWV), Paris, France, SS 231-235
- Richner H, Christie P, Oppliger A (1995) Paternal investment affects malaria prevalence. Proc Nat Acad Sci USA 92:1192-1194
- Roberts CW, Satoskar A, Alexander J (1996) Sex steroid, pregnancy-associated hormones and immunity to parasitic infection. Parasitol Today 12:382-388
- Richner H, Christie P, Oppliger A (1995) Paternal investment affects malaria prevalence. Proc Nat Acad Sci USA 92:1192-1194
- Ryckman RE, AE Ryckman (1963) Loma Linda University's 1962 expedition to Baja California. Med Arts Sci 17:65-76
- Schaub GA (1989) Trypanosoma cruzi: quantitative studies of development of two strains in small intestine and rectum of the vector *Triatoma infestans*. Exp. Parasitol 68:260-273
- Schaub GA (1990) Membrane feeding for infection of the reduviid bug *Triatoma infestans* with *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) and pathogenic effects of the flagellate. Parasitol Res 76:306-310
- Schaub GA, Pospischl R (1995) Chagas (Teil2) – Epidemiologie, Vektorbiologie und Bekämpfung. Reisemedizin 2:19-20
- Schaub GA (1996) Auswirkungen der Parasiten auf ihre Vektoren. Nova Acta Leopoldina 2:19-20
- Schaub GA (2001) Kissing bugs. In: Mehlhorn, H. (Ed.) Encyclopedic reference of parasitology. Vol. 1 Biology, structure, function. 2nd ed. Parasitology in Focus. Springer-Verlag, Heidelberg, SS 326-329
- Scheuerlein A, Rickfels RE (1994) Prevalence of blood parasites in European passeriform birds. Roy Soc 271:1363-1370
- Schofield CJ (1994) Feeding behaviour and bloodmeal digestion. In: Schofield C. J. (Ed.), Triatominae Biology & Control, Eurocommunica Publications, West Sussex, SS 37-40
- Schuster JP, Schaub GA (2001) Experimental Chagas disease: the influence of sex and psychoneuroimmunological factors. Parasitol Res 87:994-1000

- Seed TM, Manwell RD (1977) Plasmodia of birds. In J. P. Kreier, Parasitic Protozoa 3:133-357
- Smyth JD (1976) Introduction to Animal Parasitology, 2nd ed. In J. Smyth. New York: Halsted Press.
- Smyth JD (1994) Introduction to Animal Parasitology. Cambridge University Press, Cambridge, SS 109-136
- Stadler A, Lawrenz A, Schaub G (2007) Der Einsatz von Raubwanzen zur Gewinnung von Blutproben bei Zootieren. Zeitschrift des Kölner Zoo, 50:163-173
- Stadler A, Lawrenz A, Schaub G (2009). Der Einsatz der südamerikanischen Raubwanze *Diptelogaster maxima* in Zoologische Gärten zur Gewinnung von Blutproben. Tierärztliche Umschau 64:1-7
- Thomsen R, Voigt CC (2006) Non- invasive blood sampling from primates using laboratory- bred blood- sucking bugs (*Diptelogaster maximus*; Reduviidae, Heteroptera). Primates 47:397-400
- Valentin A, Haberkorn A, Hensch B, Jakob W (1994) Massive Malaria- Infektionen mit *Pharahaemoproteus spec.* in Schnee- Eulen (*Nyctea Scandiaca*) und deren Behandlung mit Primaquin. Verh ber Erkrang Zootiere 36:401-404
- Valkiūnas G, Iezhova TA (2001) A comparison of the blood parasites in three subspecies of the yellow wagtail *Motacilla flava*. J Parasitol 87:930-934
- Valkiūnas G, Zehindjiev P, Hellgren O, Ilieva M, Iezhova TA, Bensch S (2007) Linkage between mitochondrial cytochrome b lineages and morphospecies of two avian malaria parasites, with a description of *Plasmodium (Novyella) ashfordi* sp. nov. Parasitol Res 100:1311-1322
- Valkiūnas G, Zehindjiev P, Dimitrov D, Križanauskienė A, Iezhova TA, Bensch S (2008) Polymerase chain reaction-based identification of *Plasmodium (Huffia) elongatum*, with remarks on species identity of haemosporidian lineages in GenBank. Parasitol Res 102:1185-1193
- Viner TC, Nichols D, Montali RJ (2001) Malaria in birds at Smithsonian National Zoological Park. Proceedings of the Joint Conference of the American Association of Zoo Veterinarians (AAZV), the American Association of Wildlife Veterinarians (AAWW), the Association of Reptilian and Amphibian

- Veterinarians (ARAV) and the National Association of Zoo and Wildlife Veterinarians (AZWV), Orlando, Florida, USA, SS 68-70
- Von Helversen O, Reyer H-U (1984) Nectar intake and energy expenditure in a flower visiting bat. *Oecologia* 63:178-184
- Von Helversen O, Volleth M, Núñez J (1986) A new method for obtaining blood from a small mammal without injuring the animal: use of triatomid bugs. *Experientia* 42:809-810
- Voigt CC, Faßbender M, Dehnhardt M, Wibbelt G, Jewgenow K, Hofer H, Schaub GA (2004) Validation of a minimally invasive blood sampling technique for the analysis of hormones in domestic rabbits, *Oryctolagus cuniculus* (Lagomorpha). *Gen Comp Endocrin* 135:100-107
- Voigt CC, Peschel U, Wibbelt G, Fröhlich K (2006) An alternative, less invasive blood sampling collection technique for serologic studies utilizing triatomine bugs. *J Wildl Dis* 42:446-469
- Waldenström J, Bensch S, Hasselquist D, Östman O (Febr. 2004) A new nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections from avian blood. *J Parasitol* 90:191-194
- Wiersch SC (2006) Molekulare Phylogenie der Malariaerreger (Haemosporina) unter besonderer Berücksichtigung des Vogelmalariaerregers *Plasmodium* (Haemamoeba) *cathemerium*, sowie Untersuchungen zum Vorkommen der Vogelmalaria in Deutschland. Dissertation, Mathem.- Naturw. Fakultät, Bonn.