



**Die Rote Vogelmilbe,
Dermanyssus gallinae DE GEER, 1778,
ein experimentell nachgewiesener mechanischer
Vektor von Influenza A-Virus und Versuche zur
Bekämpfung der Roten Vogelmilbe
mit einem Phenolderivat**

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

Dagmar Sieglinde Sommer

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2011

© 2011 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**,
Gießen
Printed in Germany

ISBN 978-3-86345-050-2

Verlag: DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17
35392 Gießen
0641/24466
geschaeftsstelle@dvg.net
www.dvg.net

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

Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. E. F. Kaleta

**Die Rote Vogelmilbe,
Dermanyssus gallinae DE GEER, 1778,
ein experimentell nachgewiesener mechanischer
Vektor von Influenza A-Virus und Versuche zur
Bekämpfung der Roten Vogelmilbe
mit einem Phenolderivat**

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

Eingereicht von

Dagmar Sieglinde Sommer

Tierärztin und Diplom-Biologin aus Gießen

Gießen, 2011

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

Dekan:

Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter

Prof. Dr. Dr. h.c. E. F. Kaleta
Prof. Dr. H.-J. Thiel

Tag der Disputation:

12. Oktober 2011

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt:

SOMMER, D., HEFFELS-REDMANN, U., HARDER, T., KÖHLER, K., TEIFKE, J. P. und KALETA, E. F. (2009): Die Rote Vogelmilbe, *Dermanyssus gallinae*, als Vektor des aviären Influenzavirus A.

Poster

1. DVG-Tagung über Vogel- und Reptilienerkrankungen, 25.-27.09.2009, Leipzig

SOMMER, D., HEFFELS-REDMANN, U., HARDER, T., KÖHLER, K., TEIFKE, J. P. and KALETA, E. F. (2009): The poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) as vector for avian influenza A virus (H5N9).

Vortrag

XVIth Congress of the World Veterinary Poultry Association, 08.-12.11.2009, Marrakesch, Marokko

SOMMER, D., HEFFELS-REDMANN, U., HARDER, T., KÖHLER, K., TEIFKE, J. P., LIERZ, M. und KALETA, E. F. (2010): Die Rolle der Roten Vogelmilbe (*Dermanyssus gallinae*) bei der Übertragung der aviären Influenza.

Vortrag

16. DVG-Tagung Vogelkrankheiten, 05.-06.03.2010, München

SOMMER, D. und LIERZ, M. (2011): Verschiedene Tiermodelle an der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische, Justus-Liebig-Universität Gießen.

Vortrag

Jenaer Fachgespräche – Integrierte Nutztiermodelle für die Tierseuchen- und Zoonoseforschung, 25.-28.05.2011, Jena

Meinen Eltern

I. Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Die Rote Vogelmilbe, <i>Dermanyssus gallinae</i> DE GEER, 1778	3
2.1.1	Anatomie und Morphologie der Roten Vogelmilbe	3
2.1.2	Ontogenetische Entwicklung der Roten Vogelmilbe	4
2.1.3	Vorkommen und Epidemiologie der Roten Vogelmilbe	5
2.1.4	Die Rote Vogelmilbe als Parasit beim Geflügel	6
2.1.5	Diagnose	7
2.1.6	Bedeutung der Roten Vogelmilbe als Vektor für verschiedene Krankheitserreger	8
2.1.6.1	Bakterien	9
2.1.6.2	Viren	12
2.1.6.3	Parasiten	15
2.1.7	Maßnahmen zur Bekämpfung der Roten Vogelmilbe	15
2.1.7.1	Chemische Bekämpfungsmethoden	16
2.1.7.1.1	Systemische Wirkstoffe	17
2.1.7.1.2	Ektoparasitika und Desinfektionsmittel	18
2.1.7.1.3	Neopredisan® 135-1	19
2.1.7.2	Weitere Bekämpfungsmethoden	19
2.1.8	Akarizidresistenzen der Roten Vogelmilbe	21
2.2	Influenza A-Virusinfektionen beim Vogel	22
2.2.1	Ätiologie der aviären Influenza A	22
2.2.1.1	Aufbau und Eigenschaften der Influenza A-Viren	22
2.2.1.2	Subtypen der Influenza A-Viren	22
2.2.1.3	Pathogenität der Influenza A-Viren	23
2.2.1.4	Replikation der Influenza A-Viren	23
2.2.1.5	Tenazität der Influenza A-Viren	24
2.2.2	Epidemiologie der Influenza A-Viren	25
2.2.3	Transmission und Infektionswege von Influenza A-Viren beim Vogel	26
2.2.3.1	Hämophage Arthropoden als Vektoren beim Vogel	26
2.2.3.2	Arthropoden als Vektoren von Influenza A-Virus	27
2.2.4	Erkrankungen beim Vogel nach Infektion mit aviärem Influenza A-Virus	28
2.2.4.1	Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9)	29
2.2.4.1.1	Klinische Befunde nach der Infektion mit Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9)	29
2.2.4.1.2	Pathologische Befunde nach der Infektion mit Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/ 1966 (H5N9)	31

2.2.4.1.3	Histologische Befunde nach der Infektion mit Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9)	32
2.2.4.2	Diagnose einer Infektion mit AIV	32
2.2.5	Bekämpfung der Geflügelpest	33
3	MATERIAL und METHODEN	35
3.1	Material	35
3.1.1	Aviäres Influenza A-Virus	35
3.1.2	Bruteier	36
3.1.3	SPF-Hühner	36
3.1.4	Rote Vogelmilben	38
3.1.5	Haltung und Vermehrung der Roten Vogelmilben in Behältnissen	38
3.1.6	Zellkulturmedien, Reagenzien und Geräte	41
3.2	Methoden	41
3.2.1	Ablauf der durchgeführten Versuche	41
3.2.1.1	Vorversuch - Induktion einer Virämie und Reproduktion der Klassischen Geflügelpest durch Influenzavirus A/turkey/Ontario/ 7732/1966 (H5N9)	41
3.2.1.1.1	Isolierung und Reisolierung des Influenza A-Virus	41
3.2.1.1.2	Charakterisierung der Virulenz des AIV in vivo	42
3.2.1.2	Experiment I - Nachweis der AIV-Aufnahme durch die Roten Vogelmilben	43
3.2.1.3	Experiment II - Bestimmung der Übertragung von AIV durch Rote Vogelmilben auf Hühner	45
3.2.1.4	Experiment III - Bestimmung der Wirksamkeit von Neopredisan [®] 135-1 auf Rote Vogelmilben	48
3.2.2	Methoden zur Durchführung der Experimente	49
3.2.2.1	Probenentnahme von Hühnern und Probenaufarbeitung	49
3.2.2.1.1	Tupfer und Sammelkot	49
3.2.2.1.2	Blut	49
3.2.2.1.3	Sektionen und Organproben	50
3.2.2.2	Probenentnahmen von Roten Vogelmilben	51
3.2.2.3	Äußerliche Desinfektion der Roten Vogelmilben	51
3.2.2.4	Herstellung von primären Hühnerembryofibroblastenkulturen	52
3.2.2.5	Vermehrung der Virusstammsuspension in SPF-Bruteiern	52
3.2.2.6	Bestimmung des Virusgehalts der Virusstammsuspension	52
3.2.2.7	Virus-Reisolierung in embryonierten SPF-Bruteiern	53
3.2.2.8	Virus-Reisolierung in HEF-Kulturen	53
3.2.2.9	Bestimmung des Virusgehalts der Blutfraktionen und der Roten Vogelmilben	53
3.2.2.10	Virustiterbestimmungen und statistische Auswertung	54
3.2.2.11	Identifizierung der Virusreisolat	54

3.2.2.11.1	Hämagglutinationstest	54
3.2.2.11.2	Hämagglutinations-Hemmungstest	55
3.2.2.11.3	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	55
3.2.2.11.4	Polymerasekettenreaktionen	56
3.2.2.12	Bestimmung des Intravenösen Pathogenitätsindex	56
3.2.2.13	Weitere Untersuchungen der Organe sezierter Hühner	56
3.2.2.13.1	Bakteriologische Untersuchung der Hühnerorgane	56
3.2.2.13.2	Histopathologische Untersuchung von Organproben aus Hühnern	57
3.2.2.13.3	HE- und PAS-Färbung von Roten Vogelmilben	57
3.2.2.13.4	Immunhistochemische Färbung von Roten Vogelmilben und Hühnerorganen	57
3.2.2.13.5	Kontrollen der immunhistochemischen Färbungen	58
4	ERGEBNISSE	60
4.1	Vorversuch - Induktion einer Virämie und Reproduktion der Klassischen Geflügelpest durch Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9)	60
4.1.1	Eigenschaften des Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9) in vitro	60
4.1.2	Eigenschaften des Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9) in vivo	61
4.1.2.1	Nachweis der Virämie durch AIV	61
4.1.2.1.1	Nachweis der Virämie in Blutfraktionen mit HEF-Kulturen	61
4.1.2.1.2	Nachweis der Virämie mit Eikulturen	65
4.1.2.2	Ausscheidung und Nachweis des AIV in HEF-Kulturen	66
4.1.3	Befunde an Hühnern nach der experimentellen AIV-Infektion	68
4.1.3.1	Klinische Symptomatik der Hühner nach Infektion mit AIV	68
4.1.3.1.1	Intravenöser Pathogenitätsindex (IVPI)	68
4.1.3.1.2	Antikörperbildung nach AIV-Infektion der Hühner	70
4.1.3.1.3	Letale und infektiöse Dosis der AIV-infizierten Hühner	70
4.1.3.1.4	Minimale infektiöse Dosis und Minimale letale Dosis der AIV-infizierten Hühner	71
4.1.3.2	Pathologisch-anatomische Veränderungen der Hühner	71
4.1.3.3	Histopathologische Veränderungen der Hühnerorgane	72
4.1.3.4	Immunhistochemische Befunde in Hühnerorganen	72
4.1.3.5	Bakteriologische Untersuchungen der Hühnerorgane	74
4.1.3.6	Virusreisolierung aus Organen der Hühner	74
4.2	Experiment I - Nachweis des AIV in den Roten Vogelmilben	74
4.2.1	Virusreisolierung aus Roten Vogelmilben mittels HEF-Kulturen	75
4.2.2	Virusreisolierung aus Roten Vogelmilben in embryonierten Hühnereiern und HA-Test	76

4.2.3	Histologische und immunhistochemische Studien an Roten Vogelmilben	78
4.2.3.1	Histologische Befunde von Roten Vogelmilben	78
4.2.3.2	Immunhistochemischer Nachweis von AIV in den Roten Vogelmilben	80
4.3	Experiment II - Übertragung von AIV durch Rote Vogelmilben auf Hühner	83
4.3.1	Befunde von intravenös mit AIV infizierten Hühnern	83
4.3.2	Virusreisolierung aus Roten Vogelmilben	83
4.3.3	Virusisolierung aus Hühnern nach Kontakt mit AIV-haltigen Roten Vogelmilben	83
4.4	Experiment III - Wirksamkeitsprüfung von Neopredisan® 135-1 auf die Bewegungsaktivität von Roten Vogelmilben	85
5	DISKUSSION	88
5.1	Die heutige Bedeutung der Aviären Influenza	88
5.2	Eignung des verwendeten AIV für die Experimente mit Roten Vogelmilben	91
5.2.1	Untersuchung der Eigenschaften des AIV in vitro	92
5.2.2	Untersuchung der Eigenschaften des AIV in vivo	93
5.3	Nachweis der Aufnahme von AIV durch die Roten Vogelmilben	96
5.4	Übertragung von AIV durch die Roten Vogelmilben	99
5.5	Wirksamkeitsnachweis von Neopredisan® 135-1 auf die Roten Vogelmilben	106
6	ZUSAMMENFASSUNG	110
7	SUMMARY	112
8	LITERATURVERZEICHNIS	113
	ANHANG I: Reagenzien und Geräte	138
I.I.	Zellkulturmedien, Puffer und Reagenzien	138
I.I.I.	Puffer	138
I.I.II.	Zusätze zu den Zellkulturmedien	138
I.I.III.	Zellkulturmedien	139
I.I.IV.	Herstellung einer 1 %igen Erythrozytensuspension	139
I.I.V.	Lösungen und Puffer für die immunhistochemischen Färbungen	140
I.I.VI.	Sonstige Reagentien	141
I.II.	Verbrauchsmaterialien und Geräte	142
I.II.I.	Verbrauchsmaterialien	142
I.II.II.	Verbrauchsmaterialien immunhistologische Färbung	142
I.II.III.	Geräte	142

ANHANG II: Auszüge aus dem Prospekt Neopredisan [®] 135-1	144
ANHANG III: Protokolle der immunhistochemischen Färbungen	146
DANKSAGUNG	149

II. **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: <i>Dermanyssus gallinae</i> ♀: dorsal und ventral (ECKERT et al., 2005)	4
Abbildung 2: Hühnerhaltung in Gruppen in Bodenhaltung auf Tiefstreu aus Kurzstroh mit Hobelspänen (links) und während der Experimente im Infektionsstall in Isolatoren (rechts) der KVRAF	37
Abbildung 3: Konstruktionszeichnung der Milbenboxen	39
Abbildung 4: Konstruktionszeichnung der Seitenteile und des Deckels	39
Abbildung 5: Milbenbox im Stapelkasten (links). Milbenbox mit Stapelkasten im Isolator (rechts)	40
Abbildung 6: Zytopathischer Effekt in HEF-Kulturen durch Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9)	60
Abbildung 7: Virusreisolierung aus Erythrozyten der AIV-infizierten Hühner mittels HEF-Kultur und zeitlicher Verlauf der Todesfälle	62
Abbildung 8: Immunhistochemische Färbung (PAP-Methode) der Organe eines AIV-infizierten Huhnes	73
Abbildung 9: Immunhistochemische Färbung Hühnerleber (ABC-Methode)	73
Abbildung 10: Histologische Schnitte zur Darstellung der Innenstrukturen einer Roten Vogelmilbe, 1. Tag p.s., HE-Färbung (links), PAS-Färbung (rechts)	79
Abbildung 11: Histologische Schnitte zur Darstellung der Innenstrukturen einer Roten Vogelmilbe, 5. Tag p.s., HE-Färbung (links), PAS-Färbung (rechts)	80
Abbildung 12: Immunhistochemischer Nachweis (PAP-Methode) von AIV-Ribonukleoprotein im Verdauungstrakt und unspezifische Anfärbung des Chitins in einer Roten Vogelmilbe am 4. Tag p.s. (rechts) bzw. am 8. Tag p.s. (links)	81
Abbildung 13: Immunhistochemischer Nachweis (ABC-Methode) von AIV-Nukleoprotein und unspezifische Anfärbung des Chitins in einer Roten Vogelmilbe am 3. Tag p.s. (rechts) bzw. am 6. Tag p.s. (links)	82
Abbildung 14 : Kontrollfärbungen AIV-naiver Roter Vogelmilben	82

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aus <i>Dermanyssus gallinae</i> isolierte geflügelpathogene Bakterien	10
Tabelle 2: Aus <i>Dermanyssus gallinae</i> isolierte Viren	13
Tabelle 3: Häufig eingesetzte Wirkstoffgruppen in der Ektoparasiten- und Schädlingsbekämpfung	17
Tabelle 4: Alternative Methoden zur Bekämpfung der Roten Vogelmilben	20
Tabelle 5: Charakterisierung des AIV in vivo. Probenentnahmen und -untersuchungen	43
Tabelle 6: Experiment I - Nachweis der AIV-Aufnahme durch Rote Vogelmilben. Probenentnahmen und -untersuchungen	45
Tabelle 7: Experiment II - Nachweis der Übertragung von AIV durch Rote Vogelmilben auf Hühner	47
Tabelle 8: Chronologischer Verlauf der AIV-Nachweise aus Erythrozyten in HEF-Kulturen in Abhängigkeit von der Virusdosis	62
Tabelle 9: Chronologischer Verlauf der AIV-Nachweise aus Erythrozyten, Leukozyten und Plasma in HEF-Kulturen ohne Berücksichtigung der einzelnen Virusverdünnungen	63
Tabelle 10: Titrationen der Erythrozyten-Fraktion auf HEF-Kultur, Titer als KID ₅₀ /ml (log ₁₀) bezogen auf 1 ml heparinisiertes Vollblut	64
Tabelle 11: Quantitative Bestimmung des AIV-Gehalts der Erythrozyten mittels HA in AAF an Tagen nach der Infektion der Hühner	65
Tabelle 12: Chronologischer Verlauf der AIV-Nachweise aus Rachen, Kloake und Sammelkot der Hühner in HEF-Kultur in Abhängigkeit von der Virusdosis an Tagen p.i.	67
Tabelle 13: Klinische Symptome nach AIV-Infektion von fünf Hühnern je Virusverdünnung und daraus errechnete IVPI-Werte	69
Tabelle 14: Antikörpertiter in Blutseren von rekonvaleszenten Hühner	70
Tabelle 15: AIV-Reisolierung aus Roten Vogelmilben nach deren Blutmahlzeit(en) an AIV-infizierten Hühnern mittels HEF-Kultur	76
Tabelle 16: Virusreisolierungen aus Roten Vogelmilben nach deren Blutmahlzeit(en) an AIV-infizierten Hühnern mittels embryonierter Hühnereier	78
Tabelle 17: Nachweis der Übertragung von AIV durch AIV-haltige Rote Vogelmilben auf AIV-naive Hühner	85
Tabelle 18: Effekt von Neopredisan [®] 135-1 auf die Vitalität der Roten Vogelmilben	87

IV. Abkürzungsverzeichnis

(-)	negativ polarisiert
(+)	positiv polarisiert
AAF	Amnioallantoisflüssigkeit
ABC-Methode	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode
AI	Aviäre Influenza
AIV	Aviäres Influenza A-Virus
BGBI	Bundesgesetzblatt
BME	Basal Medium Eagle mit Earle'schen Salzen
BPLS	Brilliantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose
d	dies (Tag, Tage)
<i>D.</i>	<i>Dermanyssus</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DIVA	differentiating infected from vaccinated animals
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ds	double stranded (doppelsträngig)
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EEE	Eastern Equine Encephalitis
EG	Europäische Gemeinschaft
EID ₅₀	Embryoinfektiöse Dosis 50 %
ELD ₅₀	Embryoletale Dosis 50 %
et al.	et alii (und andere)
etc.	et cetera (und so weiter)
EU	Europäische Union
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
Exp.	Experiment
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FKS	Fetales Kälberserum
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut (Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit)
FSME-Virus	Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus
GABA-Agonisten	Gamma-aminobutyric acid (γ -Aminobuttersäure)
GeflPestSchV	Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpest (Geflügelpest-Verordnung)
GM	Gliedmaßenanschnitte
h	hora (Stunde)
HA	Hämagglutinin
HA-Test	Hämagglutinationstest
HAH-Test	Hämagglutinationshemmungstest
HCH	Hexachlorcyclohexan

HE	Hämatoxylin-Eosin Färbung
HEF	Hühnerembryofibroblasten
HHG-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse
HPAI	Hochpathogene Aviäre Influenza
HPAIV	Hochpathogenes Aviäres Influenza-Virus
i.c.	intracutan
i.p.	intraperitoneal
IVPI	Intravenöser Pathogenitätsindex
JLU	Justus-Liebig-Universität
Ka-Kanal	Kaliumkanal
KF	Körnerfutter
KGW	Körpergewicht
KID ₅₀	Kulturinfektiöse Dosis 50 %
kPa	Kilo Pascal
KVRAF	Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische
LD ₅₀	Letale Dosis 50 %
NPAI	Niedrigpathogene aviäre Influenza
NPAIV	Niedrigpathogenes aviäres Influenzavirus
M	Mundwerkzeuge
M ₁	Matrixprotein 1
M ₂	Matrixprotein 2
MDF-Platte	medium density fiberboard (Mitteldichte Holzfaserplatte)
MH	Milbenhomogenisat
MID	Minimale infektiöse Dosis
MLD	Minimale letale Dosis
MOI	Multiplicity of infection (Multiplizität der Infektion)
mm	Millimeter
NA	Neuraminidase
NaCl	Natriumchlorid
Na-Kanal	Natriumkanal
n. d.	nicht durchgeführt
NEP	nuclear export proteine (früher NS2)
nm	Nanometer
NP	Nukleoprotein
NS	Nicht-Struktur-Proteine
OIE	ab 2003 World Organization for Animal Health (Weltorganisation für Tiergesundheit), vor 2003 Office International des Epizooties (Internationales Tierseuchenamt)
p.s.	post sugo (nach dem Saugen/ der Blutmahlzeit)
p.o.	per os
PA	Polymerase acidic (säurereicher Anteil)
PAP-Methode	Peroxidase-Anti-Peroxidase-Methode

PAS	Periodic-acid-Schiff-reaction (Perjodsäure/Schiffsches Reagenz/Hämalaun Färbung nach Mayer)
PB1	Polymerase-basic-1 (basischer Anteil 1)
PB2	Polymerase-basic-2 (basischer Anteil 2); PA, PB1 und PB2 bilden zusammen den RNA-abhängigen RNA-Polymerase-Komplex
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
p.i.	post infectionem
PMV-1	Paramyxovirus-Typ 1 (Virus der <i>Newcastle</i> -Krankheit)
p-Wert	Signifikanzwert
RKI	Robert-Koch-Institut (Bundesinstitut im Geschäftsbereich des Bundesministeriums für Gesundheit)
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
r_s	Rangkorrelationskoeffizient nach SPEARMAN
RVM	Rote Vogelmilbe(n)
RWZ	Raiffeisen Warenzentrum
sp.	Spezies
spp.	species pluralis, mehrere, nicht im Einzelnen zu nennende Spezies einer Gattung
SPF	spezifiziert-pathogen-frei
SRH	single-radial-haemolysis-Test
ss	single stranded (einzelsträngig)
ssp.	Subspezies
syn.	synonym
TierSeuchAnzV	Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen
TierSG	Tierseuchengesetz
TME	Meningoenzephalitis der Puten
USA	United States of America (Vereinigte Staaten von Amerika)
VALO	Vakzine Lohmann
VEE	Venezuelan Equine Encephalitis
Verd.	Verdünnung
Verd.stufe	Verdünnungsstufe
WEE	Western Equine Encephalitis
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
WSH	Wasser standardisierter Härte
x	mal
\bar{x}	Durchschnitt
ZPE	Zytopathischer Effekt

1 Einleitung

In den letzten Jahren wurden durch die aktuellen Ausbrüche der aviären Influenza (AI) in Asien, Afrika und Europa vielfältige und kontroverse Diskussionen über die möglichen Routen der Ausbreitung des aviären Influenza A-Virus (AIV) geführt. Im Regelfall infizieren sich AIV-empfindliche Vögel und Säugetiere mittels Inhalation virushaltiger Aerosole oder durch direkten und indirekten Kontakt. Eine weitere vorstellbare Infektionsquelle könnten belebte Vektoren sein, zu denen auch die Rote Vogelmilbe (RVM, *Dermanyssus gallinae*) gehört (VALIENTE MORO et al., 2005).

Die RVM ist der am häufigsten in Legehennenhaltungen anzutreffende Ektoparasit (SCHMÄSCHKE und RIBBECK, 1997; LIEBISCH und LIEBISCH, 2003). In der Vergangenheit wurde die RVM schon mehrfach als Vektor für verschiedene Viren und Bakterien identifiziert, zum Beispiel für das Geflügelpockenvirus oder für das Bakterium *Erysipelothrix rhusiopathiae* (BRODY, 1936 (zit. von YUNKER, 1973); SHIRINOV et al., 1972; CHIRICO et al., 2003; BRÄNNSTRÖM et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob die RVM bei einer Blutmahlzeit an einem Huhn, das mit AIV infiziert und in der virämischen Phase ist, AIV mit aufnimmt. Weiterhin sollen die Möglichkeit einer Virusvermehrung und die Dauer der Persistenz des AIV in der RVM untersucht werden.

Eine weitere wesentliche Fragestellung ist, ob AIV-infizierte RVM durch einen erneuten Saugakt AIV-naive Hühner infizieren können. Denkbar ist, dass Vogelmilben, die nach einem AI-Seuchenfall nicht vollständig durch Reinigungs-, Entwesungs- und Desinfektionsmaßnahmen aus den Stallungen eliminiert wurden, bei Wiederbelegung eines Stalles an AIV-naiven Hühnern Blut saugen und dabei AIV übertragen. In der Vergangenheit ist es mehrmals zu erneuten Seuchenausbrüchen nach Wiederbelegung von Stallungen gekommen, in denen vorausgehend AIV-infizierte Hühner oder Puten und sehr wahrscheinlich auch RVM lebten.

Als Vektor wird allgemein ein belebter Überträger von Krankheitserregern bezeichnet (WIESNER und RIBBECK, 2000). Es wird unterschieden in mechanische und biologische Vektoren. Ein mechanischer Vektor ist selbst nicht infiziert und stellt einen Transportwirt oder Zwischenträger dar, da er dem Infektionserreger nur als Vehikel dient (TENTER, 2006). Es handelt sich bei diesem Infektionsweg um eine Kontakt- oder Schmierinfektion durch einen Transportwirt, an oder in dem das Virus haftet (THRUSFIELD, 1986; MARTIN et al., 1987; LAST, 1988). Der biologische Vektor stellt dagegen einen echten Wirt dar, der bei der Übertragung von Infektionserregern als Zwischenwirt fungiert (TENTER, 2006). Im Zwischenwirt können sich diese Erreger wie auch im Vertebraten, der den Endwirt darstellt, vermehren. Bei einem Arbovirus (arthropod-borne) beispielsweise handelt es sich um ein Virus, das durch Arthropoden übertragen wird und sich sowohl in Arthropoden als auch in Vertebraten vermehrt (WIESNER und RIBBECK, 2000; MODROW et al., 2010).

In der Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpest (GeflPestSchV, 2009) ist eine 21-tägige Frist vom Ende der Schlussdesinfektion bis zur Wiederbelegung der Ställe vorgeschrieben. RVM können aber bis zu neun Monate ohne erneute Blutmahlzeit überleben (NORDENFORS et al., 1999b). Deshalb wird ebenfalls untersucht, wie lange die RVM infektiöses AIV enthält und ob ihr dadurch in der Epidemiologie eine besondere Bedeutung zukommt. Auch diese wesentliche Frage soll durch experimentelle Untersuchungen geklärt werden.

Auch der Einfluss des chemischen Desinfektionsmittels Neopredisan[®] 135-1 auf die RVM wird geprüft. Ihre Bekämpfung ist schwierig, zum einen dadurch, dass sie sich im Stall in kleinste Ritzen zurückziehen kann, in die Akarizide oder Desinfektionsmittel nicht eindringen können. Zum anderen, weil sie im Laufe der letzten Jahre begonnen hat, Resistenzen gegen die herkömmlich eingesetzten Präparate zu entwickeln. Dadurch und bestärkt durch die hohen ökonomischen Verluste der Geflügelwirtschaft durch die RVM, wird verstärkt nach Alternativen zur Bekämpfung geforscht. Ob Neopredisan[®] 135-1 eine Alternative darstellen kann, soll durch in-vitro Experimente abgeklärt werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Die Rote Vogelmilbe, *Dermanyssus gallinae* DE GEER, 1778

Die Rote Vogelmilbe (RVM), *Dermanyssus gallinae*, wird in folgender Weise in die Systematik der Arthropoda eingeordnet (Systematik nach ECKERT et al., 2005):

Phylum: Arthropoda

Subphylum: Amandibulata

Classis: Arachnida

Subclassis: Acari (Milben i. w. S. = Zecken und Milben)

Superordo: Parasitiformes (Anactinotrichida)

Ordo: Mesostigmata (Gamasida = Käfermilben)

Familia: Dermanyssidae

Genus: *Dermanyssus*

Species: *Dermanyssus gallinae*

2.1.1 Anatomie und Morphologie der Roten Vogelmilbe

Die Körpergröße adulter RVM ist abhängig vom Grad ihrer Blutfüllung. Sie schwankt dadurch zwischen 0,6-1,0 mm Länge und 0,3-0,4 mm Breite. Die RVM ist nüchtern von grau-weißer Farbe und erhält erst durch die Aufnahme von Blut die namensgebende rote Färbung (GRATZL und KÖHLER, 1968). Der Körper der RVM ist schwach chitinisiert und spärlich beborstet (SCHMÄSCHKE und RIBBECK, 1997). Kopf und Körper sind zu einer Einheit, dem Idiosoma, verschmolzen. Sie besitzt ein Rückenschild, welches den Rücken nicht vollständig bedeckt, und vier stark beborstete Beinpaare (Abbildung 1). Die Mundwerkzeuge werden als Gnathostoma bezeichnet, welches sich aus den paarigen fünfgliedrigen Pedipalpen, dem Hypostom und den paarigen dreigliedrigen Chelizeren zusammensetzt (LUCIUS und LOOS-FRANK, 1997; SCHMÄSCHKE und RIBBECK, 1997). Die Mundöffnung mündet in den Saugpharynx, der über den Mitteldarm, ausgestattet mit ein bis sieben Paaren Blindsäcken und Drüsen, in den Enddarm führt (LUCIUS und LOOS-FRANK, 1997). Als Atmungsorgane sind ein Paar Tracheen mit seitlichen Stigmen angelegt, die lateral in Höhe der vorderen Begrenzung der vierten Hüfte liegen (HOFFMANN, 1987; LUCIUS und LOOS-FRANK, 1997). Die Larve ist durch ihre geringe Körpergröße ein Hautatmer. Adulte Männchen besitzen ein Paar

Hoden und zwei Vasa deferentia, die von den Testikeln zur Gonophore führen. Beim adulten Weibchen ist ein einzelnes Ovar angelegt, welches durch einen Ovidukt mit der Genitalöffnung verbunden ist (WALL und SHEARER, 1997). Die jeweiligen Geschlechtsöffnungen liegen ventrokaudal der Genitoventralplatte. Die Larven besitzen nur drei Beinpaare. Über vier Beinpaare verfügen dagegen die zwei Nymphenstadien und die adulte Form. Das vorderste der vier Beinpaare der adulten Milben beider Geschlechter besitzt zusätzlich zur Fortbewegung Tasterfunktion (LUCIUS und LOOS-FRANK, 1997). Zur Wirtsfindung dienen den Milben feine Sinneshaare an den Tarsen der ersten Beinpaare sowie an den Palpen (Abbildung 1), bei denen es sich um olfaktorische und mechanosensitive Rezeptoren handelt (CRUZ et al., 2005; LEONOVICH, 2006).

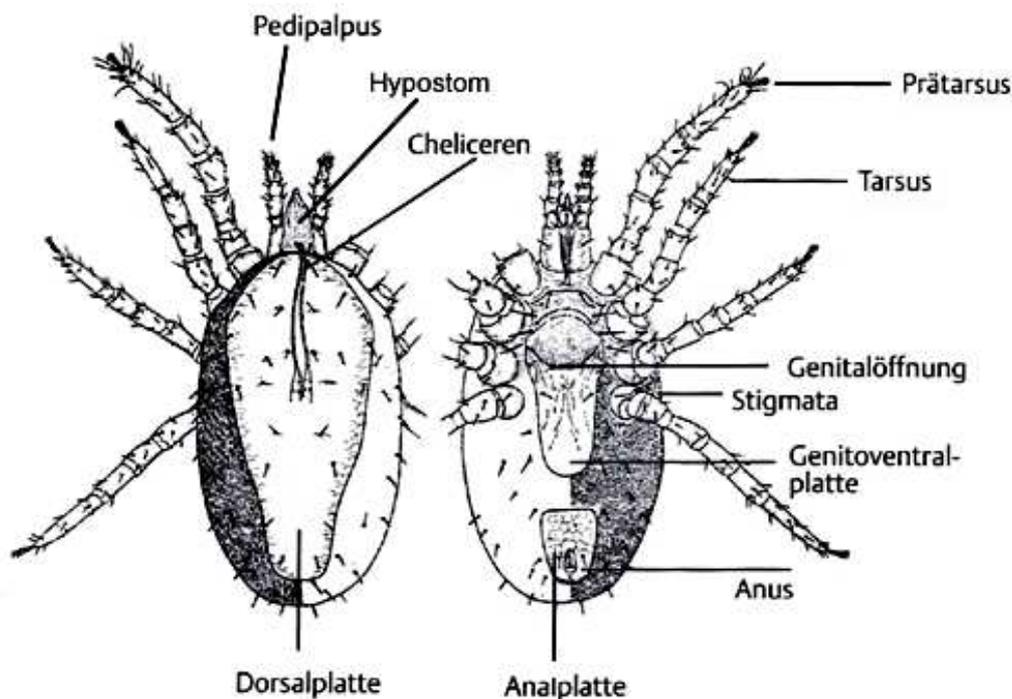


Abbildung 1: *Dermanyssus gallinae* ♀: dorsal und ventral (ECKERT et al., 2005)

2.1.2 Ontogenetische Entwicklung der Roten Vogelmilbe

Der Lebenszyklus der RVM wurde erstmalig von WOOD (1917) beschrieben. Nach der Befruchtung beginnt das Weibchen innerhalb von zwölf Stunden mit der Eiablage. Ein Weibchen kann in seinem Leben ungefähr 30 Eier produzieren. Nach jeder Blutmahlzeit

werden vier bis acht Eier abgelegt (SCHMÄSCHKE und RIBBECK, 1997). Die Eier der RVM sind ca. 400 x 260 µm groß, ellipsoid, glatt und perlweiß (CHAUVE, 1998; PAULUS und WEYGOLDT, 2004). Die schlüpfende weiße, sechsbeinige Larve nimmt keine Nahrung auf. Sie häutet sich nach etwa einem Tag zur achtbeinigen hämophagen Protonymphen. Diese häutet sich zwei bis drei Tage nach der Blutaufnahme zur Tritonymphen, die sich nach einer weiteren Blutmahlzeit zum Adultus entwickelt. Eine Deutonymphen fehlt bei der Entwicklung der RVM (PAULUS und WEYGOLDT, 2004). Der Generationszyklus dauert je nach Umweltbedingungen sieben bis zwölf Tage (KIRKWOOD, 1963; CHAUVE, 1998). Die ideale Temperatur für die Entwicklung der RVM liegt zwischen 20-30 °C (NORDENFORS et al., 1999a, 2000; TUCCI et al., 2008a, 2008b). Die günstigste relative Luftfeuchte liegt zwischen 70-90 % (BÜCHER, 1998). Die längste Lebensdauer von RVM wurde mit bis zu neun Monaten nachgewiesen (NORDENFORS et al., 1999b).

2.1.3 Vorkommen und Epidemiologie der Roten Vogelmilbe

Die RVM ist die häufigste, weltweit vorkommende Parasitenart beim Hausgeflügel (SEDDON, 1968; SCHMÄSCHKE und RIBBECK, 1997; CENCEK, 2003; LIEBISCH und LIEBISCH, 2003; THEKISOE et al., 2003; FORONDA et al., 2004; GUY et al., 2004; BOGDANOVA, 2005; O'CONNOR et al., 2005). Hauptsächlichliche Wirte sind Hühner und anderes Nutzgeflügel. Sie verhält sich wenig wirtsspezifisch und befällt auch andere Vögel, Säugetiere und den Menschen (DANIEL und ČERNÝ, 1971; DECLERQ und NACHTEGAELE, 1993; MEHLHORN et al., 1993; BAKR et al., 1995; CHAUVE, 1998; BECK, 1999; ROSEN et al., 2002; ARENDS, 2004; ELSTON, 2004; PAULUS und WEYGOLDT, 2004; HAAG-WACKERNAGEL, 2005; BECK und PANTCHEV, 2006; BECK und PFISTER, 2006; MIGNON und LOSSON, 2008; HAAG-WACKERNAGEL und BIRCHER, 2010). Die RVM tritt in den Sommermonaten aufgrund der für sie günstigen klimatischen Verhältnisse massenhaft auf (FRITZSCHE, 1962; GRATZL und KÖHLER, 1968; NORDENFORS et al., 1999a, 1999b). Warme, feuchte, dunkle und schmutzige Stallungen begünstigen die Entwicklung von großen Populationen (HIEPE und RIBBECK, 1982).

Die RVM ist ein temporärer, nachtaktiver Parasit, der nur nachts und bei Dunkelheit seine Wirtstiere aufsucht und sich nach dem Blutsaugen wieder in seine Verstecke in

der Umgebung zurückzieht (CHAUVE, 1998; LIEBISCH und LIEBISCH, 2003; SOKÓL et al., 2008). Den Weg zum Wirt weisen vermutlich CO₂, Wärme und Erschütterung. RVM fallen zwar auch auf ihre Wirtstiere, tun dies aber im Gegensatz zu Zecken nicht gezielt (MAURER et al., 1987; LIEBISCH und LIEBISCH, 2003). Im Versteck abgegebene Pheromone dienen dazu, den Rückweg zu finden (KILPINEN, 2001). Das typische Aggregationsverhalten der Milben wird ebenfalls durch Pheromone gesteuert und dient der Partnerfindung (LIEBISCH und LIEBISCH, 2003). Die RVM kann bis zu neun Monate ohne Nahrungsaufnahme überleben, wenn es die abiotischen Faktoren Lufttemperatur und relative Luftfeuchte erlauben (NORDENFORS et al., 1999b). Auch Weibchen, die länger als fünf Monate nüchtern waren, können sich nach erneuter Blutaufnahme weiter reproduzieren (BÜCHER, 1998). Tiefe Minustemperaturen (< -20 °C) und große Hitze (> 45 °C) vertragen RVM nicht (NORDENFORS et al., 1999a). Sehr empfindlich sind sie gegen Austrocknung oder Nässe (ECKERT et al., 2005). Im Winter kommt es durch diese Einflüsse zu einem Populationsabfall der RVM (TUCCI et al., 2008a, 2008b). Verbreitet wird die RVM von Betrieb zu Betrieb v. a. mittels Eierkartons und Mitarbeitern sowie Wildvögeln und Nagern (AXTELL und ARENDS, 1990; ECKERT, 2005).

2.1.4 Die Rote Vogelmilbe als Parasit beim Geflügel

Die Bisse der RVM sind schmerzhaft und verursachen Hautirritationen. Infolge des Scheuerns durch den Juckreiz können Sekundärinfektionen auftreten (SCHMÄSCHKE und RIBBECK, 1997). Die Gefiederpflege der Vögel steigert sich dadurch um ein Vielfaches. Durch das beständige Picken am Gefieder drohen Schädigung und Verlust von Federn (KILPINEN et al., 2005). Befallenes Geflügel ist infolgedessen sehr unruhig und schreckhaft. Tagsüber zeigt es meist ein vermehrtes Schlafbedürfnis (SCHMÄSCHKE und RIBBECK, 1997). Nach Eintritt der Milben in die natürlichen Körperöffnungen der Wirtstiere können Rhinitis, Otitis externa und Konjunktivitis entstehen (HOFFMANN, 1987; SCHMÄSCHKE und RIBBECK, 1997). Starker Befall führt zur Anämie (JUNGMANN et al., 1970; HOFFMANN, 1987; COSOROABA, 2001; KEÇECI et al., 2004). Eine adulte Milbe entzieht dem Wirtstier pro Saugakt etwa 200 µg Blut (LIEBISCH und LIEBISCH, 2003). Zur Kompensation des Blutverlustes bei sehr stark befallenen Hennen wird nach KILPINEN (1999) die Hämatopoese gesteigert. Oft werden außerdem Apathie und Abmagerung bis hin zur Kachexie beobachtet. Eine erhöhte Mortalität ist dann die

Folge (KIRKWOOD, 1967a, 1967b; HIEPE und RIBBECK, 1982; AXTELL und ARENDS, 1990; HÖGLUND et al., 1995; WOJCIK et al., 2000; ARKLE et al., 2006). Bei stark befallenen Hühnern kommt es häufig zu einem Rückgang der Legeleistung. Dies ist eine typische Reaktion bei erheblich stressbelasteten Individuen. Durch den Stress wird die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-(HHG)-Achse inaktiviert. Die Inaktivierung dieser Hormonkaskade kann zur völligen Unfruchtbarkeit führen. Ursache hierfür ist das negative Feedback hoher Katecholamin- und Glukokortikoidtiter auf die HHG-Achse (IMMELMANN et al., 1996). Die hohen Glukokortikoidspiegel bewirken weiterhin eine reduzierte Futtermittelaufnahme und eine verzögerte Immunantwort (AXTELL und ARENDS, 1990; KOWALSKI und SOKÓL, 2009). Durch einen Milbenbefall können beim Geflügel auch Entwicklungsstörungen und Mauserprobleme auftreten (SCHMÄSCHKE und RIBBECK, 1997).

Die RVM besitzt eine hohe wirtschaftliche Bedeutung durch den Abfall der Lege- und Mastleistungen. Außerdem erhöht sich der Anteil der Schmutzeier, da Hühner mit Milben stark infestierten Legenestern nur ungern aufsuchen und ihre Eier bevorzugt auf dem Boden ablegen (HIEPE und RIBBECK, 1982; RIBBECK, 1992; KILPINEN, 1999; COSOROABA, 2001; ARENDS, 2004; KILPINEN, 2005; KILPINEN et al., 2005; ARKLE et al., 2006). Beispielsweise gibt die niederländische Legehennen-Industrie an, jährlich 11 Millionen Euro für die Bekämpfung und durch die RVM verursachte Schäden aufzuwenden (EMOUS et al., 2005).

2.1.5 Diagnose

Die Diagnose eines Befalls wird durch den direkten Nachweis der Milben gestellt, die mit bloßem Auge oder mittels einer Lupe zu erkennen sind. Sie halten sich tagsüber meist in Ritzen und Spalten des Stalls verborgen und sind besonders in der direkten Umgebung der Hühner zu finden (MAURER et al., 1987). Bei der Sektion von toten Vögeln können Milben überall am Körper des Tieres, aber auch in der Schnabelhöhle, im Kropf und im Magen-Darm-Trakt gefunden werden (RIBBECK, 1992; SCHMÄSCHKE und RIBBECK, 1997). Differenzialdiagnostisch müssen alle Milbenspezies in Betracht gezogen werden, die der RVM morphologisch ähneln. Am weitesten häufigsten wird die

RVM mit *Ornithonyssus sylviarum* CANESTRINI und FANZAGO, 1877, der Nordischen Vogelmilbe (Familie Macronyssidae) verwechselt (ECKERT, 2005).

2.1.6 Bedeutung der Roten Vogelmilbe als Vektor für verschiedene Krankheitserreger

Die Relevanz von Zecken als Vektoren für verschiedene Krankheitserreger bei Mensch und Tier ist schon lange bekannt. Für Zecken ist die Übertragung von Babesien, Borrelien und Arboviren, wie das Virus der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME), gesichert (BRATTON und COREY, 2005). Weniger geläufig ist, dass auch Milben als Überträger von Krankheitserregern fungieren können (VALIENTE MORO et al., 2005). Die Übertragung von verschiedenen Bakterien und Viren durch hämophage Milben konnte von mehreren Arbeitsgruppen experimentell belegt werden. In unseren Breiten ist die RVM besonders relevant, da sie am häufigsten vorkommt (CHAUVE, 1998). In den Tabellen 1 und 2 sind Bakterien bzw. Viren aufgeführt, die von RVM übertragen werden können. Die Definitionen der verwendeten Begriffe für unterschiedliche Vektoren werden im Folgenden kurz erläutert:

Biologischer Vektor: Beim biologischen Vektor handelt es sich um einen echten Wirt, was epidemiologisch besonders bedeutsam ist. Bei der Transmission von Infektionserregern durch biologische Vektoren wird nochmals zwischen Zwischenwirt und Endwirt unterschieden (TENTER, 2006). Im Zwischenwirt befinden sich bei Parasiten ungeschlechtliche Stadien, die sich durch Wachstum oder Differenzierung weiter entwickeln oder sich vermehren. Im Endwirt dagegen erreicht der Parasit die Geschlechtsreife und bildet Fortpflanzungsprodukte (WIESNER und RIBBECK, 2000; TENTER, 2006). Arboviren werden durch Arthropoden verbreitet und durchlaufen sowohl im Arthropoden als Zwischenwirt als auch im Vertebraten als Endwirt eine Vermehrung. Voraussetzung dafür ist, dass auch Arthropodenzellen vom Virus infiziert werden können (MODROW et al., 2010). Beim nächsten Blutsaugen an einem neuen Wirt kann dieser infiziert werden. Mit einem biologischen Vektor kann das Pathogen viel weiter und häufiger als bei der mechanischen Transmission weitergetragen werden (MARTIN et al., 1987).

Mechanischer Vektor: Die mechanische Übertragung durch einen konta-minierten Saugrüssel blutsaugender Arthropoden ist ein weiterer Transmissionsweg. Dieser erregerspezifische Weg stellt eine Kontakt- oder Schmierinfektion durch einen Transportwirt oder Zwischenträger dar (TENTER, 2006). Voraussetzung dafür ist, dass der Arthropode kurz nach der ersten Blutaufnahme an einem infizierten Wirt ein zweites Mal an einem weiteren, naiven Tier saugt. Zum Haften der Infektion muss eine ausreichend hohe Erregerdosis übertragen werden, was selten vorkommt, da im Vektor keine Vermehrung des Erregers stattfindet (THRUSFIELD, 1986; MARTIN et al., 1987; LAST, 1988). Als Sonderform einer mechanischen Übertragung kann die orale Aufnahme von erregerehaltigen Vogelmilben angesehen werden. Durch eine massenhafte orale Aufnahme vom Wirt kann eine Infektion hervorgerufen werden, sofern die pathogenen Agenzien nicht zuvor verdaut werden (MONREAL et al., 1971; LIEBISCH und LIEBISCH, 2003; VALIENTE MORO et al., 2007b).

Experimenteller Vektor: Die Transmission des Pathogens durch den jeweiligen Vektor wurde bisher nur im Labor nachgewiesen. Es bestehen Zweifel an der epidemiologischen Bedeutung dieses Übertragungsweges, da keine Vermehrung des Bakteriums, des Virus oder des Parasiten im Vektor festgestellt werden konnte. Bei der RVM ist die biologische Übertragung von Pathogenen trotz einiger Untersuchungen noch immer ungewiss, da sich die Ergebnisse von Laborexperimenten schwerlich auf die Verhältnisse in der Umwelt übertragen lassen. Es wurden bislang keine Untersuchungen publiziert, die belegen, ob erregerehaltige Vogelmilben eine Änderung ihres Verhaltens zeigen oder ob ihre Reproduktionsleistungen beeinflusst werden. Es existieren auch keine Nachweise zu erregerbedingten makroskopischen oder histologischen Organveränderungen oder spezifische Erregernachweise aus einzelnen Organen/ Organsystemen der Vogelmilben. Die folgenden Abschnitte und die Tabellen 1 und 2 bieten eine Übersicht zu den bisher durchgeführten Studien.

2.1.6.1 Bakterien

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten mehrere geflügelpathogene Bakterien erfolgreich aus der RVM isolieren. Die folgende Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die nachgewiesenen Bakterien und die von ihnen beim Geflügel hervorgerufenen Erkrankungen.

Tabelle 1: Aus *Dermamyssus gallinae* isolierte geflügelpathogene Bakterien

Bakterium	Erkrankung	Isolierung/ Persistenz	Rolle als Vektor	Literatur
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Intoxikation möglich	ja	fraglich	ROMASHEVA, 1968
<i>Borrelia anseris/ gallinarum</i>	GeflügeIspirochätose	ja	biologischer Vektor	RESHETNIKOV, 1967
<i>Borrelia anseris/ gallinarum</i>	GeflügeIspirochätose	ja	Vektor	ECKERT et al., 2005 RIBBECK, 1992 BAKER et al., 1956 CIOLCA et al., 1968 SEDDON, 1968
<i>Coxiella burnetti</i>	Q-Fieber	ja	experimenteller Vektor	ZEMSKAYA und PCHELKINA, 1955, 1967
<i>Escherichia coli</i>	Colibazilllose	ja	fraglich	VALIENTE MORO et al., 2009
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	Rotlauf	ja	experimenteller Vektor	CHIRICO et al., 2003 BRÄNNSTRÖM et al., 2010
<i>Listeria monocytogenes</i>	Listeriose	ja	–	GREBENYUK et al., 1972

Bakterium	Erkrankung	Isolierung/ Persistenz	Rolle als Vektor	Literatur
<i>Pasteurella avium</i>	keine	ja	Infektion durch Aufnahme vieler Milben p.o.	WEYER und ZUMPT, 1966
<i>Pasteurella multocida</i>	Geflügelcholera	Persistenz 42-64 d	mechanischer Vektor	HERTEL, 1904 PETROV, 1975 STURMANN, 1965; BIGLAND, 1954 (zit. von YUNKER, 1973)
<i>Rickettsia</i> ssp.	<i>Spotted Fever Group</i>	ja	Vektor	BOYD, 1997 REHACEK et al., 1975
<i>Salmonella</i> Gallinarum ¹	Salmonellose	Persistenz min. 4 Monate	möglicher Vektor	ZEMAN et al., 1982 ZANELLA, 2007
<i>Salmonella</i> Enteritidis ²	Salmonellose	ja	transovariale und transstadiale Passage, Vektor	MORO et al., 2007a, 2007b VALIENTE MORO et al., 2007a, 2007b, 2009
<i>Staphylococcus</i> ssp.	Staphylokokkose	ja	fraglich	VALIENTE MORO et al., 2009
<i>Streptomyces</i> ssp.	keine	ja	fraglich	VALIENTE MORO et al., 2009

d = Tag(e). Definitionen unter Abschnitt 2.1.7

Vektor: der Autor/ die Autoren haben in ihren Experimenten nicht zwischen einem biologischen oder mechanischen Vektor unterschieden.

¹ *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Gallinarum

² *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Enteritidis

2.1.6.2 Viren

Aus der RVM wurden bereits verschiedene Viren isoliert (Tabelle 2). Zur besseren Übersichtlichkeit wurde die Auflistung der Viren anhand ihres Genoms vorgenommen. Für manche Viren konnte experimentell eine Übertragung auf einen neuen Wirt bei dem Saugakt der Milben nachgewiesen werden. Einige Autoren geben zusätzlich die Persistenz des Virus in der Milbe an. Eine transovarielle oder transstadiale Übertragung konnte nur sehr selten festgestellt werden (Tabelle 2). Die meisten Autoren sind der Ansicht, dass die Virusübertragung durch die RVM kaum eine epidemiologische Rolle spielt, da eine Virusvermehrung innerhalb der Milbe bisher nicht nachgewiesen werden konnte (Tabelle 2).

Eine gelungene Übertragung von AIV durch einen Arthropoden einschließlich der RVM wurde bisher noch nicht dokumentiert. Es konnte aber von zwei Arbeitsgruppen der H5N1-Nachweis aus folgenden Insekten geführt werden: SAWABE et al. (2006, 2009) wiesen das Virus in der Schmeißfliege *Calliphora nigribarb* auf einer Farm nach, wo es kurz zuvor zu einem Ausbruch der Geflügelpest gekommen war. BARBAZAN et al. (2008) konnten hochpathogenes AIV (H5N1) aus blutgefüllten Stechmücken-Weibchen der Art *Culex tritaeniorhynchus* Giles isolieren. Am Tag nach der Sammlung der Moskitos mittels verschiedener Mückenfallen kam es zu einem H5N1-Ausbruch auf dem beprobten Betrieb. Es wurden von keiner der beiden Arbeitsgruppen weitere Untersuchungen zur Transmission des AIV durch die Insekten durchgeführt.

Tabelle 2: Aus *Dermanyssus gallinae* isolierte Viren

Virusfamilie	Virusspezies	Wirt	Persistenz in Milbe	Transmission			Literatur
				Biss/transovariell/sonstiges	Biss/transovariell/sonstiges	Biss/transovariell/sonstiges	
Poxviridae ds DNS	Geflügelpocken- Virus	Geflügel	min. 300 d	ja	ja	–	SHIRINOV et al., 1972 BRODY, 1936 (zit. von YUNKER, 1973)
Retroviridae RNS-RT	Aviäres Leukosevirus	Huhn	fraglich	ja	–	–	HILBRICH, 1978 HOFFMANN, 1987
Paramyxoviridae ss (–) RNS	PMV-1 (Virus der Newcastle- Krankheit)	Geflügel	fraglich	–	ja	–	ARZEY, 1990 HOFSTAD, 1949 (zit. von YUNKER, 1973)
Flaviviridae ss (+) RNS	Langatvirus (Tick-borne Encephalitis)	Maus	direkt nach Blutmahlzeit	nein	–	nein	DURDEN und TURELL, 1993
		Wild- vögel	kein Virus- nachweis	–	–	–	KORENBERG et al., 1984
		Maus	–	nein	–	–	WEGNER, 1976
Flaviviridae ss (+) RNS	Saint-Louis- Encephalitis Virus	Maus Geflügel	keine Virus- konservierung	nein	–	–	ZEMSKAYA und PCHELKINA, 1962
		Maus	Virusisolierung	–	–	durch i.c. Inokulation von AAF	SMITH et al., 1944 HOWITT et al., 1948

Virusfamilie	Viruspezies	Wirt	Persistenz in Milbe	Transmission			Literatur
				Biss/transovariell/sonstiges	Biss/transovariell/sonstiges	Biss/transovariell/sonstiges	
Flaviviridae ss (+) RNS	Saint-Louis-Encephalitis Virus	Maus	Virusisolierung	nein	-	-	CHAMBERLAIN et al., 1957 REEVES et al., 1955
		Huhn	1.-30. d	ja, 3d + 7d	nein	-	DURDEN et al., 1993
Togaviridae ss (+) RNS	Eastern equine Encephalitis (EEE) Virus	Huhn	1.-4. d + 15. d	ja, ein Mal	nein	mit MH per Haut/Auge auf 1 Huhn von 5	CHAMBERLAIN et al., 1957
		Huhn	-	-	-	-	CHAMBERLAIN and SIKES, 1957 HOWITT et al., 1948
Togaviridae (+) RNS	Venezuelan equine Encephalitis (VEE) Virus	Maus	1.-7. d	-	nein	rein mechanisch	DURDEN et al., 1992
		Wild- vögel	Virusisolierung	-	nein	-	REEVES et al., 1955 HOWITT et al., 1948
Togaviridae ss (+) RNS	Western equine Encephalitis (WEE) Virus	Huhn	kein Virusnachweis	-	-	mit MH i.p. in Meerschwein, Maus	SULKIN, 1945 SULKIN et al., 1955
		Huhn	1.-5. d + 9. d, 1.-6. d aus Kot	-	nein	mit MH über 2 Hühner von 4	CHAMBERLAIN et al., 1957

d = Tag(e); MH = Milbenhomogenisat; i.c. = intracutan; i.p. = intraperitoneal; zit. = zitiert; ds = doppelsträngig; ss = einzelsträngig;
DNS = Desoxyribonukleinsäure; RNS = Ribonukleinsäure; RT = Reverse Transkriptase; (-) = negativ polarisiert; (+) = positiv-polarisiert

2.1.6.3 Parasiten

Bisher wurde nur *Lankesterella* sp. bzw. *Atoxoplasma* sp., der Erreger der Atoxoplasmose, aus der RVM isoliert. LAINSON (1958, 1960) wies die Rolle der RVM als mechanischer Vektor für diesen Parasiten nach.

2.1.7 Maßnahmen zur Bekämpfung der Roten Vogelmilbe

Die RVM stellt in der Nutzgeflügelhaltung durch die von ihr verursachten Krankheitsbilder und die damit einhergehenden wirtschaftlichen Verluste ein ernst zunehmendes Problem dar. Diese Problematik hat sich in den letzten Jahren deutlich verschärft, da ihre Bekämpfung immer schwieriger wird (ARKLE et al., 2006; SPARAGANO et al., 2009). Die RVM kommt in nahezu allen Geflügelhaltungen vor, Legehennen sind jedoch am stärksten betroffen, da sie am längsten in einem Stallgebäude verbleiben. Ursachen für die Probleme bei der Bekämpfung sind erstens der relativ kurze Lebenszyklus und die versteckte Lebensweise der Milben, zweitens die derzeitige Gesetzgebung, welche die Möglichkeiten zur medikamentellen Bekämpfung stark limitiert und drittens die Zunahme von Resistenzen der Milben gegenüber den gebräuchlichen Akariziden (CHAUVE, 1998; CHIRICO und TAUSON, 2002; LIEBISCH und LIEBISCH, 2003). Außerdem muss beachtet werden, dass jede Form der Bekämpfung in direkter oder indirekter Weise in die Umwelt eingreift, da die wenigsten Maßnahmen nur auf den Parasiten ausgerichtet sind. Und schlussendlich müssen die Bekämpfungsmethoden und -präparate für die Praxis anwendbar und finanzierbar sein (LIEBISCH, 1996; LIEBISCH und LIEBISCH, 2003).

Idealerweise sollte ein Stall möglichst sauber und ohne Ritzen und Fugen gebaut sein, da sich diese als Verstecke und Rückzugsmöglichkeiten für den Schädling anbieten und seine Tilgung erschweren. Eine Optimierung des Managements in den Geflügelställen gilt als erster Schritt zur Bekämpfung des Parasiten. Dabei sollten folgende Punkte beachtet werden:

1. Anwendung des All-in-all-out-Verfahrens mit möglichst langen Leerstehzeiten vor Wiederbesatz.
2. Regelmäßige Reinigung von Kotgrube und Scharraum.
3. Staubsaugen des gesamten Stalls in kurzen Abständen.
4. Gründliches Ausspritzen des Stalls mit einem Hochdruckreiniger, da Nässe von den Milben nicht vertragen wird.
5. Sorgfältiger Einsatz von Akariziden: Aerosole sollten mit einem Druck von 540 kPa und einer Partikelgröße von 40-50 µm eingesetzt werden (SCHMÄSCHKE und RIBBECK, 1997).
6. Kontrolle der Kisten und Kartons für Geflügel- und Eiertransporte auf Sauberkeit.
7. Kontrolle des Ektoparasitenbefalls des Geflügels vor dem Einstellen und eventuell vorangehende Quarantäne (MAURER et al., 1987; CHAUVE, 1998).
8. Verhinderung des Eindringens von Wildvögeln und Nagetieren (AXTELL und ARENDS, 1990; RIBBECK, 1992; ECKERT, 2005).

MUL und KOENRAADT (2009) entwickelten in diesem Sinne zusammen mit einem Expertenteam eine Checkliste analog des HACCP-(Hazard Analysis and Critical Control Points³)-Konzepts zur Verhinderung der Einschleppung und Verbreitung der RVM in Geflügelbestände. Diese Checkliste wurde von holländischen und britischen Geflügelhaltern evaluiert und als praktikabel und nützlich bewertet. Sie könnte demnach für Betriebe mit Managementproblemen hilfreich sein (MUL und KOENRAADT, 2009; MUL et al., 2009).

2.1.7.1 Chemische Bekämpfungsmethoden

Die Bekämpfung der RVM mit chemischen Wirkstoffen ist derzeit die mit weitem Abstand am häufigsten angewendete Maßnahme. In Tabelle 3 sind die Wirkstoffgruppen und Wirkmechanismen der gebräuchlichsten Wirkstoffe aufgeführt. Mit der steigenden Zunahme von Resistenzen der RVM gegen diese Chemikalien gewinnen in den letzten Jahren die biologischen Bekämpfungsverfahren an Bedeutung.

³ deutsch: Gefahrenanalyse und kritische Lenkungspunkte

Tabelle 3: Häufig eingesetzte Wirkstoffgruppen in der Ektoparasiten- und Schädlingsbekämpfung

(nach LIEBISCH, 1996, erweitert)

Wirkstoffgruppe	Wirkstoff	Wirkung
Chlorierte Kohlenwasserstoffe	DDT, HCH, Lindan	Hemmung der In- bzw. Aktivierung Na/ Ka-Kanäle (obsolet)
Organophosphate = Phosphorsäureester	Tetrachlorvinphos, Dichlorovos, Bromophos, Metrifonat, Butonat, Phoxim, Chlorpyrifos, Parathion, Paraoxon, Diazinon, Heptenophos	Acetylcholinesteraseblock
Carbamate bzw. Carbamidsäureester	Carbaryl, Propoxur, Dikresyl, Bendiocarb	Acetylcholinesteraseblock
Synthetische Pyrethrum-Abkömmlinge = Pyrethroide	Cypermethrin, Flumethrin, Deltamethrin, Permethrin, Fenvalerat, Pyrethrin	Hemmung der In- bzw. Aktivierung Na/ Ka-Kanäle
Amidine	Amitraz	Antagonist der Rezeptoren für Oktopamin
Makrozyklische Laktone	Avermectine (Ivermectin, Selamectin, Moxydectin), Milbemycine	GABA-Agonisten
Pflanzliche Insektizide	Pyrethrum, Nikotin, Derris (Tubawurzel - Rotenon)	Pyrethrum: Blockade der Na-Kanäle; Nikotin: cholinmimetisch (nicht zugelassen); Rotenon: Blockade ATP-Synthese
Entwicklungshemmer	Methopren, Lufenuron, Pyriproxyfen	Larvalentwicklungshemmer bzw. Chitinsynthesehemmer (Pyriproxyfen)

2.1.7.1.1 Systemische Wirkstoffe

Der Einsatz von systemischen Wirkstoffen wäre nur als Futterzusatzstoff sinnvoll. Zwar wird für die orale Verabreichung kein teures Sprühgerät benötigt, aber effektive Dosen sind teuer, nur kurzfristig wirksam und oft toxisch für das Geflügel. Deshalb ist eine ausgedehnte Nutzung nicht zweckmäßig und eine Zulassung wurde bislang nicht angestrebt (ZEMAN, 1987; REYNAUD et al., 1997; CHAUVE, 1998; SCHMÄSCHKE und RIBBECK, 1997; ASH und OLIVER, 1989; DEVANEY, 1986). Untersuchungen zu diesem

Thema wurden mit Carbaryl, verschiedenen Organophosphaten, Sulfonamiden und makrozyklischen Laktonen wie Ivermectin und Moxidectin durchgeführt (KIRKWOOD, 1967b, 1974). Letztere sind im Ziervogelbereich gebräuchliche und wirksame Spot-on-Präparate (BECK und PANTCHEV, 2006; TODISCO et al., 2008).

2.1.7.1.2 Ektoparasitika und Desinfektionsmittel

Ektoparasitika und chemische Desinfektionsmittel werden mittels Hochdruckreiniger in den Stallungen verteilt. Das ideale Akarizid kommt in jeden Winkel, bleibt lange aktiv auf Oberflächen, wirkt selektiv auf Parasiten (keine Warmblüttoxizität) und induziert keine Resistenzen (CHAUVE, 1998; ARKLE et al., 2004). Viele Präparate wirken effizient gegen die RVM, sind jedoch aus umweltschutzrechtlichen Gründen ungeeignet. Andere wiederum sind nur unter Laborbedingungen wirksam (CHAUVE, 1998). Wichtig für den Verbraucher ist außerdem die Vermeidung von Rückständen in und auf Hühnereiern (HAMSCHER et al., 2002, 2007a, 2007b).

Die Anwendung von Akariziden muss generell mehrfach wiederholt werden, da die Milbeneier oft nicht mit abgetötet werden (SCHMÄSCHKE und RIBBECK, 1997). Dies wird in der Praxis aber oft vernachlässigt und kann durch Selektion zu einer Resistenzbildung der RVM führen. Bei rein akarizid wirkenden Präparaten ist es möglich, die Dosis auf das Doppelte bis auf das Vierfache zu erhöhen. Weiterhin müssen die örtlichen Gegebenheiten wie Untergrund und Feuchtigkeitsverhältnisse im Stall bei der Auswahl eines Akarizids einbezogen werden (LIEBISCH, 1996). Aktuell gibt es relativ viele Ektoparasitika, aber keines ist als Tierarzneimittel zugelassen (LIEBISCH und LIEBISCH, 2003; HAMSCHER et al., 2007a). Wahrscheinlich ist die Erprobung am Tier zu kostspielig. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt besitzt keines der eingesetzten Ektoparasitika eine vollständige und nachhaltige Wirkung gegen die RVM, da keines der Mittel in ihre schmalen Verstecke eindringt, in denen sie zusätzlich durch eine feuchtigkeitsabweisende Schicht bestehend aus ihren abgestoßenen Exuvien geschützt sind.

2.1.7.1.3 Neopredisan® 135-1

Das chemische Desinfektionsmittel Neopredisan® 135-1 (Menno Chemie-Vertrieb GmbH, Norderstedt) besitzt ein weites Wirkungsspektrum: Es wirkt laut verschiedener Gutachten gegen Nematodeneier (*Ascaris suum*, *Heterakis* spp.), Kokzidien (*Isospora suis*, *Eimeria tenella*), Kryptosporidien, Clostridien, *Mycobacterium tuberculosis* und andere Bakterien, Viren, Pilze und Prionen (Anhang II). Neopredisan® 135-1 enthält als Wirkstoff p-Chlor-m-Kresol (25-30 %), der zu der Gruppe der Alkylphenole gehört. Alkylphenole besitzen nach FREY und LÖSCHER (2007) einen guten Reinigungseffekt, ein ausgezeichnetes Penetrationsvermögen (Kot, Schmutz) und eine gute desinfizierende Wirksamkeit. P-Chlor-m-Kresol hat die größte praktische Bedeutung, da es durch die Substitution eines H-Atoms durch ein Chlor-Atom fünfmal stärker bakterizid wirksam ist als m-Kresol, aber gleichzeitig wesentlich geringer toxisch für die Umwelt ist (FREY und LÖSCHER, 2007). Der Wirkmechanismus dieses Phenolderivats beruht auf einer Schädigung der Zellmembran durch die Denaturierung von Proteinen (RUMMEL, 1996). Die Wirksamkeit von Neopredisan® 135-1 gegen die RVM wurde bisher weder experimentell unter Laborbedingungen noch im Feldversuch getestet. Aufgrund seines bereits nachgewiesenen breiten Wirkungsspektrums könnte es eine brauchbare Alternative zur Bekämpfung der RVM darstellen.

2.1.7.2 Weitere Bekämpfungsmethoden

Auf der Suche nach weiteren Bekämpfungsmethoden wurden in der Praxis und von einigen Arbeitsgruppen in Laborexperimenten u. a. der Einsatz von Veränderungen der Temperatur und des Lichtregimes im Stall, Silikatstäuben, Impfstoffen, ätherischen Ölen und Essenzen, Prädatoren, pathogenen Bakterien oder Pilzen und präparierten Fallen untersucht (Tabelle 4). Keine dieser Methoden hat sich als vollständig effektiv gegen die RVM herausgestellt.

Tabelle 4: Alternative Methoden zur Bekämpfung der Roten Vogelmilben

Methode	Literatur
Erhöhung der Temperatur auf > 49 °C	NORDENFORS et al., 1999a
Einsatz von Dampfstrahlreinigern und zusätzliches Abflammen der nicht brennbaren Stallteile	Eigene Erfahrung der Autorin im Tierärztlichen Geflügelbetreuungsdienst der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische (KVRAF)
Veränderung des Lichtregimes im Stall	LEWIS et al., 1992; ZOONS, 2004; STAFFORD et al., 2006
Silikatstäube aus naturreiner Diatomeenerde	MAURER und PERLER, 2006; MAURER et al., 2009; KILPINEN und STEENBERG, 2009
Impfstoffe, bestehend aus von der RVM isolierten Proteinen	WILLADSEN, 1999; ARKLE et al., 2006; BARTLEY et al., 2009; HARRINGTON et al., 2009a; 2009b; WRIGHT et al., 2009
Ätherische Öle und Essenzen	ZÜRN, 1882; CARROLL, 1994; LIEBISCH, 1996, 2003; KIM et al., 2004, 2007; LUNDH et al., 2005; ABDEL-GHAFFAR et al., 2008, 2009; BIRKETT et al., 2008; MAURER et al., 2009; GEORGE et al., 2008, 2009a, 2009b, 2009c, 2010
Natürliche Prädatoren (Raubmilben, Käfer)	PRUDNIKOVA, 1992; EICHLER, 1980; CHAUVE, 1998; MAURER und HERTZBERG, 2001; EVERS, 2009; LESNA et al., 2009
Toxinbildende Bakterien	KRIEG, 1981; MCKEEN et al., 1988; LIEBISCH, 1996
Endopathogene Pilze	ELSTON, 2004; TAVASSOLI et al., 2008
Insektenwachstumsregulatoren	OLIVER et al., 1985; LIEBISCH, 1996; CHAUVE, 1998
Präparierte Fallen (Akarizide, Pheromone, Klebstoffe)	KIRKWOOD, 1963, 1965; MAURER et al., 1987; MCCARRY und TREES, 1991; HÖGLUND et al., 1995; REYNAUD et al., 1997; NORDENFORS und HÖGLUND, 2000; LIEBISCH und LIEBISCH, 2001; NORDENFORS et al., 1999b, 2001; NORDENFORS und CHIRICO, 2001; ZENNER et al., 2003, 2009
Akarizidhaltige Tauchbäder	DEVANEY et al., 1982

2.1.8 Akarizidresistenzen der Roten Vogelmilbe

In den letzten Jahren kam es immer wieder zu Berichten über das Nachlassen der Wirksamkeit einiger Akarizide. Die Grenzen der konventionellen Kontrollmethoden durch die Entstehung von Resistenzen, durch neu erlassene gesetzliche Regelungen zum Einsatz von chemischen Bekämpfungsmitteln und durch die strengere Tierschutzgesetzgebung werden immer ersichtlicher. Mittlerweile ist allgemein bekannt, dass wiederholte Langzeitbehandlungen mit denselben Akariziden die Entwicklung von Resistenzen begünstigen können (CHAUVE, 1998). LIEBISCH und LIEBISCH (2001) vertreten die Ansicht, dass eine Erhöhung der Wirkstoffdosis bei nicht ausreichender Wirksamkeit des Akarizids erst recht zur Entwicklung von resistenten Milbenpopulationen führt, da die resistenten RVM auf diese Weise selektiert werden. Zusätzlich sehen sie die Gefahr einer erhöhten Rückstandsproblematik im Lebensmittel Ei durch die vielfache Erhöhung der empfohlenen Dosis. Mehrere Autoren untersuchten bereits, bei welchen Akariziden vermehrt Resistenzen der RVM vorkommen (FLETCHER und AXTELL, 1991; NORDENFORS et al., 2001; LIEBISCH und LIEBISCH, 2001, 2003; FIDDES et al., 2005; MARANGI et al., 2009). Zur Vermeidung von Fehlschlägen bei der Bekämpfung der RVM ist das frühzeitige Erkennen sich entwickelnder oder schon vorhandener Resistenzen notwendig. Sobald eine Resistenz der Milben entdeckt wird, sollte sofort der verwendete Wirkstoff gewechselt werden (CHAUVE, 1998). In-vitro-Tests sind, trotz der bestehenden Diskrepanz zwischen Labor- und Feldbedingungen, nach der Ansicht einiger Autoren essenziell, um Resistenzen der RVM nachzuweisen. Sie wurden entweder mit dem Pasteur-Glaspipetten-Test (ZEMAN und ZELEZNY, 1985; FLETCHER und AXTELL, 1991; ZEMAN, 1991) und/ oder mit dem WHATMAN-Filterpapier-Test (BEUGNET et al., 1997) durchgeführt. LIEBISCH und LIEBISCH (1998) bieten kommerziell zwei in-vitro-Resistenztests an, für die sie einen H0-Milbenstamm verwenden, der seit über 30 Jahren isoliert gehalten wird und der nach Ansicht der Autoren keinerlei Resistenzen gegenüber Akariziden aufweist (LIEBISCH und LIEBISCH, 2001). Alternative Methoden bleiben aber aus den genannten Gründen vermehrt in der Diskussion.

2.2 Influenza A-Virusinfektionen beim Vogel

2.2.1 Ätiologie der aviären Influenza A

Influenza A-Viren (AIV) werden in die Familie Orthomyxoviridae eingeordnet. Diese Familie umfasst die Genera Influenzavirus A, Influenzavirus B, Influenzavirus C, Thogotovirus und Isavirus (KAWAOKA et al., 2005; ALEXANDER, 2006). Nur Angehörige des Genus Influenzavirus A sind beim Vogel als Krankheits- bzw. Seuchenerreger von Bedeutung (ALEXANDER, 2006).

2.2.1.1 Aufbau und Eigenschaften der Influenza A-Viren

Influenza A-Viren sind behüllte, pleomorphe Partikel mit sphärischer oder seltener filamentöser Gestalt mit einem Durchmesser von 80–120 nm (KAWAOKA et al., 2005). In die äußere Virushülle sind die viralen Glykoproteine, das Hämagglutinin (HA) und die Neuraminidase (NA), eingelagert. Das Genom der AIV besteht aus einer linearen, einsträngigen, negativ polarisierten RNS, die in acht Segmenten vorliegt. Diese kodieren für zehn virale Proteine (PB1, PB2, PA, HA, NA, NP, M1, M2, NS1, NS2), von denen das HA und die NA eine wichtige Rolle für die Variabilität der AIV, die Einteilung in verschiedene Subtypen und ihre Funktion spielen (WEBSTER et al., 1992; KAWAOKA et al., 2005).

2.2.1.2 Subtypen der Influenza A-Viren

Alle AIV werden aufgrund von Aufbau und Funktion ihrer Oberflächen-glykoproteine, HA und NA, in Subtypen unterteilt. Bisher wurden 16 HA- und 9 NA-Subtypen isoliert (FOUCHIER et al., 2005; KALETA et al., 2005; YASSINE et al., 2010). Bei Influenza A-Viren werden für die Replikation ihres Genoms virale RNA-abhängige RNA-Polymerasen verwendet, denen die Proofreading-Aktivität anderer Polymerasen fehlt. Dadurch werden mit höherer Wahrscheinlichkeit mehr falsche Nukleotide in ihr Genom eingebaut. Durch solche Punktmutationen in den für die Oberflächenproteine HA und NA kodierenden Genen, die zusätzlich dem Selektionsdruck des Immunsystems ausgesetzt sind, kommt es zur Veränderung des Antigenprofils und zum Auftreten neuer Subtypen (MODROW et al., 2010). Dies wird als antigenic drift bezeichnet. Zusätzlich können Influenzaviren durch ihr segmentiertes Genom erhebliche genetische

Veränderungen durchlaufen, die genetic reassortment genannt werden. Darunter wird der Austausch von einem oder mehreren Genomsegmenten zweier unterschiedlicher Influenzaviren verstanden, die gleichzeitig eine Zelle infiziert haben. Es wird vom antigenic shift gesprochen (WEBSTER et al., 1992; ALEXANDER, 2006; SWAYNE und HALVORSON, 2008; MODROW et al., 2010).

2.2.1.3 Pathogenität der Influenza A-Viren

AIV werden beim Geflügel nach dem Grad ihrer Pathogenität in zwei Gruppen unterschieden. Bei allen AIV wird als Vorstufe des Hämagglutinins das HA0 gebildet. Erst durch Spaltung des HA0 zu HA1 und HA2 mittels Wirtstierproteasen wird das Virus infektiös. Die Unterschiede in der Pathogenität ergeben sich aus dem unterschiedlichen Aufbau des HA0. Niedrig pathogene AIV (NPAIV), die die Geflügelinfluenza auslösen, besitzen an ihrer HA0-Spaltstelle nur ein Arginin oder ein Lysin (KAWAOKA et al., 1990, MODROW et al., 2010). Das HA0 muss durch trypsinähnliche Enzyme gespalten werden, die nur im Respirations- und Digestionstrakt vorkommen. Deshalb ist die Replikation des Virus auf diese beiden Organsysteme limitiert (ALEXANDER, 2006; SWAYNE und HALVORSON, 2008). Verfügt das AIV an der Spaltstelle des HA0 über mehrere Arginin/Lysin-Aminosäurebausteine, die ubiquitär von intrazellulär vorhandenen Proteasen gespalten werden können, so repliziert es sich in sämtlichen Zellen des Körpers. Es handelt sich somit um ein hochpathogenes AIV (HPAIV), das die Klassische Geflügelpest verursacht (ALEXANDER, 2006).

2.2.1.4 Replikation der Influenza A-Viren

Das HA des AIV adsorbiert an Rezeptoren permissiver Wirtszellen, die an Glykoproteine gebundene Sialinsäure enthalten müssen. Diese Bindung löst eine Endozytose aus. In den Endosomen findet eine pH-abhängige Fusion der Virushülle mit der Endosomenmembran statt. Die proteolytische Spaltung von HA0 zu HA1 und HA2 ist die essenzielle Voraussetzung für diesen Vorgang und für die Infektiösität des AIV allgemein. Die Genomsegmente der Viruspartikel werden zum Zellkern transportiert, wo der virale Transkriptase-Komplex eine mRNS synthetisiert. Die Transkription wird durch zehn bis dreizehn Nukleotide, die vom Wirtszellgenom durch die Endonukleaseaktivität von PB2 generiert wurden, initiiert. Es werden sechs monozistronische mRNS

gebildet, die jeweils nur für ein Gen kodieren. Sie werden zur Translation in die viralen Proteine HA, NA, PB1 und PB2, NP und PA ins Zytoplasma transportiert. Die mRNS, die NS und M kodiert, unterliegt einem splicing, aus dem zwei mRNS hervorgehen, welche in die Proteine NS1, NEP, M1 und M2 translatiert werden. Die HA- und NA-Proteine werden im rauen endoplasmatischen Retikulum glykosyliert, im Golgi-Apparat prozessiert und an die Zelloberfläche transportiert, wo sie in die Zellmembran eingebettet werden. Die acht RNS-Segmente und die inneren Proteine assemblieren und wandern zu den Stellen in der Wirtszellmembran, wo die Proteine HA, NA und M2 bereits integriert wurden. Das M1 bewirkt eine enge Verbindung der RNS-Segmente und der inneren Proteine zu diesem Teil der Plasmamembran und anschließend die Knospung des Virions (SWAYNE und HALVORSON, 2008).

Über die Replikation von AIV in Arthropodenzellen liegen bisher keine Untersuchungen vor. BARBAZAN et al. (2008) infizierten Zellen einer Moskitozelllinie (C6/36) mit einem H5N1 und konnten 24 Stunden nach der Infektion die RNS des Virus reisolieren. Sie sahen damit die Replikation des AIV als erwiesen an. Es könnte sich aber auch um die Isolation der RNS der eingesetzten Virussuspension handeln. Bei einer Studie zur Identifizierung von Wirtszellgenen für die Influenzavirus-Replikation konnte festgestellt werden, dass es nicht möglich war, mit einem H1N1-Feldisolat *Drosophila melanogaster*-Zellen zu infizieren. Dies gelang erst nach der genetischen Modifikation des Virus, bei der das HA und NA gegen Gene des Vesikulären Stomatitis-Virus ausgetauscht wurden (HAO et al., 2008). Im Bereich der Impfstoff-Industrie wird als Alternative zur Herstellung von Influenza-A-Impfstoffen mittels Brutei zur Entwicklung von Vakzinen mittels eines Baculovirus-Insektenzell-Systems (z. B. mit *Spodoptera frugiperda* (Sf9)-Zellen) geforscht. Aber auch hier ist die Replikation von nativen AIV in insektoiden Zellen bisher nicht möglich (SHEN et al., 2008; COX und HOLLISTER, 2009; KRAMMER und GRABHERR, 2010).

2.2.1.5 Tenazität der Influenza A-Viren

Das AIV überdauert nicht lange in der Außenwelt, da es durch UV-Strahlung und Wärme leicht zerstört wird. AIV wird auf einer Oberfläche nach Antrocknung innerhalb von vier Stunden zu 90 % inaktiviert (THRAENHART, 2002). In feuchtem Milieu, wie

etwa im Wasser, bleibt es aber relativ lange infektiös (ALEXANDER, 2006; BROWN et al., 2007; SWAYNE und HALVORSON, 2008). AIV kann mit allen viruziden Desinfektionsmitteln abgetötet werden (KALETA und WERNER, 2005; SWAYNE und HALVORSON, 2008). Für die Desinfektion von AIV geeignete und vom DVG-Ausschuss geprüfte und für wirksam befundene chemische Desinfektionsmittel sind in der 6. Desinfektionsmittelliste der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) für den Lebensmittelbereich (DVG, 2006a) und in der 12. Desinfektionsmittelliste für den Bereich Tierhaltung (DVG, 2006b) niedergelegt. HAFEZ et al. (2002) beschrieben die korrekte Durchführung der Desinfektion eines Geflügelstalles und die dabei erforderliche Elimination möglicher belebter Vektoren.

2.2.2 Epidemiologie der Influenza A-Viren

AIV infizieren unter natürlichen Bedingungen nur Vögel (World Organization for Animal Health (OIE⁴), 2005). Mittlerweile wurden aber AIV-Infektionen auch bei verschiedenen Säugetieren und dem Menschen nachgewiesen (KEAWCHAROEN et al., 2004; KUIKEN et al., 2004; DINH et al., 2006; RIMMELZWAAN et al., 2006; SONGSERM et al., 2006; AMONSIN et al., 2007; RÜLKE, 2007; SANDROCK und KELLY, 2007; THIRY et al., 2007; MARSCHALL und HARTMANN, 2008; WHO, 2010). Zahlreiche AIV-Subtypen sind besonders in den Ordnungen Anseriformes, (Gänse- und Entenvögel), Passeriformes (Sperlingsvögel) und Charadriiformes (Wat-, Strand- und Möwenvögel) verbreitet (STALLKNECHT, 1998; KRAUSS et al., 2004; KALETA et al., 2005). Fast alle bekannten 16 HA- und 9 NA-Subtypen wurden aus dem Gastrointestinaltrakt dieser Vögel isoliert, bei denen sie nur selten zu einer Erkrankung führen (HERGARTEN, 1994; FOUCHIER et al., 2005; OLSEN et al., 2006). HPAIV wurden bisher nur sehr selten aus Wildvögeln isoliert. In jedem Fall hatte zuvor in geographischer oder chronologischer Nähe ein Geflügelpestausbuch bei Hausgeflügel stattgefunden. SUAREZ (2000) sieht in dem hochgradig empfänglichen Nutzgeflügel einen Fehlwirt und im Wassergeflügel den natürlichen Wirt und das Virusreservoir des AIV. Das wird deutlich bei nicht abschirmbaren Geflügelhaltungen, die in der Nähe von Vogelzugrouten oder größeren Wasserflächen liegen (ALEXANDER, 2000). Seit 1955 kam es weltweit insgesamt zu 26

⁴ Im Mai 2003 wurde das Internationale Tierseuchenamt (Office International des Epizooties) in die Weltgesundheitsorganisation für Tiergesundheit (World Organisation for Animal Health) umgewandelt, behielt aber sein altes Akronym OIE.

Epidemien. 24 Ausbrüche der Geflügelpest betrafen Nutzgeflügel und nur zwei Wildvogelpopulationen.

2.2.3 Transmission und Infektionswege von Influenza A-Viren beim Vogel

Die Ausscheidung von AIV findet über alle Ex- und Sekrete des Respirations- und Digestionstraktes statt. Den hauptsächlichen Übertragungsweg von AIV stellt die Tröpfcheninfektion durch direkten Kontakt mit infizierten Vögeln dar. Die Virusaufnahme erfolgt aber nicht nur über den oberen Nasen-Rachen-Raum, sondern auch über den Digestionstrakt, die Konjunktiven oder mit kontaminierten Eischalen (LIEBERMANN, 1992; WEBSTER, 1997; SWAYNE und HALVORSON, 2008). Eine aerogene Virusübertragung über weitere Strecken wurde häufig vermutet, konnte jedoch in mehreren Versuchen nicht bestätigt werden (SWAYNE und HALVORSON, 2008). AIV verbreitet sich in der Umwelt durch unbelebte und belebte Vektoren, wie Kotpartikel, Blut beim Schlachten, Kleidung, Arbeitsgeräte und Futter, andere Tiere und den Menschen (HERGARTEN, 1994; WEBSTER, 1997; ALEXANDER, 2006). Bei Wildvögeln erfolgt die AIV-Infektion oft durch kontaminiertes Seewasser oder Trinkwasser (ALEXANDER, 2006; BROWN et al., 2007; SWAYNE und HALVORSON, 2008). Säugetiere wie Katzen, Marder, Großkatzen und Hunde, können sich durch Verzehr von rohem, infiziertem Fleisch mit AIV anstecken und in der Folge schwer erkranken (KEAWCHAROEN et al., 2004; KUIKEN et al., 2004; RIMMELZWAAN et al., 2006; SONGSERM et al., 2006; AMONSIN et al., 2007; RÜLKE, 2007; THIRY et al., 2007; MARSCHALL und HARTMANN, 2008). Experimentell konnten naive Hühner mit AIV per Aerosol, intranasal, intrasinal, intratracheal, oral, konjunktival, kloakal und mittels Injektion intramuskulär, intraperitoneal, Installation in die kaudalen Luftsäcke, intravenös und intrakranial infiziert werden (SWAYNE und HALVORSON, 2008).

2.2.3.1 Hämophage Arthropoden als Vektoren beim Vogel

Blutsaugende Arthropoden können als biologische und mechanische Vektoren Krankheitserreger mit dem Speichel von einem Tier auf das andere übertragen. Als Arboviren (arthropod-borne = „getragen durch Arthropoden“) werden Viren bezeichnet, die durch einen biologischen Vektor übertragen werden. Der Vektor ist in diesem Fall ein echter Wirt und das Virus durchläuft einen Vermehrungszyklus sowohl im Vektor

als auch im Vertebraten (MODROW et al., 2010). Bei Vögeln konnten bisher fünf krankheitsauslösende Arboviren belegt werden: Das Eastern Equine Encephalitis-Virus, das Western Equine Encephalitis-Virus, das Highlands J-Virus, das West Nile-Virus und das Virus der Meningoenzephalitis der Puten (TME). Als Vektor dienen Stechmücken oder im Fall von TME auch zusätzlich Gnizen (OSTLUND und PEARSON, 2008). Die Definitionen der verschiedenen Vektoren, wie z. B. der Begriff „biologischer Vektor“, wurden unter Abschnitt 2.1.6 näher erläutert.

2.2.3.2 Arthropoden als Vektoren von Influenza A-Virus

Es werden immer wieder Untersuchungen durchgeführt, um die Übertragungswege von AIV besser zu verstehen. Da prinzipiell immer die Möglichkeit besteht, dass ein hämophager Arthropode mit dem aufgenommenen Blut auch Virus aufnimmt, wurde dieser mögliche Infektionsweg des AIV schon zu Beginn des letzten Jahrhunderts von mehreren Arbeitsgruppen untersucht. CENTANNI (1902) versuchte als erster AIV durch *Dermanyssus avium (gallinae)* auf Hühner zu übertragen. Er scheiterte aber, da seine Methodik noch ungenügend war. Der Franzose MARCHOUX (1910) wollte die Übertragung von AIV durch Zecken nachweisen, hatte aber ebenfalls keinen Erfolg. Auch HINDLE (1912) konnte die Transmission von AIV durch *Argas persicus* als Vektor nicht belegen. Er konnte aber nachweisen, dass das Virus für neun Tage im Magen-Darm-Trakt der Zecke infektiös blieb. Der Italiener MAZZUOLI (1916) dokumentierte die erfolgreiche Übertragung von AIV auf Hühner durch *Argas persicus*. Er stellte außerdem fest, dass das Virus auch durch eine Kontamination von Haut- und Schleimhautwunden mit infektiösem Kot oder Speichel auf gesunde Hühner übertragen werden konnte. GERLACH (1927) gibt die RVM als einen möglichen Vektor von AIV sowie für die Erreger der Geflügelcholera und der Spirochätose an. Er führt aber weiter aus, dass dies bis dahin nicht bewiesen sei und lediglich der Umstand, dass die Geflügelpest hauptsächlich in der warmen Jahreszeit auftritt, diese Theorie einigermaßen unterstütze (GERLACH, 1927). Desgleichen nahm VAN HEELSBERGEN (1929) an, dass es möglich wäre, dass das AIV durch Hautparasiten übertragen wird, misst aber diesem Weg keine praktische Bedeutung bei. Die Übertragung von AIV durch Stechmücken wurde von NIESCHULZ und BOS (zitiert von GRZIMEK, 1942) untersucht und konnte nicht nachgewiesen werden.

Erst im Zuge des asiatischen H5N1-Seuchenzuges beschäftigten sich wieder Arbeitsgruppen mit diesem möglichen Übertragungsweg: SAWABE et al. (2006) führten eine Studie zur Detektion von H5N1 in Schmeißfliegen durch. Sie entdeckten im Magendarmtrakt von 5 % der getesteten *Calliphora nigribarbis* ein AIV, welches identisch mit demjenigen war, welches zuvor in diesem Stall einen Geflügelpestausbruch verursacht hatte. Schmeißfliegen ernähren sich in erster Linie von Exkrementen und Sekreten anderer Tiere und können so leicht ausgeschiedene Pathogene oral aufnehmen. Die Autoren halten es für möglich, dass die Exkremente der Fliegen oder ihre Regurgitationsprodukte infektiös sein könnten, und sie dadurch als mechanischer Vektor in Frage kommen (SAWABE et al., 2006). Bei einer weiteren Untersuchung konnten sie nachweisen, dass das H5N1 für 24 Stunden nach der Aufnahme durch die Fliegen mit \log_{10} -Titern zwischen 0,5 bis 4,6 KID₅₀/ml⁵ infektiös bleibt (SAWABE et al., 2009). Schmeißfliegen sind bekannt für ihre Rolle als mechanischer Vektor für verschiedene andere Pathogene und können bis zu 3.500 m pro Tag zurücklegen, was zur Streuung von pathogenen Agenzien auf umliegende Farmen führen kann (SAWABE et al., 2006; TSUDA et al., 2009). Ebenso wurde AIV aus Moskitos von einer Geflügelfarm isoliert, wo es zufällig am Tag nach der Probensammlung zu einem H5N1-Ausbruch kam. Aus drei von elf einzeln untersuchten und zwei Pools von je 10 blutgefüllten Stechmücken-Weibchen (*Culex tritaeniorhynchus* Giles) konnte dieses AIV mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Außerdem konnte die RNA des H5N1 24 Stunden p.i. aus in einer mit dem Virus infizierten Moskitozelllinie C6/36 reisoliert werden (BARBAZAN et al., 2008). Sollte tatsächlich eine Replikation stattgefunden haben, könnte dies bedeuten, dass Moskitos als biologischer Vektor von AIV fungieren. In der aktuellen Literatur konnten keine weiteren Nachweise zur Übertragung von AIV durch andere Arthropoden oder Invertebraten gefunden werden.

2.2.4 Erkrankungen beim Vogel nach Infektion mit aviärem Influenza A-Virus

Die klinische Symptomatik und die pathologischen Veränderungen nach einer Infektion mit AIV sind äußerst variabel. Beide sind in allererster Linie vom Grad der Pathogenität des jeweiligen Subtyps abhängig. Zusätzlich wirken sich die Spezies der infizierten

⁵ Kulturinfektiöse Dosis 50 % = Virusdosis, bei der die Hälfte der mit der höchsten Virusverdünnung inokulierten Zellkulturen einen ZPE zeigt

Vögel, ihr Alter und ihr Geschlecht auf Verlauf, Dauer und Ausgang aus. Wichtig sind außerdem ihr aktueller Infektions- und Immunstatus und diverse Umweltfaktoren (NARAYAN et al., 1969a; ALEXANDER et al., 1986; SWAYNE und HALVORSON, 2008). Eine Infektion mit einem AIV führt bei den meisten Vögeln nicht zu klinischen Symptomen. Beim Hausgeflügel können NPAIV die Geflügelinfluenza, eine mild verlaufende Erkrankung der Organe des Respirationstrakts, auslösen. Eine Infektion mit HPAIV bewirkt beim Geflügel dagegen einen Ausbruch der Geflügelpest (WERNER und KALETA, 2005; ALEXANDER, 2006). Dieser Teil der Literaturübersicht beschränkt sich auf die Symptomatik sowie die pathologisch-anatomischen und histologischen Befunde, die durch das in dieser Arbeit verwendete Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9) hervorgerufen werden.

2.2.4.1 *Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9)*

Für die eigenen Experimente wurde das Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9) verwendet. Dieser Subtyp verursachte 1966 in Ontario, Kanada, einen vergleichsweise geringfügigen Ausbruch von HPAI bei Puten, bei dem etwa 10 % eines Bestandes mit 8.100 Truthühnern starben. Dieses AIV war bis 2004 das einzige HPAIV, welches in Kanada isoliert wurde (PASICK et al., 2009). Da es zuvor im Dezember 1965 zu einer Infektion von Zuchtputen mit einem NPAIV mit dem Hämagglutininsubtyp H5 in Kanada gekommen war, wird angenommen, dass das HPAIV aus diesem NPAIV entstanden ist (LANG et al., 1968a, 1968b; NARAYAN et al., 1969a; RÜLKE, 2007). Die Infektion mit diesem NPAIV 6213 führte nur bei Putenküken zu einer Erkrankung. LANG et al. (1968b) wiesen nach, dass beide Isolate eng verwandt sind.

2.2.4.1.1 *Klinische Befunde nach der Infektion mit Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9)*

Die klinischen Befunde während des Ausbruchs von Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9) in Ontario stellten sich folgendermaßen dar: Die Puten wirkten teilnahmslos, und es wurden bei allen Tieren Zyanosen der Kopfanhänge beobachtet. Während Futteraufnahme und Legeleistung stufenweise abfielen, stieg die tägliche Mortalität mit jedem Tag an. Am Ende der 2. Woche setzte die hohe Mortalität genauso abrupt aus wie sie zuvor begonnen hatte. Beide Geschlechter waren

gleichermaßen betroffen. Die Eiproduktion fiel während der Erkrankung auf 10 % ab und stieg während der Rekonvaleszenz nur noch auf 30 % an. Auf diesem Level blieb die Legeleistung konstant für den Rest der Legeperiode (LANG et al., 1968b).

Bei experimentell mit Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9) infizierten Hühnern konnten NARAYAN et al. (1969a) 48 Stunden p.i. eine Virämie feststellen. Die Hühner wirkten matt, plusterten sich auf und stellten die Futteraufnahme ein. Es trat eine blässliche Verfärbung ihrer Kämme auf, die insgesamt blass und schlaff erschienen und zyanotische Spitzen entwickelten. Schwellungen im Kopfbereich fielen ebenfalls auf. Die Hühner starben zwischen dem 4. und 5. Tag p.i. (NARAYAN et al., 1969a). Für gleichfalls infizierte Enten, Gänse und Tauben erwies sich dieses Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9) als apathogen (NARAYAN et al., 1969a). SLEMONS und EASTERDAY bestätigten dies bei Infektionsversuchen mit Puten, Enten, Wachteln, Fasanen und Tauben. Während die Puten schwer erkrankten und starben, entwickelten nur wenige Wachteln und Tauben Krankheitserscheinungen. Fasane, Tauben und Enten zeigten keinerlei Symptomatik und wiesen nur eine sehr begrenzte Serokonversion auf (SLEMONS und EASTERDAY, 1972). ALEXANDER et al. (1986) infizierten ebenfalls Enten, Wachteln, Hühner und Puten mit Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9). Weder bei den Enten noch bei den Wachteln konnte eine klinische Symptomatik festgestellt werden. Sie wiesen nach, dass dieses Virus für Hühner weniger virulent als für Puten ist. Weiterhin zeigten sie, dass die Route der Virusapplikation einen hohen Einfluss auf den Infektionserfolg und die Ausprägung der klinischen Symptomatik hat. Nach intramuskulärer Injektion des Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9) starben 9 von 10 Hühnern und nach intranasaler Applikation starben nur 2 von 10. Außerdem belegten ALEXANDER et al. (1986) die geringere Transmissibilität des Virus für Hühner: Durch engen Kontakt mit infizierten Hühnern infizierten sich 3 von 10 Hühnern, von denen wiederum zwei starben. Im Gegensatz dazu überlebte keine Pute dieses Experiment (ALEXANDER et al., 1986). In den zuvor erwähnten Quellen wurden weder der Beginn und die Dauer der Virämie noch der Virusgehalt im Blut festgestellt.

2.2.4.1.2 Pathologische Befunde nach der Infektion mit Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/ 1966 (H5N9)

Bei der pathologischen Untersuchung der Puten nach dem Ausbruch 1966 zeigte sich eine schwere serofibrinöse Entzündung der thorakalen und abdominalen Luftsäcke und des Peritoneums mit merklicher Stauung der Blutgefäße in den Ovarien und des Ovidukts. Freier Dotterinhalt aus durch die Entzündung brüchigen, rupturierten Dotterkugeln vermischt mit entzündlichen Exsudaten wurde in der Leibeshöhle festgestellt. Die Lebern wiesen bei einigen Tieren eine schwere Kongestion und vereinzelt eine gelbliche Diskoloration auf. Einige Milzen besaßen stecknadelkopfgroße, weiße Flecken auf der Oberfläche. Die Nieren erschienen geschwollen und gefleckt, die Ureter gestaut. Lungen, Haut und Muskulatur waren hyperämisch. Hämorrhagien wurden kaum beobachtet. Bei männlichen Puten war die Ausprägung der Peritonitis weniger prominent als bei weiblichen (LANG et al., 1968b).

Zur genaueren Untersuchung der pathologischen Veränderungen durch das Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9) infizierten NARAYAN et al. (1969b) 90 Puten und 75 Hühner mit diesem Virus. Es zeigte sich, dass die experimentelle Infektion eine perakute und eine akute Verlaufsform verursachte. Bei der perakuten Form traten bei gestorbenen Puten und Hühnern außer einer massiven Stauungshyperämie keine weiteren Läsionen auf. Die akute Form führte dagegen eine große Anzahl pathologischer Veränderungen herbei: Haut und Muskulatur waren bei allen Tieren dehydriert, gerötet und teilweise zyanotisch. Bei Hühnern traten zusätzlich eine Zyanose des Kammes auf, teilweise mit gangränösen Veränderungen der Spitzen, und Ödeme des gesamten Kopfes. Die Entstehung eines Hydroperikards und von Petechien wurde bei beiden Spezies häufig beobachtet. Der Magen-Darm-Trakt war zum größten Teil leer und unauffällig. Nur im Kolon fanden sich Anzeichen einer milden katarrhalischen Entzündung und zahlreiche Petechien. Leber und Pankreas waren oft hochgradig gestaut und das Pankreas wies stecknadelkopfgroße, rote Veränderungen auf. Die Milz erschien hochgradig gestaut, geschwollen und zeigte im Anschnitt miliare, diffus verteilte weiße Herde. Die Nieren waren ebenfalls hochgradig gestaut, geschwollen und die Ureteren gestaut. Die Ovarien der Hühner waren hochgradig hyperämisch, wiesen zahlreiche Petechien auf, und in fast allen Fällen

wurde eine Eiperitonitis beobachtet. Es kam bei beiden Spezies nur selten zu Veränderungen des respiratorischen Systems. Als einzig wiederkehrende Veränderung bei den Puten wurde eine wolkige Trübung der Luftsackwände festgestellt. Bei den infizierten Hühnern traten zusätzlich Veränderungen der Nasenmuscheln auf, die mittelgradig mit klarem Schleim bedeckt waren und eine hochgradige Rötung aufwiesen (NARAYAN et al., 1969b). MO et al. (1997) konnten bei Infektionsversuchen mit mehreren AIV ähnliche pathologische Veränderungen durch das Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9) bei Hühnern feststellen.

2.2.4.1.3 Histologische Befunde nach der Infektion mit Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9)

Histologisch konnten im Gehirn von Hühnern und Puten bei der akuten Verlaufsform disseminierte fokale Nekrosen und eine Enzephalitis nachgewiesen werden (NARAYAN et al., 1969b; MO et al., 1997). Die Milzen wiesen häufig eine Lymphozytendepletion und einzelne Nekrosen auf. Die Lebern zeigten durchweg eine massive Stauung und disseminiert kleine Koagulationsnekrosen (NARAYAN et al., 1969b). Im Pankreas konnten multiple Nekroseherde festgestellt werden (NARAYAN et al., 1969b; MO et al., 1997). Läsionen der Nieren wurden dominiert von einer akuten Stauung, einer Proliferation der Retikuloendothelzellen und von Koagulationsnekrosen der Tubuli. Mehr als 50 % der Tiere wiesen Myokardschäden auf. NARAYAN et al. (1969b) stellten keinerlei histopathologische Veränderungen in den Lungen und im Magendarmtrakt fest. MO et al. (1997) konnten jedoch ausnahmslos in jedem Organsystem Nekrosen und Entzündungsanzeichen belegen. MO et al. (1997) führten zusätzlich immunhistochemische Untersuchungen durch und konnten Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9) in allen parenchymatösen Organen nachweisen.

2.2.4.2 Diagnose einer Infektion mit AIV

In Deutschland obliegt die Stellung der Erstdiagnose den jeweiligen Landeslaboratorien. Die endgültige Diagnose ist dem Nationalen Referenzlabor im Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) vorbehalten. Den diagnostischen Leitfaden bildet das Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees) der OIE (OIE, 2004).

Die Diagnose AIV kann nicht von der klinischen Symptomatik oder dem pathologischen Bild abgeleitet werden. Zur eindeutigen Diagnose muss immer die Virusisolierung und -identifikation, gegebenenfalls der serologische Nachweis, der Nachweis des viralen Antigens oder viraler Nukleinsäuren und zusätzlich unbedingt ein Pathogenitätstest erfolgen (SWAYNE und SUAREZ, 2000; SWAYNE und HALVORSON, 2008). Die Virusisolierung in ovo stellt den „Goldstandard“ dar, ist aber sehr zeitaufwändig und kostenintensiv (LU, 2006). Der Nachweis von hämagglutinierendem Virus in der Amnioallantoisflüssigkeit (AAF) wird mittels eines Hämagglutinationstests erbracht (OIE, 2004; SWAYNE und HALVORSON, 2008; SWAYNE et al., 2008). Alternativ zur Anzucht im embryonierten Hühnerei kann AIV in Zellkulturen angezüchtet werden. Dies ist möglich in primären Zellkulturen wie Hühnerembryofibroblasten (HEF) oder in verschiedenen Zelllinien (OIE, 2004; SWAYNE und HALVORSON, 2008). Zur Bestätigung, dass es sich bei dem hämagglutinierenden Isolat um AIV handelt, werden verschiedene Methoden eingesetzt: Standardmäßig werden Hämagglutinationshemmungsteste (HAH) zum Ausschluss von Paramyxoviren und zur Identifikation des HA-Subtyps eingesetzt (SWAYNE et al., 2008). Alternativ wird die RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion) verwendet. Sie besitzt eine vergleichbare Sensitivität und Spezifität wie die Virusisolierung mit nachfolgendem HAH-Test, ist aber schneller und preisgünstiger. Außerdem ist diese Methode nicht auf den Erhalt der Vermehrungsfähigkeit und die Anpassung des Virus an künstliche Kulturbedingungen angewiesen (SPACKMAN et al., 2002; FOUCHIER et al., 2005; LU, 2006; XIE et al., 2006).

2.2.5 Bekämpfung der Geflügelpest

Die Bekämpfung der Geflügelpest steht auf fünf verschiedenen Säulen: Aufklärung, Biosicherheit, fortlaufende epidemiologische Überwachungsprogramme, Eradikation von infiziertem Geflügel und die Reduktion der Empfänglichkeit für AIV-Infektionen. Ziel ist es, auf lange Sicht eine Eradikation zu erreichen (SWAYNE und HALVORSON, 2008; MILES et al., 2009; WHO, 2010). Auch die Ausmerzung von NPAIV der Subtypen H5 und H7 besitzt eine Bedeutung, da diese in der Vergangenheit mehrfach zu HPAIV mutierten (SWAYNE und HALVORSON, 2008).

In Deutschland erfolgt die Bekämpfung der Geflügelpest auf der Grundlage des Tierseuchengesetzes, der Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen und der Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpest (TierSG, 2007; TierSeuchAnzV, 2009; GeflPestSchV, 2009). Die Geflügelpest ist in Deutschland anzeigepflichtig. Die Geflügelpest-Verordnung setzt die Richtlinie 2005/94/EG in deutsches Recht um. Sie regelt die Maßnahmen bei Verdacht und Auftreten eines HPAI-Ausbruchs, allgemeine Verhaltensweisen und Schutzmaßnahmen für Geflügelhalter, besondere Schutzmaßnahmen vor und nach amtlicher Feststellung der Geflügelpest sowie die Desinfektion und die Aufhebung der Schutzmaßnahmen. International ist die Geflügelpest eine von der OIE gelistete Seuche. Ihr Auftreten und ihre Tilgung müssen daher auch der OIE mitgeteilt werden (OIE, 2009).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Aviäres Influenza A-Virus

Unter der großen Zahl grundsätzlich verfügbarer aviärer Influenza A-Virus-(AIV)-Isolate musste eine Auswahl getroffen werden. Zu den angestrebten in vivo-Eigenschaften des auszuwählenden AIV-Isolats zählten:

- a. Das zu verwendende AIV-Isolat sollte eine möglichst frühzeitig post infectionem (p.i.) beginnende und möglichst lang anhaltende Virämie im infizierten Huhn verursachen, um den RVM einen hinreichend langen Zeitraum zum Blutsaugen zu bieten,
- b. das AIV-Isolat sollte deutlich erkennbare klinische Symptome nach experimentellen Infektionen verursachen, um das Haften der Infektion bei der Haltung der Hühner in Isolatoren zweifelsfrei zu erkennen und
- c. es sollte sich um ein AIV-Isolat handeln, welches bekannt ist für eine geringe Übertragungsrate durch Kontaktinfektion.

Zu den erwünschten in vitro-Eigenschaften des auszuwählenden AIV zählten:

- i. Vermehrung des AIV im embryonierten Hühnerei zu hohen EID₅₀-Titern und hohen Hämagglutinationstitern,
- ii. Eignung des AIV für die Durchführung von Hämagglutinationshemmungstests zur Antikörperbestimmung im Serum infizierter Hühner und
- iii. deutlich erkennbarer zytopathischer Effekt in inokulierten Hühnerembryo-fibroblasten-(HEF)-Kulturen, um das AIV leicht nachzuweisen und zuverlässig zu titrieren.

Das schließlich verwendete und der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische (KVRAF) überlassene AIV gehörte ursprünglich zur Stammsammlung von Prof. Dr. C. Scholtissek, ehemals im Institut für Virologie (JLU, Gießen). Da nähere Angaben zur Vorgeschichte und zur Feintypisierung dieses Isolats noch fehlten, wurde es im Institut für Virusdiagnostik des Friedrich-Loeffler-Instituts (Insel Riems, Greifswald) von Prof. Dr. T. Harder subtypisiert. Das an das Friedrich-Loeffler-Institut gesendete AIV-Isolat wurde als ein Passagederivat des Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9)

identifiziert. Die endoproteolytische Spaltstelle des HA-Glykoproteins wurde als typisch für ein HPAIV festgestellt, da die Aminosäuren PQRK*GLF⁶ nachgewiesen wurden. Dieses AIV wurde für alle Infektionsversuche mit Hühnern und Vogelmilben verwendet, weil es die genannten und selbst noch zu bestimmende Kriterien erfüllte. Aufgrund bereits publizierter Daten (NARAYAN et al., 1969a; ALEXANDER et al., 1986) und der eigenen Ergebnisse des Vorversuchs wurde es als geeignet für die nachfolgenden Experimente eingestuft.

Für die Durchführung des Vorversuchs und der nachfolgenden Experimente wurde eine Stammvirussuspension hergestellt. Die hierfür angewendete Methodik ist unter Abschnitt 3.2.2.5 beschrieben. Die Stammsuspension wies einen Hämagglutinationstiter von 2⁶ auf. Sie wurde portioniert und über den gesamten Versuchszeitraum bei -80 °C aufbewahrt.

3.1.2 Bruteier

Spezifiziert-pathogen-freie-(SPF)-Eier (VALO, Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven) wurden nach 9-11-tägiger Bebrütung zur Anzucht und Vermehrung des AIV sowie für die Herstellung von primären HEF-Kulturen verwendet. Sie wurden bis zum Versuchsbeginn in einem Brutschrank mit eingebauter Wendung (Schumacher, Grünberg) bei 37,5-38,0 °C und 50-60 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert.

3.1.3 SPF-Hühner

Für die Durchführung der Experimente wurden SPF-Hühner in mehrfacher Hinsicht benötigt: (i) für die Induktion einer Virämie mit AIV; (ii) für den Nachweis von Beginn und Grad, d. h. Virusgehalt je ml Blut, einer Virämie; (iii) als Wirtstier für die Aufnahme von virushaltigem Blut durch die RVM; (iv) für den Nachweis einer Virusübertragung durch den Biss von virushaltigen RVM; (v) für die Reproduktion des klinischen Bildes und der pathologisch-anatomischen Veränderungen wie sie für die Klassische Geflügelpest typisch sind.

⁶ Entschlüsselung des Einbuchstabencodes für Aminosäuren: Prolin-Glutamin-Arginin-Arginin-Lysin-Lysin-Arginin-Spaltstelle-Glycin-Leucin-Phenylalanin

Unter epidemiologischen Gesichtspunkten ist die Dauer einer Virämie bedeutsam, da lange Virämiephasen die Wahrscheinlichkeit einer Virusaufnahme beim Blutsaugen durch die RVM erhöhen und dadurch auch die Chance einer Virusübertragung vom Huhn zur RVM zu einem zweiten AIV-naiven Huhn vergrößert wird.

Es wurden weißfiedrige spezifiziert-pathogen-freie-(SPF)-Hühner (VALO, Lohmann-Tierzucht GmbH, Cuxhaven) verwendet, die zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns definitionsgemäß sowohl frei von nachweisbarem AIV als auch frei von Antikörpern gegen AIV waren. Die Hühner hatten bei der Einnistung ein Alter von 6 bis 8 Wochen. Im Verlauf der Untersuchungen nahm ihr Alter zu, was jedoch für die Experimente ohne Bedeutung ist, da Hühner jeglichen Alters gleichermaßen empfänglich für Infektionen mit AIV sind. Bis zum jeweiligen Versuchsbeginn wurden die Hühner in isolierter Bodenhaltung gehalten. Für die Dauer der Infektionsversuche wurden sie in Isolatoren verbracht (Abbildung 2). Futter und Leitungswasser wurde ihnen stets ad libitum gereicht. Alle Futtermittel wurden vom Raiffeisen Waren-Zentrum Rhein-Main eG bezogen.

Nach § 8 (1) des Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 18. Mai 2006 (BGBl I, S. 1207) ist die Durchführung dieser Versuche mit Hühnern genehmigungspflichtig. Die Genehmigung wurde vom Regierungspräsidium Gießen unter dem Geschäftszeichen V 54 – 19 c 20 -15 (1) GI 18/9 Nr. 2/2008 erteilt.



Abbildung 2: Hühnerhaltung in Gruppen in Bodenhaltung auf Tiefstreu aus Kurzstroh mit Hobespänen (links) und während der Experimente im Infektionsstall in Isolatoren (rechts) der KVRAF

3.1.4 Rote Vogelmilben

Die verwendeten RVM wurden in dem Betrieb L. Klingelhöfer in Großseelheim (Legehennen in Bodenhaltung) gesammelt und in einem Plastikgefäß in die KVRAF transportiert. Dort angekommen wurden die Milben in die zwei Versuchsboxen eingesetzt (Abbildung 5 und 6). Die Speziesdiagnose der RVM erfolgte nach den im Literaturteil (2.1.1) beschriebenen morphologischen Merkmalen. Es konnte eine in sich homogene Milbenpopulation vorgefunden werden, die ausschließlich aus RVM bestand.

3.1.5 Haltung und Vermehrung der Roten Vogelmilben in Behältnissen

Zur Haltung und Vermehrung der RVM und für die Experimente wurden zwei Milbenboxen aus 1 cm starken MDF-Platten⁷ gebaut. Als Vorbild diente eine Fotografie der Milbenzuchtkästen aus dem Institut für Parasitologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover (BÜCHER, 1998). Die selbst neu gefertigten Boxen besaßen größere Dimensionen als das Vorbild, um den eingesetzten Hühnern mehr Bewegungsfreiheit und mehr Luftzufuhr zu bieten. Die Boxen wurden nach ihrer Fertigstellung mit ca. 1000 vitalen RVM je Box besiedelt. Die Milben vermehrten sich deutlich nach jeder Blutmahlzeit. Jeden Tag wurden einige RVM entnommen und unter einem umgekehrten Mikroskop (Leitz, Wetzlar) betrachtet. Dabei wurden alle Entwicklungsstadien (Eier, Larven, Protonymphen, Tritonymphen und adulte Milben) und abgestoßene Exuvien nachgewiesen. Die Vermehrungsrate der RVM wurde aufgrund ihrer Größe und Beweglichkeit nicht erfasst.

Maße der Milbenboxen:	Höhe:	40 cm
	Länge:	außen 50 cm, innen 48 cm
	Tiefe:	außen 32 cm, innen 30 cm

Der Deckel der Box besitzt eine mit Kaninchendraht verschlossene Luft- und Lichtöffnung von 18 x 30 cm. Die Seitenwände der Box sind doppelwandig konstruiert, zwischen ihnen blieb ein Spalt von ca. 1 mm frei. Die inneren Seitenplatten besitzen zwölf Bohrungen mit einem Durchmesser von 3 cm, um den RVM den Rückzug

⁷ Bei der mitteldichten Holzfaserverplatte oder auch MDF-Platte (*medium density fiberboard*) handelt es sich um einen gebräuchlichen Holzfaserverwerkstoff. Weitere Erläuterungen unter <http://www.sign-lang.uni-hamburg.de/Tlex/Lemmata/L4/L426.htm>

zwischen die doppelten Seitenwände zu ermöglichen. Da die äußeren Seitenplatten nur mit zwei Flügelschrauben gehalten werden und sich mittels eines Griffs abheben lassen, können diese Verstecke von außen geöffnet werden (Abbildung 3 und Abbildung 4).

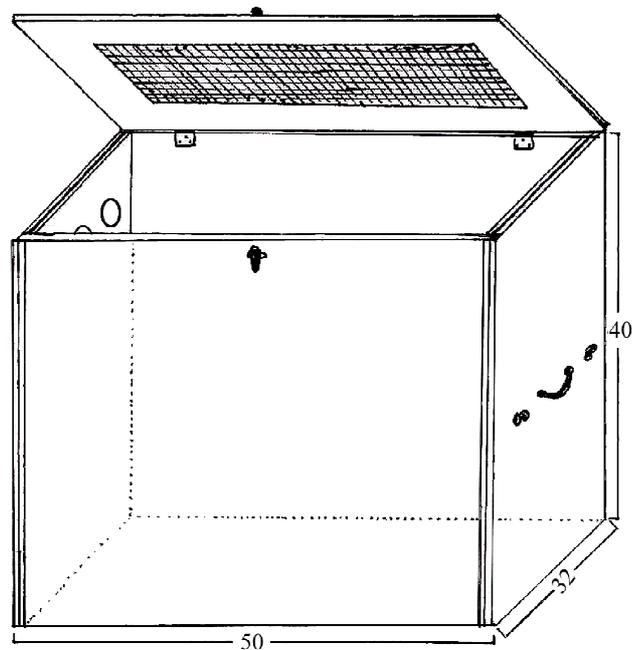


Abbildung 3: Konstruktionszeichnung der Milbenboxen

Ansicht einer Milbenbox von vorne, mit geöffnetem Deckel (Maßangaben in cm)

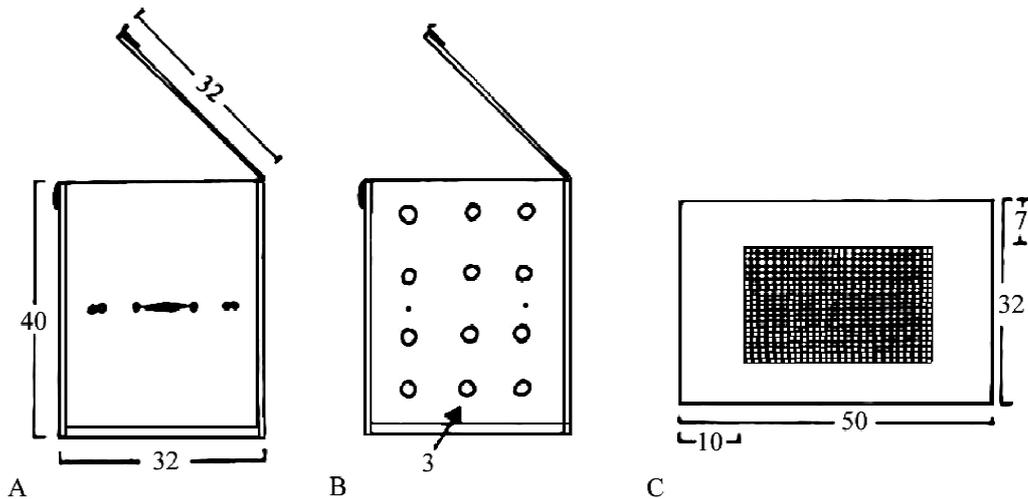


Abbildung 4: Konstruktionszeichnung der Seitenteile und des Deckels

- A: Ansicht des äußeren Seitenteils mit Flügelschrauben und Griff
- B: Ansicht des inneren Seitenteils mit 12 Bohrungen
- C: Ansicht des Deckels von oben mit einer Licht- bzw. Luftöffnung, die mit Kaninchendraht verschlossen ist (Maßangaben in cm)

In die Milbenbox wurde eine grüne Kunststoffmatte eingelegt, durch die der Kot der Hühner getreten werden konnte und die den Milben als zusätzliches Versteck diente (Abbildung 5). Das Trinkwassergefäß, das dem Huhn in der Box zur Verfügung stand, war aus Keramik gefertigt und hatte einen Durchmesser von 8 cm. Es wurde in einer Ecke der Box positioniert, damit das eingesetzte Huhn es nicht umwerfen konnte.

Die Milbenbox stand zum Schutz vor Feuchtigkeit in einem weißen Stapelkasten (Enders, Reiskirchen) mit den Innenmaßen 60 x 40 x 12 cm und den Außenmaßen 66 x 45 x 13 cm. Der Stapelkasten befand sich in einem nach oben offenem Isolator aus Plexiglas (Abbildung 6). Dieser war ca. 5 cm hoch mit Wasser gefüllt, dem herkömmliches Spülmittel zur Beseitigung der Oberflächenspannung zugesetzt war, um ein Entweichen der Vogelmilben zu verhindern. Der Isolator hatte die Innenmaße 118 x 58 x 58 cm und die Außenmaße 120 x 60 x 60 cm. Im Laufe der Versuche konnte festgestellt werden, dass die als Versteckmöglichkeit gedachten doppelten Wände von den RVM kaum genutzt wurden. Vielmehr saßen die Milben auf den Maschen der Lichtöffnung.

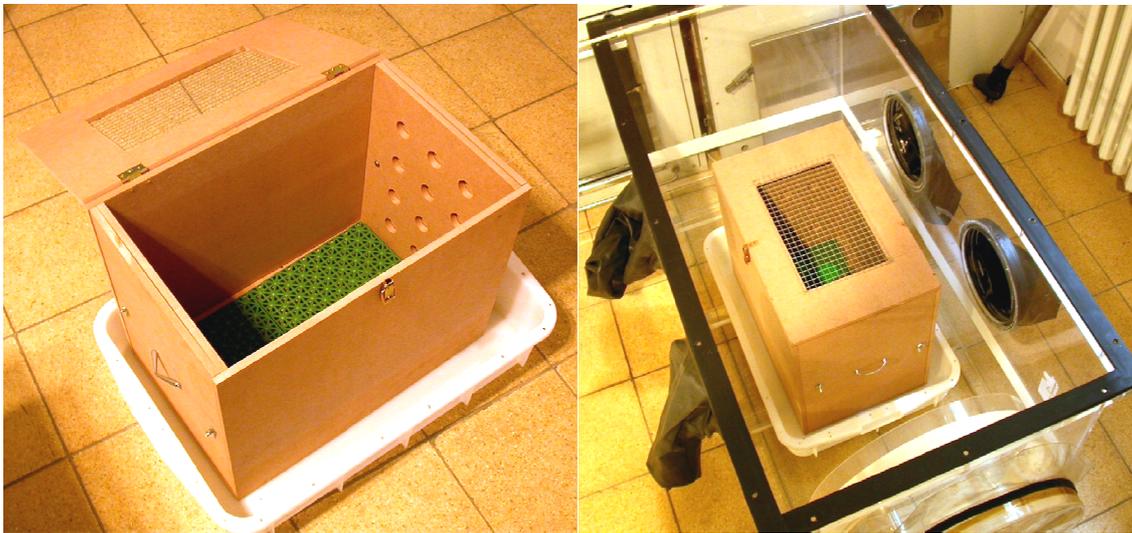


Abbildung 5: Milbenbox im Stapelkasten (links). Milbenbox mit Stapelkasten im Isolator (rechts).

3.1.6 Zellkulturmedien, Reagenzien und Geräte

Die verwendeten Zellkulturmedien, Reagenzien und weiteren Geräte sind mit ihren jeweiligen Bezugsquellen im Anhang I aufgelistet.

3.2 Methoden

3.2.1 Ablauf der durchgeführten Versuche

3.2.1.1 Vorversuch - Induktion einer Virämie und Reproduktion der Klassischen Geflügelpest durch Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9)

Ziel dieses Vorversuches ist es eine Virämie mit AIV zu induzieren, um eine Virusaufnahme durch die RVM zu ermöglichen. Wichtige Faktoren für das Gelingen der Aufnahme von virämischen Blut durch die RVM sind Kenntnisse über den Beginn und Grad einer Virämie im Huhn, also den Virusgehalt je ml Blut, und über die Entwicklung der klinischen Symptomatik und der pathologisch-anatomischen Veränderungen nach Infektion mit diesem AIV für die Beurteilung der erfolgreichen Infektion bei der Haltung der Hühner in Isolatoren. Die Dauer einer Virämie und der Virusgehalt sind bedeutsam, da lange Virämiephasen die Wahrscheinlichkeit einer Virusaufnahme beim Blutsaugen durch die RVM erhöhen. Außerdem wird dadurch die Chance einer Virusübertragung vom Huhn zur RVM und zu einem zweiten AIV-naiven Huhn vergrößert. Zur Reisolierung des AIV aus den RVM und den Hühnern werden folgende Eigenschaften des AIV ermittelt: Bestimmung der EID₅₀, der Hämagglutinationstiter und der Antikörperentwicklung im Serum infizierter Hühner mittels Hämagglutinations-Hemmungstests. Die Ausbildung eines zytopathischen Effektes in inokulierten HEF-Kulturen dient zur Reisolierung und zur Titration des AIV.

3.2.1.1.1 Isolierung und Reisolierung des Influenza A-Virus

Zum Nachweis einer Virämie im experimentell infizierten Huhn und zum Nachweis des AIV in den RVM wurden primäre Zellkulturen (HEF) und 9-11 Tage bebrütete embryonierte Hühnereier verwendet. Zur quantitativen Erfassung der Virusgehalte wurden die kulturinfektiöse Dosis (KID)₅₀/ml in HEF-Kulturen bzw. die embryo-infektiöse (EID₅₀/ml) Dosis und die embryoletale Dosis (ELD)₅₀/ml errechnet.

Außerdem wurden die jeweiligen HA-Titer in \log_2 des AIV in den Amnioallantoisflüssigkeiten (AAF) aus inokulierten Hühnereiern bestimmt (OIE, 2004).

3.2.1.1.2 Charakterisierung der Virulenz des AIV in vivo

Zur Feststellung einer geeigneten Virusdosis zur Erzeugung einer Virämie für die nachfolgenden Infektionsversuche erfolgte eine Charakterisierung des AIV in vivo. Zum einen sollte sich durch die Injektion des AIV eine ausreichend starke Virämie im infizierten Huhn entwickeln, um später den RVM die Aufnahme von virämischen Blut zu ermöglichen. Zum anderen musste der Verlauf der Virämie in den infizierten Hühnern untersucht werden, um abschätzen zu können, welcher Zeitpunkt am günstigsten ist, um die RVM zu den infizierten Hühnern zu setzen. Die minimale bzw. die letale Infektionsdosis wurden bestimmt, um festzustellen, welchen Virushalt eine bestimmte Anzahl AIV-haltige RVM haben müssen, um bei einem AIV-naiven Huhn eine Infektion bzw. eine fatale Infektion mit AIV auszulösen. Außerdem wurde so die erfolgte Infektion mit AIV verifiziert.

Zur Induktion der Virämie wurden jeweils fünf SPF-Hühner mit dem Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9) in neun verschiedenen Verdünnungsstufen (10^{-1} - 10^{-9}) der Stammvirussuspension intravenös zur Bestimmung des intravenösen Pathogenitätsindex (IVPI) infiziert (OIE, 2004). Die Stammvirussuspension wurde mit PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) verdünnt und davon 0,5 ml je Huhn intravenös injiziert. Die Hühner wurden täglich über einen Zeitraum von vierzehn Tagen klinisch beobachtet und beprobt. Die Probenentnahmen und die durchgeführten Untersuchungen sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Charakterisierung des AIV in vivo. Probenentnahmen und -untersuchungen

in vivo = Tag 1-14 p.i.

Huhn (n = 5)	Proben	Einzel- proben	Indikator- system	Indikator	Ziel
in vivo			Huhn	Klinische Symptomatik	Bestimmung des IVPI
	Blut	Erythrozyten	Brutei	HA-Titer	Virämienachweis, Titerbestimmung
			Titration HEF	ZPE / Titer	Virämienachweis, Titerbestimmung
			HEF	ZPE	Virämienachweis
		Leukozyten	HEF	ZPE	Virämienachweis
		Plasma	HEF	ZPE	Virämienachweis
	Sammelkot		HEF	ZPE	Virusausscheidung
	Rachentupfer		HEF	ZPE	Virusausscheidung
	Kloakentupfer		HEF	ZPE	Virusausscheidung
	post mortem	Huhn	Organe	HEF	ZPE
Brutei				HA-Titer	Virus-Reisolierung, Virustiter
BU				Bakterien- kolonien	Ausschluss von Begleitkeimen

3.2.1.2 Experiment I - Nachweis der AIV-Aufnahme durch die Roten Vogelmilben

Zum Nachweis der Aufnahme von AIV durch die RVM wurden sieben mit Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9) infizierte Hühner zu ca. 1000 RVM in eine Milbenbox (A und B) gesetzt, um den Milben die Aufnahme von virushaltigem Blut zu ermöglichen. Das Experiment I gliedert sich in vier Versuche auf (I/1-4), die nacheinander durchgeführt wurden. Der Versuchsablauf ist in Tabelle 6 dargestellt. In Experiment I/1 wurde nur ein Huhn eingesetzt (Box A), während in den Experimenten I/2-4 je zwei Hühner (Box A, B) eingesetzt wurden.

Die virämischen Hühner wurden aufgrund der Ergebnisse aus dem Vorversuch am ersten Tag p.i. zu den Vogelmilben gesetzt. Nach Einsetzen von je einem mit AIV infiziertem Huhn (Virusdosis $10^{6,7}/0,1$ ml) am ersten Tag p.i. in zwei Boxen (A und B) mit RVM bzw. einem Huhn in die Box A bei Experiment I/1, hatten die Milben 24 Stunden lang die Gelegenheit zum Blutsaugen. Anschließend wurden die Milben aus dem Gefieder entfernt und die Hühner zurück in die Isolatoren gebracht, wo sie bis zum Versuchsende wie im Vorversuch beobachtet und untersucht wurden. Von den eingesetzten RVM wurden nun täglich ca. 50 Stück genommen, um aufgenommenes Virus mittels Inokulation in Bruteiern und HEF-Kulturen nachweisen zu können. Die Milbenboxen wurden im Anschluss an jeden Versuch bei 65 °C für zwei Stunden autoklaviert und gesäubert.

Zur Überwachung des Infektionsverlaufs bei den Hühnern wurden ebenfalls täglich Proben (heparinisiertes Blut, Rachen- und Kloakentupfer, Kot) genommen. Wie im Vorversuch wurden gestorbene und nach Ablauf des Versuchs getötete Hühner seziiert und Organe steril entnommen, um die Infektion mit AIV zu verifizieren. Bakterielle Begleitinfektionen wurden mittels einer bakteriologischen Untersuchung von Organabstrichen ausgeschlossen. Es wurden von jedem Huhn Abstriche von Herz, Leber, Milz und Niere und zusätzlich Abstriche von Organen mit makroskopisch erkennbaren pathologischen Veränderungen untersucht. Von allen makroskopisch veränderten Hühnerorganen wurden zusätzlich histologische Schnitte und immunhistochemische Färbungen angefertigt, um die pathologischen Veränderungen beurteilen zu können und um für die immunhistochemischen Färbungen der RVM Positivkontrollen zur Beurteilung der Färbungen zu erhalten.

Tabelle 6: Experiment I - Nachweis der AIV-Aufnahme durch Rote Vogelmilben. Probenentnahmen und -untersuchungen

¹ heparinisieretes Vollblut, Rachen- und Kloakentupfer, frischer Kot

² Es wurden jeweils 50 RVM zur weiteren Untersuchung entnommen

Tag	Maßnahmen	
	SPF-Hühner (n = 2)	Rote Vogelmilben
0	Probenentnahme ¹ Infektion mit AIV	Nullproben ²
1	Probenentnahme ¹ Einsetzen in Milbenbox A, B	Blutsaugen der Milben an mit AIV infizierten Hühnern
2	Probenentnahme ¹ Behandlung gegen Milben Zurücksetzen in Isolator	Milbenentnahme ²
3-13	Probenentnahme ¹	Milbenentnahme ²
14	Probenentnahme ¹ Diagnostische Tötung Sektion Organentnahme	Milbenentnahme ²

3.2.1.3 Experiment II - Bestimmung der Übertragung von AIV durch Rote Vogelmilben auf Hühner

Experiment II gliedert sich ebenfalls in vier Versuche auf, die nacheinander durchgeführt wurden. Der Versuchsablauf ist detailliert in Tabelle 7 dargestellt und wurde dreimal wiederholt.

Zur Bestimmung der Übertragbarkeit von AIV durch die RVM auf AIV-naive Hühner wurden in Experiment II acht Hühner mit AIV infiziert, in Kontakt mit RVM gebracht und nach 24 Stunden wieder entfernt. Drei Tage nach dem Blutsaugen der RVM wurde in Box A und B je ein AIV-naives Huhn hinzugesetzt. Dies wurde dreimal wiederholt. Somit kamen in den Experimenten II/1-4 insgesamt acht i.v. mit AIV infizierte und acht AIV-naive Hühner zum Einsatz. Nach 24 Stunden wurden die Hühner aus den Milbenboxen entnommen und gegen RVM behandelt. Sie wurden anschließend in getrennte Isolatoren verbracht, um eine mögliche, wenn auch unwahrscheinliche Ansteckung untereinander zu vermeiden. Die Hühner wurden jeweils über 14 Tage

täglich beprobt und am Ende dieses Zeitraums schmerzlos getötet. Nach der anschließenden Sektion wurde aus entnommenen Organen eine Virusreisolierung in HEF-Kultur und Bruteiern versucht. Die Organe wurden immunhistochemisch auf AIV untersucht. Bei Entwicklung eines ZPE in Zellkultur oder nach 7-tägiger Inkubation der inokulierten Bruteier wurde eine elektronenmikroskopische Untersuchung des Zellkulturüberstandes bzw. der AAF und ein HA-Test der AAF angeschlossen. AIV-(H5)-spezifische Antikörperbildung wurde mittels HAH-Test nachgewiesen.

Auch in Experiment II wurden aus jeder Milbenbox täglich ca. 50 RVM entnommen, um beim Blutsaugen aufgenommenes Virus mittels Inokulation in Bruteier und HEF-Kulturen nachweisen und die mögliche Persistenz des AIV in der RVM zeitlich verfolgen zu können.

Die Milbenboxen waren vor dem Einsetzen der AIV-naiven Hühner gereinigt worden, soweit dies möglich war, ohne die Milben zu beschädigen. Insgesamt wurde darauf geachtet, dass die Boxen sauber und trocken waren. Im Anschluss an die jeweilige Versuchswiederholung wurden die Milbenboxen bei 65 °C autoklaviert und gereinigt.

Tabelle 7: Experiment II - Nachweis der Übertragung von AIV durch Rote Vogelmilben auf Hühner¹ heparinisiertes Vollblut, Rachen- und Kloakentupfer, frischer Kot² Es wurden jeweils 50 RVM zur weiteren Untersuchung entnommen

Tag	Maßnahmen		
	SPF-Hühner (n = 2)	Rote Vogelmilben	SPF-Hühner (n = 2)
0	Probenentnahme ¹ Infektion mit AIV	Nullproben ²	–
1	Probenentnahme ¹ Einsetzen in Milbenbox A, B	Blutsaugen	–
2	Probenentnahme ¹ Behandlung gegen Milben Zurücksetzen in Isolator	Milbenentnahme ²	–
3	Probenentnahme ¹	Milbenentnahme ²	–
4	Probenentnahme ¹	Blutsaugen Milbenentnahme ²	Probenentnahme ¹ Einsetzen in Milbenbox A, B
5	Probenentnahme ¹	Milbenentnahme ²	Probenentnahme ¹ Behandlung gegen Milben Zurücksetzen in Isolator
6-13	Probenentnahme ¹	Milbenentnahme ²	Probenentnahme ¹
14	Probenentnahme ¹ Diagnostische Tötung Sektion Organentnahme	Milbenentnahme ²	Probenentnahme ¹
15-17	–	Milbenentnahme ²	Probenentnahme ¹
18	–	Milbenentnahme ²	Probenentnahme ¹ Diagnostische Tötung Sektion Organentnahme

3.2.1.4 Experiment III - Bestimmung der Wirksamkeit von Neopredisan[®]-135-1 auf Rote Vogelmilben

Neopredisan[®] 135-1 wird laut EG-Sicherheitsdatenblatt als chemisches Desinfektionsmittel zur Behandlung von Flächen und Geräten eingesetzt. Neopredisan[®] 135-1 enthält als Wirkstoff p-Chlor-m-Kresol (25-30 %) und zusätzlich Propan-1-ol (20-25 %) und Propan-2-ol (10-15 %). Das Präparat besteht aus einer klaren Flüssigkeit und ist gut mit Wasser mischbar.

Zur Desinfektion von Stallflächen sollen nach Herstellerangaben 400 ml/m² Desinfektionslösung verwendet werden. Dieses Volumen wurde umgerechnet auf die Fläche einer Glas-Petrischale von 38,5 cm². Dies ergab den Einsatz von 1,5 ml Desinfektionsmittellösung pro Petrischale. Der Versuch fand bei Zimmer-temperatur (ca. 20-22 °C) statt. Die Verdünnungen des Desinfektionsmittels wurden mit „Wasser standardisierter Härte“ (WSH) nach den Vorgaben des Ausschusses für Desinfektion in der Tierhaltung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft hergestellt (DVG, 2007).

Neun Verdünnungen des Neopredisan[®] 135-1 wurden mit WSH direkt vor Versuchsbeginn frisch angesetzt und jeweils 1,5 ml dieser Verdünnungen pro einer Petrischale verwendet: 0,025; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 und 5,0 %. Je eine dieser Verdünnungen wurde in eine Petrischale pipettiert, in der fünf übereinander liegende Rundfilter lagen, die den gesamten Boden der Petrischale bedeckten. Durch die Verwendung von handelsüblichem Filterpapier in fünf Lagen wurde die Flüssigkeit so weit aufgesaugt, dass die RVM nicht ertrinken konnten, sondern nur dem Einfluss des Desinfektionsmittels ausgesetzt waren. Pro Petrischale wurden 50 vitale RVM eingesetzt. Anschließend wurde der Rand der Petrischale mit einem lösungsmittelfreien „Prittstift“ abgedichtet, um sowohl ein Entweichen der RVM als auch ein Verdunsten des Desinfektionsmittels zu verhindern. Die Vitalität der Milben wurde anhand ihrer Beweglichkeit nach 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h und nach 24 h unter einem Makroskop (Auflichtmikroskop; 6,4-fache Vergrößerung) kontrolliert. Dieser Versuch wurde insgesamt sechsmal wiederholt.

3.2.2 Methoden zur Durchführung der Experimente

3.2.2.1 Probenentnahme von Hühnern und Probenaufarbeitung

3.2.2.1.1 Tupfer und Sammelkot

Tupferproben von Rachen und Kloake wurden allen infizierten Hühnern täglich mit einem sterilen Wattetupfer entnommen, um die Ausscheidung des Virus und damit eine mögliche Kontamination der Milbenboxen verfolgen zu können. Zum gleichen Zweck wurde täglich frischer Sammelkot aus den Isolatoren entnommen. Die Tupfer und die Kotproben wurden in ein mit 3 ml Basal Medium Eagle mit Earle'schen Salzen (BME) gefülltes Reagenzröhrchen gegeben. Das Medium enthielt als Zusätze 5 % fetales Kälberserum (FKS) und 0,1 % Enrofloxacin (Baytril®). Zur Überführung von möglichst vielen Viruspartikeln in das Zellkulturmedium wurden die Proben mit mehreren kurzen Ultraschallimpulsen (drei Pulse bei 60 %) behandelt und anschließend bei 1.200 x g für fünf Minuten zentrifugiert, um Kotanteile und Zelldetritus zu sedimentieren. Von allen Proben wurden je 0,1 ml des Überstandes zum Aufbringen auf Zellkulturen verwendet (24-Lochplatten, Doppelansatz).

3.2.2.1.2 Blut

Allen Hühnern wurde heparinisiertes Blut entnommen, um den Beginn und den Verlauf der durch die AIV-Infektion induzierten Virämie verfolgen zu können. Eine erste Blutentnahme als Negativkontrolle erfolgte kurz vor der Infektion und die weiteren Blutentnahmen dann alle 24 Stunden p.i. jeweils im Wechsel aus den Venen des rechten bzw. linken Flügels (Venae ulnaris) der Hühner. Etwa 1 ml Blut wurde in heparinisierten Röhrchen aufgefangen und zur Durchmischung vorsichtig geschwenkt. Zur Trennung der einzelnen Komponenten des Hühnerblutes wurde eine Ficoll-Iso-Paque-Gradientenzentrifugation (Buffy Coat-Separation) durchgeführt (BØYUM, 1964). Das Blut wurde auf ca. 1 ml Ficoll-Iso-Paque im Reagenzröhrchen vorsichtig aufgeschichtet, für 15 min bei 2.880 x g zentrifugiert. Die einzelnen Fraktionen waren nach der Zentrifugation von oben nach unten geschichtet in: Blutplasma, Leukozyten, Ficoll-Iso-Paque, Erythrozyten. Das Plasma wurde mit einer Eppendorfpipette vorsichtig abgenommen und in ein separates Röhrchen überführt. Als nächste Fraktion wurde die dünne Schicht der Leukozyten gewonnen und mit 5 ml Dulbecco's-Phosphat-

Puffer in einem frischen Reagenzglas gewaschen. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 300 x g. Die sedimentierten Leukozyten wurden nach Entfernung des Überstandes in 1 ml PBS resuspendiert. Nach Entfernung des Ficoll-Iso-Paques wurden die verbliebenen Erythrozyten ebenfalls in PBS gewaschen und in 1 ml PBS resuspendiert.

Es wurde versucht, das Virus auf zweierlei Art aus dem Hühnerblut zu reisolieren. Zum einen wurden die drei Fraktionen des heparinisierten Vollbluts separat auf HEF-Kulturen aufgebracht (je 0,1 ml in 24-Lochplatten im Doppelansatz). Da sich die Zellkulturen in den 24-Lochplatten, die mit der Erythrozyten-Fraktion beimpft worden waren, mikroskopisch nicht auf die Entwicklung eines ZPE beurteilen ließen, wurde nach drei Tagen der Überstand abgenommen und in neue 24-Lochplatten mit konfluenten HEF-Kulturen überführt. Außerdem wurde die Erythrozyten-Fraktion in 96-Lochplatten auf konfluenten HEF-Kulturen titriert, um den Titer des an den Erythrozyten haftenden Virus zu bestimmen. Zum anderen wurden embryonierte Hühnereier mit 0,1 ml der Erythrozyten-Fraktion inokuliert.

Bei diagnostischer Tötung der Hühner wurde eine V. jugularis eröffnet und das Blut ohne Antikoagulanz zur Antikörperbestimmung aufgefangen und abzentrifugiert, um die zellulären Bestandteile abzutrennen.

3.2.2.1.3 Sektionen und Organproben

Am Versuchsende oder nach vorherigem Verenden wurden alle Hühner seziiert. Die Sektionen wurden wie bei SIEGMANN et al. (2005) beschrieben durchgeführt und pathologische Veränderungen protokolliert. Im Verlauf der Sektionen wurden von jedem Huhn steril Organproben (Herz, Leber, Niere, Milz, Lunge, Enddarm, Pankreas, Großhirn, Drüsenmagen und Legedarm/ Hoden) entnommen. Etwa ein Gramm große Teile der Proben wurden in BME überführt und einer Ultraschallbehandlung (drei Pulse bei 60 %) unterzogen, um die Organteile zu homogenisieren und das Virus aus den Zellen freizusetzen. In der anschließenden Zentrifugation bei 1.200 x g für 10 min wurde Zelldetritus aus dem Überstand weitgehend entfernt. Vom gereinigten Überstand wurden je 0,1 ml in zwei Löcher auf 24-Lochplatten oder in Bruteier verimpft, um AIV

zu reisolieren. Herz, Leber, Milz und Nieren wurden zusätzlich bakteriologisch untersucht, um eventuell vorhandene Begleitkeime nachzuweisen (siehe 3.2.2.13.1). Veränderte Organe wurden histopathologisch untersucht.

3.2.2.2 Probenentnahmen von Roten Vogelmilben

Zum Nachweis der Virusaufnahme durch die RVM wurden sowohl während Experiment I als auch während Experiment II täglich ca. 50 blutgefüllte Milben aus den Milbenboxen entnommen. Diese waren an Hand der roten bis schwärzlichen Verfärbung ihres Körpers, die durch das durchscheinende aufgenommene Hühnerblut verursacht wird, leicht zu erkennen. Im Gegensatz dazu sind nüchterne Milben gräulich-weiß gefärbt. Abgesehen von der Färbung ist eine Änderung der Bewegungsaktivität nicht wahrnehmbar. Ein Größenunterschied zwischen nüchternen und blutgefüllten RVM ist mit bloßem Auge kaum erkennbar.

3.2.2.3 Äußerliche Desinfektion der Roten Vogelmilben

Mittels einer äußerlichen Desinfektion der RVM würde eine oberflächliche, äußere Kontamination der Milben mit dem AIV durch Kontakt mit infektiösen Sekreten oder Ausscheidungen der infizierten Hühner beseitigt. Es wurde eine Hälfte der jeweils entnommenen 50 RVM desinfiziert und die andere Hälfte nicht. Dies zum Ziel nur mit dem Saugakt aufgenommenes Blut im Inneren der RVM nachzuweisen und eine äußerliche Kontamination der Milben mit dem Testvirus auszuschließen.

Zur äußerlichen Desinfektion der RVM (ZEMAN et al., 1982) wurde 4 %iges Formalin verdünnt in Aqua dest. verwendet. Die Vogelmilben wurden zweimal mit 5 ml NaCl-Lösung gewaschen und dann 5 ml 4 %igem Formalin für sieben Minuten ausgesetzt. Nach vorsichtiger Entfernung des Formalins mit einer Pipette wurden sie erneut zweimal mit 5 ml NaCl-Lösung gewaschen. Der größte Teil der RVM überlebte diese Desinfektion, was an den fortbestehenden Bewegungen erkennbar war. Anschließend wurden die RVM in einem Mörser homogenisiert und in 0,5 ml PBS aufgenommen. Die Homogenisate wurden nun jeweils auf HEF-Kulturen aufgebracht (je 0,1 ml in zwei Kavitäten von 24-Lochplatten) und in embryonierte Hühnereier inokuliert (je 0,1 ml in drei 9-11 Tage bebrütete Bruteier). Zur Kontrolle der erfolgreichen Desinfektion

wurden nicht-homogenisierte Milben, die an den infizierten Hühnern Blut gesaugt hatten, ebenfalls auf HEF-Kulturen aufgebracht. Es entwickelte sich kein ZPE.

3.2.2.4 Herstellung von primären Hühnerembryofibroblastenkulturen

Primäre HEF-Kulturen wurden aus 10-tägigen SPF-Hühnerembryonen nach der bei SCHAT und PURCHASE (1989) beschriebenen Methode einmal wöchentlich hergestellt. Beim Anzuchtmedium handelte es sich um BME mit 5 % FKS unter Zusatz von 5 % L-Glutamin und 7,5 % HEPES-Puffer. Das Erhaltungsmedium enthielt zusätzlich 0,1 % Enrofloxacin (Baytril®). Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Die Subkultivierung von HEF-Kulturen mittels Trypsin-Versen-Lösung erfolgte ebenfalls nach der Methode nach SCHAT und PURCHASE (1989). HEF-Kulturen wurden bei 37 °C in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre im Brutschrank (Heraeus, Hanau) inkubiert.

3.2.2.5 Vermehrung der Virusstammsuspension in SPF-Bruteiern

Zur Herstellung der Virusstammsuspension wurden 0,1 ml des Isolats in die Allantoishöhle von zehn 9-11 Tage bebrüteten SPF-Hühnereiern inokuliert (SWAYNE et al., 2008). Jeden folgenden Tag wurde mit der Schierlampe die Vitalität der Embryonen geprüft. Nach Absterben der Embryonen bzw. am siebten Tag p.i. wurden die AAF geerntet, zentrifugiert und gepoolt. Anschließend wurde der Virustiter mittels HA-Test festgestellt und die Suspension bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.2.6 Bestimmung des Virusgehalts der Virusstammsuspension

Zur Bestimmung der EID₅₀ und der ELD₅₀ im Vorversuch wurden jeweils fünf Bruteier pro Verdünnungsstufe (10⁻¹-10⁻⁹) verwendet. Die Eier wurden im Abstand von 12 Stunden geschickt und der Absterbezeitpunkt protokolliert. Nach dem Absterben der Embryonen oder nach Ablauf von sieben Tagen Inkubation wurden die AAF geerntet und die Hämagglutinationstiter mittels HA-Test festgestellt. Die EID₅₀ und die ELD₅₀ wurden mit Hilfe der Formel von SPEARMAN und KÄRBER (MAYR et al., 1977) errechnet.

3.2.2.7 Virus-Reisolierung in embryonierten SPF-Bruteiern

Es wurden 0,1 ml der jeweiligen Proben (Erythrozyten, Milbenhomogenisate, homogenisierte Organproben) in die Allantoishöhle von je drei 9-11 Tage bebrüteten SPF-Hühnereiern inokuliert (SWAYNE et al., 2008). Bei den Milbenhomogenisaten wurden jeweils drei embryonierte SPF-Hühnereier mit Homogenisat von nicht desinfizierten Milben und drei mit Homogenisat von desinfizierten Milben inokuliert. Die beimpften SPF-Bruteier wurden jeden Tag die Vitalität der Embryonen geprüft.

3.2.2.8 Virus-Reisolierung in HEF-Kulturen

Alle Tupferproben aus Pharynx und Kloake der Hühner, der Sammelkot und die einzelnen Blutbestandteile wurden auf ausgewachsene HEF-Kulturen im Doppelansatz in 24-Lochplatten aufgebracht und täglich auf die Entwicklung eines ZPE mittels eines umgekehrten Mikroskops kontrolliert und die Zellkulturüberstände nach sieben Tagen einmal passagiert. Ein Mediumwechsel mit Erhaltungsmedium erfolgte alle zwei Tage. Beim Aufbringen von 0,1 ml des Milbenhomogenisats auf HEF-Kulturen wurden jeweils zwei Ansätze ohne und mit vorangegangener Desinfektion der Milben angefertigt (Abschnitt 3.2.2.3).

3.2.2.9 Bestimmung des Virusgehalts der Blutfraktionen und der Roten Vogelmilben

Die Virustitrationen wurden im Mikrotiterverfahren in subkultivierten HEF-Kulturen in 96-Lochplatten nach Standardarbeitsmethoden (KRÜGER, 2002) durchgeführt. Die Virustiter wurden bestimmt für die Erythrozyten-, Leukozyten- und Plasma-Fraktion der Hühner. Da 1 ml aus der Flügelvene entnommenes heparinisieretes Vollblut verwendet wurde, beziehen sich die aus den Titrationen errechneten KID_{50} -Werte stets auf die aus 1 ml heparinisieretem Blut gewonnenen Fraktionen. Die Auftrennung des Blutes in seine einzelnen Fraktionen ist unter Abschnitt 3.2.2.1.2 beschrieben.

Für die Titrationen wurden jeweils die Verdünnungsstufen 10^{-1} - 10^{-8} angefertigt. Dafür wurden von der jeweiligen Probe 0,2 ml abgenommen und mit 1,8 ml BME 1:10 verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden wiederum 0,2 ml entnommen und in 1,8 ml BME 1:10 überführt, usw. bis zu einer Verdünnung von 10^{-8} . Von den einzelnen

Probenverdünnungen wurden jeweils 0,1 ml auf 96-Lochplatten mit subkultivierten HEF-Kulturen pipettiert. Für jede Probe wurden fünf Kavitäten genutzt (Fünffach-Ansatz). Die Zellkulturen wurden bis zu sieben Tage p.i. täglich mit einem umgekehrten Mikroskop auf Entwicklung eines ZPEs kontrolliert und das Ergebnis protokolliert.

Mit den Milbenhomogenisaten wurde ebenfalls eine Titration versucht, um den durchschnittlichen Virusgehalt der RVM festzustellen. Es wurden von den Milbenhomogenisaten ebenfalls die Verdünnungsstufen 10^{-1} - 10^{-8} nach der gleichen Verfahrensweise angefertigt. Von den einzelnen Probenverdünnungen wurden jeweils 0,1 ml auf 96-Lochplatten mit subkultivierten HEF-Kulturen pipettiert. Für jede Probe wurden fünf Kavitäten genutzt (Fünffach-Ansatz). Die Zellkulturen wurden bis zu sieben Tage p.i. täglich mit einem umgekehrten Mikroskop auf Entwicklung eines ZPEs kontrolliert und die Ergebnisse protokolliert.

3.2.2.10 Virustiterbestimmungen und statistische Auswertung

Zur Charakterisierung des AIV *in vitro* in Zell- und Eikultur und *in vivo* in Hühnern wurden verschiedene quantitative Pathogenitätscharakteristika bestimmt (HANSON et al., 1963; VILLEGAS, 1998). Die Berechnung der Titer erfolgte nach der Formel von SPEARMAN und KÄRBER (zitiert aus MAYR et al., 1977). Die statistische Auswertung aller Ergebnisse einschließlich der Berechnungen wurde dankenswerter Weise mit Unterstützung von Herrn ADir. Dr. K. Failing durchgeführt. Es wurden der KRUSAL-WALLIS-Test, die Berechnung des Rangkorrelationskoeffizienten nach SPEARMAN und eine explorative, zwei-faktorielle Varianzanalyse mit Messwertwiederholung auf die gesammelten Daten angewendet (DIXON, 1993).

3.2.2.11 Identifizierung der Virusreisolat

3.2.2.11.1 Hämagglutinationstest

Der Hämagglutinationstest (HA-Test) wurde nach der Arbeitsvorschrift 3 b zur Diagnosestellung AIV im Manual der OIE (OIE, 2004) mit 1 %iger Hühnererythrozytensuspension durchgeführt. Die Mikrotiterplatten mit U-förmigen Böden wurden für 60 min bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert und die HA-Titer in Schrägstellung der

Platten abgelesen. Dabei entsprach der HA-Titer der höchsten Verdünnungsstufe des Testvirus, bei der noch eine vollständige Hämagglutination eintrat.

3.2.2.11.2 Hämagglutinations-Hemmungstest

Der Hämagglutinations-Hemmungstest (HAH-Test) wurde ebenfalls nach den Angaben im Manual der OIE (OIE, 2004) durchgeführt (Arbeitsanweisung 3 b). Dieser Test wurde mit den geernteten HA-positiven AAF der inokulierten Bruteier und den Blutseren der nach Versuchsende getöteten Hühner durchgeführt. Als Positivkontrolle diente ein in SPF-Hühnern hergestelltes polyklonales Antiserum gegen ein AIV des Subtyps H5N9 (Stammsammlung KVRAF 05/03, JLU Gießen). Als Negativkontrollen wurden ein ebenfalls polyklonales H7N1-Serum aus SPF-Hühnern (Stammsammlung KVRAF, Coca-Stamm 1979, JLU Gießen) und ein Ansatz nur mit PBS an Stelle von Serum verwendet. Das Testvirus wurde auf 4 HA-Einheiten durch Verdünnen mit PBS eingestellt. Die 96er-Lochplatten mit den Serumverdünnungen und dem Testvirus wurden für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 1 %iger Hühnererythrozytensuspension folgte eine weitere Inkubation für 60 min bei 4 °C. Die Platten wurden in Schrägstellung abgelesen. Sind AIV-spezifische Antikörper vorhanden, bleibt die Agglutination aus. Nicht agglutinierte Erythrozyten sedimentieren und bilden einen Tropfen, der bei Schrägstellung der Platte verläuft. Der HAH-Titer eines Serums ist der Wert der höchsten Serumverdünnung, bei der die Hämagglutination noch vollständig gehemmt wurde. Die Spezifitätsgrenze wird bei einem Titer von 2^4 angesetzt (OIE, 2004).

3.2.2.11.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Mehrere Überstände aus inokulierten Zellkulturschälchen mit ausgedehntem ZPE wurden in 25 ml Zellkulturflaschen vermehrt und nach Negativkontrastierung mit 2 %iger Phosphorwolframsäure elektronenmikroskopisch auf das Vorhandensein von Viruspartikeln mit Orthomyxovirusmorphologie geprüft. Ebenso wurden mehrere AAF mit einem HA-Titer über 2^6 elektronenmikroskopisch untersucht. Herrn Dr. W. Herbst, Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der JLU Gießen, danke ich für diese Arbeiten.

3.2.2.11.4 Polymerasekettenreaktionen

Mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde überprüft, ob es sich bei den Reisolaten aus den Milbenhomogenisaten um das eingesetzte Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/1966 mit dem Subtyp H5N9 handelt. Die Untersuchung der Proben wurde von Herrn Dr. Prof. T. Harder im Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald, durchgeführt. Im Einzelnen wurden folgende molekularbiologischen Untersuchungen durchgeführt: jeweils eine Real Time Reverse Transkriptase-PCR zur Detektion des M-Gensegments (nach SPACKMAN et al., 2002, modifiziert), des H5-Gensegments (nach SPACKMAN et al., 2002, modifiziert), des N1-Gensegments (Entwicklung FLI), des H7-Gensegments (Entwicklung FLI), des HA 2- (PHIPPS et al., 2004) und des NA-Gensegments (Entwicklung FLI). Außerdem wurden Hämagglutinationshemmungsteste mit Antiseren gegen alle HA-Subtypen 1-16 durchgeführt.

3.2.2.12 Bestimmung des Intravenösen Pathogenitätsindex

Die Bestimmung des intravenösen Pathogenitätsindex (IVPI) wurde mit 45 Hühnern im Alter von 7 Lebenswochen durchgeführt. Abweichend von der Originalvorschrift wurden mit den Verdünnungsstufen 10^{-1} - 10^{-9} je fünf Hühner mit 0,1 ml der jeweiligen Virussuspension in die V. ulnaris infiziert. Die Hühner wurden p.i. täglich 10 Tage lang klinisch beobachtet und ihre Symptomatik anhand einer Faktorskala bewertet. Der Befund „schwer erkrankt“ schließt im Gegensatz zu „erkrankt“ eine ZNS-Symptomatik mit ein. Die Berechnung des IVPI erfolgte nach den Angaben im Manual der OIE (OIE, 2004). Der IVPI eines AIV wird nach der Europäischen Richtlinie 2005/94/EG folgendermaßen beurteilt: Es handelt sich um ein HPAIV, wenn der IVPI über 1,2 liegt.

3.2.2.13 Weitere Untersuchungen der Organe sezierter Hühner

3.2.2.13.1 Bakteriologische Untersuchung der Hühnerorgane

Zum Ausschluss von bakteriellen Infektionen wurden Herz, Leber, Milz und Niere aller Hühner bakteriologisch untersucht (KRÜGER, 2002). Zusätzlich wurden pathologisch veränderte Organe kulturell überprüft. Die steril entnommenen Organe wurden kurz abgeflammt, angeschnitten und sowohl auf einer Schafblutagar-Platte als auch auf einer

für Enterobacteriaceae selektiven BPLS⁸-Platte ausgestrichen. Diese Medien wurden für zwei Tage bei 37 °C bebrütet. Die festen Nährmedien wurden täglich auf das Wachstum von Kolonien überprüft. Die entstandenen Kolonien wurden mit Hilfe von bakteriologischen Standardmethoden bestimmt (HOLT et al., 1994).

3.2.2.13.2 Histopathologische Untersuchung von Organproben aus Hühnern

Die bei den Sektionen entnommenen Organproben aller Hühner wurden nach Fixierung, Einbettung, Schnitt und Färbung nach Standardmethoden am Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen untersucht. Die Paraffinschnitte aus den Hühnerorganen wurden mit Hämatoxylin-Eosin (HE) und Perjodsäure/ Schiffsches Reagenz/ Hämalan nach MAYER (Periodic-acid-Schiff-reaction, PAS) gefärbt und anschließend unter einem Mikroskop untersucht und beurteilt.

3.2.2.13.3 HE- und PAS-Färbung von Roten Vogelmilben

Täglich wurden ca. 15 Vogelmilben zur feingeweblichen Untersuchung in Formalin eingelegt und anschließend in Paraffin eingebettet. Von diesen Paraffinblöckchen wurden Schnitte angefertigt, die ebenfalls mittels HE oder PAS gefärbt wurden. Diese Schnitte wurden zur Orientierung angefertigt, um die Organe der RVM im Hinblick auf die immunhistochemische Färbung identifizieren zu können. Außerdem konnte so eine Vorstellung über die Verteilung des aufgenommenen Blutes in den Milben gewonnen werden.

3.2.2.13.4 Immunhistochemische Färbung von Roten Vogelmilben und Hühnerorganen

Immunhistochemisch sollte AIV-Antigen im Körper der RVM identifiziert und seine Expressionsorte lokalisiert werden. Die histologischen Präparate der Hühnerorgane wurden zum Vergleich der Reaktionen immunhistochemisch mit AIV-spezifischen Antikörpern angefärbt. Im Experiment II diente diese Methode, zusätzlich zur Virusisolation und Antikörperbestimmung, zur Detektion von AIV-Antigen in den naiven Hühnern, die in Kontakt mit AIV-haltigen RVM gebracht wurden.

⁸ Brilliantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose-Platte

Es wurden zwei verschiedene immunhistochemische Testverfahren durchgeführt: Zum einen die Peroxidase-Anti-Peroxidase-(PAP)-Methode bei der als Primärantikörper Kaninchen Anti-Influenza und als Sekundärantikörper Schwein Anti-Kaninchen IgG verwendet werden (STERNBERGER et al., 1970). Der Primärantikörper richtet sich gegen das Ribonukleoprotein des AIV (α -RNP). Diese Arbeiten wurden mit Herrn Dr. K. Köhler, Institut für Veterinär-Pathologie, JLU Gießen, durchgeführt und ausgewertet.

Als weitere Methode wurde die Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-(ABC)-Methode eingesetzt, bei der als Primärantikörper ebenfalls einen Kaninchen Anti-Influenza-Antikörper und als Sekundärantikörper ein Ziege-Anti-Kaninchen IgG1-Antikörper benutzt werden (HSU et al., 1981). Der im FLI auf Riems entwickelte Primärantikörper richtet sich gegen das Nukleoprotein (NP) des AIV (KLOPFLEISCH et al., 2006). Diese Untersuchung wurde von Prof. Dr. J. Teifke im Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems, durchgeführt. Die detaillierten Versuchsprotokolle beider Methoden sind im Anhang III zu finden.

Mit der PAP-Methode wurden alle histologisch untersuchten Hühnerorgane und Vogelmilben bearbeitet. Die ABC-Methode wurde testweise für die Milben eines Experiments und ein AIV-positives Huhn durchgeführt (Experiment I/2 Box A), um festzustellen, ob dieses System möglicherweise geeigneter für diese Anwendung ist. Die Beurteilung der immunhistologischen Färbungen erfolgte über den Nachweis eines Farbniederschlages im bearbeiteten Gewebe: Beim PAP-System sind die Antigen-Antikörper-Präzipitate durch 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) braun gefärbt. Bei der ABC-Methode sind die Niederschläge durch die Verwendung von 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) rot gefärbt.

3.2.2.13.5 Kontrollen der immunhistochemischen Färbungen

Zur Auswertung wurden bei jedem Färbedurchgang eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Die Positivkontrolle diente der Überprüfung der korrekten Verarbeitung der Probe. Als Positivkontrolle dienten immunhistochemisch gefärbte histologische Präparate der AIV-infizierten Hühner. Durch die Anfertigung dieser Schnitte war es möglich, die Antigen-Antikörper-Präzipitate in den Innenstrukturen der

RVM besser zu erkennen und zu beurteilen. Zur Negativkontrolle dieser Schnitte wurden Organe eines AIV-naiven SPF-Huhns verwendet und die histologischen Organpräparate immunhistochemisch gegen AIV gefärbt. Als Labor-Positivkontrolle diente jeweils ein bekannt positives Gewebe. Die Negativkontrollen stellten die jeweils parallel mit dem Kontrollserum inkubierten Folgeschnitte dar. Bei diesen Präparaten wurde jeweils auf den Primärantikörper verzichtet und Kaninchen-Kontrollserum eingesetzt. Außerdem wurden um etwaige unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, die Gewebeschnitte für 10 min mit Schweine-Kontrollserum (PAP-Methode) bzw. Ziegen-Kontrollserum (ABC-Methode) geblockt und dieses danach vorsichtig wieder entfernt. Als Negativkontrollen für die Färbungen der Vogelmilben wurden nüchterne sowie blutgefüllte, aber AIV-negative RVM verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Vorversuch - Induktion einer Virämie und Reproduktion der Klassischen Geflügelpest durch Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9)

4.1.1 Eigenschaften des Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9) in vitro

Das AIV erwies sich als zytopathogen. Es führte bereits 1-2 Tage p.i. zu einer Abkugelung und Schrumpfung der infizierten Zellen in HEF-Kulturen, die mit Vakuolisierung und Pyknose der Zellkerne einhergingen und in einer Zelllyse endeten (Abbildung 6). Bei der nicht-infizierten Zellkontrolle blieb der Zellrasen geschlossen, der überwiegend aus spindelförmigen Fibroblasten bestand. Durch Titration der Virusstamm suspension in Mikrotiterplatten konnte mittels ZPE-Bildung fünf Tage p.i. eine KID_{50}/ml von $10^{6,3}$ errechnet werden.

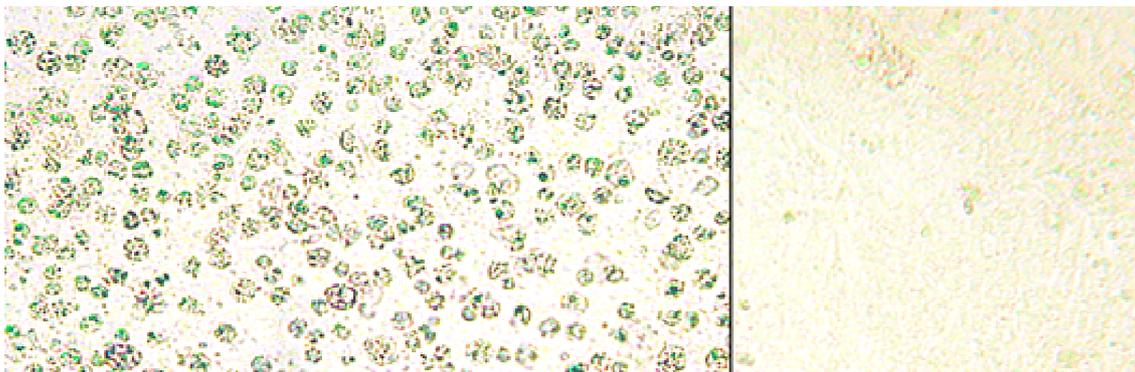


Abbildung 6: Zytopathischer Effekt in HEF-Kulturen durch Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9)

Links: ZPE durch AIV zwei Tage p.i.. Rechts: Nicht infizierte Kontrolle. Beide Kulturen nicht gefärbt, 100-fache Vergrößerung.

Der embryonale Dosis (ELD_{50}) von $10^{7,7}/ml$ der Virusstamm suspension wurde nach der Formel von SPEARMAN und KÄRBER (zit. von MAYR et al., 1977) bestimmt. Im Gegensatz zum Nachweis von hämagglutinierendem Virus in den AAF aller abgestorbenen Embryonen wurde in keiner AAF der überlebenden Embryonen hämagglutinierendes Virus nachgewiesen. Somit ist die EID_{50} von $10^{7,7}/ml$ identisch mit der ELD_{50}/ml .

4.1.2 Eigenschaften des Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9) in vivo

4.1.2.1 Nachweis einer Virämie durch AIV

Eine Virämie konnte mittels Virusreisolierungen aus der Erythrozytenfraktion für alle fünf eingesetzten Hühner bei den Verdünnungsstufen 10^{-1} - 10^{-7} nachgewiesen werden. Einzige Ausnahme war ein Huhn ohne Virämie in der Gruppe, die mit einer Virusverdünnung von 10^{-3} infiziert wurde.

4.1.2.1.1 Nachweis der Virämie in Blutfraktionen mit HEF-Kulturen

Die Virusnachweise erfolgten nach Verimpfung der einzelnen Blutfraktionen auf HEF-Kulturen mittels der Ausbildung des typischen ZPE. Anhand der Ergebnisse der Erythrozytenfraktion wird der chronologische Ablauf der Virämie und der Todesfälle der Hühner nach Infektion mit dem AIV in Abhängigkeit von der jeweiligen eingesetzten Virusdosis dargestellt (Tabelle 8).

Abbildung 8 zeigt den zeitlichen Verlauf der qualitativ bestimmten Virämie ohne Berücksichtigung der Virusdosis und den Anstieg der Todesfälle. Bereits 24 Stunden p.i. war bei 21 der 45 infizierten Hühner ein Virusnachweis mittels Erythrozyten in HEF-Kultur möglich. Am 2. Tag p.i. stieg die Anzahl der positiven Hühner auf 22 an und am 3. Tag p.i. auf 33. Am 4. Tag p.i. sank die Zahl der virämischen Hühner auf 27 (7 Hühner gestorben), bei einem Huhn konnte aber erst am 4. Tag p.i. eine Virämie festgestellt werden. Deshalb wurde AIV bei insgesamt 34 von 45 Hühnern aus der Erythrozytenfraktion mittels HEF-Kultur reisoliert. An den folgenden Tagen war die Virämie weiter rückläufig (Abbildung 7 bzw. Tabelle 8).

Tabelle 8: Chronologischer Verlauf der AIV-Nachweise aus Erythrozyten in HEF-Kulturen in Abhängigkeit von der Virusdosis

Verd. = Verdünnung; 5 Hühner je Verdünnungsstufe

Virusdosis/ Huhn		Zahl virämischer Hühner an Tagen p.i.								
Verdünnung (log ₁₀)	ELD ₅₀ je Verd. (log ₁₀)	0	1	2	3	4	5	6	7	8-11
1	6,7	0	5	5	5	4	4	0	0	0
2	5,7	0	4	5	5	2	0	0	0	0
3	4,7	0	3	4	4	3	0	0	0	0
4	3,7	0	3	5	5	4	1	0	0	0
5	2,7	0	4	5	5	4	3	2	0	0
6	1,7	0	0	5	5	5	2	1	0	0
7	0,7	0	2	1	4	5	3	0	0	0
8	0,07	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0,007	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Zahl virämischer Hühner / Tag		0	21	30	33	27	13	3	0	0
Zahl der Todesfälle / Tag		0	0	0	0	9	10	2	0	0
Zahl überlebender Hühner / Tag		45	45	45	45	36	26	24	24	24

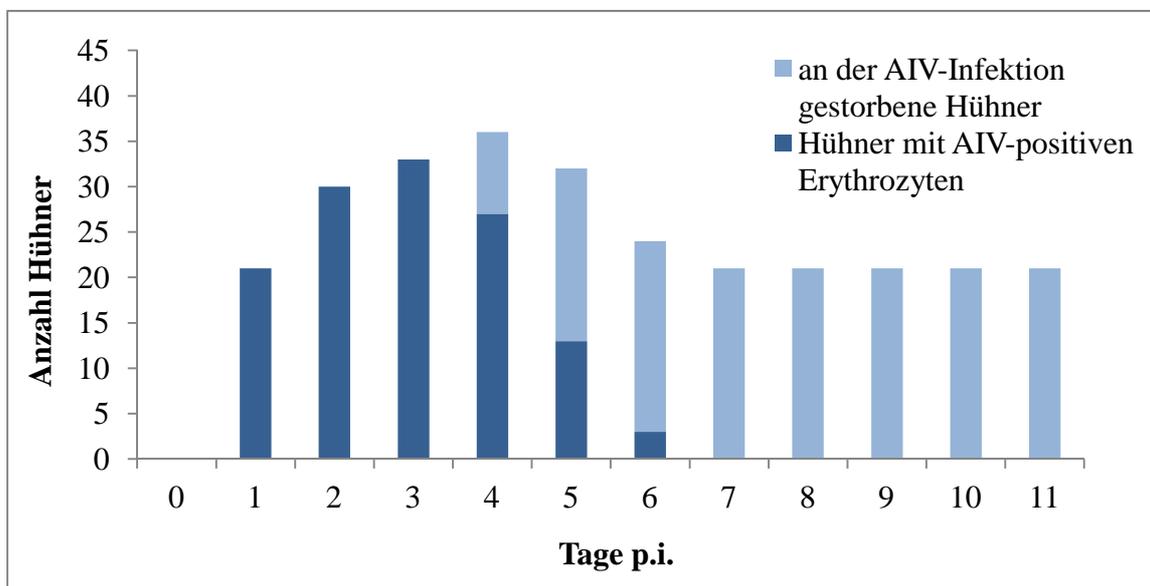


Abbildung 7: Virusreisolierung aus Erythrozyten der AIV-infizierten Hühner mittels HEF-Kultur und zeitlicher Verlauf der Todesfälle

Die Ergebnisse der Virusreisolierung aus Leukozyten entsprechen weitgehend denjenigen der Erythrozyten-Fraktion (Tabelle 9). In der Leukozyten-Fraktion ließ sich bei 20 von 45 Hühnern 1 Tag p.i. AIV nachweisen, am 2. Tag p.i. bei 22 und nach 3 Tagen p.i. in höchster Ausprägung bei 30 Hühnern. Danach fiel die Nachweiszahl wieder ab, am 4. Tag p.i. auf 23 Nachweise, am 5. auf 13 und am 6. Tag auf vier Nachweise. Danach konnte kein Virus mehr reisoliert werden. Aus den Virusverdünnungen 10^{-8} und 10^{-9} konnte nie Virus reisoliert werden (Tabelle 9). Die Virusreisolierung aus dem Blutplasma der infizierten Hühner gelang bei nur wenigen Hühnern im Zeitraum von einem bis fünf Tagen p.i. (Tabelle 9).

Tabelle 9: Chronologischer Verlauf der AIV-Nachweise aus Erythrozyten, Leukozyten und Plasma in HEF-Kulturen ohne Berücksichtigung der einzelnen Virusverdünnungen

Blutfraktion	Anzahl AIV-Nachweise aus 45 Hühnern an Tagen p.i.									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9-11
Erythrozyten	0	21	30	33	27	13	3	0	0	0
Leukozyten	0	20	22	30	23	13	4	0	0	0
Plasma	0	1	3	6	4	6	0	0	0	0
Todesfälle	0	0	0	0	9	10	2	0	0	0

Mittels einer Titration der Blutfractionen auf HEF-Kulturen wurden nur die Virusgehalte in der Erythrozyten-Fraktion je Huhn quantitativ bestimmt. In Tabelle 10 sind die einzelnen Ergebnisse dieser Titrationsen aufgeführt. Bei Titrationsen der Leukozyten- und Plasma-Fraktion konnten keine Virustiter ermittelt werden. Bei einigen Proben der Erythrozyten-Fraktion entwickelte sich nach Verimpfung der unverdünnten Probe ein ZPE, es konnten aber keine genauen Virustiter bestimmt werden. Diese Proben sind mit einem Plus gekennzeichnet. HEF-Kulturen beimpft nach dem 5. Tag p.i. entwickelten keinen ZPE mehr. Im Verlauf der Virämie stieg der Virustiter zunächst drei Tage p.i. auf ein Maximum an und fiel dann schnell ab. Die KID_{50}/ml -Titer beziehen sich auf 1 ml heparinisiertes Vollblut.

Tabelle 10: Titrations der Erythrozyten-Fraktion auf HEF-Kultur, Titer als KID₅₀/ml (log₁₀) bezogen auf 1 ml heparinisieretes Vollblut

– = kein Nachweis, + = ZPE, keine Titration möglich. 5 Hühner je Verdünnungsstufe

Verdünnungs- stufe AIV (log ₁₀)	KID ₅₀ /ml (log ₁₀) in HEF-Kulturen an Tagen p.i.							
	1	2	3	4	5	6	7	8-11
1	2,1	4,7	5,7	+	+	–	–	–
	4,5	3,3	3,3	3,9	3,1	–	–	–
	7,5	4,9	+	+	+	–	–	–
	7,3	4,7	+	+	+	–	–	–
	6,7	4,5	+	–	–	–	–	–
2	+	+	6,5	–	–	–	–	–
	+	+	+	6,5	–	–	–	–
	+	+	7,9	–	–	–	–	–
	+	+	5,7	–	–	–	–	–
	–	+	5,1	4,1	–	–	–	–
3	+	+	+	5,7	–	–	–	–
	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	+	4,9	6,5	–	–	–	–
	+	+	5,5	–	–	–	–	–
	+	+	4,3	4,9	–	–	–	–
4	–	3,5	3,9	4,5	–	–	–	–
	–	5,3	4,3	3,5	2,7	–	–	–
	+	3,5	3,5	3,5	–	–	–	–
	+	4,3	5,5	–	–	–	–	–
	+	3,5	3,5	3,9	–	–	–	–
5	–	3,7	5,3	–	–	–	–	–
	+	3,5	4,7	+	2,9	+	–	–
	+	4,1	3,5	+	–	–	–	–
	+	3,7	4,5	+	3,9	+	–	–
	+	4,3	4,3	+	2,9	–	–	–
6	–	+	3,3	3,1	–	–	–	–
	–	+	4,7	5,5	–	–	–	–
	–	+	+	3,1	3,7	+	–	–
	–	+	+	2,7	–	–	–	–
	–	+	+	3,1	+	–	–	–
7	+	–	–	2,7	+	–	–	–
	–	–	2,7	1,6	5,9	–	–	–
	+	–	3,5	2,7	–	–	–	–
	–	+	2,9	2,9	2,5	–	–	–
	–	–	2,7	+	–	–	–	–

4.1.2.1.2 Nachweis der Virämie mit Eikulturen

Pro Erythrozytenfraktion eines Huhnes einer Verdünnungsstufe wurden drei Bruteier inokuliert. Mit aus diesen Bruteiern gewonnenen AAF wurden HA-Tests zur Verifikation der erfolgten Infektion durchgeführt. Alle Absterbezeiten der Embryonen lagen in den ersten 24-48 Stunden nach der Inokulation. Alle AAF aus abgestorbenen Embryonen enthielten hämagglutinierendes Virus. Dagegen enthielten nicht-abgestorbene Embryonen keine HA-positive AAF. Die ersten Virusnachweise mittels Eikultur gelangen 1 Tag p.i. und erreichten 4 Tage p.i. ein Maximum (Tabelle 11). Danach fielen die Reisolierungen ab, aber es konnte AIV bis zum 10. Tag p.i. vereinzelt nachgewiesen werden.

Tabelle 11: Quantitative Bestimmung des AIV-Gehalts der Erythrozyten mittels HA in AAF an Tagen nach der Infektion der Hühner

Einsatz von 3 Eiern pro Erythrozytenprobe = 15 Eier pro Virusverdünnungsstufe, n.d. – nicht durchgeführt

Virusverdünnungsstufe (log ₁₀)	HA-Titer (log ₂) der AAF in Tagen p.i.											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	0	7	5,1	7	6	–	–	–	–	–	–	–
3	0	4,2	4,8	5,1	5,3	–	–	–	–	–	–	–
4	0	4,8	4,9	4,7	4,2	2,2	0	0	0	0	0	0
5	0	4,4	6,3	4,6	5,4	5,4	2,8	0	0	0	0	0
6	0	0	2,3	4,7	5,8	4	1	0	0	0,6	0	0
7	0	2,1	1,3	4,6	4,7	2,1	0	0	0,6	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0,9	0,6	0,7	0,5	0	0,5	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
\bar{x}	0	3,2	3,5	4,4	4,5	2,1	0,6	0,1	0,2	0,1	0,1	0

Beim Vergleich der beiden Virusnachweisverfahren kann festgestellt werden, dass mit beiden Methoden virämische Hühner detektiert werden können. Der Nachweiszeitraum des AIV mittels embryonierter Hühnereier war aber vier Tage länger als mit der Virusreisolierung mittels HEF-Kulturen.

Die Hühner entwickelten nach Inokulation mit der höchsten Virusdosis ($ELD_{50} = 10^{6,7}$) innerhalb von 24 Stunden eine Virämie. Deshalb wurden in Experiment I und II die Hühner ebenfalls mit dieser Virusdosis i. v. inokuliert, wo gesichert war, dass die RVM hochgradig AIV-haltiges Blut aufnehmen konnten.

4.1.2.2 Ausscheidung und Nachweis des AIV in HEF-Kulturen

Die Ausscheidung des AIV der Hühner wurde nur durch Virusreisolierung in HEF-Kulturen verfolgt. Die Reisolation des AIV aus Tupferproben von Rachen und Kloake gelang wesentlich häufiger als aus Sammelkotproben. Der chronologische Verlauf der Nachweise aus den einzelnen Probenarten ist Tabelle 12 dargestellt: Aus **Rachentupfern** wurde AIV am 1. Tag p.i. bei 5 von 45 Hühnern isoliert. Am 2. Tag stieg die Anzahl der Nachweise auf 29 und erreichte ihr Maximum am 3. Tag p.i. mit 32 AIV-Nachweisen. Danach fiel die Nachweisrate ab. AIV konnte mittels Rachentupfern bis zum 10. Tag p.i. bei einem Huhn festgestellt werden.

Mit Hilfe der **Kloakentupfer** konnte AIV am 1. Tag p.i. bei fünf und am 2. Tag p.i. bei 20 von 45 Hühnern reisoliert werden. Am dritten und 4. Tag fiel die Nachweisrate auf 16 (9 gestorben) und am 5. Tag p.i. auf 11 Reisolate ab (weitere 10 gestorben). Danach wurde das Virus sporadisch bis zum 10. Tag p.i. nachgewiesen.

Aus **Sammelkotproben** konnte das AIV nur vereinzelt nachgewiesen werden. Die Virusreisolierung aus den Tupfern folgt dem Verlauf der nachgewiesenen Virämie (siehe 4.1.2.1).

Die Berechnung des Rangkorrelationskoeffizienten nach SPEARMAN und dem KRUSAL-WALLIS-Test belegt, dass mit steigender Virusdosis die Dauer der Virusausscheidung im Mittel hoch signifikant zunimmt. Ebenso bestätigte eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwertwiederholungen, dass der früheste mittlere Virusnachweis hoch signifikant von der injizierten Dosis abhängt ($p = < 0,001$).

Tabelle 12: Chronologischer Verlauf der AIV-Nachweise aus Rachen, Kloake und Sammelkot der Hühner in HEF-Kultur in Abhängigkeit von der Virusdosis an Tagen p.i. (5 Hühner je Verdünnungsstufe)

Probe	Virusdosis/ Huhn		Anzahl AIV-Nachweise aus den Proben in HEF-Kulturen in Abhängigkeit von der Virusdosis											
	Verdünnung (log ₁₀)	ELD ₅₀ je Huhn (log ₁₀)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Rachen	1	6,7	0	4	5	5	4	4	0	0	0	0	0	0
	2	5,7	0	0	5	5	2	0	0	0	0	0	0	0
	3	4,7	0	0	4	4	3	0	0	0	0	0	0	0
	4	3,7	0	0	4	5	4	2	2	3	0	0	0	0
	5	2,7	0	1	4	5	4	3	2	2	0	0	0	0
	6	1,7	0	0	4	4	5	3	2	4	4	1	0	0
	7	0,7	0	0	3	3	4	4	2	2	2	1	1	0
	8	0,07	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0
	9	0,007	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Σ		0	5	29	32	27	17	9	12	6	2	1
Kloake	1	6,7	0	2	5	3	3	1	0	0	0	0	0	0
	2	5,7	0	0	3	3	1	0	0	0	0	0	0	0
	3	4,7	0	0	4	2	3	0	0	0	0	0	0	0
	4	3,7	0	1	4	3	2	3	0	1	1	1	1	0
	5	2,7	0	0	2	3	3	3	1	0	0	2	0	0
	6	1,7	0	2	2	1	2	1	1	0	0	0	0	0
	7	0,7	0	0	0	0	1	2	1	1	0	1	2	0
	8	0,07	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
	9	0,007	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Σ		0	5	20	16	16	11	4	3	2	5	4
Kot	1	6,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	5,7	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	4,7	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	4	3,7	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	5	2,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	1,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	0,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	0,07	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	9	0,007	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Σ		0	0	2	1	2	0	0	0	0	0	0
Todesfälle			0	0	0	0	9	10	2	0	0	0	0	0

4.1.3 Befunde an Hühnern nach der experimentellen AIV-Infektion

4.1.3.1 Klinische Symptomatik der Hühner nach Infektion mit AIV

Die Dauer der Inkubationszeiten war direkt abhängig von der verwendeten Infektionsdosis des AIV und schwankte zwischen 1-5 Tagen. Der Krankheitsverlauf war ebenfalls dosisabhängig. Er war bei hoher Virusdosis sehr kurz und endete fast immer letal. Es kam aber zu keinen perakuten Todesfällen. Insgesamt zeigten 34 von 45 Hühnern nach Infektion mit AIV in den Verdünnungsstufen 10^{-1} - 10^{-9} eine klinische Erkrankung, die bei 21 Hühnern zum Tod führte.

Die erkrankten Hühner zeigten zu Beginn Allgemeinsymptome wie gesträubtes Gefieder, sistierende Futter- und Wasseraufnahme und eine hochgradige Apathie. Im Folgenden traten häufig Zyanosen der unbefiederten Haut von Ständern und Kopfanhängen, teilweise auch Spitzennekrosen des Kammes, auf. Ein starker grünlicher Durchfall war bei allen erkrankten Hühnern festzustellen. Kurz vor dem Exitus zeigten diese Hühner zum Teil zentralnervöse Symptome wie Ataxien und Tremor. Die Entwicklung eines Kopfödems konnte nur bei 4 von 45 Tieren beobachtet werden. Bei 3 Tieren zeigte sich eine Trübung der Kornea. Bei den 24 überlebenden Hühnern wurden keine zentralnervösen Symptome festgestellt. Sie zeigten 2-3 Tage lang eine hochgradige Apathie und Diarrhöe, danach aber eine deutliche Besserung des Allgemeinbefindens und begannen erneut mit der Futter- und Wasseraufnahme.

4.1.3.1.1 Intravenöser Pathogenitätsindex (IVPI)

Es wurde gemäß der Methodik der OIE-Vorschrift ein IVPI von 2,3 für das Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9) errechnet. Zusätzlich zur geforderten Virusverdünnung von 1:10 zur Bestimmung des IVPI (OIE, 2004) wurden die Virusverdünnungsstufen 10^{-2} - 10^{-9} verwendet. Die einzelnen Werte sind in Tabelle 13 enthalten. Bis zu einer Verdünnung von 10^{-5} wurde ein IVPI errechnet, der bei 1,3 oder höher liegt. Mit weiter sinkender Virusdosis wird auch der IVPI-Wert kleiner (Tabelle 13).

4.1.3.1.2 Antikörperbildung nach AIV-Infektion der Hühner

Die Blutseren von rekonvaleszenten Hühnern wurden am Versuchsende (14 Tage p.i.) mittels HAH-Test auf die Ausbildung AIV-spezifischer Antikörper überprüft. Die Titer sind in der Tabelle 14 aufgeführt. Die Höhe der Antikörpertiter wird kaum von der eingesetzten Virusdosis ($8-12 \log_2$) beeinflusst. Bei den Hühnern, die mit den niedrigsten Virusverdünnungen $10^{-1}-10^{-3}$ infiziert worden waren, starben alle Tiere, und es konnte kein Blut mehr gewonnen werden. Eine deutliche Serokonversion zeigten bei Versuchsende am 14. Tag p.i. die zwischenzeitlich erkrankten Hühner, die mit den Verdünnungen $10^{-4}-10^{-7}$ infiziert wurden und die Infektion überlebten. Von den fünf Hühnern, die mit 10^{-8} verdünntem Virus infiziert wurden, konnte nur bei einem Tier eine Serokonversion nachgewiesen werden (Tabelle 14). Folglich enthielt das Serum von erkrankten Hühnern AIV-Antikörper. Die applizierte Virusverdünnung 10^{-9} führte zu keiner Erkrankung und eine Serokonversion blieb aus. Hühner, die keine Symptomatik entwickelten, wiesen später auch keine Antikörpertiter auf.

Tabelle 14: Antikörpertiter in Blutseren von rekonvaleszenten Hühnern

*Anzahl der Hühner, von denen Serum für diesen Test gewonnen werden konnte

Parameter	Virusverdünnung ($-\log_{10}$)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
n Hühner*	0	0	0	3	2	4	4	5	5
Virusdosis (\log_{10})	6,7	5,7	4,7	3,7	2,7	1,7	0,7	0,07	0,007
IVPI	2,3	2,4	1,7	1,3	1,6	0,9	0,9	0,1	0
HAH-Titer der überlebenden Hühner (\log_2)	–	–	–	9	9	7	8	8	0
	–	–	–	9	12	8	8	0	0
	–	–	–	8	–	8	8	0	0
	–	–	–	–	–	8	0	0	0
	–	–	–	–	–	–	–	0	0

4.1.3.1.3 Letale und infektiöse Dosis der AIV-infizierten Hühner

Die errechnete LD_{50} , bei der die Hälfte aller infizierten Hühner sterben, beträgt $10^{5,3}/\text{ml}$ bzw. $10^{4,3}/0,1 \text{ ml}$. Mittels des KRUSAL-WALLIS-Test wurde festgestellt, dass der mittlere Todestag p.i. hoch signifikant abhängig von der injizierten Virusdosis ist ($p = 0,0008$). Auch die Überlebensrate der Hühner hängt hoch signifikant von der verwendeten Dosis

ab ($r_s = -0,708$; $p < 0,0001$). Die ID_{50} der Hühner liegt zwischen einer Virusdosis von $10^{1,7}/\text{ml}$ und $10^{0,7}/\text{ml}$. Bei der Dosis von $10^{1,7}/\text{ml}$ wurden noch sämtliche Hühner virämisch und wiesen Krankheits-anzeichen auf. Bei der nächst geringeren Virusdosis von $10^{0,7}/\text{ml}$ bildete nur noch eines von fünf Hühnern sowohl eine Virämie als auch eine Symptomatik aus.

4.1.3.1.4 Minimale infektiöse Dosis und Minimale letale Dosis der AIV-infizierten Hühner

Als MID konnte ein Virustiter von $10^{1,7}/\text{ml}$ der Virusstamm suspension bei einem errechneten IVPI von 0,9 festgestellt werden. Dies entspricht der Virusverdünnung von 10^{-7} , nach ihrer Injektion erkrankten noch alle Hühner. Die MLD beträgt 10^{-2} bei einem errechneten IVPI von 2,4 bzw. 10^{-3} mit einem errechneten IVPI von 1,7, wenn berücksichtigt wird, dass in dieser Gruppe ein Huhn vermutlich nicht infiziert wurde. Die Krankheitsdauer verlängerte sich bei Zunahme der Virusverdünnung, gleichzeitig nahm die Todesrate ab.

4.1.3.2 Pathologisch-anatomische Veränderungen der Hühner

Alle verwendeten 69 Hühner wurden pathologisch-anatomisch untersucht. Von diesen zeigten 19 keine äußeren Krankheitsanzeichen und wiesen kaum oder keine pathologischen Veränderungen auf. Das AIV führte bei den restlichen 50 Hühnern zu folgenden pathologisch-anatomischen Veränderungen: Die äußeren Befunde bestanden in nahezu allen Fällen (41 von 50) in Hämorrhagien und Zyanosen der unbefiederten Haut, besonders der Ständer, des Kamms und der Kehllappen, und manchmal auch der restlichen Körperoberfläche. Die Spitzen der Käme wurden häufig nekrotisch (29 von 50). Unabhängig vom Ausgang wurden RVM hin und wieder im Gefieder, im Ösophagus und im Kropf gefunden. Einhergehend mit der klinischen Symptomatik trat eine starke Blutstauung in allen inneren Organen auf (37 von 50). Auf den inneren Organen und den serösen Häuten wurden sehr häufig Petechien beobachtet (48 von 50). Bei 18 von 50 Hühnern konnten eine Pankreatitis, die mit Vergrößerung, Verfärbung und herdförmigen Nekrosen einherging, festgestellt werden. Außerdem waren häufig eine Myokarditis und/ oder Perikarditis (insgesamt 29 von 50) und eine Enteritis (20 von 50) festzustellen. Veränderungen des Respirationstrakts konnten nur in den

Nasenmuscheln beobachtet werden: Sie waren frei von RVM, aber sehr häufig stark gerötet und mit wenig klarem Schleim bedeckt (42 von 50). Die Milz war bei 12 von 50 Hühnern geschrumpft und wirkte schlaff, wies aber eine starke Proliferation der Milzfollikel auf. Insgesamt konnte bei fünf Hühnern eine Eidotterperitonitis diagnostiziert werden. Zu Ödemen, speziell im Bereich des Kopfes, die in der Literatur als häufiges Symptom angegeben werden (SWAYNE und HALVORSON, 2008), kam es nur in vier Fällen.

4.1.3.3 Histopathologische Veränderungen der Hühnerorgane

Als häufigste histopathologische Diagnose konnte bei 40 von 69 Hühnern eine hochgradige akute Blutstauung in Lungen, Milz, Leber, Pankreas festgestellt werden. Eine Pankreatitis wurde in sieben von 69 Fällen nachgewiesen. Bei weiteren sieben Hühnern wurde eine Milzhyperplasie (viermal follikuläre und dreimal pulpöse Hyperplasie) und bei sechs Tieren eine geringgradige, gemischtzellige Peri- und Myokarditis mit Fibrinauflagerungen bestätigt. Bei zwei Hühnern wurde eine Pneumonie und bei einem ein Emphysem nachgewiesen.

4.1.3.4 Immunhistochemische Befunde in Hühnerorganen

Die AIV-Infektion konnte für alle i.v. infizierten Hühner in einem oder mehreren Organen mit der PAP-Methode bestätigt werden. Eine genaue Auswertung der Organverteilung erfolgte nicht, da die Färbungen der Organschnitte in erster Linie als Kontrolle zur Beurteilung der Färbungen der RVM dienten (4.2.3.2). Die Reaktionen der Detektionsantikörper (Primärantikörper Kaninchen Anti-Influenza (α -RNP), Sekundärantikörper Schwein Anti-Kaninchen IgG) mit dem Influenza A-Ribonukleoprotein im Gewebe sind als spezifisch für AIV zu werten, da sie im Gewebe des AIV-naiven Huhns nicht auftraten. Die folgenden Abbildungen zeigen beispielhaft immunhistochemische AIV-spezifische Antigen-Antikörper-Präzipitate in der Lunge, im Pankreas und der Leber von AIV-infizierten Hühnern. Bei der Antigen-Verteilung im Gewebe fällt auf, dass sich die farbigen Niederschläge bei beiden Nachweissystemen in den Zellkernen des jeweiligen Gewebes befinden. Die Präparate in der Abbildung 8 sind mit der PAP-Methode bearbeitet worden. Die jeweils mit einem Pfeil bezeichneten bräunlichen Verfärbungen stellen spezifische Reaktionen des Sekundärantikörpers mit

dem Primärantikörper gegen AIV dar. AIV-Antigene konnten demnach mit dieser Methode in den Geweben von AIV-infizierten Hühnern detektiert werden.

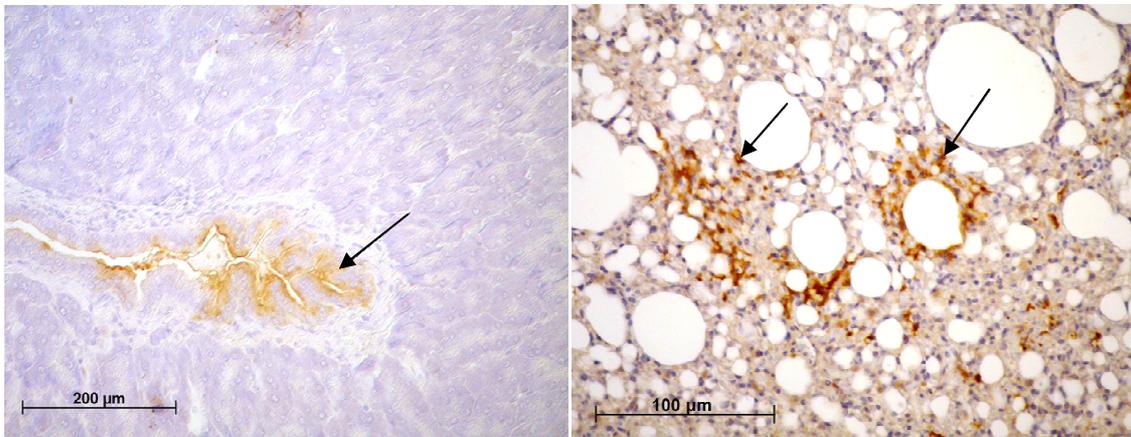


Abbildung 8: Immunhistochemische Färbung (PAP-Methode) der Organe eines AIV-infizierten Huhnes

Rechts: Antigen-Antikörper-Präzipitate in den Zellen eines Ausführungsganges des Pankreas (Pfeil). Links: Antigen-Antikörper-Präzipitate im Alveolarepithel (Pneumozyten) und im Bindegewebe (Fibrozyten) oder im Interstitium der Lunge (Pfeil).

Abbildung 9 zeigt exemplarisch die immunhistochemische Färbung einer Hühnerleber nach der ABC-Methode. Bei diesem an AIV erkrankten Huhn wurde histologisch eine Hepatitis festgestellt. Die für AIV charakteristischen rötlichen Antigen-Antikörper-Präzipitate sind in erster Linie in den Zellkernen der Hepatozyten festzustellen.

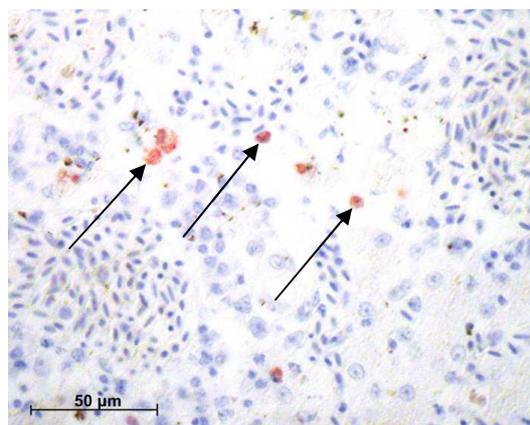


Abbildung 9: Immunhistochemische Färbung Hühnerleber (ABC-Methode)

Histologischer Schnitt einer Hühnerleber nach immunhistochemischer Färbung. Charakteristische Antigen-Antikörper-Präzipitate in einzelnen Hepatozyten-Zellkernen (Pfeile).

4.1.3.5 Bakteriologische Untersuchungen der Hühnerorgane

Bei der bakteriologischen Kontrolluntersuchung der Organe aller 69 Hühner nach Tod oder am Versuchsende wurde ein geringgradiger unspezifischer Keimgehalt festgestellt. So wurden *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp. und *Streptococcus* spp. isoliert. Bei drei von 20 Hennen mit Eidotterperitonitis und bei acht von insgesamt 69 Hühnern konnte *Escherichia (E.) coli* gering- bis mittelgradig nachgewiesen werden. Es wurden mehr Kolonien von *E. coli* festgestellt, wenn die Hühner über Nacht gestorben waren und morgens tot aufgefunden wurden.

4.1.3.6 Virusreisolierung aus Organen der Hühner

Es wurde versucht, das AIV aus den Organen der Hühner zu reisolieren, um die nach der Infektion mit AIV entstandene mittels Virusisolierung aus Erythrozyten nachgewiesene Virämie zusätzlich zu verifizieren. Das Virus konnte bei allen insgesamt 37 an den Folgen der Infektion gestorbenen Tieren in allen untersuchten Organen sowohl mit Zell- als auch mit Eikultur nachgewiesen werden. Aus Organen von rekonvaleszenten Hühnern konnte nach Tötung bei Versuchsende (14 Tage p.i.) kein Virus isoliert werden.

4.2 Experiment I - Nachweis des AIV in den Roten Vogelmilben

Der besseren Übersicht wegen sind die Ergebnisse der AIV-Aufnahme durch die RVM aus Experiment I und Experiment II in Tabelle 15 zusammengeführt. Die Hälfte der aus den Milbenboxen täglich entnommenen Milben (25 von 50) wurde in den Versuchen II/2-4 äußerlich mit Formalin desinfiziert (Tabelle 15). Alle Milben wurden homogenisiert und auf HEF-Kulturen und in Bruteier verimpft, um möglicherweise aus diesen Milben mit dem Hühnerblut aufgenommenes Virus reisolieren zu können.

Alle in diesem Experiment mit AIV i.v. infizierten Hühner erkrankten schwer und starben innerhalb von wenigen Tagen. Die Sektionsbefunde und sämtliche anschließenden Untersuchungen ihrer Organe sind unter Abschnitt 4.1.3 zusammen mit den Befunden der Hühner des Vorversuchs beschrieben, da die Befunde aller i.v. infizierten Hühner einander entsprechen. Das zur Infektion eingesetzte AIV konnte

sowohl aus von diesen Hühnern genommenen Rachen-/Kloakentupfern als auch aus ihrem Blut reisoliert werden.

4.2.1 Virusreisolierung aus Roten Vogelmilben mittels HEF-Kulturen

In Tabelle 15 ist die Reisolierung des AIV in HEF-Kulturen nach Inokulation mit homogenisierten RVM dargestellt. Das AIV konnte aus den RVM zwischen einem bis zu fünf Tagen post sugo (p.s.) nachgewiesen werden. Dabei konnten keine großen Unterschiede zwischen den äußerlich desinfizierten und den nicht-desinfizierten RVM festgestellt werden. In nur einem Fall (II/2 Box A) konnte bei den desinfizierten RVM kein AIV reisoliert werden. Nach dem 5. bis zum 14. Tag p.s. konnte kein AIV in HEF-Kulturen mehr reisoliert werden. Eine Titration zur Feststellung des Virustiters in den homogenisierten RVM, um eventuell Rückschlüsse darauf ziehen zu können, wie viele RVM nötig sind, um eine Infektion bei einem AIV-naiven Huhn auszulösen, wurde ebenfalls durchgeführt. Ein deutlicher, AIV-typischer ZPE wie in Abbildung 6 dargestellt, war aber nicht erkennbar.

Tabelle 15: AIV-Reisolierung aus Roten Vogelmilben nach deren Blutmahlzeit(en) an AIV-infizierten Hühnern mittels HEF-Kultur

p.s. = post sugo (nach dem Saugen/ der Blutmahlzeit); ¹AF bzw. BF = gleiche Probe wie A bzw. B, aber äußerlich mit Formalin desinfizierte RVM

Exp. I/ Versuch	Box	Virusreisolierungen (HEF) aus RVM an Tagen p.s.								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9-14
I/1	A	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	-	hier nur A durchgeführt								
I/2	A	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	B	+	+	+	-	-	-	-	-	-
I/3	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	+	+	-	-	-	-	-	-	-
I/4	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Exp. II/ Versuch	Box	Virusreisolierungen (HEF) aus RVM an Tagen p.s.								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9-14
II/1	A	+	+	-	+	-	-	-	-	-
	B	+	+	+	+	+	-	-	-	-
II/2	A	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	AF ¹	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	B	+	+	-	-	-	-	-	-	-
II/3	BF ¹	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	A	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	AF ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B	+	+	-	-	-	-	-	-	-
II/4	BF ¹	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	A	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	AF ¹	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	B	+	+	+	-	-	-	-	-	-
II/4	BF ¹	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	A	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	AF ¹	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	B	+	+	+	-	-	-	-	-	-

4.2.2 Virusreisolierung aus Roten Vogelmilben in embryonierten Hühnereiern und HA-Test

Zunächst wurden Versuche zur Virusisolierung aus nicht desinfizierten RVM durchgeführt (Versuche I/1-4 und II/1, Tabelle 16). Die mit Homogenisaten aus RVM inokulierten Bruteier starben innerhalb der ersten 48 Stunden nach Inokulation ab, sofern die Inokulation zu einer Infektion führte. Alle AAF aus Bruteiern mit abgestorbenen Embryonen enthielten hämagglutinierendes Virus. AAF von Bruteiern, deren Embryonen nach Ablauf von sieben Tagen durch Kühlung abgetötet wurden,

wiesen keine HA-positiven AAF auf. Insgesamt war die Isolierung des AIV aus den RVM mittels embryonierter Hühnereier häufiger und über einen längeren Zeitraum möglich als die Reisolierung mittels HEF-Kulturen. Am häufigsten konnte das Virus in den ersten vier Tagen nach der Blutmahlzeit der RVM reisoliert werden und zwar mit gemittelten Virustitern zwischen $10^{0,2}$ - 10^7 . In drei Versuchswiederholungen (I/4, II/1, II/4) konnte das AIV bis zum 9. bzw. 10. Tag p.s. reisoliert werden (Tabelle 16). Nach dem 10. bis zum 14. Tag p.s. konnte kein AIV mehr isoliert werden.

Die Hälfte der Milben wurde in den Versuchen II/2-4 äußerlich mit Formalin desinfiziert (Tabelle 16). Auch in diesen Homogenisaten ließ sich AIV nachweisen, was beweist, dass sich AIV im Körper der Milben befand, und es sich nicht um Kontaminationen der äußerlichen Oberfläche der Milben handelt. Die Virustiter der mit Formalin desinfizierten RVM unterscheiden sich nicht wesentlich von denen der nicht desinfizierten RVM.

In ausgewählten an das FLI eingesendeten HA-positiven AAF konnte mit der PCR das zur Infektion der Hühner eingesetzte AIV auch in den Reisolaten aus RVM nachgewiesen werden. Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen dieser AAF wurden Partikel gefunden, die morphologisch den Orthomyxoviridae entsprechen. Demnach konnte AIV direkt aus RVM isoliert werden, die zuvor an AIV-infizierten Hühnern Blut gesaugt hatten.

Tabelle 16: Virusreisolierungen aus Roten Vogelmilben nach deren Blutmahlzeit(en) an AIV-infizierten Hühnern mittels embryonierter Hühnereier

HA-Titer in \log_2 . – = Titer < 1

¹Mittelwerte aus 5 embryonierten Eiern je Tag bzw. 3 embryonierten Eiern je Tag ab Versuch II/2. ²AF bzw. BF = gleiche Probe wie A bzw. B, aber äußerlich mit Formalin desinfizierte RVM

Exp. I/ Versuch	Box	Tage nach der Blutmahlzeit an AIV infiziertem Huhn ¹										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11-14
I/1	A	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	–	hier nur A durchgeführt										
I/2	A	–	–	1,0	–	–	–	–	–	–	–	–
	B	–	1,0	0,6	–	–	–	–	–	–	–	–
I/3	A	–	2,4	–	–	–	2,4	–	–	–	–	–
	B	1,6	2,6	–	–	–	–	–	–	–	–	–
I/4	A	5,0	5,2	4,8	–	–	0,2	–	–	1,2	–	–
	B	5,8	5,6	6,2	–	–	0,6	–	–	1,2	–	–
Exp. II/ Versuch	Box	Tage nach der Blutmahlzeit an AIV infiziertem Huhn ¹										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11-14
II/1	A	7,0	1,6	2,8	–	–	–	4,8	–	–	–	–
	B	6,6	4,0	2,6	1,2	–	2,8	4,6	2,8	0,8	1,8	–
II/2	A	6,0	4,7	5,0	–	–	–	–	–	–	–	–
	AF ²	6,0	6,0	6,0	–	–	–	–	–	–	–	–
	B	–	6,0	6,3	4,0	2,3	–	–	–	–	–	–
II/3	BF ²	6,5	4,5	7,0	3,0	3,5	–	–	–	–	–	–
	A	7,0	5,0	–	0,7	–	–	–	–	–	–	–
	AF ²	4,0	2,3	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	B	6,7	–	–	5,3	–	–	–	–	–	–	–
II/4	BF ²	4,0	5,0	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	A	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	AF ²	–	0,7	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	B	6,0	3,3	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	BF ²	6,0	–	–	–	–	–	–	–	0,5	–	–

4.2.3 Histologische und immunhistochemische Studien an Roten Vogelmilben

4.2.3.1 Histologische Befunde von Roten Vogelmilben

Durch die histologischen Schnitte von RVM konnte die Verteilung des durch den Saugakt aufgenommenen Blutes im Milbenkörper dargestellt werden. Die körperlichen Veränderungen nach einer Blutaufnahme und der sich anschließende Blutabbau sind in den Schnitten der RVM nachvollziehbar. Aufgrund der Verteilung des Blutes ist davon

auszugehen, dass sich der Darmsack der Milbe über das gesamte Abdomen erstreckt. Es gelang einzelne Organe, wie die Mitteldarmdrüse, die Speicheldrüse und den Darmtrakt sowie Anteile des Reproduktionstrakts mit einem Ei zu bestimmen. Weiterhin sind Anschnitte der Mundwerkzeuge und der Gliedmaßen sichtbar. Exemplarisch folgen dazu die Abbildungen 10 und 11. Es konnten keine Unterschiede zu Geweben festgestellt werden, die von nüchternen und blutgefüllten, AIV-naiven Milben stammten. Deshalb ist davon auszugehen, dass das AIV-haltige Blut keine erkennbaren histopathologischen Veränderungen bei den RVM verursachte.

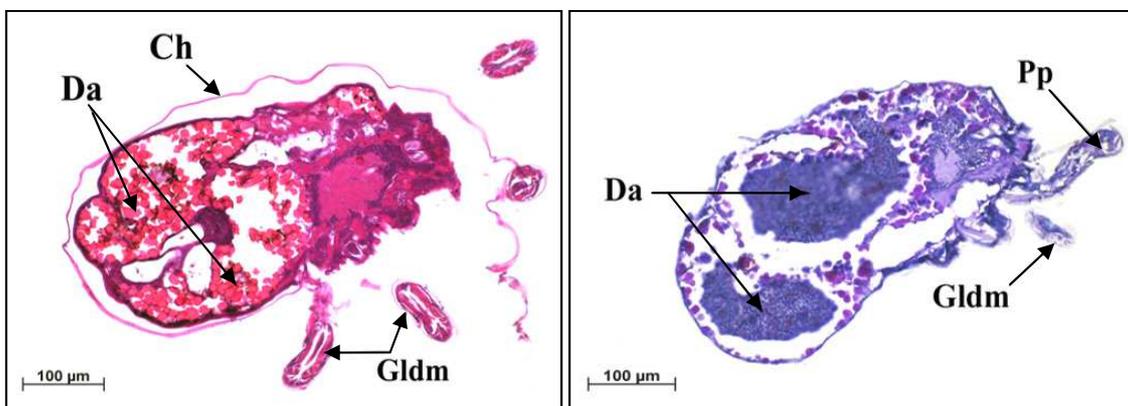


Abbildung 10: Histologische Schnitte zur Darstellung der Innenstrukturen einer Roten Vogelmilbe, 1. Tag p.s., HE-Färbung (links), PAS-Färbung (rechts)

Adulte RVM. Da = Darmanschnitte mit im Abbau begriffenen Erythrozyten, Ch = Äußere Chitinhülle, Gldm = chitinöse Anteile der Gliedmaßen, Pp = Pedipalpus (Sagittalebene), p.s. = post sugo.

Längsschnitt mit leicht gekippter Sagittalebene einer blutgefüllten adulten RVM einen Tag p.s.. Der Darmsack mit dem aufgesaugtem Blut erstreckt sich über das gesamte Abdomen. Frisch aufgenommenes Blut erscheint in der HE-Färbung hellrot und in der PAS-Färbung kräftig violett. Rechts ist zusätzlich ein Pedipalpus, ein lateraler Anteil der Mundwerkzeuge, mit angeschnitten.

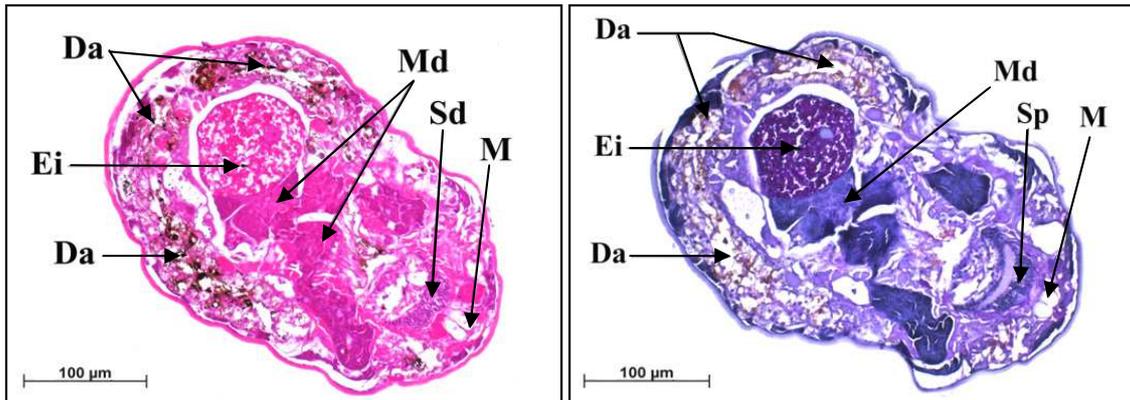


Abbildung 11: Histologische Schnitte zur Darstellung der Innenstrukturen einer Roten Vogelmilbe, 5. Tag p.s., HE-Färbung (links), PAS-Färbung (rechts)

Adulte RVM mit Ei; Da = Darmabschnitte mit im Abbau begriffenen dunkelbraun gefärbten Erythrozyten, Md = Mitteldarmdrüse, M = Mundwerkzeuge, Sd = Speicheldrüse (Frontalebene), p.s. = post sugo.

Längsschnitt durch adulte blutgefüllte RVM fünf Tage nach der Blutaufnahme in Frontalebene. Im Reproduktionstrakt ist ein Ei in Ausbildung zu differenzieren. Weiterhin abgrenzbar sind Anschnitte der Mundwerkzeuge, der Mitteldarmdrüse, der Speicheldrüse und des Darmtrakts. In den Darmanschnitten ist teilweise abgebautes Blut zu sehen, welches sich in beiden Färbungen braunrot darstellt.

4.2.3.2 Immunhistochemischer Nachweis von AIV in den Roten Vogelmilben

Durch die immunhistochemischen Färbungen wurde das Ribonukleoprotein des AIV im Darmtrakt der RVM lokalisiert. Insgesamt konnten durch die störende Interaktion der Detektionsantikörper der jeweiligen Methode mit dem Chitin der Roten Vogelmilben nur wenige immunhistochemisch gefärbte Schnitte der AIV-infizierten RVM als positiv bewertet werden. Exemplarisch für Färbungen nach der PAP-Methode sind die Schnitte in der Abbildung 12 abgebildet. Schnitte, die nach der ABC-Methode bearbeitet wurden, sind in den Abbildung 13 gezeigt.

Alle durchgeführten Negativkontrollen wiesen in den typischen Lokalisationen des Virusantigens im Darmtrakt der RVM keine charakteristischen Farbreaktionen auf (Abbildung 14). Eine unspezifische Anfärbung dieser Gewebe durch die übrigen Reagenzien war somit ausgeschlossen. Bei Verwendung der PAP-Methode sind viele bräunliche Färbeartefakte festzustellen, die den gesamten Schnitt leicht bräunlich verfärbten. Aus diesem Grund wurden einige Schnitte zusätzlich nach der ABC-

Methode gefärbt. Es konnte festgestellt werden, dass hier in geringerem Maße Färbeartefakte auftraten (Abbildung 13).

Durch die geringe Größe des Objekts war es schwierig, geeignete Ebenen der RVM mit dem Schnitt zu treffen. Es wurden zwar einige wenige Schnitte hergestellt, bei denen Anteile des Saugapparates der Milben getroffen war, aber durch den störenden Einfluss des Chitins konnte weder bestätigt noch ausgeschlossen werden, dass im Saugapparat der RVM nach dem Saugakt noch AIV zurückbleibt.

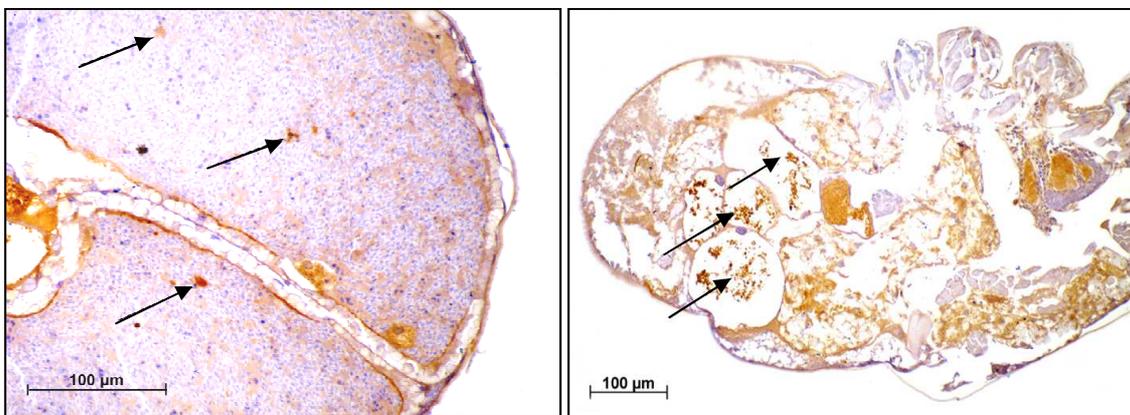


Abbildung 12: Immunhistochemischer Nachweis (PAP-Methode) von AIV-Ribonukleoprotein im Verdauungstrakt und unspezifische Anfärbung des Chitins in einer Roten Vogelmilbe am 4. Tag p.s. (rechts) bzw. am 8. Tag p.s. (links)

Rechts: Ausschnitt aus einem Frontalschnitt einer Roten Vogelmilbe: Bräunliche Antigen-Antikörper-Präzipitate im Darmsack der RVM, die aufgrund ihrer Lokalisation und Färbung als spezifisch für AIV angesehen werden können (Pfeile). Links: RVM mit Erythrozytenresten im Lumen des Darmtrakts, die eine hohe Dichte von bräunlichen Antigen-Antikörper-Präzipitaten aufweisen (Pfeile). Der Blutabbau ist weiter voran geschritten (8. Tag p.s.). (Sagittalschnitt)

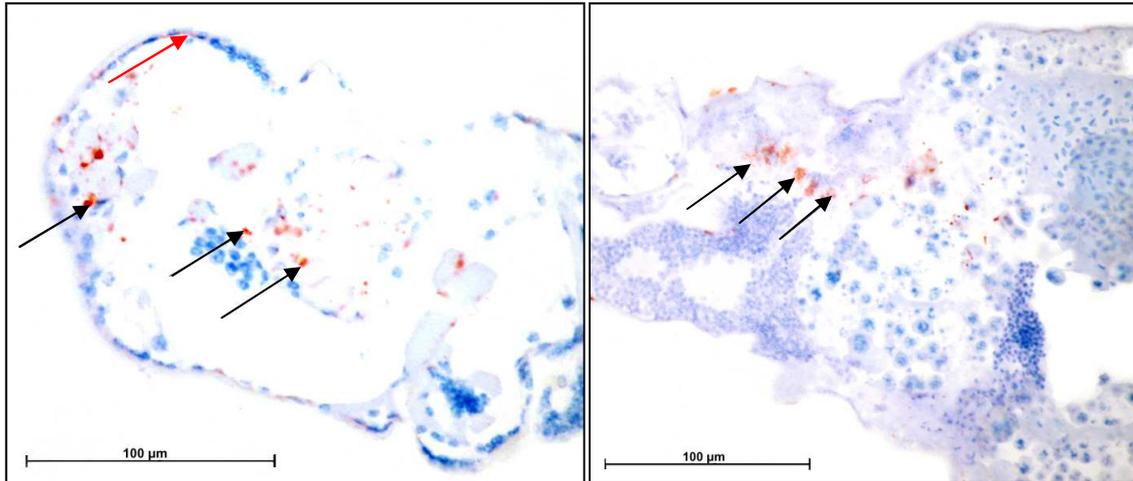


Abbildung 13: Immunhistochemischer Nachweis (ABC-Methode) von AIV-Nukleoprotein und unspezifische Anfärbung des Chitins in einer Roten Vogelmilbe am 3. Tag p.s. (rechts) bzw. am 6. Tag p.s. (links)

Rechts: Rötliche Antigen-Antikörper-Präzipitate im Darmlumen der RVM, die aufgrund ihrer Lokalisation und Färbung als spezifisch für AIV angesehen werden können (Schwarze Pfeile). Unspezifische Anfärbung des Chitins (Roter Pfeil). (Sagittalebene). Links: Rote Antigen-Antikörper-Präzipitate im Darm einer RVM (Schwarze Pfeile). (Gekippte Sagittalebene)

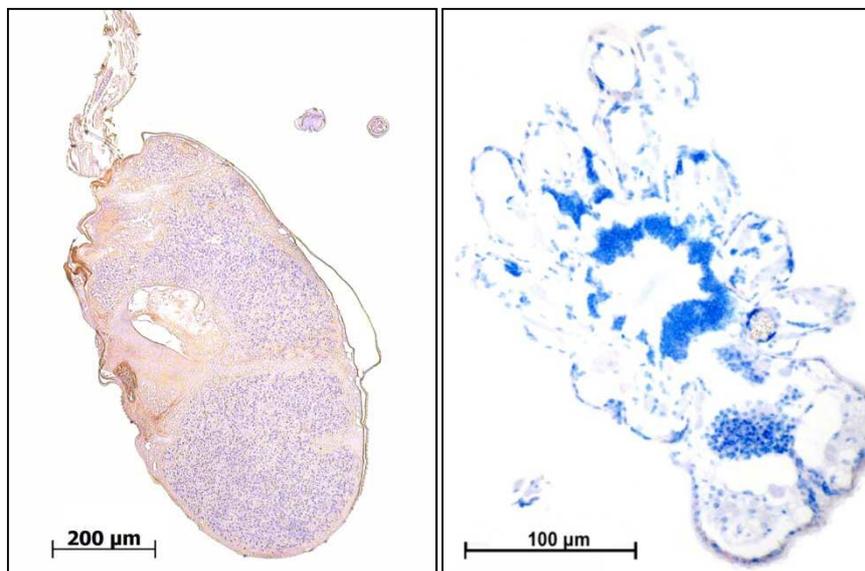


Abbildung 14: Kontrollfärbungen AIV-naiver Roter Vogelmilben

links: Kontrolle PAP-System (Sagittalschnitt); rechts: Kontrolle ABC-Methode (Frontalschnitt). Es sind jeweils keine für AIV charakteristischen Antigen-Antikörper-Präzipitate erkennbar.

4.3 Experiment II - Übertragung von AIV durch Rote Vogelmilben auf Hühner

4.3.1 Befunde von intravenös mit AIV infizierten Hühnern

Die acht Hühner, die intravenös mit AIV infiziert wurden und als Infektionsquelle der RVM dienten, starben innerhalb weniger Tage mit AI typischer Symptomatik. Die Sektionsbefunde und sämtliche weiterführenden Untersuchungen ihrer Organe sind unter Abschnitt 4.1.3 zusammen mit den Befunden der Hühner des Vorversuchs beschrieben, da die Befunde aller i.v. infizierten Hühner einander entsprechen. Das zur Infektion eingesetzte AIV konnte sowohl aus von diesen Hühnern genommenen Rachen-/Kloakentupfern als auch aus ihrem Blut reisoliert werden.

4.3.2 Virusreisolierung aus Roten Vogelmilben

Die Virusreisolierungen aus RVM mittels HEF- und in embryonierten Hühnereiern sind mit den Virusreisolierungen aus RVM aus Experiment I unter Abschnitt 4.2 zusammengefasst.

4.3.3 Virusisolierung aus Hühnern nach Kontakt mit AIV-haltigen Roten Vogelmilben

Von den acht Hühnern, die 24 Stunden mit AIV-haltigen RVM in einem Isolator saßen, entwickelte nur ein Huhn Krankheitssymptome (Huhn 2; Tabelle 17). Es zeigte ab dem 12. Tag nach Milbenkontakt die schon beschriebene Symptomatik der Klassischen Geflügelpest und starb an den Folgen der Infektion nach weiteren zwei Tagen. Dieses Huhn ist das einzige Tier, bei dem sich in HEF-Kulturen, die mit von ihm stammenden Rachen- und Kloakentupfern sowie Blutproben beimpft worden waren, ein ZPE ausbildete (Tabelle 17). Der ZPE konnte in allen HEF-Kulturen, die mit Proben von diesem Huhn beimpft worden waren, am 12.-14. Tag nach Milbenkontakt festgestellt werden.

In der Sektion wurden eine hochgradige Hämostase in allen Organen und eine Pankreatitis festgestellt. Nach dem Tod des Huhns konnte aus seinen Organen sowohl mittels embryonierter Hühnereier als auch mittels HEF-Kulturen AIV reisoliert werden. Elektronenmikroskopisch wurden Viruspartikel gefunden, die morphologisch den Orthomyxoviridae entsprechen. Die AAF der beimpften Bruteier wurde auf

hämagglutinierendes Virus überprüft, und es konnte ein HA-Titer von 2^6 festgestellt werden. Die restlichen sieben Hühner entwickelten keine AIV-typischen Symptome und es konnte kein AIV reisoliert werden.

Bei zwei der acht Hühner (Huhn 3 und 4; Tabelle 17) wurde immunhistochemisch durch die PAP-Methode AIV-Antigen nachgewiesen. Bei diesen zwei Hühnern konnten in Niere und Pankreas charakteristische Farbniederschläge nachgewiesen werden. In den Gewebsschnitten eines nicht infizierten Kontrollhuhns konnten keine charakteristischen Niederschläge beobachtet werden.

Im Serum von vier der acht Hühner wurde ein geringer HAH-Titer festgestellt (Hühner 1, 3, 4 und 6; Tabelle 17). Insgesamt konnte bei vier von acht Hühnern eine leichte Serokonversion beobachtet werden und bei einem von acht Hühnern eine Erkrankung durch AIV. Die RVM konnte demnach AIV auf naive Hühner übertragen.

Die bakteriologische Untersuchung der Hühnerorgane ergab nur bei einem Huhn Hinweise auf eine Infektion mit einem anderen pathogenen Agens (Huhn 8; Tabelle 17). Dieses Huhn entwickelte eine Eidotterperitonitis, die durch eine *E. coli*-Infektion verursacht wurde. Bei diesem Tier konnte keine Infektion mit AIV nachgewiesen werden (Tabelle 17).

Tabelle 17: Nachweis der Übertragung von AIV durch AIV-haltige Rote Vogelmilben auf AIV-naive Hühner

o.b.B. = ohne besonderen Befund

Huhn	Pathologische Veränderungen	Virus-isolierung	Antikörpertiter (log ₂)	Immun-histochemie
1	o.b.B.	negativ	3	negativ
2	Hämostase/ Pankreatitis	positiv	< 1	nicht durchgeführt
3	o.b.B.	negativ	2	positiv
4	o.b.B.	negativ	2	positiv
5	Anämie	negativ	< 1	negativ
6	o.b.B.	negativ	3	negativ
7	Anämie	negativ	< 1	negativ
8	Eidotter-peritonitis	negativ	< 1	negativ

4.4 Experiment III - Wirksamkeitsprüfung von Neopredisan® 135-1 auf die Bewegungsaktivität von Roten Vogelmilben

Da die Bekämpfung der RVM immer noch problematisch ist, wurde in einem weiteren Experiment geprüft, ob die RVM durch Neopredisan® 135-1, einem in Ställen viel verwendeten Desinfektionsmittel, abgetötet werden können. Durch den Nachweis der RVM als mechanischem Vektor des AIV gewinnt deren Bekämpfung zusätzlich an Bedeutung, zumal die Bekämpfung und Eradikation von AIV ebenfalls bisher nicht überall erfolgreich war.

Die Ergebnisse der Wirksamkeitsbestimmung von Neopredisan® 135-1 auf die RVM sind in Tabelle 18 dargestellt. In sechs konsekutiven Versuchsansätzen wurden je Desinfektionsmittel-Konzentration 50 vitale, bewegungsaktive, AIV-naive Vogelmilben verwendet. Beurteilungskriterium für die Wirksamkeit des Neopredisan® 135-1 ist das vollständige, anhaltende Unterbleiben der Beweglichkeit im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Aufgrund der mikroskopischen Beurteilung der

Bewegungsaktivität der Milben zeigte sich, dass Neopredisan[®] 135-1 schon bei einer 0,1 %igen Konzentration einen negativen Einfluss auf die Vitalität der RVM ausübt. Nach einer Stunde Einwirkzeit bewegten sich 6 % der Milben nicht mehr und nach einer weiteren Stunde waren 20 % immobil. Die restlichen 80 % zeigten die normale Bewegungsaktivität.

Bei der nächsthöheren Konzentration von 0,25 % Neopredisan[®] 135-1 reduzierte sich die Mobilität bei 10 % der Milben bereits nach einer Viertelstunde und bei weiteren 10 % nach weiteren 15 Minuten. Nach zwei Stunden Einwirkzeit zeigte nur noch die Hälfte der Vogelmilben Bewegungsaktivität.

Die Konzentration von 0,5 % Neopredisan[®] 135-1 führte nach 15 Minuten zu einer Reduktion der Zahl mobiler Milben um 10 % und nach weiteren 15 Minuten um 50 %. Nach einer Stunde Einwirkzeit waren hier nur noch 20 % der RVM vital, die aber nach einer weiteren Stunde ebenfalls keine Bewegungsaktivität mehr aufwiesen.

Eine Neopredisan[®] 135-1-Konzentration von 1 % bewirkte nach einer Viertelstunde eine Bewegungsreduktion um 20 % und nach 30 Minuten konnte keine vitale Vogelmilbe mehr entdeckt werden.

Die 2 und 3 %ige Lösung des Desinfektionsmittels Neopredisan[®] 135-1 tötete 98 % aller RVM innerhalb von 15 Minuten ab. Nach weiteren 15 Minuten konnte keine einzige bewegliche Milbe mehr beobachtet werden. Die höheren Konzentrationen von 4 und 5 % töteten sämtliche RVM innerhalb von 15 Minuten ab.

Um zu prüfen, ob die unterbundene Laufaktivität der Milben auf eine gegebenenfalls nur vorübergehenden „Lähmung“ der Gliedmaßen in Gegenwart des Wirkstoffs beruhte oder ob das Neopredisan[®] 135-1 eine tatsächliche Abtötung auslöste, wurden die Petrischalen mit RVM und Neopredisan[®] 135-1 für einen Tag bei Zimmertemperatur aufbewahrt und nochmals mikroskopisch untersucht. Die Nachprüfung ergab bei der geringsten Konzentration des Präparats von 0,025 % immer noch 100 % vitale Milben.

5 Diskussion

Das Ziel dieser Studie war es zu klären, ob die Rote Vogelmilbe (RVM, *Dermanyssus gallinae*) durch zwei- oder mehrfaches Blutsaugen Influenza A-Virus (AIV) von virämischen auf nicht virämische, AIV-empfindliche Hühner übertragen kann und dadurch entweder als mechanischer oder als biologischer Vektor in Betracht kommen kann. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden ein zytopathogenes AIV, AIV-empfindliche Hühner und zunächst AIV-freie RVM aus einem Bestand mit Legehennen sowie sensitive Virusnachweissysteme verwendet.

5.1 Die heutige Bedeutung der Aviären Influenza

Ausbrüche der Aviären Influenza (AI) sorgen immer wieder für große Schlagzeilen in den Medien. Seit Ende der 90er Jahre kam es wiederholt zu Seuchenzügen der Klassischen Geflügelpest in mehreren asiatischen, afrikanischen und europäischen Ländern (ALEXANDER, 2007; BROWN, 2010). Dabei waren die Verbreitungswege der Viren selten nachvollziehbar: Ein zunächst niedrigpathogenes und nachfolgend hochpathogenes AIV vom Subtyp H7N1 verursachte 1999/ 2000 in Oberitalien 413 Ausbrüche (CAPUA und MUTINELLI, 2001). Festgestellt wurden auch wiederholte AI-Ausbrüche in denselben Betrieben, obwohl diese nach Durchführung der angeordneten Maßnahmen von den zuständigen Behörden zur Wiederbelegung freigegeben worden waren. Insgesamt starben bzw. wurden 12,8 Mio. Nutzvögel getötet (CAPUA und MUTINELLI, 2001).

2003 verursachte ein hochpathogenes AIV vom Subtyp H7N7 255 Ausbrüche in den Niederlanden, acht in Belgien und einen in Deutschland. Der H7N7-Virus-Seuchenzug führte zum Tod bzw. zur Tötung von über 25 Mio. Hühnern und Puten (ALEXANDER, 2007). Zudem wurden in den Niederlanden 89 Infektionen bei Menschen, von denen eine fatal endete, diagnostiziert. Alle infizierten Personen waren direkt in die Arbeiten nach dem Geflügelpestausbuch involviert (DE JONG et al., 2009).

Seit 1996 führt der Seuchenzug eines ursprünglich asiatischen AIV des Subtyps H5N1 auf drei Kontinenten zu Geflügelpestausbüchen. Das Virus breitete sich über die Hongkonger Geflügelmärkte in ganz Asien aus und streute westwärts bis nach Afrika und Europa (XU et al., 1999; SIMS et al., 2005). Ungewöhnlich ist, dass nicht nur Ausbrüche beim Nutzgeflügel beobachtet wurden, sondern sogar innerhalb von Wildvogelpopulationen, insbesondere bei Wasservögeln, die als Reservoir für AIV gelten und in aller Regel nicht erkranken (ALEXANDER, 2000; NORMILE, 2005; ALEXANDER, 2007). In Deutschland verursachte das H5N1-Virus in der freien Wildbahn nur einzelne Todesfälle (662 Wildvögel, drei Katzen, ein Steinmarder). Es wurde allerdings auch achtmal in Nutzgeflügelbeständen diagnostiziert (WEBER et al., 2007; FLI, 2007, 2008, 2009). H5N1 wurde in Deutschland das letzte Mal im März 2009 aus einer Wildente isoliert (FLI, 2009).

Von Dezember 2008 bis Januar 2009 wurden im Kreis Cloppenburg in Niedersachsen 35 Ausbrüche eines NPAIV vom Subtyp H5N3 amtlich festgestellt. Betroffen waren in erster Linie Putenbestände. 570.000 Tiere wurden im Rahmen der seuchenhygienischen Maßnahmen getötet, um die Verbreitung des Virus einzudämmen. Das letzte Sperrgebiet wurde am 20.02.2009 aufgehoben (BROWN, 2009; FLI, 2009).

Die weltweit durchgeführten Eradikationsmaßnahmen waren demnach bislang wenig erfolgreich und die Problematik wiederkehrender HPAIV-Ausbrüche und zirkulierender NPAIV in Wildvögeln, besonders im Wassergeflügel, besteht weiterhin. Das Auftreten von NPAIV mit den Subtypen H5 und H7 ist ebenfalls prekär, da sie potenziell innerhalb von mehreren Passagen in hochgradig empfänglichen Hühnern und Puten zu HPAIV mutieren können (WEBSTER, 1997; WEBSTER und HULSE, 2004; ALEXANDER, 2006; SWAYNE und HALVORSON, 2008). Die asiatischen AIV-Varianten besitzen durch ihre offenbar erhöhte Humanpathogenität eine besondere Bedeutung und Brisanz. Im Laufe der letzten Jahre bis zum 31. Januar 2010 wurden 449 Erkrankungen und 262 Todesfälle bei Menschen registriert. Alle diese Personen hatten allerdings engen Kontakt zu Geflügel (FAO, 2010). Auch verschiedene karnivore Säugetiere erkrankten nach Aufnahme von infiziertem Geflügelfleisch an AI (KEAWCHAROEN et al., 2004;

KUIKEN et al., 2004; SONGSERM et al., 2006; AMONSIN et al., 2007; RÜLKE, 2007; THIRY et al., 2007; MARSCHALL und HARTMANN, 2008).

Auslöser der eigenen Untersuchungen waren die zitierten, immer wieder aufflammenden Ausbrüche von AI, die nach ordnungsgemäßer Durchführung der Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen auftraten. Die vorgeschriebenen Maßnahmen beinhalten in Deutschland, dass Stallungen vor Wiederbelegung mindestens 21 Tage leer stehen müssen (GeflPestSchV, § 45 Abs. 1, 2009). Die Rote Vogelmilbe (RVM), die ein großes Problem in der kommerziellen Geflügelproduktion darstellt, kann jedoch bis zu neun Monate im Stall ohne Blutsaugen am Wirtstier überdauern (NORDENFORS et al., 1999b). Ihre Tilgung ist äußerst schwierig, da sie sich in kleinste Ritzen und Spalten zurückziehen kann, wo sie mit Akariziden oder Desinfektionsmitteln nicht erreicht wird (CHAUVE, 1998; CHIRICO und TAUSON, 2002; LIEBISCH und LIEBISCH, 2003). Die Virusverbreitung durch die RVM wurde bereits für verschiedene andere Viren untersucht und teilweise auch bestätigt (HOFSTADT, 1949; CHAMBERLAIN et al., 1957; SHIRINOV et al., 1972; HILBRICH, 1978; HOFFMANN, 1987; ARZEY, 1990; DURDEN et al., 1992; DURDEN et al., 1993). Die Vektorfunktion der RVM für AIV wurde Anfang des letzten Jahrhunderts nur einmal, mit einer ungeeigneten Methode von CENTANNI (1902) geprüft (siehe Abschnitt 2.2.3.2 bzw. 5.4), so dass bisher zu dieser Fragestellung keine aussagekräftigen Untersuchungsergebnisse vorlagen. Isoliert wurde ein AIV H5N1 des asiatischen Typs inzwischen aus einer Schmeißfliegen-Art (SAWABE et al., 2006, 2009) und aus Moskitos (BARBAZAN et al., 2008). Die Vektorfunktion dieser Insekten wurde von den Autoren vermutet, aber nicht experimentell nachgewiesen.

Die Rolle der RVM in der Epidemiologie von AIV sollte weiterhin untersucht werden, da sie sehr häufig in Geflügelbeständen anzutreffen ist und eine große wirtschaftliche Bedeutung besitzt. Es erscheint durchaus vorstellbar, dass nach einem Ausbruch von HPAI in einem Geflügelbetrieb die vorgeschriebenen Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen zur Eliminierung des nicht sehr resistenten AIV führten, es aber nicht gelang alle RVM abzutöten. Damit könnte diesem Ektoparasiten eine Bedeutung für das Auftreten von Neuinfektionen zukommen. In einem solchen Fall könnten die RVM,

falls sie zuvor beim Blutsaugen AIV aufgenommen hätten, das Virus bei Neubelegung des Stalles an gesunde Tiere übertragen. Während die Übertragung eines HPAIV durch die RVM bei einem perakuten bis akuten Verlauf der Erkrankung eine eher untergeordnete Rolle spielen dürfte, könnte die Milbe möglicherweise beim Vorliegen einer NPAIV-Infektion in einem Bestand die Passagenzahlen in Hühnern erhöhen und dadurch zur Vergrößerung der Mutationswahrscheinlichkeit zum HPAIV beitragen.

5.2 Eignung des verwendeten AIV für die Experimente mit Roten Vogelmilben

Zur Durchführung der Übertragungsversuche von AIV durch die RVM wurde ein Influenzavirus mit der Bezeichnung A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9) ausgewählt. Dessen Eigenschaften wurde zunächst sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht, um seine Eignung für die folgenden Versuche festzustellen. Wichtig für die folgenden Versuche waren dabei: a) die Auslösung einer deutlichen klinischen Symptomatik, um die erfolgreiche Infektion der Hühner im Isolator erkennen zu können, b) eine schwache Transmissibilität durch direkten Kontakt der Hühner in den Milbenboxen (NARAYAN et al., 1969a; ALEXANDER et al., 1986), c) eine schnell p.i. eintretende und anhaltende Virämie mit d) ausreichend hohen Virustitern, um aufgenommenes Virus wieder aus den Milben isolieren zu können. Für die Reisolierung des eingesetzten Virus waren folgende *in vitro*-Eigenschaften unabdingbar: a) Vermehrung im Brutei zu hohen EID₅₀- und HA-Titern und b) deutlicher zytopathischer Effekt in HEF-Kulturen. Außerdem sollte der Beginn, der Grad und die Dauer der Virämie im Wirtstier festgestellt werden, um den Versuchsablauf mit den RVM planen zu können. Und schließlich war die Feststellung der geeigneten Infektionsdosis und Feststellung der Minimaldosis für die Infektion der Hühner in den nachfolgenden Experimenten wichtig.

Bevor Versuche zur Übertragung von AIV mittels RVM als dem experimentellen Vektor beginnen konnten, musste grundsätzlich abgeklärt werden, ob und in welchem Maße die RVM AIV mit dem Blut aufnehmen und wie lange das Virus in den Milben persistieren kann. Ein möglichst hoher Virustiter im Blut der infizierten Hühner war wichtig, um bei der geringen Blutmenge, die je Vogelmilbe aufgenommen werden kann, eine bessere Aussicht auf Virus-isolierung zu erhalten und die Aufnahme von

AIV durch die Milben nachweisen zu können. Außerdem wurden durch diese Analyse die Infektion der Hühner durch AIV bestätigt und mit weiteren Untersuchungen andere Krankheitsursachen ausgeschlossen. Im Rahmen der selbst durchgeführten Experimente war es wichtig, infektiöses und vermehrungsfähiges Virus nachzuweisen und zu reisolieren. Deswegen wurde die PCR nur stichprobenweise zur Überprüfung des Virusgehalts durchgeführt und dem Nachweis des Virus mittels Zell- bzw. Eikultur und nachfolgendem HA-Test der Vorzug gegeben. Die Virusreisolierung mittels Eikultur stellt den „Goldstandard“ dar, ist aber kostenintensiv und sehr material- und zeitaufwändig, weswegen in der Routinediagnostik die PCR oft vorgezogen wird (OIE, 2004; LU, 2006; SWAYNE und HALVORSON, 2008).

5.2.1 Untersuchung der Eigenschaften des AIV in vitro

Es wurden für die Charakterisierung in vitro sowohl Primärzellkulturen (HEF) als auch embryonierte Hühnereier genutzt. Allgemein werden embryonierte Hühnereier als Anzuchtmedium empfohlen, da AIV in diesem Milieu sehr hohe Infektions- und Hämagglutinationstiter bildet (EASTERDAY et al., 1997; OIE, 2004). Für diese Studie waren jedoch eine Vielzahl von Titrationen durchzuführen, um die genauen Titer im Blut zu bestimmen, und es sollte überprüft werden, ob die Zellkulturen als gleichwertiges Anzuchtmedium zu verwenden sind. Der eingesetzte Virusstamm bildete in HEF-Kulturen einen mikroskopisch deutlich erkennbaren typischen zytopathischen Effekt (NARAYAN et al., 1969a; MALHERBE und STRICKLAND-CHOMLEY, 1980; SCHMITZ, 2007; SWAYNE und HALVORSON, 2008). Dies war die unabdingbare Voraussetzung für qualitative und quantitative Virusnachweise in Proben von Hühnern und Milben. Mit der Sequenzierung des Virus konnte der Subtyp A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9) ermittelt werden, der aufgrund der basischen Aminosäuren an der Spaltstelle seines Hämagglutinins als hochpathogen eingestuft wurde. Zusätzlich wurden mittels Inokulation embryonierter Hühnereier die embryoletale Dosis (ELD₅₀/ml) und die embryoinfektöse Dosis (EID₅₀/ml) bestimmt. Als Folgerung ergab sich aus den Ergebnissen der in vitro-Untersuchungen, dass mit diesem AIV die eigenen Fragestellungen bearbeitet werden können.

5.2.2 Untersuchung der Eigenschaften des AIV *in vivo*

Zusätzlich wurde das Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9) *in vivo* mittels eines abgewandelten IVPI-Tests charakterisiert, um die Ausprägungen der ausgelösten Virämie und klinischen Symptomatik festzustellen und um die geeignete Virusdosis zu finden. Alle drei Blutfraktionen wurden einzeln untersucht, und das zellassozierte AIV (GRATZL und KÖHLER, 1968) wurde am häufigsten aus der Erythrozyten- und Leukozytenfraktion isoliert. AIV-Nachweise aus dem Blutplasma konnten nur vereinzelt erbracht werden und waren vermutlich auf eine bereits begonnene Elution des AIV von den Erythrozyten und/oder auf eine unvollständige Trennung der einzelnen Fraktionen zurückzuführen. Der Blutplasmaanteil ist folglich nicht geeignet, um eine Virämie bzw. eine Infektion mit AIV nachzuweisen.

Das AIV war bei i.v. infizierten Hühnern im Pharynx im Mittel vier Tage länger nachweisbar als im Blut. Es war in Tupferabstrichen aus der Schnabelhöhle vom 1. bis zum 10. Tag p.i. nachweisbar. Aus dem Sammelkot erfolgten kaum Virus-nachweise, was die geringe Tenazität des Virus nach Antrocknung bestätigt (HAFEZ et al., 2002; THRAENHART, 2002; SWAYNE und HALVORSON, 2008). Im frühen Stadium der Erkrankung eignen sich Pharynxtupfer besser zur Diagnosestellung als Kloakentupfer. Die Ausscheidung über die Kloake blieb über einen längeren Zeitraum bestehen und erscheint deshalb für den Virusnachweis in der Rekonvaleszenzphase zweckmäßiger. Grundsätzlich sollten sowohl Rachen- als auch Kloakenabstriche untersucht werden, um die Diagnose AI sicher zu stellen. Die Virusreisolation aus Rachen, Kloake und Kot waren insofern für die eigenen Untersuchungen bedeutsam, da Grad und Dauer der Virusausscheidung und damit die Kontamination der Isolatoren und dadurch auch der Oberfläche der Milben durch Ausscheidungen der Hühner einen direkten Einfluss auf die Virusnachweise nehmen können.

HPAIV sind nicht wie NPAIV an die Enzyme des Verdauungs- und Respirationstrakts gebunden, sondern sie replizieren in allen Organen des Körpers (ALEXANDER, 2006; ALEXANDER und CAPUA, 2008). Deswegen konnte AIV aus allen untersuchten Organen der gestorbenen Hühner isoliert werden. Die Replikation im gesamten Körper der Vögel verursacht die Schädigung lebenswichtiger Organe und Gewebe und führt so zur

Symptomatik der klassischen Geflügelpest (ALEXANDER und CAPUA, 2008). Als Leitsymptome werden zentralnervöse Symptome, ein massiver Einbruch der Legeleistung, eine allgemeine Depression mit Einstellung von Futter- und Wasseraufnahme und eine starke Erhöhung der Tierverluste angesehen (KALETA und WERNER, 2005; SWAYNE und HALVORSON, 2008). Die Inkubationszeit schwankte zwischen ein bis fünf Tagen. Die klinische Symptomatik der AIV-infizierten Hühner stellte sich in der erwarteten Weise und wie mehrfach in der Literatur beschrieben dar (LANG et al., 1968b; NARAYAN et al., 1969a; ALEXANDER et al., 1986; SWAYNE und HALVORSON, 2008). Abweichend davon wurde die Entwicklung eines Kopfödems sehr selten beobachtet, das in der Literatur häufig als charakteristisch für AIV-Infektionen angesehen wird. Dagegen wurde regelmäßig eine hochgradige Diarrhöe festgestellt (LANG et al., 1968b; NARAYAN et al., 1969a; ALEXANDER et al., 1986; SWAYNE und HALVORSON, 2008). Variationen durch unterschiedliche HA- und NA-Subtypen und andere Faktoren wie etwa die betroffene Tierspezies oder die Eintrittspforte des Virus sind durchaus bekannt. Die Symptomatik der Geflügelpest wird grundsätzlich als sehr vielfältig und wenig spezifisch angesehen (SWAYNE und HALVORSON, 2008). Eine bakterielle Beteiligung ist nicht nötig, um die schweren Schäden der Organe und Gewebe und die resultierenden Symptome hervorzurufen (SWAYNE und SUAREZ, 2000; KALETA und WERNER, 2005; SWAYNE und HALVORSON, 2008). Bei rekonvaleszenten Hühnern konnten vorausgehend keine zentralnervösen Symptome festgestellt werden. Nach zwei bis drei Tagen mit hochgradiger Apathie und Diarrhöe zeigten sie eine deutliche Besserung des Allgemeinbefindens und begannen erneut mit der Futter- und Wasseraufnahme. Rekonvaleszente Hühner wiesen eine deutliche Serokonversion auf, die schon NARAYAN et al. (1969a) nach experimenteller Infektion von Hühnern mit Influenzavirus *A/turkey/Ontario/7732/1966* (H5N9) beobachteten. Der über die klinische Symptomatik der infizierten Hühner beurteilte IVPI wurde mit 2,3 als typisch für ein hochpathogenes AIV festgestellt (OIE, 2004). Bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-5} konnte noch ein IVPI-Index nachgewiesen werden, der über 1,2 lag.

Auf pathologisch-anatomischer und histologischer Ebene wurden entsprechend der klinischen Symptomatik weitreichende hämorrhagische und nekrotische Läsionen gefunden. Generell können bei einem akuten Verlauf Nekrosen und Entzündungen in

allen Organen gefunden werden (ALEXANDER und CAPUA, 2008). Am augenfälligsten war hier eine starke Hyperämie in allen Organen, die schon von NARAYAN et al. (1969b) beschrieben wurde. Die hier festgestellten Befunde gleichen weitestgehend denen, die zuvor bei Untersuchungen zur Pathogenität des Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9) nachgewiesen werden konnten (NARAYAN et al., 1969b; MO et al., 1997): Pankreas und Milz wiesen hier ebenfalls mehrfach multiple fokale Nekrose- und Entzündungsherde auf und die Entwicklung einer Peri- und Myokarditis wurde gleichfalls mehrfach festgestellt. Generell sind auch die pathologischen Veränderungen abhängig vom Virusstamm, der Spezies der betroffenen Tiere, der Virusdosis und der jeweiligen Eintrittspforte (ALEXANDER und CAPUA, 2008; SWAYNE und HALVORSON, 2008). Am häufigsten und schwersten betroffen von pathologischen Veränderungen sind nach SWAYNE und HALVORSON (2008) Gehirn, Herz, Lunge, Pankreas und die Organe des Immunsystems. Bei diesem AIV scheint die Beteiligung des respiratorischen Systems von untergeordneter Rolle zu sein, da hier nur zweimal eine Pneumonie und einmal ein Emphysem nachgewiesen wurden. NARAYAN et al. (1969b) stellten nur eine Hyperämie der Konchen fest, die hier ebenfalls beobachtet wurde, und sonst keinerlei weitere histopathologischen Veränderungen. MO et al. (1997) konnten dagegen bei infizierten Hühnern in ausnahmslos jedem Organsystem Nekrosen und Entzündungsanzeichen belegen. Der Vergleich der Ergebnisse verschiedener Untersuchungen zu einem bestimmten AIV ist insofern oft schwierig, da meist andere Virusdosen und unterschiedliche Infektionsrouten eingesetzt wurden.

Die immunhistochemische Färbung der Hühnerorgane wurde als Bestätigung der erfolgten AIV-Infektion durchgeführt. Außerdem diente sie als Positivkontrolle zur Beurteilung der immunhistochemischen Färbung der RVM. AIV-Antigen konnte in sämtlichen Organen der infizierten Hühner nachgewiesen werden. Dies entspricht den Ergebnissen von MO et al. (1997), die einen Vergleich der Pathogenität verschiedener NPAIV und HPAIV durchführten. Sie stellten außerdem fest, dass sich die NPAIV nur im Respirationstrakt replizierten, während die HPAIV dies in allen Körperorganen taten (MO et al., 1997). Diese Tatsache ist mittlerweile allgemein anerkannt und belegt (ALEXANDER, 2006; ALEXANDER und CAPUA, 2008; SWAYNE und HALVORSON, 2008).

Aus dem Vorversuch konnte abgeleitet werden, dass das Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9) für die folgenden Experimente geeignet war. Zur weiteren Bearbeitung der Fragestellung wurde als der optimale Zeitpunkt zur Blutaufnahme der RVM an AIV-infizierten Hühnern der erste Tag p.i. festgestellt. Als bestmögliche Virusdosis wurden $10^{6,7}$ KID₅₀/0,1 ml für die nachfolgenden Versuche eingesetzt.

5.3 Nachweis der Aufnahme von AIV durch die Roten Vogelmilben

Die nach dem Saugakt an den AIV-infizierten Hühnern entnommenen RVM wurden sowohl unbehandelt als auch äußerlich desinfiziert, um zu verifizieren, dass AIV sich im Inneren der Milbe befindet und nicht nur eine äußerliche Verunreinigung durch Kontamination der Oberfläche der RVM mit Hühnerkot oder Ex- bzw. Sekreten der infizierten Hühner nachgewiesen wurde. Die Methode nach ZEMAN et al. (1982) mit 4 %igem Formalin, die auch von ZANELLA (2007) und VALIENTE MORO et al. (2009) erfolgreich angewendet wurde, ist hier als Desinfektionsmethode benutzt worden. Das 4 %ige Formalin tötet die RVM in dieser Konzentration nur zu einem geringen Anteil ab. Nach der Desinfektion waren noch ungefähr zwei Drittel der Milben vital. Zur Kontrolle, dass sich das AIV nicht mehr auf der Oberfläche der RVM, sondern nur in ihrem Innern befand, wurden nicht homogenisierte Milben auf HEF-Kulturen aufgebracht. Sie verursachten in HEF-Kulturen nach äußerlicher Desinfektion keinen ZPE, während homogenisierte Milben einen solchen bewirkten, d. h. dass sich das Virus innerhalb der Milben befunden haben muss. Die AIV-Nachweisraten aus desinfizierten Milbenhomogenisaten unterschieden sich nicht nachweisbar von nicht desinfizierten Milbenhomogenisaten.

Folglich wurde belegt, dass die RVM zusammen mit dem Blut beim Saugakt an virämischen Hühnern das AIV aufnehmen. AIV wurde aus Milbenhomogenisaten mittels HEF-Kulturen über fünf Tage und mittels Eikulturen über zehn Tage reisoliert. Die zahlreichsten Virusnachweise und höchsten Virustiter wurden in den ersten drei Tagen nach dem Saugakt erzielt. Die Virusreisolierung aus RVM mittels HEF-Kulturen blieb hinter der Virusisolierung mittels embryonierten Hühnereiern zurück. Dies

bestätigt nochmals, dass embryonierte Hühnereier besser als Zellkulturen als Anzuchtmedium für AIV geeignet sind (EASTERDAY et al., 1997; OIE, 2004; SWAYNE und HALVORSON, 2008).

Zum weiteren Beweis der Aufnahme des AIV wurden die RVM histologisch und immunhistochemisch untersucht. Histologisch konnten die einzelnen Organsysteme der RVM anhand von Beschreibungen in der Literatur gut abgegrenzt und definiert werden (CHITWOOD und LICHTENFELS, 1972; GARDINER und POYNTON, 1997; LUCIUS und LOOS-FRANK, 1997). So konnten Anteile des Darmtraktes anhand der Beschreibungen von CHITWOOD und LICHTENFELS (1972) als solche angesprochen werden. Aufgenommenes Blut wurde ausschließlich im Darmtrakt festgestellt. Es blieb vermutlich Virus im vorderen Verdauungstrakt zurück, was die Übertragung des Virus durch Blutaufnahme an einem neuen, naiven Wirt möglich machen könnte. Ferner konnten Anteile der Mundwerkzeuge, der Mitteldarmdrüse, der Speicheldrüse und der inneren Geschlechtsorgane mit enthaltenem Ei angesprochen werden (CHITWOOD und LICHTENFELS, 1972; GARDINER und POYNTON, 1997; LUCIUS und LOOS-FRANK, 1997). In den Eiern der Milben konnte immunhistochemisch kein AIV-Nachweis erfolgen.

Die Anwendung immunhistochemischer Verfahren ist bisher mit RVM noch nicht publiziert worden. Die Herstellung von Schnitten war wegen der geringen Körpergröße der Vogelmilben (ca. 0,5-1 mm) schwierig. Deshalb musste der automatisierte Einbettungsprozess von Geweben in Paraffinblöcke hier per Hand durchgeführt werden. Ein weit größeres Problem war das chitinhaltige Exoskelett der RVM. Das Chitin ging unspezifische Bindungen mit den Detektionsantikörpern ein und führte so zu Störungen beim Nachweis von AIV. Diese Probleme traten zuvor schon bei Experimenten mit dem Fadenwurm *Trichinella spiralis* auf, dessen Exoskelett ebenfalls Chitin enthält (TEIFKE, persönliche Mitteilung). Es zeigte sich, dass bei Anwendung der PAP-Methode viel häufiger unspezifische Anfärbungen auftraten als bei der ABC-Methode. Es scheint demnach als wäre diese zur Verwendung bei immunhistochemischen Färbungen von RVM geeigneter. Dies sollte allerdings in weiterführenden Untersuchungen genauer abgeklärt werden. Die spezifischen AIV-Nachweise waren immer im Darmsack der Milbe lokalisiert, wo sich auch der Hauptteil des aufgenommenen Blutes befand. Im

Saugapparat der Milben konnte Virus nicht eindeutig nachgewiesen werden. Dieser Teil der RVM enthält zur Stabilisierung besonders viel Chitin, deswegen kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob Virus vorhanden war oder ob es sich um unspezifische Bindungen des verwendeten Antikörpers an das Chitin handelte. Eine Regurgitation wie bei Zecken erscheint möglich, wurde aber nicht nachgewiesen. Das gleiche gilt für eine Migration des Virus zu den Speicheldrüsen der Milben, wie sie bei Zecken für das FSME-Virus belegt ist (GERN, 2005). Abgesehen von den störenden Einflüssen des Chitins ist das Treffen einer geeigneten Schnittebene, in welcher der Saugapparat optimal angeschnitten ist, diffizil. Denkbar ist auch, dass AIV an den Mundwerkzeugen der RVM nicht in für einen Nachweis ausreichender Menge vorhanden ist. In den Gonaden und den Eiern der RVM konnte ebenfalls kein Virus nachgewiesen werden. Dies kann an der aktuell getroffenen Ebene liegen oder daran, dass das Virus nicht dorthin gelangt ist. Eine vertikale Übertragung des Virus auf die nächste Milbengeneration erscheint unwahrscheinlich. Bei der Bearbeitung der Paraffinblöckchen konnte festgestellt werden, dass von den 15 eingelegten RVM bei den Schnitten nicht alle erfasst werden, da sie sich in dem 3 mm hohen Blöckchen verteilen. Für weiterführende Untersuchungen könnten mehr Milben verwendet werden oder das übliche Volumen des Paraffinblöckchens könnte reduziert werden.

Eine Vermehrung des AIV in der RVM konnte nicht festgestellt werden. Bei einer Replikation des Virus in der Vogelmilbe hätte der Virusnachweis weitaus länger als nur über zehn Tage lang möglich sein müssen und der Virustiter hätte zumindest auf gleichem Niveau bleiben oder sogar ansteigen müssen. Eine Ursache für die relativ kurze Nachweisspanne könnte sein, dass die Virusmenge nach Ablauf dieser Zeit zu gering war und deshalb keine Isolierung mehr erfolgte. Mit Fortschreiten der enzymatischen Blutverdauung im Organismus der Vogelmilben nahm wie erwartet die Reisolierung des AIV ab. Es ist denkbar, dass AIV von den Verdauungsenzymen der RVM beim Abbau des aufgenommenen Blutes zerstört wird. Nach NISBET und BILLINGSLEY (2000) ist die RVM mit zahlreichen Verdauungsenzymen wie Glukosidasen, Aspartat-Proteinasen und Zystin-Proteinasen ausgestattet, die sie zum Abbau des aufgenommenen Blutes benötigt, und die sicherlich auch in der Lage sind, behüllte Viruspartikel abzubauen. Ein weiterer Punkt ist, dass AIV ausschließlich

intrazellulär replizieren. Dementsprechend sind sie deutlich abhängiger vom Wirtstier und den vorhandenen Zelltypen inklusive ihrer Enzymausstattung. Versuche anderer Autoren Arthropodenzellen mit AIV zu infizieren und das Virus so zu replizieren, schlugen bisher fehl (HAO et al., 2008; SHEN et al., 2008; COX und HOLLISTER, 2009; KRAMMER und GRABHERR, 2010). In der Studie von BARBAZAN et al. (2008) wurde nach Infektion einer Moskitozelllinie mit einer hohen Dosis (MOI⁹ 10) eines H5N1 24 Stunden p.i. dieses Virus wieder reisoliert. Damit sahen die Autoren seine Replikation als erwiesen an. Da aber keine Virustiter bestimmt wurden, könnte es sich auch um die Reisolation des eingesetzten Virus bzw. seiner RNS handeln. Das AIV konnte vermutlich in den Zellen der RVM keinen produktiven Vermehrungszyklus durchführen, da die in der RVM vorhandenen Zelltypen mit ihren jeweiligen Enzymen ungeeignet waren. Weiterhin entsprechen sich die quantitativ bestimmten Virusgehalte des Hühnerbluts (Erythrozytenfraktion) und des im Verdauungsapparat der RVM enthaltenen Hühnerbluts, was ebenfalls einer Virusvermehrung in der RVM widerspricht. Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass sollte eine Übertragung des AIV durch die RVM stattfinden, sie nur als mechanischer und nicht als biologischer Vektor fungiert.

5.4 Übertragung von AIV durch die Roten Vogelmilben

Für den Nachweis der Übertragung des AIV mit RVM auf gesunde Hühner (Experiment II) war es besonders wichtig, den günstigsten Zeitpunkt für die zweite Blutmahlzeit der AIV-infizierten Milben an den naiven Hühnern festzulegen. Die Milben sollten wieder „Appetit“ haben und das AIV sollte noch im Magendarmtrakt der RVM vorhanden und infektiös sein. Nur unter diesen Voraussetzungen ist eine Übertragung von AIV mittels der RVM möglich. Es wurde ein Abstand von zwei Tagen zwischen den beiden den Vogelmilben gestatteten Blutmahlzeiten gewählt, da die RVM in der Regel im Abstand von ein bis drei Tagen Blut von ihren Wirtstieren aufnimmt (KIRKWOOD, 1963; CHAUVE, 1998; LIEBISCH und LIEBISCH, 2003). Die Anwesenheit von infektiösem AIV war im vorangegangenen Experiment I für diesen Zeitraum in den Vogelmilben (bis zu zehn Tagen nach der ersten Blutmahlzeit) bereits bestätigt worden.

⁹ *Multiplicity of infection* (deutsch: Multiplizität der Infektion). Eine MOI von 1 entspricht dem Verhältnis von einem infektiösen Viruspartikel auf eine Wirtszelle.

Es war nicht möglich, die Milbenboxen zwischen der Besetzung durch ein infiziertes Huhn, welches die Box durch Sekrete und Kot verunreinigte, und dem Einsetzen des naiven Huhns zu autoklavieren, da die RVM ebenfalls abgetötet worden wären. Ein Umsetzen der Vogelmilben in eine saubere Box war nicht praktikabel, da die Milben dabei größtenteils mechanisch zerstört worden wären. Eine unerwünschte indirekte Kontaktinfektion der neu eingesetzten, AIV-naiven Hühner konnte jedoch weitgehend ausgeschlossen werden, indem darauf geachtet wurde, allen Kot und sonstige Verunreinigungen aus der Box zu entfernen und die Box möglichst trocken zu halten. Bis zur Neubesetzung der Box vergingen 48 Stunden, die Wahrscheinlichkeit, zu diesem Zeitpunkt noch aktives Virus in der Box vorzufinden, ist sehr gering. AIV ist nach THRAENHART (2002) auf Oberflächen nach Antrocknung innerhalb von vier Stunden zu 90 % inaktiviert. Zusätzlich konnte in den vorangegangenen Experimenten AIV nur zu einem sehr geringen Prozentsatz aus dem Kot der Hühner isoliert werden. Bei Trocknung des Kots verlor das Virus seine Infektiosität, da es nur im feuchten Milieu relativ lange infektiös bleibt (ALEXANDER, 2006; BROWN et al., 2007; SWAYNE und HALVORSON, 2008).

NARAYAN et al. (1969a) und ALEXANDER et al. (1986) stellten bei Experimenten zum Entstehen von Kontaktinfektionen fest, dass Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9) für Hühner weitaus weniger ansteckend ist als für Puten, vor allem über die oronasale Route. NARAYAN et al. (1969a) infizierten ein achtwöchiges Huhn und ließen es in einer Gruppe von vier weiteren Hühnern und zwei zwanzig Wochen alten Puten frei laufen. Das infizierte Tier wurde einen Tag p.i. krank und starb innerhalb von sechs Tagen. Die Puten erkrankten zwei Tage später und starben kurze Zeit nach dem infizierten Huhn. Die Kontakthühner blieben gesund und zeigten keinerlei serologische Reaktion bei der Überprüfung der Antikörpertiter nach 30 Tagen (NARAYAN et al., 1969a). Bei einem zweiten Versuch wurden insgesamt zwölf Kontakthühner eingesetzt: Von fünf Hühnern, die erkrankten, starben zwei. Die sieben restlichen Kontakthühner blieben gesund, bei zweien wurde eine Serokonversion festgestellt. Diese Serokonversion war aber weitaus höher als die in dieser Untersuchung festgestellte. In einem weiteren Experiment wurden die Kontakttiere zusammen mit infizierten Hühnern

in enge Käfige gesetzt, um die Wahrscheinlichkeit einer Übertragung von Tier zu Tier zu erhöhen. Alle infizierten Hühner starben, während die Kontakttiere gesund blieben (NARAYAN et al., 1969a). Die Diskrepanz der Kontakttransmission zwischen Hühnern und Puten beruht nach der Ansicht der Autoren auf Unterschieden der Schleimhäute als Eintrittspforte bei natürlicher Infektion. Die Autoren erklären sich die Entstehung einer unterschiedlichen Infektionsempfindlichkeit der beiden Spezies dadurch, dass auf dem nordamerikanischen Kontinent die Geflügelhaltung weitestgehend kommerzialisiert wurde und sich die Produktionswege für Puten und Hühner nicht überschneiden. So konnte sich eventuell eine höhere Speziesaffinität des Virus für Puten entwickeln, da dieses AIV anscheinend nur in Putenbeständen zirkulierte (NARAYAN et al., 1969a).

Das Huhn, welches während des IVPI-Tests versehentlich nicht infiziert wurde, blieb bis zu seiner Tötung in dem Isolator, wo die restlichen Hühner der Gruppe bis zu ihrem Tod ebenfalls gehalten worden waren. Es steckte sich nicht per Kontaktinfektion an und wies keine Serokonversion auf. In den Experimenten von anderen Autoren, bei denen sich Hühner per direkten Kontakt ansteckten, wiesen sie weitaus höhere Antikörpertiter (2^6) auf als die hier untersuchten Hühner. Insgesamt erscheint eine Kontaktinfektion der naiven Hühner durch getrocknete Ausscheidungsreste der infizierten Hühner in den Milbenboxen im höchsten Maße unwahrscheinlich.

AIV konnte auf fünf von acht Hühnern mittels der RVM übertragen werden. Ein Huhn erkrankte an der Geflügelpest und bei vieren wurde eine Serokonversion 14 Tage p.i. festgestellt. Bei zwei dieser vier Hühner konnten zusätzlich immunhistochemisch nachgewiesenes AIV-Nukleoprotein in Nieren und Pankreas die erfolgte AIV-Infektion bestätigen. Aus den Organen des erkrankten Huhns konnte das eingesetzte Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/66 (H5N9) reisoliert werden. Es wurde kein weiteres pathogenes Agens festgestellt. Der bestimmte HA-Titer der AAF lag bei 2^6 . Die HAH-Titer im Blut der übrigen Hühner, 14 Tage nach der Blutaufnahme der AIV-infizierten Milben, lagen zwischen 2^2 und 2^3 und unterschritten folglich die Spezifitätsgrenze von 2^4 nach den Angaben im Manual der OIE. Da aber das Blut der SPF-Hühner am Tag der Infektion einen HAH-Titer von $\log_2 < 1$ aufwies, kann selbst ein Anstieg auf 2^2 als eine spezifische Reaktion und damit positiv gewertet werden.

ALEXANDER (2004) hält unspezifische Reaktionen in Hühnerseren für sehr selten. Eine unspezifische Agglutination tritt nach SWAYNE und HALVORSON (2008) nur auf, wenn Seren und Erythrozyten von verschiedenen Spezies für den HAH-Test benutzt werden. Die für diesen Test verwendeten Erythrozyten stammten von klinikseigenen SPF-Hühnern. Eine systemische IgM-Antikörperbildung kann nach SUAREZ und SCHULTZE-CHERRY (2000) schon fünf Tage p.i. festgestellt werden, die IgG-Bildung schließt sich kurz danach an. SWAYNE und HALVORSON (2008) halten eine Antikörper-Detektion ab dem 7. Tag p.i. für möglich. Die Serokonversion in Hühnern erfolgt sogar gegenüber der in anderem Geflügel am intensivsten (SUAREZ und SCHULTZE-CHERRY, 2000). Eine Ursache für die niedrigen Antikörpertiter könnte sein, dass nicht ausreichend AIV übertragen wurde. Die RVM könnten zu wenig AIV aufgenommen und übertragen haben oder die Menge der Milben insgesamt oder die Menge der wieder hungrigen Milben war zu gering, um eine stärkere Reaktion des Immunsystems der Hühner auszulösen.

Die Anzahl der RVM darf allerdings eine kritische Menge nicht überschreiten, da das Huhn sonst an den Folgen des Milbenbefalls, also an einer Anämie, sterben würde. Dies war bei den zwei letzten Hühnern, die in diesem Versuch eingesetzt wurden, nahezu der Fall. Ihr Blut wies aber trotz der starken Befallsstärke keine Anzeichen einer erfolgten Serokonversion auf. Eine Infektion der Hühner durch die orale Aufnahme von RVM durch die Hühner ist als sehr unwahrscheinlich anzusehen, da die orale Infektionsdosis ungleich höher sein müsste und sowohl Milben als auch das in ihnen enthaltene behüllte Virus durch die Verdauungsenzyme des Magen-Darm-Traktes der Hühner abgebaut werden.

Bisher wurde die Übertragung von AIV durch einen Arthropoden noch nicht hinreichend untersucht und folglich auch nicht festgestellt. Nur CENTANNI (1902) stellte Untersuchungen zur Übertragung von AIV mit der RVM an. Er verwendete nur relativ geringe Mengen Vogelmilben (30-100 Stück) und nur drei Hühner mit ihm unbekanntem Immunstatus und konnte eine Übertragung von AIV durch die RVM nicht nachweisen. SAWABE et al. (2006) konnten nach einem H5N1-Ausbruch aus den Schmeißfliegen des Bestandes das Virus reisolieren. Sie halten die Fliege für einen mechanischen Vektor,

stellten aber keine weiteren Untersuchungen zu diesem Thema an. Ebenfalls ein H5N1 wurde aus blutgefüllten Moskitoweibchen isoliert. Es wurden aber keine Übertragungsnachweise oder -versuche angestellt (BARBAZAN et al., 2008). Die RVM stand in der Vergangenheit schon häufiger im Verdacht, verschiedene Viren durch vorangegangene Aufnahme virämischen Blutes aus einem infizierten Vogel verbreiten zu können. Die Transmission des Geflügelpockenvirus durch Biss konnte 1936 von BRODY (zit. von YUNKER, 1973) und nochmals von SHIRINOV et al. (1972) belegt werden. SHIRINOV et al. setzten zwanzig RVM, die an mit Vogelpockenvirus infizierten Hühnern Blut aufgenommen hatten, auf Federfollikel am Unterschenkel von acht 50 Tage alten Hühnerküken. Sechs Tage später konnte bei zwei Küken bzw. weitere drei Tage später bei einem weiteren Küken eine Schwellung der Follikel und der gesamten Unterhaut beobachtet werden. Außerdem entwickelten sie eine katarrhalische Konjunktivitis. Bei den erkrankten Tieren konnte das Vogelpockenvirus kulturell nachgewiesen werden. Ebenfalls per Biss durch die RVM soll nach HILBRICH (1978) und HOFFMANN (1987) das aviäre Leukosevirus auf Hühner übertragen werden. DURDEN et al. (1993) und CHAMBERLAIN et al. (1957) konnten eine mechanische Übertragung für die Togaviren, die EEE und WEE auslösen können, auf Hühner nachweisen (Abschnitt 2.1.6.2, Tabelle 2). Für diese Experimente wurden zwei Tage alte Hühnerküken verwendet, die jeweils ungefähr 100 virushaltigen Milben ausgesetzt wurden. Bei jeweils einem bzw. zwei Küken von zehn eingesetzten naiven Tieren konnte eine Infektion mit Togavirus nachgewiesen werden.

Insgesamt erscheint es jedoch, als wäre die RVM als Vektor für die Transmission von Bakterien geeigneter als für die von Viren, da nur viermal eine Übertragung eines Virus (inklusive dieser Untersuchung insgesamt 24 Studien) und elfmal (insgesamt ebenfalls 24 Studien) die Transmission von Bakterienspezies nachgewiesen werden konnte (Abschnitt 2.1.6.1). Dieser Umstand könnte damit begründet werden, dass die Vermehrung von Viren im Gegensatz zu der von Bakterien ausschließlich intrazellulär erfolgt. Dementsprechend ist die Virusreplikation deutlich abhängig vom Wirtstier und viel komplexer (ROLLE und MAYR, 2002) (Abschnitt 5.3).

Ein weiterer möglicher Transmissionsweg ist die Übertragung des AIV nicht mittels des Saugaktes, sondern durch die orale Aufnahme von AIV-haltigen RVM durch ein von

ihnen befallenes Huhn. Der Befall durch die Milben verursacht eine Steigerung der Gefiederpflege und dabei werden häufig RVM von den Hühnern abgeschluckt (KILPINEN et al., 2005). In der Sektion betroffener Hühner werden die RVM dann vor allem in der Schnabelhöhle und im Kropf festgestellt, sind aber auch im restlichen Magendarmtrakt aufzufinden (RIBBECK, 1992; SCHMÄSCHKE und RIBBECK, 1997). Auch in selbst durchgeführten Sektionen konnten RVM in den genannten Lokalisationen nachgewiesen werden. Die orale Aufnahme von RVM bei der Gefiederpflege und damit auch die AIV-Übertragung erscheinen deshalb ebenfalls möglich.

Den Ergebnissen dieser experimentellen Untersuchung zufolge konnte die RVM als mechanischer Vektor das AIV von virämischen auf naive Hühner übertragen. Die biologische Übertragung, bei welcher der Krankheitserreger innerhalb des Arthropodenorganismus infektiös bleibt und sich vermehrt, und beim Blutsaugen ein gesundes Tier infizieren kann, wurde hier ausgeschlossen, da der Nachweiszeitraum des infektiösen Virus in der RVM zu kurz blieb. Der Virusgehalt des Blutes wurde vermutlich durch den enzymatischen Abbau im Darm der RVM innerhalb einiger Tage vermindert. Bei einer Virusvermehrung hätte der Virusgehalt stabil bleiben, wenn nicht sogar ansteigen müssen.

Ein biologischer Vektor ist ein echter Wirt eines Virus, in dem eine Virusreplikation stattfindet (TENTER, 2006). Ein bekanntes Beispiel dafür ist die Zecke *Ixodes ricinus*, die das FSME-Virus, ein Arbovirus, das sich in der Speicheldrüse der Zecke vermehrt, überträgt (THRUSFIELD, 1986; MARTIN et al., 1987; LAST, 1988; GERN, 2005). Die biologische Übertragung ist epidemiologisch wesentlich bedeutsamer, da Viren vermehrt und so schneller verbreitet werden können. Bei einem akuten Ausbruch von HPAI ist die direkte Übertragung von Vogel zu Vogel sicherlich zügiger. Die allgemeine epidemiologische Bedeutung der RVM als rein mechanischer Vektor ist nur schwer einschätzbar. Sie könnte bei der unerkannten Verbreitung von NPAIV innerhalb eines Geflügelbestandes eine wichtige Rolle spielen. Beim gegenwärtigen Stand der Forschung ist noch nicht aufgeklärt, welche Faktoren die Mutation von NPAIV zu HPAIV provozieren können (ALEXANDER und CAPUA, 2008). Es ist aber allgemein bekannt, dass AIV durch eine hohe Mutationsrate gekennzeichnet sind, die durch die

fehlende Proofreading-Aktivität der RNA-abhängigen RNA-Polymerase begründet ist. Dadurch werden mit höherer Wahrscheinlichkeit mehr falsche Nukleotide in das Genom eingebaut (MODROW et al., 2010). Deshalb ist es vorstellbar, dass durch wiederholte Passagen in den Hühnern durch erneute Blutaufnahme der RVM die Wahrscheinlichkeit einer Mutation von NPAIV gesteigert wird. Es kann zum Auftreten von Punktmutationen in den Oberflächenproteinen HA und NA kommen und, da die Wahrscheinlichkeit der Infektion einer Zelle mit zwei leicht unterschiedlichen Influenzaviren durch den kurzen Zeitraum erhöht wird, auch zum Entstehen von neuen Subtypen (MODROW et al., 2010). Diese Problematik ist bei mehrfachen Passagen in Hühnern oder Puten bekannt (KALETA et al., 2005; ALEXANDER, 2006). In der Vergangenheit konnten sich mehrfach H5- und H7-NPAIV während der Zirkulation in Hühnerbeständen zu HPAIV wandeln (CAPUA und MUTINELLI, 2001). Aus diesem Grund wurden diese Subtypen ebenfalls in die Liste des International Animal Health Codes aufgenommen (OIE, 2009). Diese Richtlinie stellt ein Werkzeug für Veterinärbehörden, Epidemiologen und für diejenigen dar, die sich im Rahmen des internationalen Handels mit dem Im- und Export von Tieren und tierischen Produkten beschäftigen, um Hygienestandards zu erhalten bzw. einzurichten (OIE, 2009). Ebenso vorstellbar ist es, dass die RVM bei einem Ausbruch von HPAIV in einem mit RVM befallenen Geflügelbestand zur schnelleren Verbreitung des Virus innerhalb dieses Gebäudes beiträgt.

Im Anschluss an einen Geflügelpest-Ausbruch müssen die Stallungen nach den durchgeführten Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen nach Geflügelpest-Verordnung (GeflPestSchV, § 45 (1), 2009) für mindestens 21 Tage leer stehen. Für eine erfolgreiche Eradikation des Virus muss gewährleistet sein, dass die Maßnahmen korrekt durchgeführt werden. RVM ziehen sich in Stallungen weit in Ritzen und Spalten zurück, wo sie nicht erreicht werden können (CHAUVE, 1998; CHIRICO und TAUSON, 2002; LIEBISCH und LIEBISCH, 2003; SPARAGANO et al., 2009). Die RVM kann lange Zeit ohne erneute Blutaufnahme überdauern und sich danach auch wieder reproduzieren. In der Literatur sind Hungerperioden bis zu neun Monate beschrieben. Ein Zeitraum von nur 21 Tagen kann problemlos von ihnen überstanden werden (BÜCHER, 1998; NORDENFORS et al., 1999b). Eine Transmission von AIV wäre

demnach möglich, wenn nach 21 Tagen Leerstand bei Neubesatz des Stalls sich noch infektiöses Virus in den Milben befinden würde. Den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge konnte infektiöses AIV nur für zehn Tage nach der Blutmahlzeit an infizierten Hühnern aus den RVM reisoliert werden. Damit ist die Ursache von wiederkehrenden Ausbrüchen in bestimmten Stallungen, wie zum Beispiel bei dem Ausbruch von H7N1 in Italien 1999/2000, wahrscheinlich auf andere Eintragsquellen zurückzuführen.

5.5 Wirksamkeitsnachweis von Neopredisan® 135-1 auf die Roten Vogelmilben

Die oben erwähnte mögliche Rolle der RVM macht die Suche nach alternativen Präparaten zur Tilgung der Milben in Geflügelbeständen noch dringender (SEDDON, 1968; SCHMÄSCHKE und RIBBECK, 1997; CENCEK, 2003; LIEBISCH und LIEBISCH, 2003; THEKISOE et al., 2003; GUY, 2004; BOGDANOVA, 2005; O'CONNOR et al., 2005; FORONDA, 2006; SPARAGANO et al., 2009). Ein starker Befall des Geflügels mit der RVM äußert sich vor allem durch Anämie, Kachexie und eine reduzierte Futteraufnahme. Dies führt durch Stress zu einem Einbruch der Ei- und Fleischproduktion und einer verminderten Resistenz gegenüber Infektionen (KIRKWOOD, 1967a, 1968; HIEPE und RIBBECK, 1982; AXTELL und ARENDS, 1990; HÖGLUND et al., 1995; IMMELMANN et al., 1996; SCHMÄSCHKE und RIBBECK, 1997; WOJCIK et al., 2000; KILPINEN et al., 2005; KOWALSKI und SOKÓL, 2009). Die dadurch und durch die Ausgaben für Bekämpfungsmaßnahmen verursachten wirtschaftlichen Verluste können immense Größenordnungen annehmen. Die Geflügelindustrie verzeichnete z. B. in den Niederlanden durch Vogelmilbenbefall einen Verlust von etwa 11 Millionen Euro pro Jahr (VAN DER SLUIS, 2009). Abgesehen von ihrer ökonomischen Bedeutung ist belegt, dass die RVM als Vektor für verschiedene bakterielle und virale Krankheitserreger dienen kann, und ein Befall nicht nur die erwähnte Symptomatik, sondern auch weitere Erkrankungen verursachen kann (DURDEN et al., 1992; CHIRICO et al., 2003; ECKERT et al., 2005; VALIENTE MORO et al., 2005, 2006, 2007a, 2007b, 2009). Aus diesen genannten Gründen wird der Bekämpfung der RVM große Bedeutung beigemessen. Aber ihre Tilgung aus den Ställen ist immer noch ein ungelöstes Problem: Die Hühner verbleiben häufig während der Maßnahmen im Stall, und es ergeben sich Rückstandsprobleme mit den Hühnereiern. Darüber hinaus

entwickelten die RVM teilweise gegen die bisher verwendeten akariziden Wirkstoffe Resistenzen und die Präparate entfalten in der Folge eine ungenügende Wirksamkeit (GENCHI et al., 1984; ZEMAN und ZELEZNY, 1985; BEUGNET et al., 1997; ZEMAN, 1987, 1988; FLECHTER und AXTELL, 1991; NORDENFORS et al., 2001; LIEBISCH und LIEBISCH, 1999/2000, 2003; FIDDES et al., 2005). Außerdem werden durch die weitere Entwicklung des Verbraucher- und Umweltschutzes immer mehr Pestizide vom Markt genommen, was die Bekämpfungsmöglichkeiten noch weiter einschränkt (CHAUVE, 1998; CHIRICO und TAUSON, 2002; LIEBISCH und LIEBISCH, 2003). Zusätzlich gestaltete sich die Tilgung der RVM im Stall insofern schwierig, da sie sich tief in Ritzen und Spalten zurückziehen kann. Dort können Desinfektionsmittel oder Akarizide selbst bei Einsatz von Aerosolen nicht hingelangen (SCHMÄSCHKE und RIBBECK, 1997; CHAUVE, 1998; ARKLE et al., 2004). Deswegen wird intensiv nach Alternativen zur Bekämpfung der RVM gesucht (STAFFORD et al., 2006; MAURER et al., 2009, BARTLEY et al., 2009, GEORGE et al., 2008, 2009a, 2009b, 2009c, 2010; EVERS, 2009; TAVASSOLI et al., 2008).

Neopredisan[®] 135-1 (Menno Chemie-Vertrieb GmbH) wird als Breitbanddesinfektionsmittel gegen verschiedene Endoparasitenstadien, wie Wurmeier, Kokzidien und Kryptosporidien, eingesetzt (MIELKE und HIEPE, 1998; DAUGSCHIES et al., 2002; JOACHIM et al., 2003; STRABERG und DAUGSCHIES, 2007; NAJDROWSKI et al., 2007; SHAHIDUZZAMAN et al., 2010; Gutachten Anhang II). Seine Wirksamkeit ist ebenfalls nachgewiesen gegen Clostridien, Mykobakterien und Prionen (Gutachten Anhang II). Die viruzide Wirkung der Gebrauchslösung bei 2 %iger Konzentration nach zwei Stunden Einwirkzeit ist für alle behüllten Viren wie z. B. AIV belegt (DVG, 2006b). Neopredisan[®] 135-1 ist von der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft in der 12. Desinfektions-mittelliste der DVG für die Tierhaltung gelistet und trägt das Gütezeichen der Deutschen Landwirtschafts-Gesellschaft (DLG) (DVG, 2006b). Der enthaltene Wirkstoff 4-Chlor-m-Kresol ist nach den OECD-Testrichtlinien 301 C biologisch gut abbaubar (zu 90 %) und darf im belegten Stall (bei sachgemäßer Anwendung) eingesetzt werden. Durch das substituierte Chlor-Atom ist 4-Chlor-m-Kresol fünfmal stärker bakterizid wirksam als m-Kresol, aber gleichzeitig wesentlich geringer schädlich für die Umwelt (FREY und LÖSCHER, 2007). Durch die kombinierte

Anwendung von Antiparasitika und anschließendem Einsatz von Neopredisan[®] 135-1 soll die erneute Aufnahme von bereits ausgeschiedenen Dauerstadien in das Wirtstier verhindert werden (DVG, 2006b; Herstellerangaben Anhang II). Anhand dieser beschriebenen Eigenschaften erschien dieses Präparat als geeigneter Kandidat zur Testung seiner Wirkung gegen die RVM.

Neopredisan[®] 135-1 zeigte in den eigenen Untersuchungen gegenüber den RVM eine Wirkung bereits ab einer Konzentration von 0,1 % und tötete bei einer Konzentration von 0,5 % nach zwei Stunden Einwirkzeit 100 % der RVM ab. LIEBISCH und LIEBISCH (2003) führten ebenfalls Untersuchungen mit 4-Chlor-m-Kresol, dem Wirkstoff von Neopredisan[®] 135-1, unter dem Präparatenamen Interkokask[®], durch und kamen zu dem Schluss, dass diese Substanz eine gute Wirksamkeit beim Einsatz gegen die RVM besitzt. HIEPE et al. (2009) berichteten auf dem 10. Hohenheimer Seminar der DVG, dass Neopredisan[®] 135-1 im Feldversuch bei 2 und 4 %iger Konzentration eine 100 %ige Wirksamkeit gegenüber allen Stadien der RVM zeigte. Die Schwierigkeit bei der Bekämpfung dieser liegt nach CHAUVE (1998) vor allem in der praktischen Anwendung der Desinfektionsmittel. Er definiert das ideale Desinfektionsmittel als einen für Arthropoden selektiv pathogenen Stoff, der in alle Spalten und Risse eindringt und so lange auf Oberflächen aktiv bleibt, bis alle RVM aus ihren Verstecken herausgekommen und getötet sind.

Da Neopredisan[®] 135-1 sich in diesen Versuchen als wirksam erwies und auch im belegten Stall angewendet werden darf, ist dieses Produkt als geeignet zur Bekämpfung der RVM zu betrachten. Eine Ausmerzung der RVM in einem betroffenen Geflügelbestand ist nach der Ansicht von CHAUVE (1998) und ARKLE et al. (2004) nur in Kombination mit moderner Geflügelhaltung ohne Versteckmöglichkeiten für die Milben möglich, da Desinfektionsmittel oft nicht bis auf den Grund von Ritzen vordringen. Dieser Ansicht sind auch SCHMÄSCHKE und RIBBECK (1997), die bei der Anwendung von Desinfektionsmitteln eine geringe Partikelgröße von 40-50 µm mit einem Druck von 540 kPa für wesentlich halten. CHIRICO und TAUSON (2002) schlugen die Anwendung von akariziden Substanzen in Fallen vor, die an den Aggregationsplätzen der RVM aufgestellt werden sollen. Der Vorteil dieser Methode

ist, dass weder das Geflügel noch die Eier mit den eingesetzten Substanzen in Berührung kommen. Oberstes Ziel sollte nach CHAUVE (1998) und AXTELL und ARENDS (1990) insgesamt eine Optimierung des Managements sein, die eine konsequente Durchführung des All-in-all-out-Verfahrens mit abschließender Desinfektion, regelmäßige trockene und nasse Reinigungen, die Quarantäne des zugekauften Geflügels und das strikte Verhindern von Zutritt jeglicher Wildtiere beinhaltet (Abschnitt 2.1.7). MUL und KOENRAADT (2009) und MUL et al. (2009) entwickelten zusammen mit einem Expertenteam eine Checkliste angelehnt an das HACCP-(Hazard Analysis and Critical Control Points)-Konzept zur Verhinderung der Einschleppung und Verbreitung der RVM in Geflügelbeständen. Sie wurde von holländischen und britischen Geflügelhaltern evaluiert und für praktikabel und nützlich befunden. Sie könnte folglich für Betriebe mit Managementproblemen hilfreich sein (MUL und KOENRAADT, 2009; MUL et al., 2009). Zur abschließenden Beurteilung der Wirksamkeit von Neopredisan[®] 135-1 gegen die RVM sollte sich in einer weiteren Untersuchung die Prüfung in praxi anschließen, da die Ergebnisse eines Laborexperimentes nicht mit den Verhältnissen im Geflügelstall zu vergleichen sind.

6 Zusammenfassung

Die Rote Vogelmilbe (RVM, *Dermanyssus gallinae* DE GEER, 1778), ist der häufigste und bedeutendste Ektoparasit beim Nutzgeflügel. Da die RVM bis zu neun Monate ohne erneute Blutaufnahme in Ritzen der Stallgebäude überdauern kann und oft nicht durch Akarizid- und Desinfektionsmaßnahmen erreicht werden kann, könnte sie eine Rolle bei der Verbreitung von aviärem Influenza A-Virus (AIV) spielen.

Ziel dieser Untersuchung war es festzustellen, ob die RVM beim Blutsaugen an experimentell mit Influenzavirus A/turkey/Ontario/7732/1966 (H5N9) infizierten, virämischen Hühnern dieses Virus aufnimmt und mit einem zweiten Saugakt an AIV-naive Hühner übertragen kann und somit als Vektor für AIV in Frage kommt. Zu diesem Zweck wurden Hühner mit dem AIV infiziert und Grad und Dauer der eintretenden Virämie durch Virusreisolierungen in Hühnerembryofibroblasten-(HEF)- und Eikulturen nachgewiesen. Die RVM hatten Gelegenheit, in einem Zeitraum von 24 Stunden von diesen virämischen Hühnern Blut aufzunehmen. Aus den blutgefüllten RVM konnte das Virus mittels HEF-Kulturen noch 5 Tage nach dem Saugakt und mittels Eikultur noch 10 Tage nach dem Saugakt nachgewiesen werden. In einem zweiten Experiment konnten die AIV-haltigen RVM aus dem ersten Experiment nochmals Blut saugen, diesmal an gesunden, AIV-naiven Hühnern. Eines der acht Hühner erkrankte an aviärer Influenza. Das Virus konnte aus den Organen dieses Huhns isoliert werden. Mittels Hämagglutinationshemmungstest konnte eine Serokonversion bei vier von acht dieser Hühner festgestellt werden. Somit kommt der RVM eine Rolle als mechanischer Vektor bei der Verbreitung von AIV zu.

Auf Grund der erfolgten Übertragung des AIV durch die RVM von virämischen auf AIV-empfindliche Hühner ist die gezielte Bekämpfung dieses Ektoparasiten auch aus der Sicht der Epidemiologie des AIV besonders bedeutsam. Die Tilgung der RVM in Geflügelhaltungen ist durch die bereits dokumentierte Akarizid-Resistenz und wegen der legalen Beschränkungen bei der Anwendung von Akariziden immer schwieriger geworden. Aus diesem Grund wurde *in vitro* das chemische Desinfektionsmittel Neopredisan[®] 135-1 (Wirkstoff 4-Chlor-m-Kresol) auf die Wirksamkeit gegen die RVM untersucht. Neopredisan[®] 135-1 tötet die RVM schon bei 0,5 %iger Konzentration des

Wirkstoffs in wässriger Lösung nach 2-stündiger Einwirkzeit bei Raumtemperatur sicher ab.

7 Summary

The poultry red mite, *Dermanyssus gallinae* DE GEER, 1778, an experimentally confirmed mechanical vector for avian influenza A virus

The Poultry Red Mite (PRM, *Dermanyssus gallinae* DE GEER, 1778), is the most common and most important ectoparasite in poultry. Since it can outlast in crevices in the barn for nine months without blood meal and can not be reached in each case by disinfectants, it may play a role in the spread of avian influenza (AI).

The purpose of this study was to investigate, if the PRM is ingesting avian influenza A virus (AIV) during a blood meal on experimentally infected and subsequently viremic chickens. And whether it is possible for it to transmit AIV to healthy chickens and therefore serve as a vector for AIV. For this aim chicken were infected in an initial experiment with AIV and the observed viremia was confirmed by virus reisolation in chicken embryo fibroblast cultures (CEF) and egg cultures. The PRM could feed on the viremic chicken for 24 hours. It was possible to reisolate AIV from blood filled mites in CEF for 5 days and in embryonated eggs for 10 days after the blood meal. In a second experiment the PRM from the first experiment could feed again on healthy, AIV-naïve chickens. Using the hemagglutination-inhibition-test a seroconversion was detected in four of eight chickens. One of eight chickens developed signs and lesions of avian influenza. Virus could be isolated from the organs of this chicken. Therefore, the PRM acts as a mechanical vector for AIV. Based on the confirmed transmission of AIV by the PRM from viremic to AIV-susceptible chickens, the systematic control of this ectoparasite is very important from the view of AIV epidemiology.

Elimination of the PRM in layer farms is getting increasingly difficult due to the documented resistance to acaricides and the legal restrictions of their use under field conditions. For these reasons the chemical disinfectant Neopredisan[®] 135-1 (active component 4-chlor-m-kresol) was tested in vitro for its efficacy against the PRM. Neopredisan[®] 135-1 is lethal for the PRM by direct exposure to a 0.5 % aqueous solution for 2 hours at room temperature.

8 Literaturverzeichnis

- ABDEL-GHAFFAR, F., SOBHY, H. M., AL-QURAIHY, S. and SEMMLER, M. (2008): Field study on the efficacy of an extract of neem seed (Mite-Stop[®]) against the red mite *Dermanyssus gallinae* naturally infecting poultry in Egypt. *Parasitological Research* **103** (3): 481-485.
- ABDEL-GHAFFAR, F., SEMMLER, M., AL-RASHEID, K. and MEHLHORN, H. (2009): In vitro efficacy of ByeMite and Mite-Stop on developmental stages of the red chicken mite *Dermanyssus gallinae*. *Parasitological Research* **105** (5): 1469-1471.
- ALEXANDER, D. J., PARSONS, G. and MANVELL, R. J. (1986): Experimental assessment of the pathogenicity of eight avian influenza A viruses of H5 subtype for chickens, turkeys, ducks and quail. *Avian Pathology* **15** (4): 647-662.
- ALEXANDER, D. J. (2000): A review of avian influenza in different bird species. *Veterinary Microbiology* **74**, 3-13.
- ALEXANDER, D. J. (2006): An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine* **25** (30): 5637-5644.
- ALEXANDER, D. J. (2007): Summary of avian influenza activity in Europe, Asia, Africa and Australasia, 2002-2006. *Avian Diseases* **51** (1 Suppl.): 161-166.
- ALEXANDER, D. J. and CAPUA, I. (2008): Avian influenza in poultry. *Poultry Science* **64** (4): 513-531.
- AMONSIN, A., SONGSERM, T., CHUTINIMITKUL, S., JAM-ON, R., SAE-HENG, N., PARIYOTHORN, N., PAYUNGORN, S., THEAMBOONLERS, A. and POOVORAWAN, Y. (2007): Genetic analysis of influenza A virus (H5N1) derived from domestic cat and dog in Thailand. *Archives of Virology* **152** (10): 1925-1933.
- ARENDS, J. J. (2004): Parasitic Diseases – Mites. In: *Diseases of Poultry*, 11th edition, SAIF, Y. M., S. 920-923.
- ARKLE, S., GUY, J. H., BLACKETT, S. M. and SPARAGANO, O. (2004): Variation in the population of *Dermanyssus gallinae* in a free range laying unit and effectiveness of chemical control. *British Poultry Science* **45** Suppl. 1: 45-46.
- ARKLE, S., GUY, J. H. and SPARAGANO, O. (2006): Immunological effects and productivity variation of red mite (*Dermanyssus gallinae*) on laying hens - implications for egg production and quality. *World's Poultry Science Journal* **62**: 249-257.
- ARZEY, G. G. (1990): Mechanisms of spread of Newcastle Disease. *New South Wales Agriculture and Fisheries Technical Bulletin* **42**.

- ASH, L. S. and OLIVER, J. H., Jr. (1989): Susceptibility of *Ornithodoros parkeri* (Cooley) (Acari: Argasidae) and *Dermanyssus gallinae* (DeGeer) (Acari: Dermanyssidae) to ivermectin. *Journal of Medical Entomology* **26** (3): 133-139.
- AXTELL, R. C. and ARENDS, J. J. (1990): Ecology and management of arthropod pests of poultry. *Annual Review of Entomology* **35**: 101-126.
- BAKER, E. T. (1956): Dermanyssidae. In: A Technical Publication of the National Pest Control Association, New York. S. 12-18.
- BAKR, M. E., MORSY, T. A., NASSEF, N. E. and EL MELIGI, M. A. (1995): Mites infesting commensal rodents in Shebin El Kom, Menoufia G., Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* **25** (3): 853-859.
- BARBAZAN, P., THITITHANYANONT, A., MISSÉ, D., DUBOT, A., BOSC, P., LUANGSRI, N., GONZALEZ, J. P. and KITTAYAPONG, P. (2008): Detection of H5N1 avian influenza virus from mosquitoes collected in an infected poultry farm in Thailand. *Vector Borne Zoonotic Diseases* **8** (1): 105-109.
- BARTLEY, K., NISBET, A. J., OFFER, J. E., SPARKS, N. H., WRIGHT, H. W. and HUNTLEY, J. F. (2009): Histamine release factor from *Dermanyssus gallinae* (De Geer): Characterization and in vitro assessment as a protective antigen. *International Journal for Parasitology* **39** (4): 447-456.
- BECK, W. (1999): Farm animals as disease vectors of parasitic epizoonoses and zoophilic dermatophytes and their importance in dermatology. *Der Hautarzt* **50** (9): 621-628.
- BECK, W. and PFISTER, K. (2006): Mites as a cause of zoonoses in human beings. *Wiener Klinische Wochenschrift* **118** Suppl. 3: 27-32.
- BECK, W. und PANTCHEV, N. (2006): *Praktische Parasitologie bei Heimtieren*, 1. Auflage. Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co.KG, Hannover. S. 198-213.
- BEUGNET, F., CHAUVE, C., GAUTHEY, M. and BEERT, L. (1997): Resistance of the red poultry mite to pyrethroids in France. *The Veterinary Record* **140** (22): 577-579.
- BIRKETT, M. A., ABASSI, S. A., KROBER, T., CHAMBERLAIN, K., HOOPER, A. M., GUERIN, P. M., PETERSSON, J., PICKETT, J. A., SLADE, R. and WADHAMS, L. J. (2008): Antiectoparasitic activity of the gum resin, gum hagggar, from the East African plant, *Commiphora holtziana*. *Phytochemistry* **69** (8): 1710-1715.
- BOGDANOVA, E. N. (2005): Distribution and control of acari as vectors of human disease in urban population of Moscow. *Meditinskaja parazitologija i parazitarnye bolezni (Moskau)* **3**: 9-15.
- BOYD, A. S. (1997): Rickettsialpox. *Dermatologic clinics* **15** (2): 313-318.
- BØYUM, A. (1964): Separation of white blood cells. *Nature* **204**: 793-794.

- BRÄNNSTRÖM, S., HANSSON, I. and CHIRICO, J. (2010): Experimental study on possible transmission of the bacterium *Erysipelothrix rhusiopathiae* to chickens by the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. *Experimental and Applied Acarology* **50** (4): 299-307.
- BRATTON, R. L. and COREY, R. (2005): Tick-borne disease. *American Family Physician* **71** (12): 2323-2330.
- BROWN, J. D., SWAYNE, D. E., COOPER, R. J., BURNS, R. E. and STALLKNECHT, D. E. (2007): Persistence of H5 and H7 avian influenza viruses in water. *Avian Diseases* **51** (1. Suppl.): 285-289.
- BROWN, I. H. (2010): Summary of avian influenza activity in Europe, Asia, and Africa, 2006-2009. *Avian Diseases* **54** (1 Suppl): 187-193.
- BÜCHER, T. (1998): Untersuchungen zur Überlebensdauer von *Dermanyssus gallinae* in Abhängigkeit von Material, Temperatur und Luftfeuchte. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- CAPUA, I. and MUTINELLI, F. (2001): A colour atlas and text on avian influenza. Papi Editore, Bologna, Italien.
- CAPUA, I., MUTINELLI, F., POZZA, M. D., DONATELLI, I., PUZELLI, S. and CANCELLOTTI, F. M. (2002): The 1999-2000 avian influenza (H7N1) epidemic in Italy: Veterinary and human health implications. *Acta Tropica* **83** (1): 7-11.
- CARROLL, J. F. (1994): Feeding deterrence of northern fowl mites (Acari: Macronyssidae) by some naturally occurring plant substances. *Pesticide science* **41** (3): 203-207.
- CENCEK, T. (2003): Prevalence of *Dermanyssus gallinae* in poultry farms in Silesia Region in Poland. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* **47**: 465-469.
- CENTANNI, E. (1902): Die Vogelpest, Beitrag zu dem durch Kerzen filtrierbaren Virus. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten./Abteilung 1, Medizinisch-hygienische Bakteriologie, Virusforschung und tierische Parasitologie/Originale* **31**: 145-152.
- CHAMBERLAIN, R. W., SIKES, R. K. and SUDIA, W. D. (1957): Attempted laboratory infection of bird mites with the virus of St. Louis encephalitis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **6** (6): 1047-1053.
- CHAMBERLAIN, R. W. and SIKES, R. K. (1957): Laboratory investigations of the role of bird mites in the transmission of Eastern and Western Equine Encephalitis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **4**: 106-118.
- CHAUVE, C. (1998): The poultry red mite *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778): current situation and future prospects for control. *Veterinary Parasitology* **79** (3): 239-245.

- CHIRICO, J. and TAUSON, R. (2002): Traps containing acaricides for the control of *Dermanyssus gallinae*. *Veterinary Parasitology* **110** (1-2): 109-116.
- CHIRICO, J., ERIKSSON, H., FOSSUM, O. and JANSSON, D. (2003): The poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*, a potential vector of *Erysipelothrix rhusiopathiae* causing erysipelas in hens. *Medical Veterinary Entomology* **17** (2): 232-234.
- CHITWOOD, M. and LICHTENFELS, J. R. (1972): Identification of parasitic metazoa in tissue sections. *Experimental Parasitology* **32** (3): 407-519.
- CIOLCA, A. L., TANASE, I. and MAY, I. (1968): Role of the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*, in the transmission of spirochaetosis. *Archivum Veterinarium Polonicum* **5**, 207-215.
- COSOROABA, I. (2001): Massive *Dermanyssus gallinae* invasion in battery-husbandry raised fowls. *Revue de Medecine Veterinaire* **152** (1): 89-96.
- COX, M. M. and HOLLISTER, J. R. (2009): FluBlok, a next generation influenza vaccine manufactured in insect cells. *Biologicals* **37** (3): 182-189.
- CRUZ, M. D., ROBLES, M. C., JESPERSEN, J. B., KILPINEN, O., BIRKETT, M., DEWHIRST, S. and PICKETT, J. (2005): Scanning electron microscopy of foreleg tarsal sense organs of the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae* (DeGeer) (Acari: Dermanyssidae). *Micron - The International Research and Review Journal for Microscopy* **36** (5): 415-421.
- DANIEL, M. and CERNY, V. (1971): A case of a mass occurrence of the mite *Dermanyssus gallinae* in town flats. *Folia Parasitologica (Praha)* **18** (4): 364.
- DAUGSCHIES, A., BÖSE, R., MARX, J., TEICH, K. and FRIEDHOFF, K. T. (2002): Development and application of a standardized assay for chemical disinfection of coccidia oocysts. *Veterinary Parasitology* **103** (4): 299-308.
- DECLERQ, J. and NACHTEGAELE, L. (1993): *Dermanyssus gallinae* infestation in a dog. *Canine Practice* **18**: 34-36.
- DE GEER, C. (1778): *Acarus gallinae*. In: Mémoires pour servir à l'histoire des insectes. Tome septième, pp. I-XII, 1-950, Pl. 1-49. Stockholm. (Hesselberg). S. 111-112.
- DE JONG, M. C., STEGEMAN, A., VAN DER GOOT, J. and KOCH, G. (2009): Intra- and interspecies transmission of H7N7 highly pathogenic avian influenza virus during the avian influenza epidemic in The Netherlands in 2003. *Revue Scientifique et Technique* **28** (1): 333-340.
- DEVANEY, J. A., BEERWINKLE, K. R. and IVIE, G. W. (1982): Residual activity of selected pesticides on laying hens treated for northern fowl mite control by dipping. *Poultry Science* **61** (8): 1630-1636.
- DEVANEY, J. A. (1986): Ectoparasites. *Poultry Science* **65**: 649-656.

- DINH, P. N., LONG, H. T., TIEN, N. T., HIEN, N. T., MAI LE, T. Q., PHONG, I. H., TUAN, I., V, VAN, T. H., NGUYEN, N. B., VAN, T. P. and PHUONG, N. T. (2006): Risk factors for human infection with avian influenza A H5N1, Vietnam, 2004. *Emerging Infectious Diseases* **12** (12): 1841-1847.
- DIXON, W. J. (1993): *Statistical software manual*, Vol. 2. Berkeley, Los Angeles, London, University of California Press.
- DURDEN, L. A., LINTHICUM, K. J. and TURELL, M. J. (1992): Mechanical transmission of Venezuelan equine encephalomyelitis virus by hematophagous mites (Acari). *Journal of Medical Entomology* **29** (1): 118-121.
- DURDEN, L. A. and TURELL, M. J. (1993): Inefficient mechanical transmission of Langat (tick-borne encephalitis virus complex) virus by blood-feeding mites (Acari) to laboratory mice. *Journal of Medical Entomology* **30** (3): 639-641.
- DURDEN, L. A., LINTHICUM, K. J. and MONATH, T. P. (1993): Laboratory transmission of eastern equine encephalomyelitis virus to chickens by chicken mites (Acari: Dermanyssidae). *Journal of Medical Entomology* **30** (1): 281-285.
- DVG (2000): *Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel*, 3. Auflage. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V., Gießen.
- DVG (2006a): 12. Desinfektionsmittelliste der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) für die Tierhaltung (2003). Ausschuss Desinfektion in der Veterinärmedizin Gießen, 1. Nachtrag zur 12. Desinfektionsmittelliste der DVG für die Tierhaltung vom 07.2006.
- DVG (2006b): 6. Desinfektionsmittelliste der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) für den Lebensmittelbereich (2003). Ausschuss Desinfektion in der Veterinärmedizin Gießen, 1. Nachtrag zur 12. Desinfektionsmittelliste der DVG für den Lebensmittelbereich vom 08.2006.
- EASTERDAY, B. C., HINSHAW, V. S. and HALVORSON, D. A. (1997): Influenza. In: *Diseases of Poultry*, 10th edition. CALNEK, B. W., BARNES, H. J., BEARD, C. W., MCDUGALD, L. R., SAIF, Y. M. (eds.). Iowa State University Press, Ames, Iowa. S. 583-605.
- ECKERT, J., FRIEDHOFF, K. T., ZAHNER, H. und DEPLAZES, P. (2005): *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin*, 1. Auflage. Enke-Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co.KG, Stuttgart. S. 343-401.
- EICHLER, W. (1980): *Grundzüge der veterinärmedizinischen Entomologie*, 1. Auflage. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena. S. 129-132.
- ELSTON, D. (2004): Prevention of arthropod-related disease. *Journal of the American Academy of Dermatology* **51**: 947-954.

- EMOUS, R. A., FIKS-VAN NIEKERK T. G. C. M. and MUL M. F. (2005): Enquete vogelmijten op leghennenbedrijven: € 11.000.000 schade voor de sector. *Pluimveehouderij* **35**: 8-9.
- EVERS, J. (2009): Bekämpfung von Vogelmilben durch Raubmilben. *AZ-Vogelinfo* **56**, 218-220.
- FAO (2010): Avian Influenza Disease Emergency. *FAO AIDE news* **63**: 1-17.
- FIDDES, M. D., LE GRESLEY, S., PARSONS, D. G., EPE, C., COLES, G. C. and STAFFORD, K. A. (2005): Prevalence of the poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) in England. *The Veterinary Record* **157** (8): 233-235.
- FLETCHER, M. G. and AXTELL, R. C. (1991): Susceptibilities of northern fowl mite, *Ornithonyssus sylviarum* (Acarina: Macronyssidae), and chicken mite, *Dermanyssus gallinae* (Acarina: Dermanyssidae), to selected acaricides. *Experimental and Applied Acarology* **13** (2): 137-142.
- FLI (2007): Lagebericht zur Aviären Influenza. *Epidemiologisches Bulletin. Friedrich-Loeffler-Institut* **1**: 1-9.
- FLI (2008): Lagebericht zur Aviären Influenza. *Epidemiologisches Bulletin. Friedrich-Loeffler-Institut* **3**: 1-6.
- FLI (2009): Risikobewertung zur Einschleppung von hochpathogenem aviärem Influenzavirus (HPAI). *Risikobewertung Februar 2009, Friedrich-Loeffler-Institut*: 1-21.
- FORONDA, P., VALLADARES, B., RIVERA-MEDINA, J. A., FIGUERUELO, E., ABREU, N. and CASANOVA, J. C. (2004): Parasites of *Columba livia* (Aves: Columbiformes) in Tenerife (Canary Islands) and their role in the conservation biology of the laurel pigeons. *Parasite* **11** (3): 311-316.
- FOUCHIER, R. A., MUNSTER, V., WALLENSTEN, A., BESTEBROER, T. M., HERFST, S., SMITH, D., RIMMELZWAAN, G. F., OLSEN, B. and OSTERHAUS, A. D. (2005): Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *Journal of Virology* **79** (5): 2814-2822.
- FREY, H.-H. und LÖSCHER, W. (Hsrg.) (2007): Desinfektionsmittel – Alkylphenole. In: *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin, Sonderausgabe der 2. Auflage*. Enke-Verlag in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co.KG. S. 470.
- FRITZSCHE, K. (1962): Parasitäre Krankheiten. In: *FRITZSCHE, K. und GERRIETS, E. (Hsrg.). Geflügelkrankheiten, 2. Auflage*, Paul Parey, Berlin. S. 324-369.
- GARDINER, C. H. and POYNTON, S. L. (1997): *An Atlas of Metazoan Parasites in Animal Tissues*, 1st edition. Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, DC. S. 56-61.

- GENCHI, C., HUBER, H. and TRALDI, G. (1984): The efficacy of flumethrin (Bayticol Bayer) for the control of chicken mite *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778) (Acarina, Dermanyssidae). *Archivio Veterinario Italiano* **35**, 125-128.
- GEORGE, D. R., SMITH, T. J., SPARAGANO, O. A. and GUY, J. H. (2008): The influence of 'time since last blood meal' on the toxicity of essential oils to the poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*). *Veterinary Parasitology* **155** (3-4): 333-335.
- GEORGE, D. R., SPARAGANO, O. A., PORT, G., OKELLO, E., SHIEL, R. S. and GUY, J. H. (2009a): Repellence of plant essential oils to *Dermanyssus gallinae* and toxicity to the non-target invertebrate *Tenebrio molitor*. *Veterinary Parasitology* **162** (1-2): 129-134.
- GEORGE, D. R., MASIC, D., SPARAGANO, O. A. and GUY, J. H. (2009b): Variation in chemical composition and acaricidal activity against *Dermanyssus gallinae* of four eucalyptus essential oils. *Experimental and Applied Acarology* **48** (1-2): 43-50.
- GEORGE, D. R., BIRON, J. M., JOLLY, G., DUVALLET, G. and SPARAGANO, O. A. (2009c): Toxicity of geraniol solution in vitro to the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. *Parasite* **16** (4): 319-321.
- GEORGE, D. R., OLATUNJI, G., GUY, J. H. and SPARAGANO, O. A. (2010): Effect of plant essential oils as acaricides against the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*, with special focus on exposure time. *Veterinary Parasitology* **169** (1-2): 222-225.
- GERLACH, F. (1927): Geflügelpest. In: KOLLE, W., KRAUS, R., und UHLENHUTH, P. (Hrsg.). *Handbuch der pathogenen Mikroorganismen*, Band IX, Lfg. 10. Gustav Fischer und Urban & Schwarzenberg, Jena und Berlin, Wien. S. 178-179.
- GERN, L. (2005): The biology of the *Ixodes ricinus* tick. *Therapeutische Umschau* **62** (11): 707-712.
- GRATZL, E. und KÖHLER, H. (1968): Geflügelpest. In: GRATZL, E. und KÖHLER, H. (Hrsg.). *Spezielle Pathologie und Therapie der Geflügelkrankheiten*. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, S. 178-200.
- GREBENYUK, R. V., CHIROV, P. A. and KADYSHEVA, A. M. (1972): The role of wild animals and blood-sucking arthropods in the epizootiology of infection with *Listeria*. Rol' Dikikh Zhivotnykh i Krovososushchikh Chlenistonogikh v Epizootologii Listerioza. Frunze, Kirghiz SSR; Izdatel'stvo Ilim. Institut Biologii, Akademiya Nauk Kirgizskoi SSR, Frunze, Kirghiz, SSR. 124 pp.
- GRZIMEK, B. (1942): *Krankes Geflügel*, 3. Auflage. Fritz Pfenningstorff, Berlin. S. 144-148.
- GUY, J. H., KHAJAVI, M., HLALEL, M. M. and SPARAGANO, O. (2004): Red mite (*Dermanyssus gallinae*) prevalence in laying units in Northern England. *British Poultry Science* **45** Suppl. 1: 15-16.

- HAAG-WACKERNAGEL, D. (2005): Parasites from feral pigeons as a health hazard for humans. *Annals of Applied Biology* **147**: 203-210.
- HAAG-WACKERNAGEL, D. and BIRCHER, A. J. (2010): Ectoparasites from Feral Pigeons Affecting Humans. *Dermatology* **220** (1): 82-92.
- HAFEZ, H. M., BÖHM, R. und STEIN, W. (2002): Tierseuchendesinfektion in der Geflügelhaltung/ Schädlinge, Biologie und Bekämpfung. In: STRAUCH, D. und BÖHM, R. (Hrsg.). *Reinigung und Desinfektion in der Nutztierhaltung und Veredelungswirtschaft*, 2. Auflage. Enke-Verlag, Stuttgart. S. 141-142 und 325-307.
- HAMSCHER, G., PRIESS, B., HARTUNG, J., NOGOSSEK, M., GLÜNDER, G. and NAU, H. (2002): Determination of propoxur residues in eggs by liquid chromatography-diode array detection after treatment of stocked housing facilities for the poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*). *Analytica Chimica Acta* **483**: 19-26.
- HAMSCHER, G., PRIESS, B. and NAU, H. (2007a): Determination of phoxim residues in eggs by using high-performance liquid chromatography diode array detection after treatment of stocked housing facilities for the poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*). *Analytica Chimica Acta* **586** (1-2): 330-335.
- HAMSCHER, G., GLÜNDER, G., EPE, C. und NAU, H. (2007b): Zur Rückstandsproblematik bei der Roten Vogelmilbe mit Antiparasitika im belegten Legehennen-Stall. Beihefte zum TiHo-Anzeiger. S. 26-29.
- HANSON, R. P., GRUMBLES, L. C., ROSENWALD, A. S. and VAN ROEKEL, H. (1963): Infective or lethal dose assay systems. In: *Methods for the Examination of Poultry Biologics*, 2nd edition. National Academy of Science, Washington, D. C., S. 25-28.
- HAO, L., SAKURAI, A., WATANABE, T., SORENSEN, E., NIDOM, C. A., NEWTON, M. A., AHLQUIST, P. and KAWAOKA, Y. (2008): *Drosophila* RNAi screen identifies host genes important for influenza virus replication. *Nature* **14**, 454 (7206): 890-893.
- HARRINGTON, D., DIN, H. M., GUY, J., ROBINSON, K. and SPARAGANO, O. (2009a): Characterization of the immune response of domestic fowl following immunization with proteins extracted from *Dermanyssus gallinae*. *Veterinary Parasitology* **160** (3-4): 285-294.
- HARRINGTON, D., CANALES, M., DE LA FUENTE, J., DE LUNA, C., ROBINSON, K., GUY, J. and SPARAGANO, O. (2009b): Immunisation with recombinant proteins subolesin and Bm86 for the control of *Dermanyssus gallinae* in poultry. *Vaccine* **27** (30): 4056-4063.

- HERGARTEN, G. (1994): Influenza A: Aviäres Wirtsspektrum, Symptomatik und Organläsionen sowie ein Vergleich biologischer Eigenschaften neuerer H1N1-Isolate aus Puten und Schweinen. Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- HERTEL, M. (1904): Geflügelcholera und Hühnerpest. Arbeit und Gesundheit **20**: 435-511.
- HIEPE, T. und RIBBECK, R. (1982): Lehrbuch der Parasitologie, 1. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. S. 19-117.
- HIEPE, T., AL HALBOUNI, A. und GOSSING, S. (2009): Zur Desinfektionsmittelprüfung gegen exogene Parasitenstadien in der Tierhaltung. 10. Hohenheimer Seminar. 1-11.
- HILBRICH, P. (1978): Krankheiten des Geflügels unter besonderer Berücksichtigung der Haltung und Fütterung, 3. Auflage. Verlag Hermann Kuhn GmbH & CO.KG, Villingen-Schwenningen. S. 261-263.
- HINDLE, E. (1912): Attempts to transmit "Fowl Pest" by *Argas persicus*. Bulletin de la Societe ´de Pathologie Exotique **5**: 165-167.
- HÖGLUND, J., NORDENFORS, H. and UGGLA, A. (1995): Prevalence of the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*, in different types of production systems for egg layers in Sweden. Poultry Science **74** (11): 1793-1798.
- HOFFMANN, G. (1987): Vogelmilben als Lästlinge, Krankheitserzeuger und Vektoren bei Mensch und Nutztier. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift **95**: 7-10.
- HOLT, J. G., KRIEG, N. R., SNEATH, P. H. A., STALEY, J. T. and WILLIAMS, S. T. (1994): Bergey's Manual[®] of determinative bacteriology, 9th edition, Williams & Wilkins, Baltimore, USA.
- HOWITT, B. F., DOGDE, H. R., BISOPH, L. K. and GORRIE, R. H. (1948): Virus of Eastern Equine Encephalomyelitis isolated from chicken mites (*D. gallinae*) and chicken lice (*E. stramineus*). Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine **68**: 622-625.
- HSU, S. M., RAINE, L. and FANGER, H. (1981): Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. Journal of Histochemistry and Cytochemistry **29** (4): 577-580.
- IMMELMANN, K., PRÖVE, E. und SOSSINKA, R. (1996): Hormonelle Regelkreise. In: Einführung in die Verhaltensforschung. 4. Auflage, Blackwell-Wissenschafts Verlag, Berlin. S. 81-82.

- JOACHIM, A., ECKERT, E., PETRY, F., BIALEK, R. and DAUGSCHIES, A. (2003): Comparison of viability assays for *Cryptosporidium parvum* oocysts after disinfection. *Veterinary Parasitology* **111** (1): 47-57.
- JUNGMANN, R., RIBBECK, R., EISENBLATTER, S. und SCHEMATUS, H. (1970): Zur Schadwirkung und Bekämpfung des *Dermanyssus gallinae*- und Federlingbefalls bei Legehennen. *Monatshefte für Veterinärmedizin* **25** (1): 28-32.
- KALETA, E. F. und WERNER, O. (2005): Orthomyxoviridae. In: SIEGMANN, O. und NEUMANN, U. (Hrsg.). *Kompendium der Geflügelkrankheiten*, 6. Auflage. Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG, Hannover. S. 135-142.
- KALETA, E. F., HERGARTEN, G. and YILMAZ, A. (2005): Avian influenza A viruses in birds - an ecological, ornithological and virological view. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* **112** (12): 448-456.
- KAWAOKA, Y., YAMNIKOVA, S., CHAMBERS, T. M., LVOV, D. K. und WEBSTER, R. G. (1990): Molecular characterization of a new hemagglutinin, subtype H14, of influenza A virus. *Virology* **179**, 759-767.
- KAWAOKA, Y., COX, N. J., HALLER, O., HONGO, S., KAVERIN, N., KLENK, H. D., LAMB, R. A., MCCAULEY, J., PALESE, P., RIMSTAD, E. and WEBSTER, R. G. (2005): Family Orthomyxoviridae. In: FAUQUET, C. M., MAYO, M. A., DESSELBERGER, U. and BALL, L. A. (eds.). *Virus Taxonomy*, 8th edition. Elsevier Inc., San Diego, London. S. 681-689.
- KEAWCHAROEN, J., ORAVEERAKUL, K., KUIKEN, T., FOUCHIER, R. A., AMONSIN, A., PAYUNGPORN, S., NOPPORNANTH, S., WATTANODORN, S., THEAMBOONIERS, A., TANTILERTCHAROEN, R., PATTANARANGSAN, R., ARYA, N., RATANAKORN, P., OSTERHAUS, D. M. and POOVORAWAN, Y. (2004): Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. *Emerging Infectious Diseases* **10** (12): 2189-2191.
- KECECI, T., HANDEMIR, E. and ORHAN, G. (2004): The effect of *Dermanyssus gallinae* infestation on hematological values and body weights of cocks. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* **28** (4): 192-196.
- KILPINEN, O. (1999): Problems caused by the chicken mite, *Dermanyssus gallinae*, in the Danish Egg Production. *Arsberetning Annual Report 1999*, 61-65.
- KILPINEN, O. (2001): Activation of the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae), by increasing temperatures. *Experimental and Applied Acarology* **25** (10-11): 859-867.
- KILPINEN, O., ROEPSTORFF, A., PERMIN, A., NORGAARD-NIELSEN, G., LAWSON, L. G. and SIMONSEN, H. B. (2005): Influence of *Dermanyssus gallinae* and *Ascaridia galli* infections on behaviour and health of laying hens (*Gallus gallus domesticus*). *British Poultry Science* **46** (1): 26-34.

- KILPINEN, O. (2005): How to obtain a bloodmeal without being eaten by the host: the case of poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. *Physiological Entomology* **30**: 232-240.
- KILPINEN, O. and STEENBERG, T. (2009): Inert dusts and their effects on the poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*). *Experimental and Applied Acarology* **48** (1-2): 51-62.
- KIM, S. I., YI, J. H., TAK, J. H. and AHN, Y. J. (2004): Acaricidal activity of plant essential oils against *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae). *Veterinary Parasitology* **120** (4): 297-304.
- KIM, S. I., NA, Y. E., YI, J. H., KIM, B. S. and AHN, Y. J. (2007): Contact and fumigant toxicity of oriental medicinal plant extracts against *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae). *Veterinary Parasitology* **145** (3-4): 377-382.
- KIRKWOOD, A. C. (1963): Longevity of the mites *Dermanyssus gallinae* and *Liponyssus sylviarum*. *Experimental Parasitology* **14**: 358-366.
- KIRKWOOD, A. C. (1965): A trap perch for the control of the poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*). *British Poultry Science* **6** (1): 73-78.
- KIRKWOOD, A. C. (1967a): Anaemia in poultry infested with the red mite *Dermanyssus gallinae*. *The Veterinary Record* **80** (17): 514-516.
- KIRKWOOD, A. C. (1967b): Control of poultry mites. *British Poultry Science* **8** (1): 75-80.
- KIRKWOOD, A. C. (1974): Sulphonamides for the experimental control of the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **68** (1): 125-128.
- KLOPFLEISCH, R., WERNER, O., MUNDT, E., HARDER, T. und TEIFKE, J. P. (2006): Neurotropism of highly pathogenic avian influenza virus A/chicken/Indonesia/2003 (H5N1) in experimentally infected pigeons (*Columbia livia f. domestica*). *Veterinary Pathology* **43** (4): 463-470.
- KORENBERG, E. I., PCHELKINA, A. A. and KOVALEVSKY, J. V. (1984): Contact of birds with tick-borne encephalitis virus in the eastern part of the Russian plain. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology* **28** (1): 65-72.
- KOWALSKI, A. and SOKÓL, R. (2009): Influence of *Dermanyssus gallinae* (poultry red mite) invasion on the plasma levels of corticosterone, catecholamines and proteins in layer hens. *Polish Journal of Veterinary Sciences* **12** (2): 231-235.
- KRAMMER, F. and GRABHERR, R. (2010): Alternative influenza vaccines made by insect cells. *Trends in Molecular Medicine* **16** (7): 313-320.

- KRAUSS, S., WALKER, D., PRYOR, S. P., NILES, L., CHENGHONG, L., HINSHAW, V. S. and WEBSTER, R. G. (2004): Influenza A viruses of migrating wild aquatic birds in North America. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **4** (3): 177-189.
- KRIEG, A. (1981): Über das Auftreten von *Bacillus thuringiensis* als Krankheitserreger bei Mehlmotten (Phycitidae) mit einem Hinweis auf sein Vorkommen in Getreideprodukten. *Nachrichtenblatt Deutscher Pflanzenschutzdienst* **33** (9): 129-132.
- KRÜGER, M. (2002): Allgemeine Bakteriologie. In: MAYR, A. und ROLLE, M. (Hrsg.). *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, 7. Auflage. Enke Verlag, Stuttgart. S. 377-415.
- KUIKEN, T., RIMMELZWAAN, G., VAN RIEL D., VAN AMERONGEN G., BAARS, M., FOUCHIER, R. and OSTERHAUS, A. (2004): Avian H5N1 influenza in cats. *Science* **306** (5694): 241.
- LAINSON, R. (1958): Some observations on the life-cycle of *Atoxoplasma*, with particular reference to the parasite's schizogony and its transmission by the mite *Dermanyssus gallinae*. *Nature* **182** (4644): 1250-1251.
- LAINSON, R. (1960): The transmission of *Lankesterella* (= *Atoxoplasma*) in birds by the mite *Dermanyssus gallinae*. *Journal of Protozoology* **7**: 321-322.
- LANG, G., NARAYAN, O., ROUSE, B. T., FERGUSON, A. E. and CONNELL, M. C. (1968a): A new Influenza A Virus infection in turkeys II. A highly pathogenic variant, A/turkey/Ontario 7732/66. *Canadian Journal of Veterinary Research* **9** (7): 151-160.
- LANG, G., ROUSE, B. T., NARAYAN, O., FERGUSON, A. E. and CONNELL, M. C. (1968b): A new influenza virus infection in turkeys I. Isolation and characterization of virus 6213. *Canadian Journal of Veterinary Research* **9** (1): 22-29.
- LAST, J. M. (1988): *A Dictionary of Epidemiology*, 2nd edition. Oxford University Press, New York. S. 129-134.
- LEONOVICH, S. A. (2006): Tarsal sensory complex of the red chicken mite *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae). *Parazitologiya* **40** (2): 124-131.
- LESNA, I., WOLFS, P., FARAJI, F., ROY, L., KOMDEUR, J. and SABELIS, M. W. (2009): Candidate predators for biological control of the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*. *Experimental and Applied Acarology* **48** (1-2): 63-80.
- LEWIS, P. D., PERRY, G. C., MORRIS, T. R. and MIDGLEY, M. M. (1992): Intermittent lighting regimes and mortality rates in laying hens. *World's Poultry Science Journal* **48** (2): 113-120.
- LIEBERMANN, H. (1992): Orthomyxoviridae. In: *Lehrbuch der veterinärmedizinischen Virologie*. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart: S. 81-89.

- LIEBISCH, A. (1996): Parasitenbekämpfung und ihre Auswirkungen auf die Umwelt. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift **103**: 268-273.
- LIEBISCH, A. und LIEBISCH, G. (1998): Neuerungen zum Resistenztest bei der Roten Vogelmilbe. 55. Fachgespräch Geflügelkrankheiten der DVG.
- LIEBISCH, G. (1999): Prüfung der Wirksamkeit und Wirkungsdauer von MENNOMITEX (Menno Chemie GmbH, Norderstedt) gegen die Rote Vogelmilbe (*Dermanyssus gallinae*). Prüfungsbericht. 1-23.
- LIEBISCH, A. und LIEBISCH, G. (2001): Resistenzen und Prüfung neuer Mittel bei der Bekämpfung von Roten Vogelmilben (*Dermanyssus gallinae*). Der Praktische Schädlingsbekämpfer **53** (3): 11-14.
- LIEBISCH, A. und LIEBISCH, G. (2003): Biologie, Schäden und Bekämpfung beim Befall durch die Rote Vogelmilbe (*D. gallinae*). Lohmann Information **4**: 1-7.
- LU, P. S. (2006): Early diagnosis of avian influenza. Science **312** (5772): 337.
- LUCIUS, R. und LOOS-FRANK, B. (1997): Parasitologie, 1. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin. S. 271-278.
- LUNDH, J., WIKTELIUS, D. and CHIRICO, J. (2005): Azadirachtin-impregnated traps for the control of *Dermanyssus gallinae*. Veterinary Parasitology **130** (3-4): 337-342.
- MALHERBE, H. H. und STRICKLAND-CHOMLEY, M. (1980): Cytopathic changes affecting both cytoplasm and nucleus, Orthomyxoviruses (Influenza A, B and C). In: Viral Cytopathology, CRC Press, Inc., Florida, United States, S. 59-60.
- MARANGI, M., CAFIERO, M. A., CAPELLI, G., CAMARDA, A., SPARAGANO, O. A. and GIANGASPERO, A. (2009): Evaluation of the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae) susceptibility to some acaricides in field populations from Italy. Experimental and Applied Acarology **48** (1-2): 11-18.
- MARCHOUX, E. (1910): La Peste Aviaire n'est pas une maladie contagieuse. Comptes rendus des séances de la Société de Biologie et de ses filiales **68**: 346-347.
- MARSCHALL, J. and HARTMANN, K. (2008): Avian influenza A H5N1 infections in cats. The Journal of Feline Medicine and Surgery **10** (4): 359-365.
- MARTIN, S. W., MEEK, A. H. and WILLEBERG, P. (1987): Methods of Disease Transmission. In: Veterinary Epidemiology - Principles and Methods, 1st edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa. S. 248-250.
- MAURER, V., BIERI, M. und FÖLSCH, D. W. (1987): Das Suchverhalten von *Dermanyssus gallinae* in Hühnerställen. Archiv für Geflügelkunde **52** (5): 209-215.

- MAURER, V. und HERTZBERG, H. (2001): Was tun gegen die kleinen Vampire? DGS-Magazin **40**: 49-52.
- MAURER, V. and PERLER, E. (2006): Silicas for control of the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*. Proceedings Joint Organic Congress, Denmark.
- MAURER, V., PERLER, E. and HECKENDORN, F. (2009): In vitro efficacies of oils, silicas and plant preparations against the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*. Experimental and Applied Acarology **48** (1-2): 31-41.
- MAYR, A., BACHMANN, P. A., BIBRACK, B. und WITTMANN, G. (1977): Virologische Arbeitsmethoden, Bd. 1 u. 2, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- MAZZUOLI, S. (1916): Osservazioni sulla peste aviaria. La Clinica Veterinaria **38**: 1-6.
- MCGARRY, J. W. and TREES, A. J. (1991): Trap perches to assess the activity of pyrethrins against the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* in cage birds. Experimental and Applied Acarology **12** (1-2): 1-7.
- McKEEN, W. D., MULLENS, B. A., RODRIGUEZ, J. L. and MANDEVILLE, J. D. (1988): *Bacillus thuringiensis* exotoxin for northern fowl mite control. Proceedings Western Poultry Disease Conference **37**: 140-141.
- MEHLHORN, H., DÜWEL, D. und RAETHER, W. (1993): Diagnose und Therapie der Parasitosen von Haus-, Nutz- und Heimtieren, 2. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York. S. 338-363.
- MIELKE, D. and HIEPE, T. (1998): The effectiveness of different disinfectants based on p-chloro-m-cresol against *Ascaris suum* eggs under laboratory conditions. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift **111** (7-8): 291-294.
- MIGNON, B. and LOSSON, B. (2008): Dermatitis in a horse associated with the poultry mite (*Dermanyssus gallinae*). Veterinary Dermatology **19** (1): 38-43.
- MILES, A., SPINK, L., KIEZEBRINK, H. and SPARREY, J. (2009): Practical adult education exercises for avian influenza prevention, preparedness and outbreak response. XVIth World Veterinary Poultry Association Congress, Book of abstracts: 209.
- MO, I. P., BRUGH, M., FLETCHER, O. J., ROWLAND, G. N. and SWAYNE, D. E. (1997): Comparative pathology of chickens experimentally inoculated with avian influenza viruses of low and high pathogenicity. Avian Diseases **41** (1): 125-136.
- MODROW, S., FALKE, D., SCHÄTZL, H. und TRUYEN, U. (2010): Die Evolution der Viren; Orthomyxoviren. In: Molekulare Virologie, 3. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin. S. 121-123; 355-384.
- MONREAL, H. M., OPITZ, H. M. und KRAFT, V. (1971): Untersuchungen über die Minimaldosis von Newcastle-Trinkwasserimpfstoffen. Tierärztliche Umschau **12**: 575-579.

- MORO, C. V., FRAVALO, P., AMELOT, M., CHAUVE, C., ZENNER, L. and SALVAT, G. (2007a): Colonization and organ invasion in chicks experimentally infected with *Dermanyssus gallinae* contaminated by *Salmonella* Enteritidis. *Avian Pathology* **36** (4): 307-311.
- MORO, C. V., DESLOIRE, S., CHAUVE, C. and ZENNER, L. (2007b): Detection of *Salmonella* sp. in *Dermanyssus gallinae* using an FTA[®] filter-based polymerase chain reaction. *Medical and Veterinary Entomology* **21** (2): 148-152.
- MUL, M., VAN NIEKERK, T., CHIRICO, J., MAURER, V., KILPINEN, O., SPARAGANO, O., THIND, B. B., ZOONS, J., MOORE, D., BELL, B., GJEVRE, A. G. and CHAUVE, C. (2009): Control methods for *Dermanyssus gallinae* in systems for laying hens: results of an international seminar. *World's Poultry Science Journal* **65**: 589-599.
- MUL, M. F. and KOENRAADT, C. J. (2009): Preventing introduction and spread of *Dermanyssus gallinae* in poultry facilities using the HACCP method. *Experimental and Applied Acarology* **48** (1-2): 167-181.
- NAJDROWSKI, M., JOACHIM, A. and DAUGSCHIES, A. (2007): An improved in vitro infection model for viability testing of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Veterinary Parasitology* **150** (1-2): 150-154.
- NARAYAN, O., LANG, G. and ROUSE, B. T. (1969a): A new influenza A virus infection in turkeys. IV. Experimental susceptibility of domestic birds to virus strain turkey-Ontario 7732-1966. *Archiv der Gesamten Virusforschung* **26** (1): 149-165.
- NARAYAN, O., LANG, G. and ROUSE, B. T. (1969b): A new influenza A virus infection in turkeys. V. Pathology of the experimental disease by strain turkey-Ontario 7732-66. *Archiv der Gesamten Virusforschung* **26** (1): 166-182.
- NISBET, A. J. and BILLINGSLEY, P. F. (2000): A comparative survey of the hydrolytic enzymes of ectoparasitic and free-living mites. *International Journal of Parasitology* **30** (1): 19-27.
- NISBET, A. J., HUNTLEY, J. F., MACKELLAR, A., SPARKS, N. and McDEVITT, R. (2006): A house dust mite allergen homologue from poultry red mite *Dermanyssus gallinae* (De Geer). *Parasite Immunology* **28** (8): 401-405.
- NORDENFORS, H., HÖGLUND, J. and UGGLA, A. (1999a): Effects of temperature and humidity on oviposition, molting, and longevity of *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae). *Journal of Medical Entomology* **36** (1): 68-72.
- NORDENFORS, H., HÖGLUND, J., UGGLA, A. and CHIRICO, J. (1999b): Studies on *Dermanyssus gallinae*, a mite pest in litter-based systems for laying hens in Sweden. *Swepar Triennial Report 1995-1997*, 66-75.
- NORDENFORS, H. and HÖGLUND, J. (2000): Long term dynamics of *Dermanyssus gallinae* in relation to mite control measures in aviary systems for layers. *British Poultry Science* **41** (5): 533-540.

- NORDENFORS, H. and CHIRICO, J. (2001): Evaluation of a sampling trap for *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae). *Journal of Economic Entomology* **94** (6): 1617-1621.
- NORDENFORS, H., HÖGLUND, J., TAUSON, R. and CHIRICO, J. (2001): Effect of permethrin impregnated plastic strips on *Dermanyssus gallinae* in loose-housing systems for laying hens. *Veterinary Parasitology* **102** (1-2): 121-131.
- NORMILE, D. (2005): Are Wild Birds to Blame? *Science* **310**: 426-428.
- O'CONNOR, B. M., FOUFOPOULOS, J., LIPTON, D. and LINDSTROM, K. (2005): Mites associated with the small ground finch, *Geospiza fuliginosa* (Passeriformes: Emberizidae), from the Galapagos Islands. *Journal of Parasitology* **91** (6): 1304-1313.
- OIE (2004): Highly pathogenic avian influenza. In: Office International des Epizooties (eds.). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees)*, 5th edition. World Organization for Animal Health, Paris. S. 258-270.
- OIE (2009): Avian influenza. *International Animal Health Code – 2009*. http://www.oie.int/eng/normes/mcode/en_sommaire.htm
- OLIVER, J. H., Jr., POUND, J. M. and SEVERINO, G. (1985): Evidence of a juvenile-hormone-like compound in the reproduction of *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae). *Journal of Medical Entomology* **22** (3): 281-286.
- OLSEN, B., MUNSTER, V. J., WALLENSTEN, A., WALDENSTROM, J., OSTERHAUS, A. D. and FOUCHIER, R. A. (2006): Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science* **312** (5772): 384-388.
- ORTON, D. I., WARREN, L. J. and WILKINSON, J. D. (2000): Avian mite dermatitis. *Clinical and Experimental Dermatology* **25** (2): 129-131.
- OSTLUND, E. N. and PEARSON, J. E. (2008): Arbovirus Infection. In: DUFOUR-ZAWALA, L., SWAYNE, D. E., PEARSON, J. E., GLISSON, J. R., REED, W. M., JACKWOOD, M. J. and WOOLCOCK, P. R. (eds.). *A Laboratory Manual for the isolation, identification, and characterisation of avian pathogens*, 5th edition. American Association of Avian Pathologist, Jacksonville. S. 184-187.
- PASICK, J., BERHANE, Y. and HOOPER-MCGREY, K. (2009): Avian influenza: The Canadian experience. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* **28** (1): 349-358.
- PAULUS, H. und WEYGOLDT, P. (2004): Arthropoda, Gliederfüßer. In: *Spezielle Zoologie, korrigierter und ergänzter Nachdruck der 1. Auflage*. Spektrum Akademischer Verlag (Elsevier GmbH), München. S. 411-494.
- PERDUE, M. L., SUAREZ, D. L. and SWAYNE, D. E. (2000): Avian influenza in the 1990s. *Avian and Poultry Biology Reviews* **11**: 1-20.

- PETROV, D. (1975): Study of *Dermanyssus gallinae* as a carrier of *Pasteurella multocida*. Veterinarno medicinski nauki **12** (5): 32-36.
- PHIPPS, L. P., ESSEN, S. C. and BROWN, I. H. (2004): Genetic subtyping of influenza A viruses using RT-PCR with a single set of primers based on conserved sequences within the HA2 coding region. Journal of Virological Methods **122** (1): 119-122.
- PRUDNIKOVA, M. A. (1992): On the impossibility of use of the beetle *Alphitobius diaperinus* for biological control of the chicken mite *Dermanyssus gallinae*. Entomological Review **70**: 75-78.
- REEVES, W. C., HAMMON, W., DOETSCHMAN, W. H., MCCLURE, H. E. and SATHER, G. (1955): Studies on mites as vectors of Western equine and St-Louis encephalitis viruses in California. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **4**, 90-105.
- REHÁČEK J., ZUPANCICOVÁ M., KOVÁCOVÁ E., URVÖLGYI J. and BREZINA R. (1975): Study of rickettsioses in Slovakia. II. Infestation of fleas and mites in mole nests in some localities in Central Slovakia with *C. burneti* and Rickettsiae belonging to the spotted fever (SF) group. Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology **19** (3): 329-339.
- RESHETNIKOV, P. T. (1967): The tick *Dermanyssus gallinae* - carrier of fowl spirochaetosis. Veterinariia **44** (3): 48.
- REYNAUD, M. C., CHAUVE, C. and BEUGNET, F. (1997): *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778): Experimental life cycle and test of the acaricidal action of moxidetin and ivermectin. Revue de Medecine Veterinaire **148** (5): 433-438.
- RIBBECK, R. (1992): Arthropodenbefall. In: HEIDER, G. und MONREAL, G. (Hrsg.). Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels, Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart. S. 445-447.
- RIMMELZWAAN, G. F., VAN RIEL, D., BAARS, M., BESTEBROER, T. M., VAN AMERONGEN, G., FOUCHIER, R. A., OSTERHAUS, A. D. and KUIKEN, T. (2006): Influenza A virus (H5N1) infection in cats causes systemic disease with potential novel routes of virus spread within and between hosts. American Journal of Pathology **168** (1): 176-183.
- ROLLE, M. und MAYR, A. (2002): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 7. Auflage. Enke Verlag, Stuttgart. S. 321-323.
- ROMASHEVA (1968): Distribution of bacteria of the group *Bac. thuringensis*. Vsesojuznoe Entomologiceskoe Obscestvo **13**: 86-90.
- ROSEN, S., YERUHAM, I. and BRAVERMAN, Y. (2002): Dermatitis in humans associated with the mites *Pyemotes tritici*, *Dermanyssus gallinae*, *Ornithonyssus bacoti* and *Androlaelaps casalis* in Israel. Medical and Veterinary Entomology **16** (4): 442-444.

- RÜLKE, C. P. A. (2007): Veterinärhistorische Studie über die Klassische Geflügelpest der Vögel: Entwicklung von der ersten Beschreibung bis zum heutigen Kenntnisstand und volkswirtschaftliche Bedeutung. Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- RUMMEL, W. (1996): Desinfektionsmittel. In: FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W. und STARKE, K. (Hrsg.). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 7. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag. S. 782-784.
- SANDROCK, C. and KELLY, T. (2007): Clinical review: Update of avian influenza A infections in humans. *Critical Care* **11** (2): 209.
- SAWABE, K., HOSHINO, K., ISAWA, H., SASAKI, T., HAYASHI, T., TSUDA, Y., KURAHASHI, H., TANABAYASHI, K., HOTTA, A., SAITO, T., YAMADA, A. and KOBAYASHI, M. (2006): Detection and isolation of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses from blow flies collected in the vicinity of an infected poultry farm in Kyoto, Japan, 2004. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **75** (2): 327-332.
- SAWABE, K., TANABAYASHI, K., HOTTA, A., HOSHINO, K., ISAWA, H., SASAKI, T., YAMADA, A., KURAHASHI, H., SHUDO, C. and KOBAYASHI, M. (2009): Survival of avian H5N1 influenza A viruses in *Calliphora nigribarbis* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology* **46** (4): 852-855.
- SCHAT, K. A. and PURCHASE, H. G. (1989): Cell-culture methods. In: PURCHASE, H. G., ARP, L. H., DOMERMUTH, C. H. and PEARSON, J. E. (eds.). A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, 3rd edition. American Association of Avian Pathologists, Kendall/Hunt Publishing Co., Dubuque, IA. S. 167-175.
- SCHMÄSCHKE, R. und RIBBECK, R. (1997): Vogelmilbenbefall. In: WIESNER, E. (Hrsg.). Handlexikon der Tierärztlichen Praxis, 1. Auflage. Enke Verlag, Stuttgart. S. 911-911f.
- SCHMITZ, S. (2007): Diagnose von Viren. In: Der Experimentator – Zellkultur. Spektrum Akademischer Verlag Elsevier GmbH, München. S. 172-174.
- SEDDON, H. R. (1968): Diseases of domestic animals in Australia, 2nd edition. A. J. Arthur, Canberra. S. 121-125.
- SHAHIDUZZAMAN, M., DYACHENKO, V., KEIDEL, J., SCHMÄSCHKE, R. and DAUGSCHIES, A. (2010): Combination of cell culture and quantitative PCR (cc-qPCR) to assess disinfectants efficacy on *Cryptosporidium* oocysts under standardized conditions. *Veterinary Parasitology* **167** (1): 43-99.

- SHEN, S., MAHADEVAPPA, G., OH, H. L., WEE, B. Y., CHOI, Y. W., HWANG, L. A., LIM, S. G., HONG, W., LAL, S. K. and TAN, Y. J. (2008): Comparing the antibody responses against recombinant hemagglutinin proteins of avian influenza A (H5N1) virus expressed in insect cells and bacteria. *Journal of Medical Virology* **80** (11): 1972-1983.
- SHIRINOV, F. B., IBRAGIMOVA, A. I. and MISIROV, Z. G. (1972): The dissemination of the fowl-pox by the mite *Dermanyssus gallinae*. *Veterinariia* **4**: 48-49.
- SIEGMANN, O., HINZ, K.-H., KALETA E. F. und NEUMANN, U. (2005): Geflügelsektion. In: SIEGMANN, O. und NEUMANN, U. (Hrsg.). *Kompodium der Geflügelkrankheiten*, 6. Auflage. Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co.KG, Hannover. S. 85-86.
- SIMS, L. D., DOMENECH, J., BENIGNO, C., KAHN, S., KAMATA, A., LUBROTH, J., MARTIN, V. and ROEDER, P. (2005): Origin and evolution of highly pathogenic H5N1 avian influenza in Asia. *The Veterinary Record* **157** (6): 159-164.
- SLEMONS, R. D. and EASTERDAY, B. C. (1972): Host response differences among 5 avian species to an influenzavirus-A-turkey-Ontario-7732-66 (Hav5N?). *Bulletin of the World Health Organization* **47** (4): 521-525.
- SMITH, M. G., BLATTNER, R. J. and HEYS, F. M. (1944): The isolation of the St. Louis encephalitis virus from chicken mites (*Dermanyssus gallinae*) in nature. *American Association for the Advancement of Science* **100**: 362-363.
- SOKÓL, R., SZKAMELSKI, A. and BARSKI, D. (2008): Influence of light and darkness on the behaviour of *Dermanyssus gallinae* on layer farms. *Polish Journal of Veterinary Sciences* **11** (1): 71-73.
- SONGSERM, T., AMONSIN, A., JAM-ON, R., SAE-HENG, N., PARIYOTHORN, N., PAYUNGPORN, S., THEAMBOONLERS, A., CHUTINIMITKUL, S., THANAWONGNUWECH, R. and POOVORAWAN, Y. (2006): Fatal avian influenza A H5N1 in a dog. *Emerging Infectious Diseases* **12** (11): 1744-1747.
- SPACKMAN, E., SENNE, D. A., MYERS, T. J., BULAGA, L. L., GARBER, L. P., PERDUE, M. L., LOHMAN, K., DAUM, L. T. and SUAREZ, D. L. (2002): Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *Journal of Clinical Microbiology* **40** (9): 3256-3260.
- SPARAGANO, O., PAVLICEVIC, A., MURANO, T., CAMARDA, A., SAHIBI, H., KILPINEN, O., MUL, M., VAN EMOUS, R.; LE BOUQUIN, S., HOEL, K. and CAFIERO, M. A. (2009): Prevalence and key figures for the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* infections in poultry farm systems. *Experimental and Applied Acarology* **48** (1-2): 3-10.

- STALLKNECHT, D. E. (1998): Ecology and epidemiology of avian influenza viruses in wild bird populations: Waterfowl, shorebirds, pelicans, cormorants, etc. In Proceedings of the 4th International Symposium on Avian Influenza, D. E. SWAYNE (ed.). American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, Pennsylvania, S. 61–69.
- STAFFORD, K. A., LEWIS, P. D. and COLES, G. C. (2006): Preliminary study of intermittent lighting regimens for red mite (*Dermanyssus gallinae*) control in poultry houses. *The Veterinary Record* **158** (22): 762-763.
- STERNBERGER, L. A., HARDY, P. H. Jr., CUCULIS, J. J. and MEYER, H. G. (1970): The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **18** (5): 315-333.
- STRABERG, E. and DAUGSCHIES, A. (2007): Control of piglet coccidiosis by chemical disinfection with a cresol-based product (Neopredisan 135-1). *Parasitology Research* **101** (3): 599-604.
- STURMAN, I. I. (1965): The role of chicken mites in pasteurellosis infection. *Veterinariia* **42** (12): 85-87.
- SUAREZ, D. L. (2000): Evolution of avian influenza viruses. *Veterinary Microbiology* **74** (1-2): 15-27.
- SUAREZ, D. L. and SCHULTZ-CHERRY, S. (2000): Immunology of avian influenza virus: A review. *Developmental and Comparative Immunology* **24**: 269-283.
- SULKIN, S. E. (1945): Recovery of equine encephalomyelitis virus (western type) from chicken mites. *Science* **101**: 381-383.
- SULKIN, S. E., WISSEMAN, C. L., IZUMI, E. M. and ZARAFONETIS, C. (1955): Mites as possible vectors or reservoirs of equine encephalomyelitis in Texas. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **4**, 119-135.
- SWAYNE, D. E. and SUAREZ, D. L. (2000): Highly pathogenic avian influenza. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* **19** (2): 463-482.
- SWAYNE, D. E. and HALVORSON, D. A. (2008): Influenza. In: SAIF, Y. M., FADLY, A. M., GLISSON, J. R., MCDUGALD, L. R., NOLAN, L. K. and SWAYNE, D. E. (eds.). *Diseases of Poultry*, 12th edition. Blackwell, Ames. S. 153-184.
- SWAYNE, D. E., SENNE, D. A. and SUAREZ, D. L. (2008): Avian Influenza. In: DUFOUR-ZAWALA, L., SWAYNE, D. E., GLISSON, J. R., PEARSON, J. E., REED, W. M., JACKWOOD, M. J. and WOOLCOCK, P. R. (eds.). *A Laboratory Manual for the isolation, identification, and characterization of avian pathogens*, 5th edition. American Association of Avian Pathologists, Jacksonville. S. 128-134.

- TAVASSOLI, M., OWNAG, A., POURSEYED, S. H. and MARDANI, K. (2008): Laboratory evaluation of three strains of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* for controlling *Dermanyssus gallinae*. *Avian Pathology* **37** (3): 259-263.
- TENTER, A. M. (2006): In: SCHNIEDER, T., BOCH, J. und SUPPERER, R.. Veterinärmedizinische Parasitologie, 6. Auflage, MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co.KG, Stuttgart. S. 21-24.
- THEKISOE, M. M., MBATI, P. A. and BISSCHOP, S. P. (2003): Diseases of free-ranging chickens in the Qwa-Qwa District of the northeastern Free State province of South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association* **74** (1): 14-16.
- THIRY, E., ZICOLA, A., ADDIE, D., EGBERINK, H., HARTMANN, K., LUTZ, H., POULET, H. and HORZINEK, M. C. (2007): Highly pathogenic avian influenza H5N1 virus in cats and other carnivores. *Veterinary Microbiology* **122** (1-2): 25-31.
- THRUSFIELD, M. (1986): The transmission and maintenance of infection. In: *Veterinary epidemiology*, 1st edition. Robert Hartnoll Limited, Bodmin, Cornwall. S. 63-75.
- TODISCO, G., PAOLETTI, B., GIAMMARINO, A., MANERA, M., SPARAGANO, O. A., IORIO, R., GIANNELLA, B. and ROBBE, D. (2008): Comparing therapeutic efficacy between ivermectin, selamectin, and moxidectin in canaries during natural infection with *Dermanyssus gallinae*. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1149**: 365-367.
- THRAENHART, O. (2002): Desinfektion, Sterilisation. In: *Medizinische Virologie – Grundlagen, Diagnostik und Therapie virologischer Krankheitsbilder*. DOERR, H. W. und GERLICH, W. H. (Hrsg.). Georg Thieme Verlag, Stuttgart: S. 116-139.
- TSUDA, Y., HAYASHI, T., HIGA, Y., HOSHINO, K., KASAI, S., TOMITA, T., KURAHASHI, H. and KOBAYASHI, M. (2009): Dispersal of a blow fly, *Calliphora nigribarbis*, in relation to the dissemination of highly pathogenic avian influenza virus. *Japanese Journal of Infectious Diseases* **62** (4): 294-297.
- TUCCI, E. C., PRADO, A. P. and ARAUJO, R. P. (2008a): Thermal requirements of *Dermanyssus gallinae* (de Geer, 1778) (Acari: Dermanyssidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria* **17** (2): 67-72.
- TUCCI, E. C., PRADO, A. P. and ARAUJO, R. P. (2008b): Development of *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae) at different temperatures. *Veterinary Parasitology* **155** (1-2): 127-132.
- TUMPEY, T. M., ALVAREZ, R., SWAYNE, D. E. and SUAREZ, D. L. (2005): Diagnostic approach for differentiating infected from vaccinated poultry on the basis of antibodies to NS1, the nonstructural protein of influenza A virus. *Journal of Clinical Microbiology* **43** (2): 676-683.

- VALIENTE MORO, C., CHAUVE, C. and ZENNER, L. (2005): Vectorial role of some dermanyssoid mites (Acari, Mesostigmata, Dermanyssoidea). *Parasite* **12** (2): 99-109.
- VALIENTE MORO, C., DESLOIRE, S., VERNZOY-ROZAND, C., CHAUVE, C. and ZENNER, L. (2007a): Comparison of the VIDAS((R)) system, FTA((R)) filter-based PCR and culture on SM ID for detecting *Salmonella* in *Dermanyssus gallinae*. *Letters in Applied Microbiology* **44** (4): 431-436.
- VALIENTE MORO, C., CHAUVE, C., and ZENNER, L. (2007b): Experimental infection of *Salmonella* Enteritidis by the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. *Veterinary Parasitology* **146** (3-4): 329-336.
- VALIENTE MORO, C., DE LUNA, C. J., TOD, A., GUY, J. H., SPARAGANO, O. A. and ZENNER, L. (2009): The poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*): a potential vector of pathogenic agents. *Experimental and Applied Acarology* **48** (1-2): 93-104.
- VAN DER SLUIS, W. (2009): An itchy issue. Newsletter WorldPoultry.net. Reed Business. <http://www.worldpoultry.net/newsletter/>
- VAN HEELSBERGEN, T. (1929): *Handbuch der Geflügelkrankheiten und der Geflügelzucht*, 1. Auflage. Enke Verlag, Stuttgart. S. 279-295.
- VILLEGAS, P. (1998): Titration of Biological Suspensions. In: AAAP (eds.). *Isolation and Identification of Avian Pathogens*, 4th edition. S. 248-254.
- WALL, R. and SHEARER, D. (1997): *Veterinary Entomology*, 1st edition. Chapman & Hall, London. S. 43-95.
- WEBER, S., HARDER, T., STARICK, E., BEER, M., WERNER, O., HOFFMANN, B., METTENLEITER, T. C. and MUNDT, E. (2007): Molecular analysis of highly pathogenic avian influenza virus of subtype H5N1 isolated from wild birds and mammals in northern Germany. *Journal of General Virology* **88** (Pt 2): 554-558.
- WEBSTER, R. G., BEAN, W. J., GORMAN, O. T., CHAMBERS, T. M. and KAWAOKA, Y. (1992): Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiology Review* **56** (1): 152-179.
- WEBSTER, R. G. (1997): Influenza virus: transmission between species and relevance to emergence of the next human pandemic. *Archives of Virology Supplement* **13**: 105-113.
- WEBSTER, R. G. and HULSE, D. J. (2004): Microbial adaptation and change: Avian influenza. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* **23** (2): 453-465.
- WEGNER, Z. (1976): Laboratory study on some parasitic hematophagous arthropods as possible subsidiary links of the biocenosis of tick-borne encephalitis. *Bulletin of the Institute of Maritime and Tropical Medicine in Gdynia* **27**: 75-85

- WEYER, F. und ZUMPT, F. (1966): Grundriss der medizinischen Entomologie, 4. Auflage. Johann Ambrosius Barth Verlag, Leipzig. S. 48-49.
- WHO (2010): H5N1 avian influenza: Timeline of major events. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/ai_timeline/en/index.html: S. 1-36.
- WIESNER, E. und RIBBECK, R. (2000): Lexikon der Veterinärmedizin, 4. Auflage, Enke im Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart. S. 99, 1533.
- WILLADSEN, P. (1999): Immunological control of ectoparasites: past achievements and future research priorities. *Genetic Analysis* **15** (3-5): 131-137.
- WOJCIK, A. R., GRYGON-FRANCKIEWICZ, B., ZBIKOWSKA, E. and WASIELEWSKI, L. (2000): Invasion of *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778) in poultry farms in the Torun region. *Wiadomości parazytologiczne* **46** (4): 511-515.
- WOOD, H. P. (1917): The chicken mite (*Dermanyssus gallinae* Redi): its life history and habits. US Department of Agriculture Technical Bulletin **553**: 15.
- WRIGHT, H. W., BARTLEY, K., NISBET, A. J., MCDEVITT, R. M., SPARKS, N. H., BROCKLEHURST, S. and HUNTLEY, J. F. (2009): The testing of antibodies raised against poultry red mite antigens in an in vitro feeding assay; preliminary screen for vaccine candidates. *Experimental and Applied Acarology* **48** (1-2): 81-91.
- XIE, Z., PANG, Y. S., LIU, J., DENG, X., TANG, X., SUN, J. and KHAN, M. I. (2006): A multiplex RT-PCR for detection of type A influenza virus and differentiation of avian H5, H7, and H9 hemagglutinin subtypes. *Molecular and Cellular Probes* **20** (3-4): 245-249.
- XU, X., SUBBARAO, K., COX, N. J. and GUO, Y. (1999) Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) virus: similarity of its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong. *Virology* **261** (1): 15-19.
- YASSINE, H. M., LEE, C. W., GOURAPURA, R. and SAIF, Y. M. (2010): Interspecies and intraspecies transmission of influenza A viruses: viral, host and environmental factors. *Animal Health Research Reviews* **11** (1): 53-72.
- YUNKER, C. E. (1973): Mites. In: FLYNN, R. J., *Parasites of Laboratory Animals*, 1st edition. The Iowa State University Press, Ames, Iowa. S. 425-433.
- ZANELLA, A. (2007): Role of *Dermanyssus gallinae* in the transmission of *Salmonella gallinarum* in caged layers. *Proceedings of the 56th Western Poultry Disease Conference*, 104-105.
- ZEMAN, P., STIKA, V., SKALKA, B., BARTIK, M., DUSBABEK, F. and LAVICKOVA, M. (1982): Potential role of *Dermanyssus gallinae* De Geer, 1778 in the circulation of the agent of pullurosis-typhus in hens. *Folia Parasitologica (Praha)* **29** (4): 371-374.

- ZEMAN, P. and ZELEZNY, J. (1985): The susceptibility of the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778), to some acaricides under laboratory conditions. *Experimental and Applied Acarology* **1** (1): 17-22.
- ZEMAN, P. (1987): Systemic efficacy of ivermectin against *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778) in fowls. *Veterinary Parasitology* **23** (1-2): 141-146.
- ZEMAN, P. (1991): Synergism and antagonism in mixtures of acaricides for controlling the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778). In: DUSBABEK, F., BUKVA, V. (eds.), *Modern Acarology*, Vol. 2. Academia, Prague and SPB Academic Publishing, The Hague: S. 759–764.
- ZEMSKAYA, A. A. and PCHELKINA, A. A. (1955): Experimental infection of ticks *Dermanyssus gallinae* Redi and *Bdellonyssus bacoti* Hirst with Q fever. *Doklady Akademii Nauk SSSR* **101** (2): 391-392.
- ZEMSKAYA, A. A. and PCHELKINA, A. A. (1962): The relationship between gamasid mites and the tick-borne encephalitis Virus. *Medskaya Parazitology* **31**: 439-442.
- ZEMSKAYA, A. A. and PCHELKINA, A. A. (1967): Gamasoid mites and Q fever. In: MARKEVICH (ed.), *Problemy Parazitologii*, Kiev, 258–259
- ZENNER, L., BON, G., DERNBURG, A., LUBAC, S. and CHAUVE, C. (2003): Preliminary studies of the monitoring of *Dermanyssus gallinae* in free-range poultry farms. *British Poultry Science* **44** (5): 781-782.
- ZENNER, L., BON, G., CHAUVE, C., NEMOZ, C. and LUBAC, S. (2009): Monitoring of *Dermanyssus gallinae* in free-range poultry farms. *Experimental and Applied Acarology* **48** (1-2): 157-166.
- ZOONS, J. (2004): The effect of light programmes on red mite (*Dermanyssus gallinae*) in battery cage housing. *Welfare of the laying Hen* **27**: 416.
- ZÜRN, F. A. (1882): *Die Krankheiten des Hausgeflügels*, 1. Auflage. Bernhardt Friedrich Voigt, Weimar. S. 73-77.

Rechtstexte

2005 Richtlinie 2005/94/EG

mit Gemeinschaftsmaßnahmen zur Bekämpfung der Aviären Influenza und zur Aufhebung der Richtlinie 92/40/EWG vom 20. Dezember 2005, Amtsblatt der Europäischen Union Nr. L 10, S. 16 vom 14.1.2006

2007 Tierseuchengesetz

(TierSG), Ausfertigungsdatum: 26.06.1909. Vollzitat: "Tierseuchengesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 22. Juni 2004 (BGBl. I S. 1260, 3588), das zuletzt durch Artikel 1 § 5 Absatz 3 des Gesetzes vom 13. Dezember 2007 (BGBl. I S. 2930) geändert worden ist". Stand: Neugefasst durch Bek. v. 22. 6.2004 I 1260, 3588; zuletzt geändert durch Art. 1 § 5 Abs. 3 G v. 13.12.2007 I 2930

2009 Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpest

(Geflügelpest-Verordnung, GeflPestSchV), Ausfertigungsdatum: 18.10. 2007. Vollzitat: "Geflügelpest-Verordnung vom 18. Oktober 2007 (BGBl. I S. 2348), die zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 18. Dezember 2009 (BGBl. I S. 3939) geändert worden ist" Stand: Zuletzt geändert durch Art. 1 V v. 18.12.2009 I 3939 Diese Verordnung dient der Umsetzung der Richtlinie 2005/94/EG des Rates vom 20. Dezember 2005 mit Gemeinschaftsmaßnahmen zur Bekämpfung der Aviären Influenza und zur Aufhebung der Richtlinie 92/40/EWG (ABl. EU 2006 Nr. L 10 S. 16).

Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen

(TierSeuchAnzV), Ausfertigungsdatum: 23.05.1991. Vollzitat: "Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen in der Fassung der Bekanntmachung vom 3. November 2004 (BGBl. I S. 2764), die zuletzt durch Artikel 5 der Verordnung vom 18. Dezember 2009 (BGBl. I S. 3939) geändert worden ist". Stand: Neugefasst durch Bek. v. 3.11.2004 I 2764; zuletzt geändert durch Art. 5 V v. 18.12.2009 I 3939

Anhang I: Reagenzien und Geräte

I.I. Zellkulturmedien, Puffer und Reagenzien

I.I.I. Puffer

Dulbecco's Phosphate Buffer (DPB)

8,00 g/l NaCl	VWR, Darmstadt
0,40 g/l KCl	VWR, Darmstadt
1,15 g/l Na ₂ HPO ₄	VWR, Darmstadt
0,20 g/l KH ₂ PO ₄	VWR, Darmstadt
gelöst in A. dest.. Der Puffer wurde steril filtriert, portioniert und bei Zimmer- temperatur aufbewahrt.	

HEPES-Puffer (Hydroxyethyl-Piperazinyl-Ethansulfonsäure)

238,3 g HEPES in 1000 ml A. dest. gelöst, filtriert und bei 4 °C gelagert.	Serva, Heidelberg
---	-------------------

PBS (Phosphate buffered saline)

PBS-Tabletten (1 Tablette/500 ml A. dest.)	Gibco, Paisley, Großbritannien
--	--------------------------------

I.I.II. Zusätze zu den Zellkulturmedien

Enrofloxacin

Baytril® 2,5 %ige Injektionslösung Leverkusen	Bayer Vital GmbH,
--	-------------------

FKS (Foetal Bovine Serum-Gold)

PAA Laboratories GmbH,
Pasching, Österreich

Gentamicin-Lösung

1 g Gentamicinsulfat (663 U/mg) in 20 ml A. dest. gelöst und bei 4 °C gelagert.	Seromed, Biochrom, Berlin
--	---------------------------

L-Glutamin-Lösung

29,25 g L-Glutamin reinst in 1000 ml A. dest. gelöst und bei -20 °C gelagert.	Serva, Heidelberg
--	-------------------

Tryptose-Phosphat-Brühe (TPB)

29,5 g TPB-Pulver in 1000 ml A. dest. gelöst und bei 4 °C gelagert.	Difco, Michigan, USA
--	----------------------

Trypsin-Stammlösung

4,0 g/l Trypsin (1:250) 10,0 g/l D(+)-Glucose-Monohydrat	Difco, Michigan, USA
---	----------------------

gelöst in zehnfach konzentriertem DPB. Die Lösung wurde steril filtriert, portioniert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Für die Herstellung der Gebrauchslösung wurde die Stammlösung 1:10 mit A. dest. verdünnt.

Trypsin-Versen (TV)

3,5 g/l Trypsin (1:250)	Difco, Michigan, USA
0,2 g/l EDTA- Na_2	Serva, Heidelberg
1,0 g/l D(+)-Glucose-Monohydrat	VWR, Darmstadt
0,5 ml/l Phenolrotlösung (1 g/l)	VWR, Darmstadt

gelöst in DPB. Die Lösung wurde mit 1 N NaOH auf pH 7,5 eingestellt, steril filtriert, portioniert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

I.I.III. Zellkulturmedien

Basal Medium Eagle (BME) mit Earle'schen Salzen

500 ml BME EARLE Instamed 10-fach konzentriert	Seromed, Biochrom, Berlin
500 ml Tryptose-Phosphat-Brühe (TPB)	Difco, Michigan, USA
5 ml Gentamicin-Lösung	Seromed, Biochrom, Berlin
2,5 ml Candio-Hermal (Nystatin [®])	Hermal, Heidelberg
75 ml HEPES-Puffer	Serva, Heidelberg
50 ml L-Glutamin	Serva, Heidelberg

Alle Komponenten wurden in A. dest. gelöst und mit 1 N NaOH (VWR, Darmstadt) auf pH 7,5 eingestellt.

I.I.IV. Herstellung einer 1 %igen Erythrozytensuspension

Diese Suspension wird für die Durchführung des Hämagglutinationstests (HA-Test) und des Hämagglutinations-Hemmungstests (HAH-Test) benötigt.

Es werden dafür 2 ml Natriumzitratlösung pro 8 ml Hühnerblut in ein steriles Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Die Blutgewinnung von klinikseigenen SPF-Hühnern erfolgt durch Punktion der V. ulnaris des rechten oder linken Flügels. Das Zitratsblut wird im Anschluss 5 min bei $2.880 \times g$ zentrifugiert. Nun kann das Plasma und der Leukozytensaum mit einer Pipette abgenommen werden. Die verbliebenen Erythrozyten werden mit ca. 5 ml physiologischer NaCl-Lösung überschichtet, vorsichtig geschüttelt und anschließend wieder zentrifugiert. Der Überstand wird mit einer Pipette abgesaugt und dieser Waschvorgang insgesamt dreimal durchgeführt. Die Erythrozyten werden nun mit physiologischer NaCl-Lösung im Verhältnis 1:10 vermischt und im Kühlschrank für längstens 7 Tage aufbewahrt. Die Gebrauchslösung wird stets frisch vor den Tests durch 1:10 Verdünnung der 10 %igen Erythrozyten-Suspension hergestellt.

38 g/l Natriumzitat-2-hydrat	Merck, Darmstadt
------------------------------	------------------

in Aqua dest. gelöst und autoklaviert.

I.I.V. Lösungen und Puffer für die immunhistochemischen Färbungen

PAP-Methode:

Tris-buffered-saline (TBS, pH 7,6)

Stammlösung (10x):

60,57 g Tris (hydroxymethyl)-aminomethane	Sigma-Aldrich Chemie, Seelze
610 ml Aqua bidest.	
390 ml 1 N HCl	Merck, Darmstadt
Der pH-Wert wurde mit 1 N HCl eingestellt.	

Gebrauchslösung:

100 ml Stammlösung	
900 ml 0,8%iges NaCl in Aqua bidest.	Merck, Darmstadt
Die Gebrauchslösung hatte einen pH-Wert von 7,8.	

Imidazol/HCl-Puffer 0,1 M (pH 7,1)

6,81 g Imidazol	Sigma-Aldrich Chemie, Seelze
Aqua bidest. ad 1000 ml.	
Zugeben von 500 ml 0,1 M HCl. Der pH-Wert wurde mit 0,1 M HCl eingestellt. Lösung ca. 1 Woche haltbar.	

3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid-Dihydrat-Lösungen (DAB)

DAB	Sigma-Aldrich Chemie, Seelze
Imidazol	Sigma-Aldrich Chemie, Seelze
HCl 1 M/l	Merck, Darmstadt
H ₂ O ₂	E. Hilburg GmbH & Co KG, Sundern
100 mg DAB in 200 ml 0,1 M Imidazol/HCl-Puffer (pH 7,1) lösen und mischen (Magnetrührer). Filtrieren und unmittelbar vor Gebrauch 70 µl 30 %iges H ₂ O ₂ zugeben.	

Kardasewitch

200 ml 25 %ige Ammoniaklösung mit 800 ml 70 %igem Ethanol ansetzen.	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe Stockmeier Chemie, Dillenburg
--	--

Papanicolaous Gebrauchslösung

Papanicolaous Hämatoxylin 1b und Aqua dest. im Verhältnis 1:10 mischen und filtrieren.	Merck, Darmstadt
---	------------------

Antikörper

Schwein Anti Kan IgG (Art.Nr. ZO 196)	DakoCytomation, Hamburg
PAP Kan (Art.Nr. ZO 113)	DakoCytomation, Hamburg
Neg. K Rabbit Immunglobulin Fraction (Art.Nr. X0936)	DakoCytomation, Hamburg

Bovine Serum Albumin (Art.Nr. 001-00016)
(IgG- und Protease-free)

Dianova GmbH, Hamburg

Titrisol 1 m/l HCl (Art.Nr. 1.09970)

Merck, Darmstadt

Perhydrol 30 % (Art.Nr. 1.07210)

Merck, Darmstadt

Schweineserum (Art.Nr. 0750)

PAA

ABC-Methode:

Aquatex

Merck, Darmstadt

ABC: Vectastain Elite ABC Kit

Vector, Burlingame

Sekundärer Antikörper: goat anti-rabbit IgG1

Vector, Burlingame

AEC: 3-Amino-9-ethylcarbazole

Dako, Carpinteria, CA

DAKO AEC substrate-chromogen System

Citrat-Puffer

10 mM, pH 6,0) 2,1 g Citrat Monohydrat, 900 ml Aqua dest., zum Einstellen des pH 2 M NaOH (max. 25 ml)

TBS

Tris-buffered saline (0,1 M Tris base, 0,9 % NaCl, pH 7,6) 10 x TBS. pH 7,6, 60,57 g Tris(hydroxymehtyl)-aminomethan, 80,0 g NaCl. Auflösen in 500 ml Aqua dest., zum Einstellen des pH HCl (max. 35 ml), auffüllen auf 1000 ml mit Aqua dest.

I.I.VI. Sonstige Reagentien

AKH Spiritus

AVG Chemie GmbH, Berlin

Ethanol 94 %ig, verdünnt mit A. dest. auf 70 %ig

Ficoll-PaqueTM PLUS

Amersham Biosciences AB,
Uppsala, Schweden

Isotone Lösung, Dichte: 1,077.

Formalin 37 %ig (Formaldehyd-Hydrat)

VWR, Leuven, Belgien

IH Intermitox[®] Propoxur

Interhygiene, Cuxhaven

Paraffin dickflüssig

VWR, Darmstadt

Methanol rein

Schmidt-Chemikalien
GmbH, Dillenburg

Neopredisan[®] 135-1 (Ch.-B.:05008)
(25 g 4-Chlor-m-Kresol / 100 g)

Menno-Chemie GmbH,
Norderstedt

I.II. Verbrauchsmaterialien und Geräte**I.II.I. Verbrauchsmaterialien****Glasgeräte**

Reagenzgläser (Typ Assistent)
 Pipetten
 Glas-Petri-Schalen (80 x 15 mm)

Karl Hecht AG, Sondheim
 Karl Hecht AG, Sondheim
 Schott Glas, Mainz

Kryoröhrchen

Greiner Bio-One GmbH,
 Frickenhausen

Mikrotiterplatten

PS, 96er System V-Form

nerbe plus, Winsen/Luhe

Probengefäß Blutentnahme

1,3 ml LH, 35 I.E. Heparin/ml Blut

Sarstedt, Nürnberg

RotilaboR-Rundfilter (70 mm)

Carl Roth GmbH & Co. KG,
 Karlsruhe

Tesa-Stick[®] ohne Lösungsmittel (20 g)

Beiersdorf AG, Hamburg

Zellkulturgefäße

Gewebekulturschalen 35 mm
 Gewebekulturschalen 94 mm
 Zellkulturflaschen (175 cm²)

Alle:
 Greiner Bio-One GmbH,
 Kremsmünster, Österreich

24-Loch-Multiwellplatten (Flachboden)
 96-Loch-Multiwellplatten (Flachboden)

Beide:
 Falcon / Becton, Dickinson,
 Heidelberg

I.II.II. Verbrauchsmaterialien immunhistologische Färbung

Plastikküvetten Typ 1013

Gesellschaft für Labortechnik
 GmbH (GfL), Burgwedel
 I. Hecht, Kiel-Hasse

Eukitt[®]

Coverplates[™]

Live Science International,
 Frankfurt am Main

Superfrost*/Plus-Objektträger

Menzel-Gläser, Braunschweig

I.II.III. Geräte**Automatische Pipetten**

Pipettman, 25 µl
 Eppendorf Pipette 100-250 µl
 Eppendorf Pipette 200-500 µl

Gilson Abimed, Langenfeld
 Eppendorf AG, Hamburg
 Eppendorf AG, Hamburg

Brutmaschinen

Vorbrutmaschine (ca. 700 Eier, mit Wendung)

Brutmaschine (ca. 500 Eier, ohne Wendung)

Schumacher, Grünberg

Schumacher, Grünberg

Digitalkamera

Canon Power Shot G5

Whatman, Göttingen

Elektrapetten

Impact, 1250 µl

Impact II, 250 µl

Cellmate II

Matrix, Wehrheim

Matrix, Wehrheim

Matrix, Wehrheim

InkubatorModell B 5060 EK-CO₂

Heraeus Instruments, Hanau

Isolatoren

Stenglin Metall + Plastik, Radolfzell

Lichtmikroskope

Diavert

Modell 62057

WILD M3B mit KL 1500 electronic

Leitz, Wetzlar

Carl Zeiss, Oberkochen

Leitz, Wetzlar

Rüttler

IKA-Vibrax-VRR

Janke & Kunkel, Staufen im Breisgau

Schierlampe

Karl Blohm, Apparatebau, Hamburg

Sterile Werkbänke

Microflow Biological Safety Cabinet

Safeflow 1,2

Nunc, Wiesbaden

Nunc, Wiesbaden

Tissue Tec[®]

Ultraschallsonde

CO Branson Sonifier Cell Disruptor B15

Sakura Finetek Germany
GmbH, HeppenheimBranson Sonic Power,
Danbury, USA**Vortex-Schüttler**

Heidolph, Kelkheim

Anhang II: Auszüge aus dem Prospekt Neopredisan® 135-1

Das einzige Breitbanddesinfektionsmittel mit patentierter Wirkformel gegen ausgeschiedene Endoparasiten: Wurmeier, Kokzidien, Kryptosporidien. Auch wirksam gegen Clostridien, TBC und Prionen. Trägt das Gütezeichen der Deutschen Landwirtschafts-Gesellschaft (DLG)

Hersteller: MENNO Chemie-Vertrieb GmbH

Langer Kamp 104; D-22850 Norderstedt

Postfach: 3310; D-22826 Norderstedt

Tel.: 040-529 06 67-0 • Fax: 040-529 06 67 66

e-mail: info@menno.de / Internet: www.menno.de

Wirksam gegen:

- Wurmeier (<i>Ascaris suum</i>) ^{*A}	2 % - 2 h
- Wurmeier (<i>Heterakis</i> spp.) ^{*B}	2 % - 2 h
- Kokzidien (<i>Isospora suis</i>) ^{*C}	2 % - 1 h
- Kokzidien (<i>Eimeria tenella</i>) ^{*D}	3 % - 4 h
- Kryptosporidien ^{*E}	3 % - 1 h
- Clostridien ^{*F}	4 % - 1 h
- TBC ^{*A}	4 % - 3 h bzw. 6 % - 2 h
- Bakterien, Pilze und Viren ^{*G}	2 % - 2 h
- Prionen (Stamm 263K) ^{*H}	2 % - ½ h

*A Von der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e. V. (DVG) in der 12. Desinfektionsmittelliste für die Tierhaltung gelistet, Stand Mai 2003. Wirksamkeit: Antiparasitäre Wirkung gegen Wurmeier: 2%-2h, Kokzidien: 4%-2h, Tuberkulozidie: 4%-3h bzw. 6%-2h.

*B Gutachten, Institut für Parasitologie und Zoologie, Veterinärmedizinische Universität Wien, Prof. Dr. A. Joachim, vom 21.09.04. Ergebnis der in vivo-Versuche: 2 %/ 2 h.

*C Gutachten, Institut für Parasitologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Dr. A. Dauschies, vom 03.06.99. Ergebnis der in vitro-Versuche: 2 %/ 1 h, Wirksamkeit 96,96 % Lysis.

*D Gutachten, Institut für Parasitologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Dr. A. Dauschies, vom 14.07.98. Ergebnis der Tierversuche: 3 %/ 4 h, Wirksamkeit 98,92 % Lysis.

*E Gutachten Institut für Parasitologie, Humboldt-Universität zu Berlin, Prof. Dr. Dr. h.c. Th. Hiepe, Dr. D. Mielke, vom 02.11.98, Ergebnis der in vitro-Versuche: 3 %/ 1 h, Wirksamkeit 94,9 % Lysis.

- *F Gutachten Staatliches Veterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Potsdam, Dr. Köhler, 22.02.99. Ergebnis des in vitro Versuches: Auf gut gereinigten Flächen kann mit einer sicheren Abtötung der Sporen von *Cl. perfringens* bereits nach einstündiger Einwirkungszeit von 4 % Neopredisan® 135-1 gerechnet werden.
- *G Numéro d'autorisation: 2040282 AMM n° 2060035, Homologué par le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, Paris Cedex 15, France, 23.05.06. Bactericide, 0,75 % - 5 min.; Fongicide 0,5 % - 15 min.; Virucide 4 % - 30 min.
- *H Publikation: Infection control and hospital epidemiology, July 2006, Vol. 27, no. 7, DVM C. Riemer, RESULTS [...] Incubation with Neopredisan 135-1 at a concentration of 2 % led to a complete loss of proteinase K-resistant material. [...] When a final concentration of 2 % Neopredisan 135-1 was used, none of the hamsters showed clinical signs of a scrapie infection.

Angaben zum Wirkstoff Preventol CMK (4-Chlor-m-Kresol)

- Biologische Abbaubarkeit: ist biologisch gut (90 %) abbaubar nach OECD-Test guidelines 301 C
- Akute Toxizität: LD₅₀ oral, Ratte: 2.500 mg/kg Ratte. LD₅₀ dermal, Ratte: > 500 mg/kg, 7d Exposition; bei dieser Dosis keine Symptome. LD₅₀ inhalativ, Ratte: > 0,7 mg/l, 4 h Exposition; bei dieser Dosis keine Symptome
- Registrierungen/Zulassungen:
 - Preventol CMK (4-Chlor-m-Kresol) ist in der Liste der zugelassenen Konservierungsstoffe aufgeführt: 11. Kosmetik-Verordnung Stand 88) Anhang VI, Teil 1; mit der maximalen Dosierung von 0,2 % und der Einschränkung „Verboten in Erzeugnissen, die mit Schleimhäuten in Berührung kommen.“
 - In den USA ist 4-Chlor-m-Kresol und/oder dessen Natriumsalz als Konservierungsstoff für Produkte im Kontakt mit Lebensmitteln durch die Food and Drug Administration zugelassen.
- Auch im belegten Stall – bei sachgemäßer Anwendung – einsetzbar

Anhang III: Protokolle der immunhistochemischen Färbungen

Immunhistochemie Protokoll – Kaninchen Anti Influenza (α -RNP) PAP Institut für Veterinär-Pathologie, JLU Gießen

1. 2-3 μ m Schnitte aufziehen auf Superfrost*/plus Objektträger und Lufttrocknen bei Raumtemperatur
2. Entparaffinieren und rehydrieren wie folgt:

Xylol-Ersatz 1	3 min
Xylol-Ersatz 2	3 min
Xylol-Ersatz 3	3 min
Isopropanol 1	3 min
Isopropanol 2	3 min
Ethanol	3 min
80 % Ethanol	3 min
3. Inaktivierung der endogenen Peroxidase in Methanol (reinst) mit frisch zugesetztem 0,5 % H_2O_2 (Perhydrol[®] 30 % H_2O_2 p.a.) für 30 min bei Raumtemperatur
4. Spülen der Schnitte in TBS (pH 7,8)
5. Aufbringen der Objektträger auf Coverplates[™] und Einführung der Coverplates[™] in die Halterung
6. Inkubation mit 20 % Schweineserum in TBS (tris buffered saline)
7. Auftragen des Primärantikörpers Kaninchen Anti-AIV (1:6000 in TBS mit 20 % Schweineserum) oder von Kontrollkaninchenserum (1:6000; Negativkontrollsnitte); Inkubation 12-18 h bei 4 °C; waschen der Schnitte durch Einbringen von 2ml TBS in das Coverplate[™]
8. Auftragen des Sekundärantikörpers Schwein anti-Kaninchen IgG. (1:100 in TBS mit 20 % Schweineserum); Inkubation der Schnitte für 30 min bei Raumtemperatur; Spülen der Schnitte durch Einbringen von 2 ml TBS in das Coverplate[™]
9. Auftragen des Kaninchen-PAP (1:100 in TBS mit 1 % BSA (Bovines Serumalbumin)) für 30 min bei Raumtemperatur; Spülen der Schnitte durch Einbringen von 2 ml TBS in das Coverplate[™]
10. Inkubation der Schnitte unter ständigem Rühren (Magnetrührer) in einer Küvette mit 0,05 % 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) mit 0,1 M Imidazol / HCl-Puffer (pH 7,08) und 0,01 % H_2O_2 (30 %ig) für 10 min bei Raumtemperatur
11. Waschen 3 x 5 min in TBS und 1 x für 3 min in Aqua dest.
12. Inkubation der Schnitte für 5 min bei Raumtemperatur in Kardasewitch (1-5 % NH_4OH in 70 %igem Ethanol) zur Entfernung von Formalinpigment und anschließendes Waschen für 10 min in Aqua dest.
13. Gegenfärben mit Papanicolaous Hämatoxylin (1:10 in Aqua dest.) für etwa 20 s und bläuen der Schnitte für 5 min in Leitungswasser, einmal mit A. dest. spülen

14. Dehydrieren der Schnitte in der aufsteigenden Alkoholreihe je 3 min und zweimaliges Klären in Roti-Histol[®]
15. Eindecken mit Eukitt oder im Automaten (TissueTec[®]), dafür Objektträger umsetzen in Xylol

Labortechnisches Protokoll für Immunhistochemie gegen Aviäres Influenza A-Virus-Antikörper (Angele Breithaupt und Jens P. Teifke, FLI, Insel Riems)

- 1. Entwachung, Rehydration und Inaktivierung der endogenen Peroxidasen**
 - Xylol: 3 min x 2
 - 1-Propanol 100 % (n-Propanol): 3 min x 2
 - 1-Propanol 96 %: 3 min x 1
 - Methanol (90 %), H₂O₂ (3 %): 10 min (9 ml Methanol 100 % mit 1 ml H₂O₂ 30 %) 1 x
 - 1-Propanol 80%: 3 min x 1
 - 1-Propanol 70%: 3 min x 1
 - 1-Propanol 50%: 3 min x 1
 - Aqua dest. 3 min
- 2. Antigen-Gewinnung mit Citrat-Puffer**
 - Die Objektträger werden in einen Plastik-Objektträgerhalter, gefüllt mit 10 mM Citrat-Puffer gestellt und müssen vollständig mit der Pufferlösung bedeckt sein.
 - Die Halter werden für 10 min in einer Mikrowelle bis kurz vorm Kochen gestellt. Sollten die Objektträger nicht mehr vollständig mit Puffer bedeckt sein, muss er aufgefüllt werden.
 - Die Objektträger werden bei Raumtemperatur abgekühlt und anschließend mit TBS gespült.
- 3. Hemmung von unspezifischen Färbereaktionen mit Ziegen Serum**
 - Die Objektträger werden auf horizontale Objektträger-Ablagen gelegt und mit Ziegen Serum (100 %, ca. 100 µl pro Gewebeschnitt) für 30 min bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer bedeckt.

4. Immunhistochemische Färbung

- Das Ziegenserum wird entfernt (hier nicht mit TBS spülen)
- Zusatz des primären Antikörpers (Kaninchen Anti-NP), 1:1000 verdünnt mit TBS. Inkubation für 60 min bei Raumtemperatur in Feuchtkammer
- 3x Spülen mit TBS für 3 min
- Zusatz des sekundären Antikörpers (Ziege Anti-Kaninchen), 1:200 verdünnt in TBS. Inkubation für 60 min bei Raumtemperatur in Feuchtkammer.
- in der Zwischenzeit (30 min vor Gebrauch) Herstellung des Avidin-Biotin-Komplexes: 7 µl Avidin + 7 µl Biotin in 1 ml TBS, Pipettenspitze zwischen durch wechseln!
- 3x Spülen mit TBS für 3 min
- Zusatz des Avidin-Biotin-Komplexes. Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur in Feuchtkammer
- 3x Spülen mit TBS für 3 min
- Zusatz von AEC Substrat, die Entwicklung der Färbung evtl. unter dem Mikroskop verfolgen (3-10 min).
- Zum Stoppen der Reaktion die Objektträger in Halter mit Aqua dest. umsetzen.
- Die Objektträger mit Hämatoxylin gegenfärben für 2 min
- Spülen unter Leitungswasser für 10 min mit 2x Wasserwechsel
- Spülen in Aqua dest.
- Versiegeln der Objektträger mit wasserhaltigem Medium (Aquatex) und Deckgläschen

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Erhardt F. Kaleta möchte ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung von Arbeitsplatz, Material und Literatur, und ganz besonders für die jederzeit gewährte, freundliche Unterstützung bei Fragen und Problemen herzlich danken.

Besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Ursula Heffels-Redmann für die kritische Auseinandersetzung mit dem Manuskript. Ihre konstruktiven Anregungen haben diese Arbeit entscheidend geprägt.

Ein großes Dankeschön geht an Herrn Dr. Kernt Köhler (Institut für Veterinär-Pathologie, JLU) für die Anfertigung sämtlicher Histoschnitte, eines Teils der immunhistochemischen Färbungen und jede Menge nützliche Anregungen. Weiterhin an Herrn Prof. Dr. Jens Teifke (Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems) für die Anfertigung des anderen Teils der immunhistochemischen Färbungen. Herrn Prof. Dr. Timm Harder (Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald) danke ich für die Untersuchung der Isolate mittels PCR. Ebenso danke ich Herrn Dr. Werner Herbst (Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, JLU) für die Durchführung der Elektronenmikroskopie und die Überlassung der Fotos. Weiterhin danke ich Herrn ADir. Dr. Klaus Failing (AG Biomathematik und Datenverarbeitung) für seine enorme Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse und seinem Mitarbeiter Herrn Lothar Hähnsen für die Geduld bei vielen Formatierungsproblemen.

Sehr bedanken möchte ich mich bei Herrn ADir. Thomas Redmann für viele Lösungen drumherum und viel zeitliches Entgegenkommen. Herrn Prof. Dr. Michael Lierz danke ich für viele nützliche Ratschläge und Ideen, die mir bei auftauchenden Fragen und Problemen sehr geholfen haben.

Allen Mitarbeitern und Doktoranden der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische, allen voran Frau Wenke Heuser, danke ich für das angenehme, oft heitere Arbeitsklima, die Diskussions- und Hilfsbereitschaft und die vielen Handgriffe, die mir

auf die eine oder andere Weise geholfen haben. Besonders tatkräftig geholfen haben mir: Frau Julia Schmalz und Frau Sandra David-Holl in der Zellkultur, Herr Hans-Joachim Brückmann mit den Brutmaschinen und Hühnern, Frau Antoinette Huhn in der Diagnostik und Herr Ralf Dörr in der Nährbodenküche.

Herrn Eugen Nevermann (Menno-Chemie Vertrieb GmbH, Norderstedt) danke ich sehr für die finanzielle Unterstützung der praktischen Durchführung dieser Arbeit. Ohne diese Mittel wäre die Durchführung des Projekts nicht möglich gewesen.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern für die jahrelange Unterstützung und die Geduld mit ihrer studierfreudigen Tochter. Christian für seine stahlharten Nerven und dafür, immer für mich da zu sein, und meinen Freunden, für viel Ablenkung und Zuspruch, wenn sich die Natur und die Technik quer stellten.

Ich erkläre:

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

Gießen, den 30.10.2011

Dagmar Sieglinde Sommer



ISBN 978-3-86345-050-2



**Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Friedrichstraße 17 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375
e-mail: info@dvg.net · Homepage: <http://www.dvg.de>**