

Steffen Kraut

Klinische Prüfung der Eignung von Virus-
ähnlichen Partikeln (virus-like particles, VLP)
als Impfstoff gegen die Nestlings-
krankheit der Wellensittiche
(*Melopsittacus undulatus* SHAW, 1805)



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

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2017

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem
Klinikum Veterinärmedizin,
Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische,
Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

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

**Klinische Prüfung der Eignung von Virus-
ähnlichen Partikeln (virus-like particles, VLP)
als Impfstoff gegen die Nestlings-
krankheit der Wellensittiche
(*Melopsittacus undulatus* SHAW, 1805)**

INAUGURAL-DISSERTATION
Zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Steffen Kraut
Tierarzt aus Pforzheim

Gießen 2016

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Erhard F. Kaleta
Prof. Dr. Hermann Müller

Prüfer: Prof. Dr. Gergely Tekes

Tag der Disputation: 10. 01. 2017

Menschenkenntnis dämpft die Menschenliebe, Tierkenntnis erhöht die Tierliebe.

Bernhard Grzimek

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Tabellenverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht.....	3
2.1 Herkunft, Haltung, Zucht und Krankheiten des Wellensittichs	3
2.2 Polyomaviren.....	7
2.2.1 Ätiologie und Taxonomie.....	7
2.2.2 Struktur und Genom von Polyomaviren	9
2.2.2.1 Morphologie und Genomstruktur der aviären Polyomaviren	9
2.2.2.2 Replikationszyklus der Polyomaviren	10
2.2.3 Wirtsspektrum von Polyomaviren	11
2.2.3.1 Polyomaviren der Säugetiere.....	12
2.2.3.2 Aviäre Polyomaviren (APV)	12
2.2.3.3 Unterschiede zwischen Säuger- und aviären Polyomaviren	16
2.2.4 Epidemiologie der APV	17
2.2.5 Tenazität des APV	17
2.2.6 Pathogenese.....	18
2.2.7 Klinische Symptomatik	19
2.2.8 Pathologie.....	21
2.2.9 Diagnostik.....	21
2.2.9.1 Serologische Nachweismethoden	22
2.2.9.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)	23
2.2.9.2.1 Konventionelle PCR.....	23
2.2.9.2.2 Real-time PCR	23
2.2.9.2.3 High-Resolution Melting Analysis (HRM)	24
2.2.10 Differenzialdiagnosen	24
2.2.11 Therapie und Prophylaxe	25
2.3 Immunisierung	26
2.3.1 Aktive Immunisierung	27
2.3.1.1 Lebendimpfstoffe	28
2.3.1.2 Inaktivimpfstoffe.....	30
2.3.1.3 Virus-like particles-Impfstoffe	32
2.3.1.3.1 Virus-like particles-Impfstoff aus APV.....	33
2.3.1.3.2 Virus-like particles-Impfstoffe gegen weitere Viruskrankheiten	34
2.3.2 Adjuvanzien	35
2.3.3 Impfstoffe zur Verhütung von APV-Infektionen.....	37
2.3.3.1 Impfstoffe zur Prophylaxe von APV-Infektionen	37
2.3.3.2 Vakzinen auf der Basis von Deletionsmutanten	38
2.3.3.3 Impfstoffe gegen GHPV	39
2.3.4 Impfschäden	39

2.4	Das Immunsystem der Vögel.....	40
2.4.1	Die unspezifische Immunabwehr	41
2.4.2	Die spezifische Abwehr.....	43
2.4.2.1	Die humorale Abwehr.....	44
2.4.2.2	Die zelluläre Abwehr	46
2.4.2.2.1	CD8-T-Zellen	47
2.4.2.2.2	CD4-T-Zellen	48
2.4.2.2.3	Zytokine	48
2.4.2.2.4	Interferon- γ	49
2.4.2.3	Zusammenwirken von humoraler und zellulärer Abwehr	50
3	Material und Methoden.....	51
3.1	Material.....	51
3.1.1	Wellensittiche für Zucht, Immunisierung und Belastungsinfektionen	51
3.1.2	Embryonierte SPF-Hühnereier für die Herstellung von HEF-Kulturen	53
3.1.3	Aviäres Polyomavirus für Belastungsinfektion und VNTs	53
3.1.4	Medien, Lösungen und Reagenzien.....	53
3.1.5	Geräte und Verbrauchsmaterialien	54
3.2	Methoden	56
3.2.1	Haltungsbedingungen der erworbenen Wellensittiche	56
3.2.2	Untersuchungen an den erworbenen adulten Wellensittichen	57
3.2.3	Eigene Zucht mit den erworbenen 28 Wellensittichen	57
3.2.4	Genehmigung des Tierversuchs und Bildung der Wellensittichgruppen für die Versuche	58
3.2.5	Herstellung des VLP-Impfantigens	59
3.2.6	Zellkulturen	60
3.2.6.1	Herstellung der primären HEF-Kulturen	60
3.2.6.2	Subkultivieren der primären HEF-Kulturen.....	61
3.2.7	Herstellung der Virusstamm suspension aus BFDV-5	61
3.2.8	Titration der Virussuspension des Stammes BFDV-5	62
3.2.9	Herstellung der VLP-Vakzine aus APV-Isolat BFDV-5.....	62
3.2.10	Vakzination der adulten weiblichen Wellensittiche.....	63
3.2.11	Überwachung der Impflinge hinsichtlich Impfreaktionen	64
3.2.12	Blutentnahmen bei Wellensittichen und Serumgewinnung	64
3.2.12.1	Blutprobenentnahmen von allen adulten Wellensittichen	64
3.2.12.2	Serumgewinnung aus Vollblut adulter Wellensittiche	65
3.2.12.3	Blutprobenentnahmen bei Wellensittichküken	65
3.2.12.4	Serumgewinnung aus Vollblut von Wellensittichküken	68
3.2.13	Entnahme von Dotter aus unbefruchteten Eiern.....	69
3.2.13.1	Aufbereitung der Dotterproben für die VNTs	71
3.2.14	Belastungsinfektionen.....	72
3.2.14.1	Belastungsinfektion der geimpften Wellensittichhennen.....	72
3.2.14.2	Belastungsinfektion der Küken von geimpften Hennen	72
3.2.14.3	Positivkontrollen – nicht geimpfte Wellensittiche und Küken von nicht geimpften Hennen.....	73
3.2.14.4	Negativkontrollen – separat gehaltene, nicht geimpfte männliche Wellensittiche	73
3.2.14.5	Überwachung der infizierten Wellensittiche.....	73
3.2.15	Titration des Testvirus und VNT	73
3.2.16	Aufbereitung der Organe zur Virusreisolierung	75
3.2.17	Real-Time PCR	76
3.2.17.1	Einstellung der Spezifitätsgrenze	76

Inhaltsverzeichnis

3.2.17.2	Isolierung der viralen DNS	77
3.2.17.3	Real-Time PCR	77
3.2.18	Histologische Untersuchung veränderter Organe	77
3.3	Statistische Analyse	78
4	Ergebnisse.....	80
4.1	Klinische Untersuchung der Wellensittiche nach Immunisierung .	80
4.1.1	Klinische Untersuchungen der adulten Wellensittiche.....	80
4.1.2	Klinische Untersuchungen der Küken von immunisierten Hennen	82
4.2	Antikörperbildung der geimpften adulten Wellensittichhennen	85
4.2.1	Serokonversion der Wellensittichhennen	85
4.2.1.1	in der 30 µg-VLP-Gruppe	85
4.2.1.2	in der 120 µg-VLP-Gruppe	87
4.3	Antikörpertiter im Dotter geimpfter Hennen	89
4.4	Maternale Antikörpertiter in Seren der Wellensittichküken	91
4.5	Belastungsinfektion der adulten Wellensittiche mit dem APV-Isolat BFDV-5.....	93
4.5.1	Virusausscheidung nach der Belastungsinfektion	94
4.5.1.1	Kloakale Ausscheidung des Testvirus bei nicht geimpften und nicht testinfizierten adulten männlichen Wellensittiche	94
4.5.1.2	Kloakale APV-Ausscheidung bei ungeimpften und infizierten adulten Wellensittichen	95
4.5.1.3	Kloakale Virusausscheidung der mit 30 µg VLP geimpften und testinfizierten weiblichen Wellensittiche	97
4.5.1.4	Kloakale Virusausscheidung der mit 120 µg geimpften und testinfizierten weiblichen Wellensittiche	99
4.5.1.5	Kloakale Virusausscheidung und –persistenz der Küken ungeimpfter Hennen	102
4.5.1.6	Kloakale Ausscheidung und Viruspersistenz der Küken von Hennen, die mit 30 µg Antigen geimpft wurden.....	106
4.5.1.7	Kloakale Ausscheidung und Viruspersistenz der Küken von Hennen, die mit 120 µg Antigen geimpft wurden	107
4.5.2	Gewichtsentwicklung von Wellensittichküken nach Infektion mit BFDV-5	109
4.5.3	Ergebnisse der histologischen Untersuchung von Organen	112
5	Diskussion	113
5.1	Eignung der Wellensittiche	114
5.2	Verträglichkeit des Impfstoffes.....	115
5.3	Antikörperbildung bei geimpften Wellensittichhennen	116
5.4	Antikörpertiter im Dotter geimpfter Hennen	117
5.5	Maternale Antikörper im Blutserum der Küken	118

Inhaltsverzeichnis

5.6	Gewichtsentwicklung von Wellensittichküken	119
5.7	Eignung des eingesetzten APV-Isolats BFDV-5.....	119
5.8	Kloakale Virusausscheidung und Viruspersistenz in Organen....	120
5.9	Kloakale Virusausscheidung und Symptome der Wellensittich- küken.....	121
5.10	Histologisch-pathologische Untersuchungen.....	122
5.11	Fazit.....	122
6	Zusammenfassung.....	124
7	Summary.....	126
8	Literaturverzeichnis	128
9	Danksagung	144
10	Eidesstattliche Erklärung	145
11	Wissenschaftliche Beiträge	146
11.1	Kongressbeiträge	146
11.2	Preise	146

Tabellenverzeichnis

<u>Tabelle 1:</u> Die 7 Vogelpolyomaviren der Gattung Gammapolyomavirus: Aktuelle taxonomische Bezeichnung, alte Bezeichnung und Angabe aus welcher Tierart die Erstisolation erfolgte (nach ICTV, 2016).....	9
<u>Tabelle 2:</u> Merkmale von Lebend- und Inaktivatimpfstoffen (SIEGMANN und KALETA, 1997).....	28
<u>Tabelle 3:</u> Adjuvanzien, die in APV-Papageienimpfstoffen eingesetzt wurden, deren Vor- und Nachteile und Empfehlung als Einsatz in einer APV-Vakzine basierend auf VLP	36
<u>Tabelle 4:</u> Morphologie der Makrophagen und deren Funktion an unterschiedlichen Einsatzorten (GERLACH, 1994)	42
<u>Tabelle 5:</u> Gesamtzahl, Anzahl pro Geschlecht und Gefiederfarbe der adulten Wellensittiche	52
<u>Tabelle 6:</u> Bestimmung der Körpermassen der Nestlinge aus Eiern mit einer Antigenosis von 30 µg geimpfter Wellensittichweibchen ...	83
<u>Tabelle 7:</u> Bestimmung der Körpermassen der Nestlinge aus Eiern mit einer Antigenosis von 120 µg geimpfter Wellensittichweibchen .	84
<u>Tabelle 8:</u> Immunisierung mit 30 µg Antigen und Serumneutrali- sationstiter der 8 adulten Wellensittichhennen. Angegeben sind die Antigenosis, die Tage der Blutentnahmen nach den vorangegangenen Immunisierungen und die Antikörpertiter nach 1., 2. und 3. Immunisierung mit VLP	87
<u>Tabelle 9:</u> Immunisierung mit 120 µg Antigen und Neutralisationstiter der 8 adulten Wellensittichhennen. Angegeben sind die Antigen- dosis, die Tage der Blutentnahmen nach den vorangegangenen Immunisierungen und die Antikörpertiter nach 1., 2. und 3. Immunisierung mit VLP	88
<u>Tabelle 10:</u> Antikörpertiter im Dotter von 26 unbefruchteten Eiern geimpfter Wellensittichhennen (Antigenosis 30 µg)	90
<u>Tabelle 11:</u> Antikörpertiter im Dotter von 17 unbefruchteten Eiern geimpfter Wellensittichhennen (Antigenosis 120 µg)	90
<u>Tabelle 12:</u> Titer maternaler Antikörper (Hennen dreimal immunisiert mit 30 µg) im Blutserum der 18 Küken. Dargestellt werden die Antikörpertiter der Küken am 3. Lebenstag	92

<u>Tabelle 13:</u> Titer maternalen Antikörper (Hennen dreimal immunisiert mit 120 µg) im Blutserum der 19 Küken. Dargestellt werden die Antikörpertiter der Küken am 3. Lebenstag	93
<u>Tabelle 14:</u> Anzahl der überlebenden und gestorbenen Vögel nach der Belastungsinfektion in Abhängigkeit von der Antigendosis	94
<u>Tabelle 15:</u> Mittels PCR ermittelte kloakale Virusausscheidung nicht geimpfter und nicht testinfizierter adulter männlicher Wellensittiche ..	95
<u>Tabelle 16:</u> Mittels PCR ermittelte kloakale Virusausscheidung infizierter, aber nicht geimpfter adulter Wellensittiche	96
<u>Tabelle 17:</u> Mittels PCR ermittelte kloakale Virusausscheidung infizierter und mit einer Antigendosis von 30 µg geimpfter adulter Wellensittiche	98
<u>Tabelle 18:</u> Mittels PCR ermittelte kloakale Virusausscheidung in- fizierter und mit einer Antigendosis von 120 µg geimpfter adulter Wellensittiche	100
<u>Tabelle 19:</u> Mittels PCR ermittelte kloakale Virusausscheidung, Viruspersistenz in gepoolten Organen und Klinik von am dritten Lebenstag infizierten Küken von nicht geimpften Hennen	103
<u>Tabelle 20:</u> Mittels PCR ermittelte kloakale Virusausscheidung, Viruspersistenz in gepoolten Organen und Klinik von am dritten Lebenstag infizierten Küken von Hennen, die mit einer Antigendosis von 30 µg geimpft worden waren	107
<u>Tabelle 21:</u> Mittels PCR ermittelte kloakale Virusausscheidung, Viruspersistenz in gepoolten Organen und Klinik von am dritten Lebenstag infizierten Küken von Hennen, die mit einer Antigendosis von 120 µg geimpft worden waren	108
<u>Tabelle 22:</u> Bestimmung der Körpermassen der infizierten Nestlinge aus Eiern mit einer Antigendosis von 30 µg geimpfter Wellensittichhennen	110
<u>Tabelle 23:</u> Bestimmung der Körpermassen der infizierten Nestlinge aus Eiern mit einer Antigendosis von 120 µg geimpfter Wellensittichhennen	111
<u>Tabelle 24:</u> Bestimmung der Körpermassen der infizierten Nestlinge aus Eiern ungeimpfter Wellensittichhennen	111

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Blick in einen Nistkasten mit jungen Wellensittichnestlingen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Die Nestlinge schlüpfen in etwa zweitägigen Abständen, was sich deutlich in Größe und Gefiederentwicklung zeigt	58
Abbildung 2: Darstellung der rechten Vena jugularis zur Blutentnahme aus einem dreitägigen Wellensittichnestling	66
Abbildung 3: Wellensittichnestling im Alter von 3 Tagen. Aus der Vena jugularis dextra nach Punktion ausgetretenes Blut vor dem Auffangen mit einer Hämatokritkapillare	67
Abbildung 4: Wellensittichnestling im Alter von 3 Tagen: Auffangen des aus der rechten Vena jugularis ausgetretenen Vollbluts mittels Hämatokritkapillare	68
Abbildung 5: Schieren eines Eies vom Wellensittich 10 Tage nach Beginn der Bebrütung zur Feststellung der Befruchtung. Der sich entwickelnde Embryo verhindert bereits das Durchleuchten des Eies	70
Abbildung 6: Ei eines Wellensittichs beim Durchleuchten mit einem Otoskop 3 Tage nach der Eiablage. Es ist keine beginnende Vaskularisierung unter der Eischale sichtbar	71
Abbildung 7: Zur Zucht wurden mehrere Nistkästen in der Voliere angebracht, die von den Wellensittichen gut angenommen wurden ..	81
Abbildung 8: Adulte Wellensittichhenne (Lutino) mit ihren Nestlingen in unterschiedlichem Alter	82
Abbildung 9: Wellensittichnestling im Alter von 3 Tagen. Beachte: noch keine Befiederung, noch geschlossene Augenlider, große Öffnung des äußeren Gehörgangs, hochgradig (aber physiologisch) gefüllter Kropf, Füße mit langen Krallen	85
Abbildung 10: Individuelle Antikörpertiter im Serum der Wellensittichhennen nach 1., 2. und 3. Immunisierung mit VLP. Dargestellt sind die Einzelwerte je Henne (Symbole) und die errechneten Mittelwerte (horizontale Balken) aller Tiere je Untersuchungszeitpunkt, die über der festgelegten Spezifitätsgrenze von $\log_2 \geq 2$ liegen	89
Abbildung 11: Höhe der durchschnittlichen Antikörpertiter im Dotter unbefruchteter Eier von geimpften Hennen	91

<u>Abbildung 12:</u> Dargestellt ist die Anzahl der kloakal virus- ausscheidenden ungeimpften Wellensittiche an Tagen nach der Infektion mit BFDV-5.....	97
<u>Abbildung 13:</u> Anzahl der kloakal virusausscheidenden, mit einer Antigenosis von 30 µg VLP geimpften weiblichen Wellensittiche an Tagen nach der Infektion mit BFDV-5.....	99
<u>Abbildung 14:</u> Anzahl der kloakal Virus ausscheidenden, mit einer Antigenosis von 120 µg geimpften 8 Wellensittichhennen an verschiedenen Tagen nach der Infektion mit BFDV-5	101
<u>Abbildung 15:</u> Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl von kloakalen Virusausscheidern in der ungeimpften, 30 µg Antigen und 120 µg Antigen Gruppe nach Infektion mit BFDV-5.....	102
<u>Abbildung 16:</u> Fehlende große Schwungfedern des linken Flügels als Folge einer Belastungsinfektion bei einem nicht geimpften Nestling im Alter von 38 Tagen	104
<u>Abbildung 17:</u> Wellensittich im Alter von 38 Tagen nach der Impfung mit 30 µg VLP und nachfolgender Testinfektion: Fehlentwicklung der langen Schwanzfedern und fehlende Schwanzfedern	105
<u>Abbildung 18:</u> Wellensittich, 38 Tage alt. Es fehlen teilweise die langen Schwungfedern an beiden Flügeln und die langen Federn am Schwanz. Typisches Bild eines „Hopsers“ oder „Renner“	106
<u>Abbildung 19:</u> Dargestellt ist die prozentuale Anzahl klinisch unauffälliger Küken, Küken mit Befiederungsstörungen („Renner“) und gestorbener Küken, unterteilt nach ungeimpften, mit 30 µg Antigen und mit 120 µg Antigen geimpften Mutterhennen	109

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
A.	Arteria (Arterie)
Abb.	Abbildung
a. d.	an der
AG	Aktiengesellschaft
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
APV	Aviäres Polyomavirus
ApyV	Avipolyomavirus
Ak	Antikörper
Asp.	Aspergillus
AT	Adenin-Thymin
bp	Basenpaare
BFD	Budgerigar Fledgling Disease
BFDV	Budgerigar Fledgling Disease Virus
BELISA	Blocking Enzyme-linked Immunoassay
BFPyV	Budgerigar Fledgling Disease Polyomavirus
BK-Virus	Humanes Polyomavirus 1
BpyV	Bovines Polyomavirus
B	Breite
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C-Terminus	Carboxyterminales Ende von Proteinen
ca.	circa
CaPyV	Canary Polyomavirus
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary desoxyribonucleic acid)
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat (cyclic guanosine monophosphate)
ChPyV	Chimpanzee Polyomavirus
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPyV	Crow Polyomavirus
Ct-Werte	cycle threshold Werte
d	Tag(e)
d.h.	das heißt
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
Dr.	Doktor
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e. V.
ELISA	Enzyme-linked Immunoassay
EG	Europäische Gemeinschaft
et al.	et alii (und andere)

Inhaltsverzeichnis

EU	Europäische Union
Fa.	Firma
FKS	Fetales Kälberserum
FM	Französische Mauser
FPyV	Finch Polyomavirus
g	relative Erdbeschleunigung
GbR	Gesellschaft bürgerlichen Rechts
G	Guanin
ggf.	gegebenenfalls
GHPV	Goose Hemorrhagic Polyomavirus
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
gr	Gramm
G	Gauge
H	Höhe
HAH	Hämagglutinationshemmung
HAHT	Hämagglutinationshemmungstest
HaPV	Hamsterpolyomavirus
HBV	Hepatitis B Virus
h.c.	honoris causa (ehrenhalber)
HEF	Hühnerembryofibroblasten
HNEG	Hemorrhagic Nephritis and Enteritis of Geese
HPV	Humanes Papillomavirus
HRM	high resolution melting point
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IgA	Immunglobulin alpha
IgG	Immunglobulin gamma
IgM	Immunglobulin M
IgY	Immunglobulin Y
inkl.	inklusive
IL	Interleukin
IUDR	5'-Jod-2'-Desoxyuridin
JC Virus	Humanes Polyomavirus 2
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Kommanditgesellschaft
KID ₅₀	Kultur-infektiöse Dosis 50 %
KI Virus	KI Polyomavirus, K-Virus
KRK	nukleäres Lokalisationssignal
l	Liter
L	Länge
Log	Logarithmus
LPV	B-Lymphotropes Papovavirus
IT-Antigen	large Tumorantigen
m	Meter
M	Molar
m ²	Quadratmeter
MCPyV	Merkel Cell Polyomavirus
mg	Milligramm

Inhaltsverzeichnis

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	Major Histokompatibilitätskomplex
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
MpyV	Murines Polyomavirus
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
mT-Antigen	medium Tumorantigen
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaOCl	Natriumhypochlorit
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NKZ	natürliche Killerzellen
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
O ₂	Sauerstoff
OHG	offene Handelsgesellschaft
p.	post
PBFD	Psittacine Beak and Feather Disease
PBFDV	Psittacine Beak and Feather Disease Virus
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline solution)
PC	Personal Computer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PH	pondus hydrogenii, pH-Wert
p.i.	post infectionem
PML	progressive multifokale Leukenzephalopathie
PMV	Paramyxovirus
Py	Polyomavirus
RKV	Rabbit Kidney Vacuolating Virus
RNA/RNS	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RT-PCR	real-time Polymerase-Kettenreaktionen (real time polymerase chain reaction)
Sf9-Zellen	immortalisierte Insektenzelllinie aus Ovargewebe von <i>Spodoptera frugiperda</i>
s.c.	subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide)
sec.	Sekunde
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
SNT	Serumneutralisationstest
SPF	spezifisch pathogen-frei
spp.	Species pluralis

Inhaltsverzeichnis

sT-Antigen	small Tumorantigen
SV	Simian Virus
T	Triangulationszahl
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TV-Lösung	Trypsin-Versen-Lösung
U/min	Umdrehungen je Minute
u.a.	unter anderem
USA	United States of America
UV	ultraviolett
v. a.	vor allem
vac	Vakzination
vgl.	vergleiche
VLP	Virus-ähnliche Partikel (virus-like particles, VLP)
VNT	Virusneutralisationstest
VP	Strukturprotein(e)
z. B.	zum Beispiel
ZPE	zytopathischer Effekt

1 Einleitung

Nach CARL VON LINNÉ (1758) erfolgt die Einteilung der gesamten Materie dieser Erde in Regna tria naturae (Naturreiche, mit Minerale, Plantae, Animalia). Das Regnum animalia (Tierreich) gliederte Linné in Phylum vertebrales (Wirbeltiere) und Classis aves (Vögel). Eine weitergehende Unterteilung aller Vögel publizierte WOLTERS (1975-1982). Demnach werden Wellensittiche taxonomisch wie folgt eingeteilt:

Ordo *Psittaciformes* (Papageien; WOLTERS, 1975-1982)

Familia *Psittacidae* (Eigentliche Papageien, WOLTERS, 1975-1982)

Genus *Melopsittacus* (Wellensittiche, GOULD, 1840) und

Spezies (*Melopsittacus undulatus*, SHAW, 1805).

Wellensittiche sind im Ursprungsland Australien noch immer häufig angetroffene und weltweit sehr gern in Privathaushalten gehaltene Ziervögel. Sie stellen keine besonderen Ansprüche an Haltung und Ernährung, lassen sich auch unter eher schlichten Haltungsbedingungen vermehren, erweisen sich bei einiger Geduld als lehrreich und lernen dabei das Nachsprechen einiger Worte in der Sprache des Eigentümers. Aus Versehen entflozene Wellensittiche schließen sich meist Schwärmen aus Haussperlingen an und können auch eine harte Winterzeit überstehen.

Wellensittiche sind empfänglich für einige infektiöse Krankheiten, darunter auch die als Wellensittichnestlingskrankheit (engl.: Budgerigar Fledgling Disease, BFD) bezeichnete, durch ein Polyomavirus hervorgerufene Krankheit der Küken und der adulten Tiere.

Primäres Ziel der eigenen Untersuchungen ist die Feststellung der Verträglichkeit und Wirksamkeit einer Vakzine bestehend aus virus-like particles (VLP), die aus einem aviären Polyomavirus hergestellt und bei adulten Wellensittichen zur Immunisierung angewendet wurde. Ferner galt es, Antworten zu finden für die Frage nach der Übertragbarkeit von IgG-Antikörpern von der Blutzirkulation geimpfter Wellensitticheltern via Dotter auf deren Nestlinge und die ggf. nachweisbare Schutzwirkung der

1 Einleitung

maternalen Antikörper bei Nestlingen, die durch eine intramuskuläre Belastungsinfektion mit virulentem BFDV-5 überprüft wurde. Schließlich sollte auch die Pathogenität des verwendeten BFDV-5 für nicht geimpfte adulte männliche Wellensittiche, geimpfte adulte Wellensittichhennen und junge Wellensittichnestlinge festgestellt werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Herkunft, Haltung, Zucht und Krankheiten des Wellensittichs

Der Wellensittich (*Melopsittacus undulatus*, SHAW, 1805) repräsentiert die einzige Art innerhalb der Gattung *Melopsittacus*. Systematische Unterteilungen, etwa nach natürlichem Verbreitungsgebiet in Australien, Körpergröße oder Gefiederfärbung fanden bisher keine Berücksichtigung in der taxonomischen Fachliteratur.

Die Trockengebiete des gesamten australischen Kontinents werden von Wellensittichen bevölkert. Zuerst entdeckt wurden diese Vögel 1770 bei einer Exkursion des Seefahrers **James Cook** (NIEMANN, 2014). Erste nachgewiesene nähere Bekanntschaft mit den aufgeweckten Tierchen machte der nach Australien deportierte englische Sträfling **Thomas Watling** im Jahr 1788. Er brachte während des Gefängnisalltags seinen Schützlingen einfache englische Worte bei. Erst 1831 wurde der erste Wellensittich in Europa in einem Londoner Museum ausgestellt, wobei es sich um ein ausgestopftes Tier handelte. 1840 gelangte durch **John Gould** das erste lebende Pärchen nach England. Gould lieferte die erste ausführliche Beschreibung dieses Vogels, was zur vollständigen taxonomischen Benennung des Wellensittichs „*Melopsittacus undulatus* GOULD, 1840“ führte.

In den folgenden Jahren wurden hunderttausende Exemplare eingefangen und nach Europa verschifft. Daher erließ die australische Regierung 1884 ein Verbot des Exports dieser und anderer Tierarten, welches bis heute gültig ist (SCHMITZ, 1996).

In Europa wurden bereits 7 Jahre nach Gould's Import die ersten Wellensittiche im Zoo von Antwerpen öffentlich präsentiert. Dieser Zoo galt damals mit seinen jährlich stattfindenden Tierversteigerungen als Tierbörse. In deutschen Zoos werden Wellensittiche seit 1860 gehalten und gezüchtet (VINS, 1993). Die erstmalige deutsche Zucht gelang 1855 eher zufällig in der Schale einer Kokosnuss (NIEMANN, 2014) durch die Gräfin von Schwerin, Gattin eines Berliner Fabrikanten.

2 Literaturübersicht

In großen Zuchtbetrieben im klimatisch günstigen Süden Frankreichs wurden ab 1880 zehntausende Tiere in „Massenzuchten“ erzeugt und zum Leidwesen der überall in Europa vertretenen kleineren Züchter zu Spottpreisen verkauft (VINS, 1993). Auch heute erhält man in jeder Tierhandlung oder von kleinen Wellensittichzüchtern Wellensittiche zu günstigen Preisen.

In der Regel werden Wellensittiche zumindest paarweise in kastenförmigen Käfigen mit rostfreien, waagerechten Gitterstäben gehalten, deren Boden mit Sand bedeckt ist. Neben Futternapf und Trinkschale oder –flasche sind Sitzstangen, Leitern, Schaukeln und ähnliche Freizeitbeschäftigungsmöglichkeiten vorhanden. Die mehr Platz beanspruchende, aber für die Tiere schönere Variante ist die Vogelvoliere, die aber in den meisten Haushalten nicht vorkommt. Auch die nicht zu empfehlende Einzeltierhaltung ist immer noch weit verbreitet (SCHMITZ, 1996).

Die heutigen Wellensittiche sind etwa 40 bis 60 gr schwer und können in Gefangenschaft bis zu 15 Jahre alt werden. Gefüttert werden die Vögel mit Sämereien, Obst, Gemüse und Kräutern (NIEMANN, 2014).

Auf der Suche nach Nahrung, Wasser und dem geeigneten Klima sind Wellensittiche in der freien Natur gezwungen, sich ständig neue Lebensräume zu erschließen. Sie sind sehr gesellige Vögel, die in freier Natur paarweise in großen Schwärmen leben. Die sehr sozialen Wellensittiche füttern und putzen sich gegenseitig (vor allem der Hahn seine Partnerin). Da sie, um ihre Nachzucht mit halbreifen Sämereien füttern zu können, auf Regenfälle angewiesen sind, hängt die Fortpflanzung grundsätzlich von diesem meteorologischen Ereignis ab. Wellensittiche sind von der Jahreszeit unabhängige, opportunistische Brüter, d.h. sie können brüten wann immer gute Bedingungen herrschen. Die Eiablage findet in der Natur in Baumhöhlen statt, die vom Weibchen mit selbst gerupftem Bauchgefieder ausgelegt werden (VINS, 1993).

Ist das Weibchen paarungsbereit, demonstriert es dies durch eine nach vorne gebeugte, an die Unterwürfigkeit von Jungtieren erinnernde, kahnförmige Körperhaltung. Dabei duckt die Henne sich starr auf einen

Ast, spreizt und senkt die Flügel, hebt den Schwanz an und legt den Kopf nach hinten. Der Hahn steigt mit beiden Füßen auf das Weibchen, wobei beide Köpfe in dieselbe Richtung zeigen. Dann werden die Kloaken beider Tiere aneinandergespreßt und die Paarung wird vollzogen (VINS, 1993).

Zur Zucht in Gefangenschaft werden im oberen Bereich des Vogelkäfigs 2 etwa 13 cm x 13 cm x 25 cm große und mit einem etwa 4 cm großen Loch versehene Nistkästen angebracht. 2 Kästen sind zu empfehlen, damit sich das Vogelpaar eine „Ersatzhöhle“ aussuchen kann. Im Boden der Kästen sollte eine kleine Mulde geschaffen werden, damit das Gelege, welches durchschnittlich 5 bis 6 (seltener: 4 bis 10) Eier pro Brut groß ist, nicht im Kasten hin und her rollt. Die Eier werden im Abstand von 2 Tagen gelegt, was ebenfalls zum jeweils 2 Tage verzögertem Schlupf der Küken führt. Henne und Hahn beginnen abwechselnd mit der Brut sobald das Gelege vollständig ist, wobei der Hauptteil des Brutgeschäftes von der Henne übernommen wird und der Hahn sich auf Nahrungssuche begibt. Die Brutzeit dauert in der Regel 18 bis 20 Tage. Danach schlüpfen die ca. 1 Gramm leichten Wellensittichküken und entwickeln sich in ca. 35 Tagen zu flüggen und selbständigen Jungvögeln (VINS, 1993; SCHMITZ, 1996).

Obwohl Wellensittiche bereits nach drei Monaten geschlechtsreif sind, sollten die Zuchttiere bei Zuchtbeginn etwa 10 Monate alt sein. Nicht immer werden Tiere erst ab diesem Alter zur Zucht eingesetzt (VINS, 1993).

Um heute günstige Preise für Wellensittiche zu erzielen, wenden Züchter die sogenannte „Vermehrungszucht“ an, bei der viele Tiere gemeinschaftlich in großen Volieren gehalten werden und kein besonderer Wert auf eine gezielte Anpaarung gelegt wird. Inzucht und Kämpfe sind hierbei nicht auszuschließen. Die Jungvögel dieser Vermehrungszuchten werden vom „Durchschnittsverbraucher“ preisgünstig angeschafft und umgangssprachlich meist „Hansi-Bubi“-Vögel genannt (VINS, 1993).

Im Gegensatz zur Vermehrungszucht stehen die Schau- oder Standardwellensittichzucht und die Farbwellensittichzucht. Bei beiden Zuchtarten ist koordinierte Verpaarung der Tiere und strikte Dokumentation uner-

lässlich. Der Sinn der Schauwellensittichzucht ist die Zucht von wenigen Exemplaren nach einem bestimmten Idealbild. Diese Idealbilder werden vom jeweiligen Wellensittichzüchterverein festgelegt. Auf den Vogel-schauen werden diese Tiere präsentiert, nach festgelegtem Punktesystem bewertet und gegebenenfalls prämiert.

Die Farbwellensittichzucht bringt Tiere in bestimmten Farbschlägen hervor. Farbschläge sind Mutationen und Mutationskombinationen die seit dem Import des ersten Wellensittichs (Wildform = grün) entstanden sind. Schon 1872 entstand der erste „gelbe“ Wellensittich (Lutino) und 6 Jahre später folgte eine blaue Gefiedermutante dieses kleinen Papageis. Anfang des 20. Jahrhunderts gab es bereits dunkelgrüne und dunkelblaue Vögel. Insgesamt unterscheidet man derzeit 89 Farbschläge (VINS, 1993).

Neben Farbänderungen und Abweichungen der Zeichnung der Federn mutierte auch die Form der Federn wie beispielsweise beim Haubenwellensittich, der verlängerte und etwas aufgerichtete Federn auf dem Kopf trägt.

Neben den vererbbaeren Mutationen kommen auch nicht vererbbaere Modifikationen vor, wie es bei sogenannten Halbseitem der Fall ist, bei denen die beiden Körperhälften andersfarbig sind (VINS, 1993).

Bedauerlicherweise begehen viele Wellensittichliebhaber trotz Zuneigung zu ihren Tieren verschiedene Haltungsfehler. Hierzu gehören unter anderem die Aufstellung von Käfigen an zugigen Stellen, Außenhaltung bei starkem Frost oder Nässe, Aufnahme von giftigen Pflanzen während des „Freiflugs“, schädliches Material der Gitterstäbe (z. B. verzinktes Blei) und zu fettreiche Ernährung mit Kolbenhirse und Kardisaat (NIEMANN, 2014).

Zusätzlich besteht immer das Risiko einer Verletzung durch den am Fuß angebrachten Kennungsring. Dieser Ring ist in der Verordnung über meldepflichtige Krankheiten für Züchter vorgeschrieben und dient dem Herkunftsnachweis und der Kennzeichnung des Tieres, vor allem im Fall der meldepflichtigen (früher anzeigepflichtigen) Chlamydiose hervor-

rufen durch *Chlamydia psittaci* (Erreger der Papageienkrankheit Psittakose) (SCHMITZ, 1996).

Neben verschiedenen Parasitosen, wie z. B. Befall mit Spulwürmern, Haarwürmern, Trichomonaden, Luftsackmilben (Endoparasiten), Räudemilben, Rote Vogelmilben (Ektoparasiten) (KUMMERFELD, 2011) und häufig vorkommenden Erkrankungen durch bakterielle Erreger wie *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp. (SCOPE, 2011) und *Chlamydia psittaci* (HAFEZ, 2011) können Wellensittiche auch an Mykosen erkranken (KRAUTWALD-JUNGHANNS, 2011). Hierzu gehören Hefen (meist *Candida albicans*), Schimmelpilze (besonders *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*) (VINS, 1993) aber auch Megabakterien (*Macrorhabdus ornithogaster*) (HANKA, 2008). Darüber hinaus sind Wellensittiche empfänglich für virale Erreger, wie die Paramyxoviren, besonders PMV-1 und PMV-3, (BENNEWITZ, 1988; ALEXANDER, 1997; BECK-SCHILDWÄCHTER, 2003), das Circovirus (Psittacine Beak and Feather Disease Virus – PBFDV, JOHNE, 1999) und das aviäre Polyomavirus (APV) (KALETA et al., 1984, 1997).

2.2 Polyomaviren

2.2.1 Ätiologie und Taxonomie

Die virale Natur des Erregers von BFD wurde bereits sehr frühzeitig erkannt. HUNTER et al. (1979) vermuteten ein Adenovirus als kausales Agens. Zahlreiche weitere Arbeitsgruppen ordneten das kausale Virus den Papovaviren zu (BOZEMAN et al., 1981; DAVIS et al., 1981; PASCUCCI et al., 1983; BERNIER et al., 1981 und 1984; DYKSTRA und BOZEMAN, 1982, DYKSTRA et al., 1984, HIRAI et al., 1984; JACOBSEN et al., 1984, CLUBB und DAVIS, 1984; KALETA et al., 1984, MATHEY und CHO, 1984). LOWENSTEIN (1984) vermutete die Beteiligung eines Parvovirus oder Papovavirus an der Entstehung des Krankheitsbildes, das mit Nestlingssterblichkeit und mit Befiederungsstörungen einhergeht.

Die Viren der heutigen Familie *Polyomaviridae* wurden zuerst als allein-stehendes Genus in der Familie *Papovaviridae* geführt (MATTHEWS, 1982)

und danach als Subfamilie *Polyomavirinae* innerhalb der Familie *Papovaviridae* etabliert (PORTERFIELD, 1989). Bis zum 7. Report des International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) fand eine Zuordnung zur neu etablierten Familie *Polyomaviridae* statt. Wie sich aus dem 7., 8. und 9. Report des ICTV ergibt, wurden das Genus *Polyomavirus* und das Genus *Papillomavirus* als 2 Genera der *Papillomaviridae* geführt. Diese Gruppierung wurde bald verworfen.

Der 9. Report aus dem Jahr 2012 enthält die Familie *Polyomaviridae* mit dem einzigen Genus *Polyomavirus* und der Spezies Budgerigar Fledgling Disease Polyomavirus (BFDV) und 12 weiteren Spezies, die bei Säugetieren vorkommen (FRISQUE et al., 1995, NORKIN et al., 2012).

JOHNE et al. (2011) hatten vorgeschlagen, die aviären Polyomaviren (APV, auch als APyV bzw. BFPyV abgekürzt) zur etablierten Familie *Polyomaviridae*, aber mit der neuen Unterfamilie *Polyomavirinae* und der neuen Gattung *Avipolyomavirus* zuzuordnen. Der Polyomaviridae Study Group des ICTV hatten JOHNE et al. (2011) geraten, die Polyomaviren der Säugetiere und Vögel in 3 Genera aufzuteilen. Demnach sollten die Polyomaviren der Säugetiere in die beiden Genera *Orthopolyomavirus* und *Wukipolyomavirus* und das Polyomavirus der Vögel in das Genus *Avipolyomavirus* (ApyV) gestellt werden.

Der Empfehlung von STOLL et al. (1993) zur Bildung eines Subgenus „*Avipolyomavirus*“ innerhalb des Genus *Polyomavirus* wurde nicht gefolgt.

Der Vorschlag der Polyomaviridae Study Group die Familie *Polyomaviridae* in die 4 Genera *Alpha-*, *Beta-*, *Delta-* und *Gammapolyomavirus* zu unterteilen wurde vom ICTV schließlich angenommen (ICTV, 2016). Hierbei beinhalten die Gattungen *Alpha-*, *Beta-*, und *Deltapolyomavirus* Polyomaviren der Säugetiere einschließlich des Menschen. Das Genus *Gammapolyomavirus* enthält 7 aus Vögeln isolierte Polyomaviren (Tabelle 1). Die Polyomaviren, die aus Rindern (*Bos taurus polyomavirus* 1), Delfinen (*Delphinus delphis polyomavirus* 1) und Fischen (*Centropristis striata polyomavirus* 1) isoliert wurden, wurden noch keiner Gattung zugeordnet. Zugleich wurde die Spezies BFDV in

Aves polyomavirus 1 umbenannt. Erstmals werden nun 7 aus Vögeln isolierte Polyomaviren auf Artniveau geführt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Die 7 Vogelpolyomaviren der Gattung Gammapolyomavirus: Aktuelle taxonomische Bezeichnung, alte Bezeichnung und Angabe aus welcher Tierart die Erstisolation erfolgte (nach ICTV, 2016)

Aktuelle Bezeichnung	Alte Bezeichnung	Isoliert aus Tierart
Aves polyomavirus 1	Budgerigar Fledgling Disease polyomavirus (BFDV)	Wellensittich
Serinus canaria polyomavirus 1	Canary polyomavirus (CaPyV)	Kanarienvogel
Corvus monedula polyomavirus 1	Crow polyomavirus (CPyV)	Dohle
Pyrrhula pyrrhula polyomavirus 1	Finch polyomavirus (FPyV)	Japangimpel
Anser anser polyomavirus 1	Goose hemorrhagic polyomavirus (GHPV)	Graugans
Cracticus torquatus polyomavirus 1	-	Graurücken Krähenwürger
Pygoscelis adeliae polyomavirus 1	-	Adeliepinguin

2.2.2 Struktur und Genom von Polyomaviren

2.2.2.1 Morphologie und Genomstruktur der aviären Polyomaviren

Aviäre Polyomaviren sind unbehüllte, ikosaedrische Viren mit einem Kapsiddurchmesser von 40 – 50 nm. Die Triangulationzahl beträgt $T = 7$.

Das Genom besteht aus einem zirkulären DNS-Doppelstrang (LEHN und MÜLLER, 1986; MÜLLER und NITSCHKE, 1986; STOLL et al., 1993; NORKIN et al., 2012) mit ca. 5.000 bp (STOLL et al., 1993). Das Kapsid der Polyomaviren besteht aus 3 Hauptstrukturproteinen VP1, VP2 und VP3. APV besitzt zusätzlich ein 4. Strukturprotein VP4 (JOHNE und MÜLLER, 2001; ENDERLEIN, 2013), welches für die Virusreplikation essentiell ist (JOHNE et al., 2000). Das mit 42 kDa größte Hauptstrukturprotein VP1 ist dabei von immunogener Bedeutung (MÜLLER und NITSCHKE, 1986; ROTT et al., 1988). Das Canary Polyomavirus (CaPyV) exprimiert lediglich 3 Hauptstrukturproteine VP1, VP2 und VP3 (HALAMI et al., 2010).

Molekularbiologisch bestehen mehr als 50 % Übereinstimmung bei den Strukturproteinen von APV und Säugerpolyomaviren. Die molekularbiologische Übereinstimmung von APV mit Säugerpolyomaviren beim t-Antigen beträgt allerdings weniger als 15 % (SHAH, 1990).

2.2.2.2 Replikationszyklus der Polyomaviren

Der Replikationszyklus beginnt mit der Virusbindung an einen zellulären Rezeptor, welcher einen Sialinsäureanteil besitzt und mit dem VP1 interagiert. Das virale Genom wird nach rezeptorvermittelter Endozytose des Virus in einer permissiven Zelle freigesetzt, dort in den Zellkern transportiert und transkribiert (COLE, 1996). Das Virus kann nur erfolgreich replizieren, wenn sich die Zelle in der S-Phase der Zellteilung befindet. Hierzu interagiert das Virus mit den zellulären Proteinen RB105 und 107. Die Steuerung der Expression der viralen Gene und der Beginn der viralen DNS-Replikation erfolgt von einer nicht kodierenden regulatorischen Kontrollregion. Zunächst werden dabei die „frühen“ Gene exprimiert, die für das große Tumorantigen (IT-Antigen), für das kleine Tumorantigen (sT-Antigen) und bei manchen Polyomaviren für das mittlere Tumorantigen (mT-Antigen) kodieren (IMPERIALE und MAJOR, 2007). Diese frühen Genprodukte sind für die Virusreplikation zuständig und beeinflussen hierbei den Zellteilungszyklus. Nachdem das IT-Antigen sequenzspezifisch an die *ori*-Region gebunden hat, startet durch die DNS-Helikaseaktivität des IT-

Antigens die Replikation der viralen DNS. Hierbei kommen auch zelluläre Enzyme zum Einsatz, deren Expression in der infizierten Zelle durch das IT-Antigen oder das mT-Antigen über die Interaktion mit zellulären Faktoren induziert wird (COLE, 1996).

Nach der DNS-Replikation werden die Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 des Virus exprimiert, die das gemeinsame virale Kapsid im Zellkern bilden. Das Hauptstrukturprotein VP1 bildet hierbei zuerst Pentamere aus, welche sich danach zu Kapsiden zusammenlagern. Die beiden anderen Strukturproteine VP2 und VP3 lagern sich nach der Interaktion mit den VP1-Pentameren an deren Innenseite an. Das VP4 befindet sich an der Basis des großen VP1 (ENDERLEIN, 2013). Die virale DNS befindet sich im Kapsid und ist an die zellulären Histone H2a, H2b, H3 und H4 gebunden. Die Variation der Kapsidgröße von APV liegt vor allem am abgeschnittenen C-Terminus von VP1 (SHEN et al., 2011).

Die Freisetzung der zusammengebauten Viruspartikel aus der Zelle erfolgt auf einem bisher noch unbekanntem Weg (COLE, 1996) nach Lyse der infizierten Zelle (MODROW et al., 2003).

Erst spät im Replikationszyklus werden bei aviären Polyomaviren die Agnoproteine 1a, 1b und 2a und 2b exprimiert. Agnoprotein 1a und 1b sind multifunktionelle Proteine mit strukturellen Aufgaben im viralen Kapsid und in der Wechselwirkung zwischen Wirtszelle und Virus. Beide Proteine können Apoptose auslösen, darüber hinaus ist das Agnoprotein 1a zusätzlich in der Lage, zusammen mit dem Kapsidprotein VP1 und der viralen DNS als virales Strukturprotein zu funktionieren. Die Agnoproteine 2a und 2b befinden sich im Zytoplasma, wobei ihre stark hydrophoben Anteile wahrscheinlich eine Verbindung mit der Zellmembran eingehen können (JOHNE, 1999).

2.2.3 Wirtsspektrum von Polyomaviren

2.2.3.1 Polyomaviren der Säugetiere

Durch Polyomaviren hervorgerufene Erkrankungen sind beim Menschen und vielen Säugetierspezies beschrieben worden. Viele Polyomaviren der Säuger verursachen in ihren natürlichen Wirten für gewöhnlich keine Krankheiten. Meist erfolgt erst nach einer Immunsuppression des Wirtsorganismus die Ausbildung von Krankheitssymptomen. Eine wichtige Rolle spielt hierbei beim Menschen z. B. die von dem JC Virus (JCV) induzierte progressive multifokale Leukencephalopathie (PML), die vor allem bei AIDS-Patienten vorgefunden wird (SHAH, 1996).

Bei Labornagern, die unter Laborbedingungen mit Säugerpolyomaviren infiziert wurden, können diese darüber hinaus Tumoren induzieren. Hiervon wurde der Name „Poly-oma“, d.h. viele Tumoren, abgeleitet. Bei diesen Säugetieren führt die Expression des IT-Antigens oder des mT-Antigens zur Induktion von Tumoren. Beide Antigene können mit Faktoren der Zelle interagieren und diese transformieren (PIPAS, 1992). Voraussetzung dafür ist, dass die Produktion von Viruspartikeln unterbleibt und damit der Infektionszyklus unterbrochen wird und keine Lyse der Zelle erfolgt.

2.2.3.2 Aviäre Polyomaviren (APV)

Seit der erstmaligen Einfuhr von Wellensittichen (*Melopsittacus undulatus*) im Jahre 1840 von Australien nach England ist das Problem der „Französischen Mauser“ (FM) bekannt (RAETHEL, 1973; SCHÖNE und ARNOLD, 1980). Schon im Ursprungsland wurde die FM bei freilebenden Wellensittichen beobachtet (RAETHEL, 1968; SCHÖNE und ARNOLD, 1980). Die Namensgebung kam zustande, da die mit der FM einhergehenden Gefiederveränderungen adulter Wellensittiche erstmals in Südfrankreich beobachtet wurden. In Deutschland trat die FM zuerst bei Wellensittichen auf, die aus Frankreich importiert worden waren (SCHÖNE und ARNOLD, 1980). Ende der 70er und am Anfang der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts wurde vermehrt von einer akut verlaufenden Nestlingskrankheit bei Wellensittichen berichtet, die bei überlebenden mit Befiederungs-

2 Literaturübersicht

störungen einhergehen kann (HUNTER et al., 1979; BERNIER et al., 1982/1984; BOZEMAN et al., 1981; CLUBB et al., 1984; DAVIS et al., 1981/1984; DYKSTRA et al., 1982/1984; JACOBSEN et al., 1984; PASCUCCI et al., 1983; KALETA et al., 1984; KRAUTWALD, 1986).

Bei der Polyomavirusinfektion der Wellensittchnestlinge handelt es sich um ein akutes Krankheitsgeschehen mit hohen Mortalitätsraten. Deswegen wurde diese Krankheit als Nestlingskrankheit der Wellensittiche (BFD) bezeichnet.

In der Folge konnte von gestorbenen Wellensittichen ein Virus isoliert werden, das zunächst als „Polyoma-like Virus“ (MÜLLER und NITSCHKE, 1986) und kurze Zeit später von LEHN und MÜLLER (1986) „aviäres Polyomavirus“ benannt wurde.

Von 5 verschiedenen APV-Isolaten wurden die Genome sequenziert und miteinander verglichen (ROTT et al., 1988; STOLL et al., 1993; JOHNE und MÜLLER, 1998). Trotz unterschiedlicher Herkunft sind alle APV-Isolate eng miteinander verwandt, da sie auf Nukleotidebene eine Homologie von 99,7 – 99,8 % aufweisen.

Die Herkunft der molekularbiologisch untersuchten APV-Isolate ist vielfältig. BFDV-1 stammt aus einem holländischen Wellensittich (*Melopsittacus undulatus*) (ROTT et al., 1988; STOLL et al., 1993), BFDV-2 aus Fäzes und Trinkwasser einer Hühnerzuchtanlage in den Niederlanden (STOLL et al., 1993), BFDV-3 von einem Gelbbrustara (*Ara ararauna*) aus den Niederlanden (STOLL et al., 1993, STOLL et al., 1994), BFDV-4 von einem Turmfalken (*Falco tinnunculus*) aus Deutschland (JOHNE und MÜLLER, 1998) und BFDV-5 von einem Orangekeöpfchen (*Agapornis pullarius*) aus Mozambique (ENDERS et al., 1997). Aus Untersuchungen zur Homologie der BFDV-Isolate 1 bis 5 wurde gefolgert, dass alle sequenzierten Isolate zu einem Sero- und Genotyp gehören und somit die irreführende Bezeichnung „Virus der Nestlingskrankheit der Wellensittiche (BFDV)“ durch die aktuell zutreffende Bezeichnung „Aviäres Polyomavirus (APV)“ ersetzt werden sollte (JOHNE und MÜLLER, 1998). 2016 wurde

BFDV in Aves polyomavirus 1 umbenannt (ICTV 2016). Im Rahmen dieser Arbeit wird die Abkürzung APV verwendet.

PHALEN et al. (1999) untersuchten 20 bekannte APV-Isolate aus Europa und den USA molekularbiologisch auf deren Verwandtschaftsverhältnisse. Auch sie fanden sehr enge Homologien unter allen Isolaten und zählten alle Isolate zu einem Genotyp. Darüber hinaus war es möglich, einen Stammbaum zu erstellen. Hierbei zeigte sich, dass dieser sich in 3 Zweige aufspaltet. Dabei trat die größte Divergenz innerhalb eines Zweiges bei den 3 europäischen Isolaten BFDV-1, BFDV-2 und BFDV-3 auf. Weiterhin sind auf allen 3 Zweigen Isolate aus erkrankten Wellensittichen, Unzertrennlichen (*Agapornis* spp.) und Aras zu finden. Auch dies spricht für eine hohe Homologie unter den Isolaten (PHALEN et al., 1999).

Wellensittiche stellen die am häufigsten betroffene Vogelart und das größte Reservoir des APV dar. Darüber hinaus wurden Infektionen mit APV auch bei anderen Psittaziden beschrieben. Aus der Ordnung *Psittaciformes* sind Arten der Familie *Cacatuidae* und der Gattungen *Agapornis*, *Amazona*, *Ara*, *Aratinga*, *Chalcopsitta*, *Chamosyna*, *Eclectus*, *Eunymphicus*, *Forpus*, *Lori*, *Loriculus*, *Melopsittacus*, *Neopsitta*, *Neophema*, *Nestor*, *Pionites*, *Pionus*, *Psittacus*, *Pyrrhura* und *Trichoglossus* für eine natürliche Infektion empfänglich (RITCHIE et al., 1998; JOHNE, 1999).

Auch viele Arten aus der Ordnung *Passeriformes* sowie einige Spezies der *Phasianiformes*, *Anseriformes* und *Falconiformes* (JOHNE und MÜLLER, 1998; SANDMEIER et al., 1999) sind für eine APV-Infektion empfänglich, wodurch Nestlinge und adulte Vögel plötzlich sterben (FORSHAW et al., 1988; MARSHALL, 1989; GARCIA et al., 1994; SANDMEIER et al., 1999).

Des Weiteren starb in den USA ein in Gefangenschaft gehaltener Grüner Arakari (*Pteroglossis viridis*), eine Tukanart, an den Folgen einer APV-Infektion. Das aus diesem Tier isolierte Virus weist ebenfalls eine hohe Homologie zu anderen untersuchten APV-Isolaten auf (LAFFERTY et al., 1999).

BFDV war lange Zeit das einzig bekannte aviäre Polyomavirus. Später konnten aus erkrankten Gänsen, Finken, Krähen, Pinguinen, Graurücken-

Krähenwürger, Adelpinguinen und Kanarienvögeln weitere Polyomaviren isoliert werden, die sich molekularbiologisch und phylogenetisch vom APV unterscheiden lassen und als eigenständige aviäre Polyomavirenspezies identifiziert wurden. Hierzu zählen bisher das Goose hemorrhagic polyomavirus (GHPV; jetzt: *Anser anser polyomavirus 1*) bei Gänsen, das Finch Polyomavirus (FPyV; jetzt: *Pyrrhula pyrrhula polyomavirus 1*) bei Finken, das Crow Polyomavirus (CPyV; jetzt: *Corvus monedula polyomavirus 1*) bei Krähen (GUERIN et al., 2000; WITTIG et al., 2007), das Canary Polyomavirus (CaPyV; jetzt: *Serinus canarius polyomavirus 1*) bei Kanarienvögeln (HALAMI et al., 2010), das *Cracticus torquatus polyomavirus 1* bei Graurücken Krähenwürgern und das *Pygoscelis adeliae polyomavirus 1* bei Adelpinguinen (ICTV, 2016). Zwischenzeitlich wurde für BFDV die Abkürzung BFPyV empfohlen (JOHNE et al., 2011).

Mit **GHPV** können sich vor allem junge Gänse infizieren, die im Alter von 4 bis 10 Wochen deutliche Symptome zeigen. Die natürliche Infektion führt häufig zu hämorrhagischen Enteritiden und Nephritiden (hemorrhagic nephritis and enteritis of geese – HNEG), welche mit hohen Mortalitätsraten einhergehen (GUERIN et al., 2000). Darüber hinaus berichteten HEENEMANN et al. (2013) vom Nachweis des GHPV in wild lebenden Höckerschwänen (*Cygnus olor*).

Auch **FPyV** der Finkenvögel konnte als ein aviäres Polyomavirus identifiziert werden, das sich von APV unterscheiden lässt. An den Folgen einer FPyV-Infektion können Nestlinge und Jungvögel plötzlich sterben. Darüber hinaus können betroffene adulte Vögel auch Federmissbildungen und Entzündungen an Schnabelbasis und am Kopf zeigen (FORSHAW et al., 1988). Eine FpyV-Infektion in einem Japangimpelbestand (*Pyrrhula pyrrhula griseiventris*) ging mit einer hohen Mortalitätsrate einher (WITTIG et al., 2007).

Das Genom von **CPyV** wurde aus einer in Spanien gestorbenen frei lebenden Dohle nachgewiesen (JOHNE und MÜLLER, 2007).

Zu **CaPyV** liegen bisher nur wenige Mitteilungen zum Genom vor (JOHNE und MÜLLER, 1998 und 2004); klinische Details fehlen noch.

Interessanterweise exprimiert CaPyV lediglich die Hauptstrukturproteine VP 1, VP 2 und VP 3, wobei das für APV typische Strukturprotein VP 4 fehlt (HALAMI et al., 2010).

2.2.3.3 Unterschiede zwischen Säuger- und aviären Polyomaviren

Der Vergleich von APV mit den Polyomaviren der Säuger zeigt einerseits Gemeinsamkeiten, andererseits aber auch deutliche Unterschiede in strukturellen und biologischen Eigenschaften. Gemeinsamkeiten finden sich im Aufbau der viralen Partikel, der Organisation des Genoms in eine „frühe“ und „späte“ Region sowie in den viralen Hauptstrukturproteinen VP1, VP2 und VP3. Die Analyse des APV-Genoms zeigt korrespondierende offene Leserahmen (ORFs) für IT-Antigen, sT-Antigen, VP1, VP2, VP3 und Agnoproteine (ROTT et al., 1988).

Biologische Unterschiede zeigen sich in der Fähigkeit zur Auslösung einer Krankheit und zur Induktion von Tumoren. Während Infektionen mit Säugerpolyomaviren im immunkompetenten Wirt subklinisch verlaufen, kann eine APV-Infektion mit akuten Krankheitssymptomen und einer hohen Mortalitätsrate einhergehen (MÜLLER und NITSCHKE, 1986; LEHN und MÜLLER, 1986). Nach Verimpfung von APV auf neugeborene Hamster oder Mäuse konnte eine Induktion von Tumoren nicht nachgewiesen werden, die infizierten Tiere zeigten aber Wachstumsstörungen oder starben (JOHNE, 1999).

Strukturelle Unterschiede werden im Aufbau der Regionen, die für das IT-Antigen und die Agnoproteine kodieren, sowie in der nichtkodierenden regulatorischen Kontrollregion vorgefunden.

Das Vorhandensein von Agnoproteinen im viralen Kapsid der APV stellt einen weiteren Unterschied zu Säugerpolyomaviren dar. Die Agnoproteine 1a und 1b unterscheiden sich dabei in mehreren Gesichtspunkten von denen der Säuger, während die Agnoproteine 2a und 2b näher mit denen der Säuger verwandt zu sein scheinen (MÜLLER, unveröffentlicht).

2.2.4 Epidemiologie der APV

Virusnachweise in Kanada (BERNIER et al., 1981), den USA (NIAGRO et al., 1991; RITCHIE et al., 1989), Australien (MARSHALL, 1989; PASS et al., 1987), Japan (HIRAI et al., 1984), Europa (STOLL et al., 1993; JOHNE und MÜLLER, 1998; SANDMEIER et al., 1999; PASCUCCI et al., 1983, KALETA et al., 1984), Afrika (ABREY, 1984; ENDERS et al., 1997) und China (KOU et al., 2008) belegen, dass APV weltweit verbreitet ist.

Viele Arten aus den Familien *Psittaciformes* und *Passeriformes* sowie einige Spezies der *Phasianiformes* und *Falconiformes* (JOHNE und MÜLLER, 1998) sind empfänglich für eine Infektion mit APV. Bei Finken können Nestlinge und adulte Vögel plötzlich an den Folgen einer APV-Infektion sterben (FORSHAW et al., 1988; MARSHALL, 1989; GARCIA et al., 1994; SANDMEIER et al., 1999).

Als Virusreservoir werden ältere, persistent infizierte Wellensittiche angesehen. Diese können das Virus intermittierend ausscheiden (PHALEN et al., 1993; PHALEN et al., 1994). Virusüberträger anderer Vogelspezies könnten subklinisch infizierte Vögel sein. Der Nachweis des APV aus Wildvögeln legt nahe, dass auch die Wildvogelpopulation ein Virusreservoir ist (JOHNE und MÜLLER, 1998).

Von BERNIER et al. (1981) wurde APV aus Wellensittichnestlingen im Alter von einem Lebenstag isoliert, was für eine Virusübertragung via Ei spricht und zugleich bedeuten kann, dass eine Virusübertragung mit dem Ei nicht zwangsläufig zum Embryotod führen muss.

Aufgenommen wird das Virus über den Atmungs- oder Verdauungstrakt (RITCHIE, 1995). Die Virusausscheidung erfolgt mit Kloakeninhalt, und die Übertragung findet über virushaltige Stäube aus Kot und kontaminierten Federn statt (BERNIER et al., 1984; DYKSTRA et al., 1984).

2.2.5 Tenazität des APV

Grundsätzlich besitzen alle unbehüllten DNS- und RNS-Viren eine höhere Tenazität als behüllte Viren (STRAUCH und BÖHM, 2002). Obwohl bisher keine Ergebnisse zur Tenazität des APV publiziert wurden, darf erwartet

werden, dass APV sowohl in der Umwelt als auch bei *in vitro*-Prüfungen recht stabil gegenüber chemischer, thermischer und UV-Licht-Einwirkung sind (STRAUCH und BÖHM, 2002). Folglich empfiehlt es sich, den Empfehlungen der 13. Liste der nach den Richtlinien der DVG geprüften und als wirksam befundenen Desinfektionsmittel für die Tierhaltung, Stand 01. Januar 2011, zu folgen. Diese Liste enthält Handelspräparate, die auf der Basis von organischen Säuren (z. B. Ameisen- und Peressigsäure), Kresolen, quaternalen Ammoniumverbindungen und diversen Aldehyden hergestellt und vom Ausschuss für Desinfektionsmittel geprüft und als wirksam beurteilt worden sind. Zu beachten ist bei der Auswahl geeigneter chemischer Desinfektionsmittel der Beschluss der Kommission vom 25. April 2013 über die Nichtaufnahme von Formaldehyd in Anhang I, IA oder IB der Richtlinie 98/8/EG des Europäischen Parlaments und des Rates über das Inverkehrbringen von Biozid-Produkten (2013/204/EU).

Weil das APV unbehüllt ist, kann es in der Umwelt lange Zeit infektiös bleiben und dadurch leicht indirekt mit unbelebten und belebten Vektoren verschleppt und übertragen werden (BOZEMAN et al., 1981; SHAH, 1996).

Nicht alle gängigen Desinfektionsmittel sind gegen APV wirksam. Als wirksames Desinfektionsmittel hat sich nach RITCHIE et al. (1993) eine 1 : 400 Verdünnung von Chlordioxid gezeigt, aber auch 0,525 %iges Natrihypochlorit (NaOCl) kann wirksam sein.

2.2.6 Pathogenese

Nach oraler oder aerogener APV-Aufnahme entwickeln Wellensittiche eine Virämie (BERNIER et al., 1981). Die sich anschließende massive Virusvermehrung mit Lysis der virushaltigen Zellen in allen Organen inklusive des zentralen Nervensystems wird als Ursache für die schwerwiegende Erkrankung angesehen (BERNIER et al., 1981; MÜLLER und NITSCHKE, 1986).

Als Folge einer hämatogenen Virusausbreitung werden intranukleäre Einschlusskörperchen vorwiegend in Endothelzellen, Hepatozyten, Epithelien der Nierentubuli und in der Haut von Wellensittichen nachgewiesen

(LATIMER et al., 1993; PHALEN et al., 1991). Bei anderen Psittaziden wurde APV vorwiegend in Monozyten und Makrophagen gefunden (PHALEN et al., 1992). Die nach einer APV-Infektion bei verschiedenen Psittazidenarten vorgefundenen Nierenveränderungen werden als Folge einer Autoimmunreaktion interpretiert (PHALEN et al., 1992; GERLACH et al., 1998; SANDMEIER et al., 1999).

Entscheidend für die Ausprägung des Krankheitsbildes ist das Alter der Vögel bei der 1. Infektion. Nach experimentellen Infektionen von Wellensittichen zwischen dem 3. und 10. Lebenstag sterben die Nestlinge, während andere, die am 25. Lebenstag infiziert wurden, klinisch unauffällig bleiben (KRAUTWALD et al., 1989). Um zu erklären, weshalb einige Vögel schwere Krankheitserscheinungen nach einer APV-Infektion zeigen, andere jedoch nicht, wird das Mitwirken weiterer Faktoren, die zu einer Immunsuppression und dadurch zur Ausbildung einer Erkrankung führen, diskutiert (RITCHIE et al., 1989).

2.2.7 Klinische Symptomatik

Das Krankheitsbild nach einer APV-Infektion ist durch einen perakuten bis akuten Verlauf bei Wellensittichnestlingen und durch einen chronischen Verlauf bei älteren Jungvögeln gekennzeichnet. Die Inkubationszeit bei Psittaziden (ausgenommen Wellensittiche) liegt bei 2 bis 14 Tagen (CLUBB und DAVIS, 1984; JACOBSEN et al., 1984; GASKIN, 1989). Dabei erkranken meist Jungvögel im Alter bis zu 150 Tagen (RITCHIE et al., 1997).

Neugeborene vertikal infizierte oder in den ersten Lebenstagen infizierte Wellensittiche entwickeln sich vorerst normal und sterben dann plötzlich ohne vorherige klinische Zeichen zwischen dem 10. und 15. Lebenstag (BERNIER et al., 1981; DAVIS, 1983). Manche Nestlinge entwickeln akute Krankheitssymptome, die durch aufgetriebenes Abdomen und subkutane Blutungen gekennzeichnet sind (DAVIS et al., 1984; MÜLLER und NITSCHKE, 1986; KRAUTWALD et al., 1989). Bei einigen Vögeln entstehen neurologische Symptome in Form von Depression, Ataxien und Tremor (MATTHEY und CHO, 1984; BERNIER et al., 1984). Die Verluste sind meist

hoch und können in manchen Fällen bis zu 100 % aller erkrankten Nestlinge betragen. Bei einigen Spezies, z. B. *Agapornis pullarius*, können auch adulte Vögel erkranken und kurz darauf sterben (ENDERS et al., 1999). Auch adulte nicht-Psittaziden können an den Folgen einer akuten APV-Infektion sterben (LAFFERTY et al., 1999).

Veränderungen am Federkleid von Wellensittichen treten vor allem bei überlebenden Jungvögeln ab dem 15. Lebenstag auf (KRAUTWALD, 1986; RITCHIE, 1995). Hierbei stehen symmetrische Dystrophien der Schwung- und Schwanzfedern sowie fehlende Federn im Rücken-, Bauch-, Hals- und Kopfbereich im Vordergrund (DAVIS et al., 1981; HIRAI et al., 1984; KALETA et al., 1984; KRAUTWALD et al., 1989; RITCHIE, 1995). Die betroffenen Vögel zeigen ein lebhaftes, offenbar ungestörtes Allgemeinbefinden, können jedoch wegen der Fehlbildungen des Groß- und Kleingefieders nicht fliegen. Solche flugunfähigen Wellensittiche werden als „Renner“ oder „Hopper“ bezeichnet. Die Federmissbildungen ähneln der „Französischen Mauser“ – einem schon lange bekannten Krankheitsbild adulter Wellensittiche (KRAUTWALD, 1986), das durch eine langsame, progressive Entwicklung von Federmissbildungen in Wellensittichbeständen gekennzeichnet ist. Im Laufe von 2 bis 3 Mauserperioden werden veränderte Federn abgestoßen und normal gestaltete Federn können nachwachsen (KRAUTWALD und KALETA, 1985; JOHNE, 1999).

Serologische Untersuchungen in Beständen mit „Französischer Mauser“ bestätigten eine Beteiligung des APV an diesem Krankheitsbild (KRAUTWALD und KALETA, 1985; KRAUTWALD et al., 1989). Darüber hinaus zeigen ältere Vögel keine klinische Symptomatik nach einer APV-Infektion (MÜLLER und NITSCHKE, 1986; GOUGH, 1989). Solche älteren, persistent infizierten Vögel können als Ansteckungsquelle dienen, wenn es durch Stressfaktoren bei diesen Vögeln zu einer erneuten Ausscheidung des Virus kommt (PHALEN et al., 1993; PHALEN et al., 1994).

Auch beim GHPV wird angenommen, dass für die Ausprägung der Erkrankung das Alter bei der ersten Infektion die entscheidende Rolle

spielt. PALYA et al. (2004) beschrieben, dass jüngere infizierte Gänse eine kürzere Inkubationszeit haben als ältere Gänse.

Die GHP-Virusreplikation findet in fast allen Geweben statt, besonders häufig sind allerdings Endothelzellen und lymphoides Gewebe betroffen (LACROUX et al., 2004; BERNATH et al., 2006). Im Zellkern infizierter Zellen kann man Viruspartikel nachweisen (LACROUX et al., 2004), allerdings keine Einschlusskörperchen (GUERIN et al., 2000).

Zu klinischen Bildern nach Infektionen mit Finken- und Krähen-APV liegen bisher noch keine detaillierten Beschreibungen vor.

2.2.8 Pathologie

Pathologisch-anatomische Untersuchungen von Wellensittichnestlingen zeigen nach akutem, letalem Verlauf subkutane Hämorrhagien, Hepatitis, Aszites und Hydropericard als deutlichste Veränderungen (MÜLLER und NITSCHKE, 1986; BERNIER et al., 1981; DAVIS et al., 1981). In den Zellkernen makroskopisch veränderter Organe sind meist Einschlusskörperchen vorhanden (LATIMER et al., 1993; PHALEN et al., 1991).

2.2.9 Diagnostik

Symptome und pathologische Veränderungen liefern meist nur einen Anfangsverdacht. Neben der elektronenmikroskopischen Darstellung von Viruspartikeln in Homogenisaten aus inneren Organen (DYKSTRA et al., 1984) stehen eine Reihe weiterer molekularbiologischer Tests zum Virus- bzw. Genomnachweis zur Verfügung.

In Hühnerembryofibroblasten-Kulturen erzeugt APV einen recht typischen zytopathischen Effekt (ZPE). In einem durch abgelöste Zellen unterbrochenen Zellrasen befinden sich große rund-ovale Zellen mit vergrößertem, optisch nahezu leer erscheinenden Zellkern mit randständigem Chromatin und vergrößert erscheinenden Nukleolus (KRAUTWALD und KALETA, 1985; STOLL et al., 1993).

Embryonierte Hühnereier erweisen sich ebenfalls als empfänglich für APV. Allerdings werden für die Virusisolierung HEF-Kulturen bevorzugt (HIRAI et al., 1984; KALETA et al., 1984).

2.2.9.1 Serologische Nachweismethoden

Der Nachweis einer zurückliegenden APV-Infektion oder die Persistenz des Virus in inneren Organen noch lebender oder toter Vögel kann mittels serologischer Methoden erfolgen. Neutralisierende Antikörper sind längere Zeit im Serum nachweisbar. Mit dem Virusneutralisationstest (VNT) ist es möglich, APV-spezifische Antikörper durch die Neutralisation des Virus in der Zellkultur zu erfassen (PHALEN et al., 2000).

Zur Diagnostik von APV-Antikörpern im Serum steht ein Neutralisationstest (SNT) zur Verfügung, mit dem die Höhe der neutralisierenden Antikörper in betroffenen Tieren gemessen werden kann (JACOBSON et al., 1984; CLUBB et al., 1984). Daneben kann auch ein Immundiffusionstest eingesetzt werden, der jedoch keine quantitative Aussage über die Titerhöhe ermöglicht (KRAUTWALD und KALETA, 1985).

KHAN et al. (2000) entwickelten einen blocking ELISA, auch BELISA genannt, um Seren auf APV-Antikörper untersuchen zu können. Der Test enthält als positive Kontrolle einen monoklonalen Antikörper, der gegen das Hauptstrukturprotein VP1 gerichtet ist und nach dem Sandwichprinzip funktioniert. Dieser Test hat den Vorteil, dass er weniger zeit- und kostenintensiv ist als der SNT (KHAN et al., 2000).

Die Genotypen BFDV-1 und BFDV-5 agglutinieren Vogelerythrozyten (ZIELONKA, 2010). Durch Hefeexpression synthetisierte virus-like particles (VLP) aus dem VP1 von BKPyV, JCPyV und MPyV besitzen die Fähigkeit zur Agglutination von Erythrozyten durch die Bindung an Sialinsäure auf der Erythrozytenoberfläche (GEDVILAITE et al., 2006b). Somit ermöglichen VLP von APV die Etablierung eines Hämmagglutinationshemmungstestes (HAHT) zum diagnostischen und serologischen Nachweis von APV. Mit GHPV-VLP erfolgte bereits die Etablierung eines HAHT zur Detektion GHPV-spezifischer Antikörper (ZIELKONKA et al., 2006).

In den meisten Fällen korrelieren die Ergebnisse des HAHT stärker mit der neutralisierenden Aktivität von Antikörpern als die ELISA-Ergebnisse (Khan et al., 2000). Antikörpernachweise sind bei Viren, bei welchen aufgrund der fehlenden Anzuchtmöglichkeit in der Zellkultur kein VNT durchgeführt werden kann, von besonderem Interesse (ZIELONKA, 2010). GHPV kann in Zellkulturen nicht unter Ausbildung eines ZPE angezüchtet werden. Durch die Herstellung von VLP in Sf9-Insektenzelllinien konnten VLP für diagnostische Tests hergestellt werden, welche auch hämagglutinieren (ZIELONKA et al., 2006). Des Weiteren wurde ein indirekter ELISA entwickelt, der GHPV-spezifische Antikörper in Gänseserum detektiert (ZIELONKA et al., 2006).

2.2.9.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

2.2.9.2.1 Konventionelle PCR

Die virale DNS von APV kann mittels konventioneller PCR nachgewiesen werden (PHALEN et al., 1991; JOHNE und MÜLLER, 1998). JOHNE und MÜLLER (1998), SANDMEIER et al. (1999) und JOHNE (1999) benutzten ein hoch sensitives PCR-Protokoll, um das Vorhandensein von APV-DNS in verschiedenen Geweben verschiedener Vogelarten darzustellen.

OGAWA et al. (2005) beschrieben eine duplex shuttle PCR zur Differenzialdiagnose von APV und PBFDV.

Da zur Detektion des PCR-Produkts eine Gelelektrophorese durchgeführt werden muss, ist die konventionelle PCR relativ zeitintensiv (4 bis 8 Stunden). Darüber hinaus kann sie unspezifische Produkte derselben Größe nicht von den wahren Produkten differenzieren.

2.2.9.2.2 Real-time PCR

Die real-time PCR hat einige Vorteile gegenüber der konventionellen PCR. Zu den Vorteilen gehören eine schnellere Geschwindigkeit (Ergebnisse sind innerhalb 1,5 bis 3 Stunden verfügbar), quantitative Messungen, höhere Sensitivität und höhere Spezifität. Darüber hinaus ist die real-time PCR einfacher zu standardisieren (KE et al., 2006).

2.2.9.2.3 High-Resolution Melting Analysis (HRM)

Eine der Möglichkeiten zur Bestimmung der Spezifität eines PCR-Produktes bei der real-time PCR ist die Schmelzkurvenanalyse (High-Resolution Melting Analysis, HRM) (RIRIE et al., 1997; LAY und WITTEW, 1997). Verschiedene DNS-Abschnitte zeigen ein unterschiedliches Schmelzverhalten. Dies beruht darauf, dass Adenin-Thymidin-(AT-)Paare 2 und Guanin-Cytosin-Paare 3 Wasserstoffbrücken ausbilden. Da zum Aufbrechen der AT-Paare beim Schmelzen der DNS weniger Energie benötigt wird, sind AT-Paare thermodynamisch instabiler. Hierbei eingesetzte Fluoreszenzfarbstoffe fluoreszieren, wenn sie an doppelsträngige DNS gebunden sind und haben keinen Einfluss auf das Schmelzverhalten (GUNDRY et al., 2003). Die HRM wird am Anschluss an eine konventionelle PCR, der ein Fluoreszenzfarbstoff zugefügt wurde, durchgeführt. Zur Detektion von APV-DNS wird der Fluoreszenzfarbstoff Sybr Green verwendet (KATOH et al., 2008).

Während der Erhitzung des PCR-Produktes in einem Temperaturbereich von 50 bis 95 °C wird in kurzen Abständen die Fluoreszenz gemessen und grafisch dargestellt. Die DNS-Produkte werden an einer für bestimmte DNS-Sequenzen typischen Temperatur getrennt. Hierdurch erlöscht die Fluoreszenz. Form und Temperatur der Kurve sind vom AT/GC-Verhältnis sowie Sequenz und Länge der Probe abhängig (RIRIE et al., 1997).

2.2.10 Differenzialdiagnosen

Die Blutungen als kausale Folge einer APV-Infektion können auch bei anderen Krankheiten auftreten, die mit Vaskulitis, Gerinnungsstörungen oder Leberschäden einhergehen (RITCHIE, 1995). Weiterhin kann der akute Verlauf durch hochgradig toxische Substanzen und Infektionskrankheiten wie die Newcastle-Krankheit und das PMV Typ 3 verursacht werden (BENNEWITZ, 1988; KALETA, 2011).

Gefiederveränderungen können zudem durch Mykotoxine, diverse Haltungs- und Ernährungsfehler, Vitamin- und Mineralstoffmangel und auch durch PBFDV verursacht werden (KRAUTWALD und KALETA, 1985;

JOHNE, 1999). Die oftmals im Zuge einer PBFDV-Infektion beobachtete Immunsuppression wird als prädisponierender Faktor für eine APV-Infektion diskutiert (RITCHIE, 1995).

2.2.11 Therapie und Prophylaxe

Eine kausale Therapie der Wellensittchnestlingskrankheit fehlt bis heute. Allenfalls können palliative Mittel eingesetzt werden, die jedoch nicht zur Heilung und Viruselimination führen können. Die mühevollen Zwangsfütterung lebensschwacher Jungvögel mit leicht verdaulichem und energiereichem Futter (z.B. A21 NutriBird Breipulver, Fa. Versele-Laga) wird von manchen Züchtern praktiziert.

In den USA wurden in den 90-iger Jahren des vergangenen Jahrhunderts inaktivierte Vakzinen mit und ohne Adjuvanzen mit unterschiedlichem Erfolg getestet (RITCHIE et al., 1993, 1994, 1996, 1997; GELFI et al., 2010). Eine Zulassung einer Vakzine in Deutschland ist bis zum heutigen Tag nicht erfolgt (LEMKE, 2014).

Als bisher einzig wirksame Prophylaxemaßnahme in Beständen, in denen APV nachgewiesen wurde, wird empfohlen, die Zucht zu unterbrechen und alle adulten Wellensittiche durch engen Kontakt miteinander mehrere Monate durchseuchen zu lassen. Hierbei infizieren sich empfängliche adulte Vögel an den virushaltigen Ausscheidungen APV-infizierter Vögel. Dadurch bilden die erwachsenen Kontaktwellensittiche neutralisierende Antikörper ohne selbst zu erkranken. Es wird vermutet, dass diese Antikörper von den Hennen über den Eidotter an die Küken als maternale Antikörper weitergegeben werden und die Küken in den ersten Lebenstagen vor einer APV-Infektion schützen. Der Nachweis der Übertragung maternalen Antikörper mit Eidotter auf das Küken konnte von PHALEN et al. (1995) allerdings nicht schlüssig bewiesen werden.

Die Übertragung von maternalen Antikörpern bei Hühnern erfolgt meist vom Serum des Muttertiers über den Dotter auf den Embryo und somit auch auf das Küken (SIEGMANN und KALETA, 1973; SIEGMANN et al., 1974; GERLACH, 1994; RAUTENSCHLEIN und KALETA, 2005). Diese konnatale

Immunität nimmt nach dem Schlupf linear ab, schützt das Küken aber in den ersten Lebenswochen (SIEGMANN et al., 1974). Die zeitlineare Elimination der maternalen Antikörper und die Halbwertszeit von 4 bis 5 Tagen im Serum der jungen Küken muss bei der zeitlichen Festlegung der ersten aktiven Immunisierung berücksichtigt werden (SIEGMANN und KALETA, 1973). Aus der Höhe der maternalen Antikörper während der ersten 3 Lebenstage und der Halbwertszeit errechnet sich der optimale Zeitpunkt der ersten aktiven Immunisierung.

Eine weitere sinnvolle Prophylaxemaßnahme ist die Quarantäne. RITCHIE (1995) empfiehlt alle neu angekommenen und alle den Bestand verlassenden Vögel während der Quarantänezeit von 60 bis 90 Tagen regelmäßig zu untersuchen und Proben zu entnehmen, um persistent infizierte Tiere identifizieren zu können.

Eine rekombinante Subunitvakzine schützt junge Gänse vor den Folgen einer Infektion mit GHPV (MATÒ et al., 2009). Eine inaktivierte Vakzine mit Carbopol als Adjuvanz wird als sicher und recht zuverlässig bezeichnet, weil junge Gänse vor den Folgen einer spontanen GHPV-Infektion geschützt werden konnten (GELFI et al., 2010).

2.3 Immunisierung

Zur Gesunderhaltung eines Bestandes sind Schutzimpfungen heute ein unverzichtbarer Teil der krankheits- und seuchenhygienischen Maßnahmen. Das Ziel der Schutzimpfungen besteht in der Vermeidung von Krankheiten und Todesfällen und in der Erhaltung der Leistungsfähigkeit der geimpften Tiere (JUNGBÄCK et al., 2005). Hierbei soll ein Impfstoff die Bildung von humoralen Antikörpern (neutralisierende Antikörper) und die Auslösung erregerspezifischer Mechanismen (Phagozytose und Interferone) sowie zellvermittelter Mechanismen (zellvermittelte Zytotoxizität und Lymphokinproduktion) bewirken (THIEL et al., 1997; SHARMA, 1999).

Die passive Immunisierung durch Injektion von Hyperimmun- oder Rekonvaleszentenserum wurde früher gegen Reo-, Parvo- und Picornavirusinfektionen bei eintägigen Gänse-, Enten- und Flugentenküken erfolgreich

eingesetzt (KALETA, 1997). Die passive Immunisierung wird nur noch selten verwendet, vielmehr steht heute die aktive Immunisierung im Vordergrund der Immunprophylaxe (WITTIG, 1996).

Zum Einsatz kommen hierbei sowohl Lebend- als auch Inaktivatvakzinen. Im Einzelfall bestimmen die Seuchenlage (Prophylaxe oder Notimpfung), die Herdengröße, das Ziel der Vakzinierung (Erst- oder Boosterimmunisierung) und der finanzielle Aufwand, welcher der beiden Impfstoffe angewendet werden soll (LEMKE, 2014).

2.3.1 Aktive Immunisierung

Man unterscheidet zwischen Lebend- von Inaktivatimpfstoffen. Lebendimpfstoffe enthalten definitionsgemäß vermehrungsfähiges, komplettes Virus. Inaktivatimpfstoffe beinhalten in der Regel vollständiges aber nicht mehr vermehrungsfähiges Virus. Darüber hinaus wurden Vektor-, Spalt- und Subunit-Vakzinen hergestellt (WITTIG, 1996; THIEL et al., 1997; LEMKE, 2014). Die Unterschiede zwischen diesen Impfstofftypen werden in Tabelle 2 genauer dargestellt.

Tabelle 2: Merkmale von Lebend- und Inaktivimpfstoffen (SIEGMANN und KALETA, 1997)

Merkmal	Lebendimpfstoff	Totimpfstoff
Reversion zur Virulenz	selten, aber möglich	äußerst selten
Systemische Impfreaktionen	möglich	nicht möglich
lokale Impfreaktionen	nein	Granulom-/ Abszessbildung möglich
Erstimpfung	gut geeignet	weniger gut geeignet
2.- oder Boosterimpfung	möglich	gut geeignet
Impfschutz p. vac.	einige Tage	1–3 Wochen
Homogenität der Herdenimmunität	z.T. ungleichmäßig	Gut
Dauer der Immunität	ca. 1-3 Monate	6-12 Monate
Notimpfung	möglich	nicht möglich
Kosten der Impfstoffe	gering	Hoch
Fleischuntersuchung	unbedenklich	lokale Reaktionen

p. vac.: post vaccinationem

2.3.1.1 Lebendimpfstoffe

Da Lebendimpfstoffe vermehrungsfähiges Virus enthalten, kann und soll eine Replikation des Erregers im geimpften Organismus stattfinden. Hierdurch wird häufig eine starke Immunantwort, jedoch keine Erkrankung verursacht. Lebendvakzinen beinhalten vermehrungsfähiges, infektiöses Virus in der Regel in Kombination mit Zusatzstoffen (z. B. Antibiotika, Adjuvanzen, Kulturmedium, Wirtszellkomponenten).

Lebendimpfstoffe lassen sich wie folgt einteilen:

- a) Natürlich vorkommende avirulente und virulente Viren
- b) Deletionsmutanten
- c) Attenuierte Viren
- d) Virusvektorvakzinen

Werden **natürlich vorkommende Viren** als Lebendvakzinen verwendet, handelt es sich um Viren, die antigenetisch mit dem krankheitsauslösenden Virus verwandt aber hinsichtlich der Ursprungstierspezies oft heterolog sind. Dabei induzieren diese Viren eine Immunität, aber keine Erkrankung (WITTIG, 1996; THIEL et al., 1997; LEMKE, 2014). So wird beispielsweise heterologes Taubenpockenvirus zur Immunisierung von Hühnern gegen Hühnerpocken eingesetzt. Ein weiteres bekanntes Beispiel ist das *Vacciniavirus* aus der Familie *Poxviridae*. Das Vaccinia-virus ist beim Menschen nur schwach pathogen, bei Haustieren (Rind, Schaf) führt es hingegen zu Krankheitserscheinungen. Daher wurde es beim Menschen als Impfstoff gegen Pocken eingesetzt. Ein apathogenes Herpesvirus aus Puten dient seit ca. 1970 bis heute zur Immunisierung von Hühnerküken gegen die Mareksche Krankheit (LEMKE, 2014).

Auf der Basis von **Deletionsmutanten** hergestellte Lebendimpfstoffe bestehen aus Viren, bei denen Gene, die für die Virusreplikation nicht essentiell sind, deletiert wurden. Die Wahrscheinlichkeit für eine Reversion zum ursprünglichen Virus ist davon abhängig wie groß und wie vielfältig die Deletion ist. Ein aktuelles Beispiel zur Verwendung von Lebendimpfstoffen auf der Basis von Deletionsmutanten ist die Vakzine gegen *Streptococcus equi* beim Pferd. Der Vorteil, aber auch die zwingende Voraussetzung zur Zulassung dieses Impfstoffes durch das Paul-Ehrlich-Institut, ist die einfache und eindeutige Unterscheidung von Antigen im Impfstoff und dem pathogenen Feldvirus.

Unter **Attenuierung** versteht man eine gezielte künstliche Abschwächung oder Aufhebung der Virulenz eines vermehrungsfähigen, pathogenen Mikroorganismus für einen bestimmten Wirt oder eine bestimmte Zellart unter Erhalt der Vermehrungsfähigkeit, Antigenität und Immunogenität, die über Generationsfolgen konstant bleiben muss und genetisch fixiert ist. Durch Passagen bei suboptimalen Temperaturen oder Passagen in Zellkulturen bzw. embryonierten Eiern kann eine Attenuierung erfolgen (LEMKE, 2014). Durch die hierdurch verursachte Selektion und Anhäufung von avirulenten Mutanten wird die Anpassung eines Wildvirusstammes an

geänderte Umweltbedingungen bzw. an einen neuen Wirt ermöglicht. Dies geht oft mit einem Verlust bzw. einer Verminderung der Virulenz für den natürlichen Wirt einher. Zu beachten ist, dass zumindest in den Anfangsstufen eine Reversion zu virulentem Virus möglich ist (WITTIG, 1996; THIEL et al., 1997; LEMKE, 2014).

Viren als **Vektoren** für die Expression definierter protektiver Gene anderer Viren (Bakterien, Parasiten, u.a.) werden in Virusvektorvakzinen verwendet. Dabei wird das Hühnerpockenvirus als attenuierter Vektor für ein zusätzliches immunogenes Epitop (Partialantigen) verwendet. Dieses Epitop exprimiert einen Teil eines Antigens eines anderen Virus (z.B. des Virus der Newcastle-Krankheit). Zur Erzeugung einer Immunität muss sich das Vektorvirus im Impfling vermehren. Daher muss es parenteral appliziert werden. Die Voraussetzung ist, dass zuvor nicht gegen das Hühnerpockenvirus geimpft worden ist (JUNGBÄCK et al., 2005).

2.3.1.2 Inaktivimpfstoffe

Inaktivimpfstoffe enthalten definitionsgemäß kein vermehrungsfähiges Virus. Um eine ausreichende Reaktion des Immunsystems hervorzurufen, sind sehr hohe Impfstoffvolumina, große Mengen inaktivierten Vollvirus und Adjuvanzien als Hilfs- oder Wirkstoffe notwendig (DAUBNEY et al., 1949; HOHMANN, 2009; ZÜNDORF und DINGERMANN, 2009). Zur erfolgreichen Immunisierung sind nach der Grundimmunisierung noch ein bis 2 weitere Boosterinjektionen notwendig, häufig auch eine jährliche Wiederholungsimpfung. Die Dauer des Impfschutzes ist nach einmaliger Applikation oft kürzer (Tabelle 2) als bei einer Lebendvakzine (WITTIG, 1996; THIEL et al., 1997; ZÜNDORF und DINGERMANN, 2009; LEMKE, 2014).

Inaktivimpfstoffe werden eingeteilt in:

- a) Inaktivatvakzine
- b) Spaltvakzine
- c) Subunitvakzine
- d) Synthetische Peptide

2 Literaturübersicht

- e) DNS-Vakzine
- f) Toxoidvakzine

Zu a): Eine **Inaktivatvakzine** besteht aus kompletten aber inaktivierten Viruspartikeln, Resten eines Inaktivierungsstoffs zur chemischen Inaktivierung, einem Hilfsstoff als Adjuvanz und einem Konservierungsmittel zur Verhütung bakterieller und mykotischer Kontamination (meist Thiomersal, eine Quecksilberverbindung). Darüber hinaus enthalten Inaktivatvakzinen herstellungsbedingt Reste vom Zellkulturmedium (oder Allantoisflüssigkeit) und Wirtszellkomponenten, Antibiotika, Stabilisatoren und Antioxidanzien (ZÜNDORF und DINGERMANN, 2009).

Die Inaktivierung des Virus kann auf chemische oder physikalische Weise geschehen. Als chemische Inaktivierungsmöglichkeiten kommen Formalin (führt zur Denaturierung der Proteine), β -Propiolakton, Ethylenimin, Hydroxylamin oder Farbstoffe in Betracht. Die Inaktivierung auf physikalischem Weg erfolgt mit Hitze oder UV-Bestrahlung.

Die ersten Inaktivatvakzinen wurden bereits von TRAUB (1943a und 1943b) und DAUBNEY et al. (1949) zur Verhütung der atypischen Geflügelpest (Newcastle-Krankheit) der Hühner hergestellt. Auch gegenwärtig werden überwiegend formalinisierte Inaktivatimpfstoffe zum Schutz gegen die Folgen einer Infektion mit dem Virus der avären Influenza (H5N1) in vielen asiatischen und afrikanischen Ländern eingesetzt (SPACKMAN und SWAYNE, 2013).

Zu b): **Spaltvakzinen** werden hergestellt, indem das zukünftige Impfvirus aufgereinigt und anschließend die Lipiddoppelmembran vom Viruspartikel abgespaltet wird. Hierdurch werden virale Strukturproteine aus der Virus-hülle herausgelöst, die mit einem Adjuvanz als Impfstoff eingesetzt werden können.

Zu c): **Subunitvakzinen** enthalten nur diejenigen viralen Bestandteile, die zur Erzeugung einer protektiven Immunität notwendig sind. Das klassische

Verfahren zur Herstellung dieser Vakzine beruht auf der Herauslösung relevanter Antigene von Viren durch Aufreinigung. Des Weiteren wurden hierzu auch gentechnische Verfahren etabliert. Hierbei werden durch Expression klonierter Gene virale Proteine hergestellt. Diese bieten den Vorteil, dass mit relativ wenig Aufwand große Mengen viraler Proteine synthetisiert werden können. Nach Einsatz von Subunitvakzinen können natürlich infizierte von geimpften Tieren unterschieden werden (THIEL et al., 1997).

Zu d): Durch *in vitro*-Synthese von Teilen viraler Proteine erhält man **synthetische Peptide**, die als Impfstoff Verwendung finden können. Die nach Injektion induzierten neutralisierenden Antikörper lassen sich von Antikörpern gegen das Vollvirus unterscheiden (THIEL et al., 1997).

Zu e): Nach intramuskulärer oder subkutaner Applikation von DNS führt die **DNS-Vakzine** im Impfling zur Expression erregerspezifischer Proteine. Diese induzieren eine Immunantwort (VANROMPAY et al., 1999).

Zu f): **Toxoidimpfstoffe**, die bakterielle Toxine (z.B. Botulismus, Tetanus) und ein Adjuvanz enthalten, spielen beim Geflügel nur eine untergeordnete Rolle. Die Applikation muss parenteral erfolgen (JUNGBÄCK et al., 2005; Lemke, 2014).

2.3.1.3 Virus-like particles-Impfstoffe

VLP-Impfstoffe gehören zur Gruppe der Subunitimpfstoffe, sie sind „Marker“-fähig und ermöglichen deshalb eine Unterscheidung von zirkulierenden Antikörpern, die durch ein Impfantigen bzw. durch ein Feldvirus hervorgerufen wurden. Zudem können VLP-Impfstoffe den Aufbau von polyomavirusfreien Zuchten ermöglichen.

2.3.1.3.1 Virus-like particles-Impfstoff aus APV

Nach rekombinanter Expression des immunogenen Hauptstrukturproteins VP1 von APV in einem Hefeexpressionsmodell entstehen VLP, die sich zu einem virusähnlichen Gebilde zusammenlagern und auch in ihrer Form und Größe vom kompletten Virus nicht zu unterscheiden sind, jedoch keine DNS enthalten und somit nicht infektiös sind (SASNAUSKAS et al., 2002). Diese VLP eignen sich sehr gut als Antigen.

Die VLP von APV lagern sich mit einer zehnfach niedrigeren Effizienz zusammen als die VP1-Proteine anderer Polyomaviren (SASNAUSKAS et al., 2002). Ein fehlendes nukleäres Lokalisationssignal (NLS) und die Notwendigkeit zellspezifischer Faktoren sind dafür ursächlich (JOHNE und MÜLLER, 2004). Zur Herstellung von VLP aus APV wird daher zur DNS-Sequenz von VP1 das nukleäre Lokalisationssignal KRK hinzugefügt, wonach größere VLP mit einer Größe von 45 nm entstehen (ZIELONKA et al., 2007).

ZIELONKA et al. (2007) transformierten Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) mit dem Hefeexpressionsplasmid pFX7. Dieses Plasmid beinhaltet die Encodingregionen für das Hauptstrukturprotein VP1 des Budgerigar Fledgling Disease Polyomavirus (BFPyV), des Chimpanzee Polyomavirus (ChPyV), des Simian Virus 40 (SV 40), des Goose Hemorrhagic and enteritis-Polyomavirus (GHPV), des Finch- und des Crow-Polyomavirus (FpyV und CpyV). Bei der Vermehrung der Hefezellen wurde die Expression des Hauptstrukturproteins VP1 induziert. Danach wurde die VP1-Expression mittels SDS-PAGE und nachfolgender Coomassie-Brillantfärbung oder mittels Immunoblot analysiert. Hiernach wurden zur Überprüfung VP1 beinhaltende Fraktionen elektronenmikroskopisch dargestellt. Hierauf folgte die Immunisierung von Kaninchen mit gereinigten VLP in einer VLP-Dosis von 100 µg/Tier. Häufig wurden hierbei hohe neutralisierende Antikörpertiter erreicht, obwohl die VLP ohne Adjuvantien verimpft wurden (GEDVILAITE et al., 2000; SEDLIK et al., 2000; ZHANG et al., 2000; ZIELONKA, 2010).

Mittels Immunoblot wurden Kreuzreaktionen der Antisera festgestellt und beschrieben (ZIELONKA et al., 2008). Diese Kreuzreaktionen konnten beispielsweise zwischen MpyV und APV aber auch zwischen SV-40 und ChPyV festgestellt werden (ZIELONKA, 2010). In einer vergleichenden Studie konnten ZIELONKA et al. (2012) mittels Immunoblot, indirektem ELISA und Hämagglutinationshemmungstest nur geringe verwandtschaftlichen Beziehungen der 4 aviären Polyomaviren aus Psittaziden, Krähen, Finken und Gänsen nachweisen. Das Psittaziden- und das Finkenpolyomavirus einerseits sowie das Krähen- und Gänsepolyomavirus andererseits sind jeweils enger miteinander verwandt und sollten deshalb 2 unterschiedliche Serogruppen bilden (ZIELONKA et al., 2012).

Bei einer Immunisierung mit VLP von APV werden nur Antikörper gegen das Hauptstrukturprotein VP1 gebildet.

Die Einführung neuer Vögel in einen bisher APV-seronegativen Bestand könnte durch Impfung mit VLP erheblich einfacher werden. Die Einschleppung von Wildtypvirus kann bei Quarantänekontrollen durch die sichere Unterscheidung zwischen persistent infizierten oder immunisierten zugekauften Tieren vermieden werden.

2.3.1.4 Virus-like particles-Impfstoffe gegen weitere Viruskrankheiten

Zum ersten Mal wurden VLP als Vakzine mit der erfolgreichen Einführung eines Impfstoffes gegen das Hepatitis B Virus (HBV) des Menschen eingesetzt (MACARTHUR und WALTER, 1984).

Ferner wurde in Europa 2006 ein VLP-Impfstoff zur Prophylaxe des Zervixkarzinoms der Frau, welches durch das humane Papillomavirus (HPV) verursacht wird, erfolgreich zugelassen (ZUR HAUSEN, 2009). Harald zur Hausen wurde für die Forschung auf diesem Gebiet 2008 der Nobelpreis für Physiologie und Medizin zuerkannt.

Im Bereich der Veterinärmedizin wurde eine patentierte Vakzine auf der Basis von VLP gegen den wichtigsten Hauttumor des Pferdes bereits erfolgreich eingesetzt (MATTIL-FRITZ et al., 2008), gegen Zitzenpapillome

bei Rindern wird ein VLP-Impfstoff erprobt (MÜLLER, schriftl. Mitteilung, 2008).

BONNE et al. (2009) berichten, dass die Vakzinierung von Psittaziden mit Baculovirus-exprimierten VLP zur Induktion von schützenden Antikörpern gegen PBFDV führte.

2.3.2 Adjuvanzien

Adjuvanzien sind strukturell und chemisch heterogene Stoffe, die es ermöglichen, auf einen bestimmten Antigenreiz hin Immunreaktionen zu verstärken, zu verlängern und unter Umständen auch qualitativ zu verbessern (ZÜNDORF und DINGERMANN, 2009). Ein ideales Adjuvanz verursacht dabei keine unerwünschten Nebenwirkungen. In der Tiermedizin werden heutzutage folgende Adjuvanzien verwendet (BECK-SCHILDWÄCHTER, 2003; ZÜNDORF und DINGERMANN, 2009):

- a) Metallsalze (meist in Form von Aluminiumhydroxidkomplexen oder Aluminiumphosphat und Aluminiumhydroxyphosphatsulfat)
- b) Ölemulsionen (w/o, o/w und w/o/w)
 - Wasser in Öl: Specol, FICA (Paraffinöl)
 - Öl in Wasser
 - Wasser in Öl in Wasser
- c) Saponine
- d) Liposomen

Bei Papageien wurden darüber hinaus weitere Adjuvanzien verwendet. Das Adjuvanz Acemannan hat antivirale und immunmodulatorische Wirkungen (SHEETS et al., 1991; TIZARD et al., 1991). Equimun wird als Wirkungsverstärker hauptsächlich in Impfstoffen für Pferde und E3 wird als Immunmodulator in Impfstoffen für Psittaziden eingesetzt (RITCHIE et al., 1994) (Tabelle 3).

Tabelle 3: Adjuvanzen, die in APV-Papageienimpfstoffen eingesetzt wurden, deren Vor- und Nachteile und Empfehlung als Einsatz in einer APV-Vakzine basierend auf VLP

Adjuvanz	Vorteil	Nachteil	Bewertung
Aluminiumhydroxid	- erhöhte Aufnahme von Antigenen durch antigenpräsentierende Zellen - eine verlängerte Antigenpräsentation und verstärkte Wechselwirkungen zwischen CD4-positiven T-Helferzellen und dendritischen Zellen - wirksam und gut verträglich in inaktivierter APV-Vakzine	nicht an Wellensittichen getestet (RITCHIE et al., 1998)	sinnvoll als Adjuvanz in APV-VLP-Vakzine
E3	an Papageien getestet	hohe Mortalität	keine Anwendung möglich
Equimun	Einsatz bei Pferdeimpfstoffen	Ulcera	nicht zu empfehlen
Acemannan	antivirale und immunmodulatorische Wirkung	- lokale Hyperämien - keine Erhöhung der Seroconversion	möglicher Einsatz
Ölemulsion	induziert dauerhafte Immunität	Abszesse, Nekrosen, Granulome	keine Verwendung möglich
Liposomen	Doppelmembran aus Phospholipiden, in denen die viralen Antigene liegen	keine	noch wenig erprobt

2.3.3 Impfstoffe zur Verhütung von APV-Infektionen

2.3.3.1 Impfstoffe zur Prophylaxe von APV-Infektionen

In den USA entwickelte inaktivierte APV-Vakzinen aus Vollvirus wurden zur Prophylaxe an verschiedenen Vogelarten der *Ordnung Psittaciformes* getestet. Diese Vakzinen wurden subkutan oder intramuskulär verabreicht und induzierten bei den Impfungen neutralisierende Antikörper gegen APV. Darüber hinaus schützten sie die Vögel nach einer Belastungsinfektion vor einer Erkrankung (RITCHIE et al., 1993).

Allerdings verursachten die in Inaktivatvakzinen enthaltenen Adjuvanzien größtenteils schwere Nebenwirkungen. An einer Vakzine mit E3 als Adjuvanz starben 3 von 8 Vögeln nach der 2. Immunisierung. Equimune als Adjuvanz verursachte bei einem Impfling Ulcera. Das Adjuvanz Acemannan führte zu Nebenwirkungen in Form von Hyperämien an der Injektionsstelle (RITCHIE et al., 1994). Eine als Adjuvanz verwendete Ölemulsion verursachte an der Injektionsstelle Granulome, Abszesse oder Nekrosen (RITCHIE et al., 1993; RITCHIE et al., 1994) (vgl. Tabelle 3).

RITCHIE et al. (1996) verglichen eine inaktivierte Vakzine mit Acemannan mit einer Vakzine ohne Adjuvanz und kamen zu dem unerwarteten Ergebnis, dass zwischen beiden Vakzinen in der Höhe der Serokonversion kein signifikanter Unterschied bestand.

Bei Hühnern konnte eine positive Dosis-Wirkungs-Beziehung nach Immunisierung mit inaktiviertem aviärem Polyomavirus festgestellt werden (RITCHIE et al. 1996). Allerdings entstanden bei einigen Hühnern an der Injektionsstelle „Krusten“, bei anderen wurde eine heftige Mauser ausgelöst, obwohl diese Tiere mit einer Vakzine ohne Adjuvanz immunisiert worden waren.

Eine an Psittaziden (ausgenommen Wellensittiche) getestete inaktivierte Vakzine gegen APV mit Aluminiumhydroxid als Adjuvanz verursachte keine Nebenwirkungen, induzierte in den Impfungen neutralisierende Antikörper und schützte die Tiere vor einer Belastungsinfektion (RITCHIE et al., 1998). Darüber hinaus konnten im Eidotter der Eier von geimpften

Wellensittichhennen neutralisierende Antikörper gegen APV detektiert werden. Dies misslang allerdings im Serum von Küken derselben Hennen (PHALEN et al., 1995). Somit konnte die vermutete Übertragung von maternalen, neutralisierenden Antikörpern vom Muttertier über Eidotter auf das Küken nicht bestätigt werden.

Trotzdem wurde von RITCHIE et al. (1998) empfohlen, vor allem Zuchttiere und Jungtiere mit einer inaktivierten Vakzine zu immunisieren, um den Übertragungszyklus des Virus zu unterbrechen und somit die Wahrscheinlichkeit deutlich zu reduzieren, dass Neonaten dem Virus ausgesetzt werden. Da dieser Impfstoff „Marker“-fähig ist, kann er zum Aufbau polyomafreier Bestände verwendet werden.

Die Einschleppung von Wildtypvirus kann bei Quarantänekontrollen durch die sichere Unterscheidung zwischen persistent infizierten oder immunisierten zugekauften Tieren vermieden werden.

2.3.3.2 Vakzinen auf der Basis von Deletionsmutanten

Es wurde versucht VP4-Deletionsmutanten als mögliche Impfstoffe gegen APV-induzierte Erkrankungen zu verwenden. Der Vorteil war, dass diese Mutanten weniger infektiös als Wildtypviren waren und in Hühnern neutralisierende Antikörper induzierten (JOHNE und MÜLLER, 2007). Eine Ausschaltung der Expression von VP4 führte zum völligen Verlust der viralen Replikation in HEF-Kulturen (JOHNE et al., 2000). Deshalb kommen nur Deletionsmutanten in Frage, welche noch Anteile von VP4 exprimieren. Dabei kommt es zur Entstehung von infektiösen Viren mit einer deutlich langsameren Replikationsrate und der Ausbildung von niedrigeren Virustitern (JOHNE et al., 2007). Die Deletionsmutanten verursachten in Hühnerembryofibroblasten weniger apoptotische Zellen als die Wildtypviren.

Vorstellbar ist die Herstellung von Viren, welche gezielte Deletionen in den für die Apoptoseinduktion verantwortlichen Bereichen des VP4 aufweisen. Jene Viren mit Deletionen, welche in infizierten Zellen replizieren und diese minimal schädigen, könnten anschließend auf ihre Eignung als

Lebendvakzine getestet werden. Lebendimpfstoffe induzieren in den meisten Fällen eine gute und belastbare Immunität, sowohl auf humoraler als auch auf zellulärer Ebene. Nachteilig kann sich deren Einsatz zur Bekämpfung von Viren mit hoher Mutationsrate auswirken, da mit der Ausscheidung von infektiösem Impfvirus gerechnet werden muss. Bei Polyomaviren mit bekanntermaßen geringer Mutationsrate ist diese Gefahr jedoch gering. Da es derzeit keine Hinweise auf tumorinduzierende Eigenschaften der Vogelpolyomaviren gibt, scheint im Gegensatz zur Situation beim Menschen, eine Impfung von Vögeln mit attenuierten Polyomaviren unbedenklich zu sein.

Bei GHPyV, FPyV und CPyV ist die Herstellung von Lebendvakzinen bisher nicht möglich, da keine Kultivierungssysteme verfügbar sind, in welchen sich die Viren oder hergestellte Mutanten effizient vermehren können.

2.3.3.3 Impfstoffe gegen GHPV

Eine rekombinante Subunitvakzine aus GHPV-VLP schützt junge Gänse vor einer Infektion mit dem Goose hemorrhagic enteritis-Polyomavirus (MATÒ et al., 2009). Eine inaktivierte Vakzine mit Carbopol als Adjuvanz ist sicher und schützt ebenfalls junge Gänse vor einer GHPV-Infektion. Darüber hinaus waren auch Küken geimpfter Eltern vor einer Infektion geschützt. Die vom Muttertier stammenden maternalen Antikörper konnten noch 15 Tage nach dem Schlupf im Serum der Küken nachgewiesen werden (GELFI et al., 2010).

2.3.4 Impfschäden

Bei der Prüfung und Beurteilung von „Impfschäden“ muss zwischen Schäden durch bestimmte Eigenschaften des Impfstoffes und den negativen Folgen bei der Aufbewahrung und der Applikationstechnik unterschieden werden. Auch nach korrekter Lagerung des Impfstoffes sowie beim richtigen Handling des zu impfenden Tieres und der sachgemäßen Applikation unter vollständiger Berücksichtigung der

Herstellerempfehlungen kann es zu Beeinträchtigungen des Impflings in Form von Schwellungen und / oder Hämatomen an der Impfstelle kommen (JUNGBÄCK et al., 2005). Beim Auftreten großer und lange anhaltender lokaler Reaktionen, beispielsweise von Granulomen oder Abszessen, können die Ursachen vielfältig sein. Impfstoffe, Spritzen oder Kanülen, die mit Bakterien oder Pilzen kontaminiert sind, können zu lokalen oder generalisierten Veränderungen führen. Auch die Verwendung zu großer Volumina, zu kaltem Impfstoff v.a. in Kombination mit einem zu hohen Druck, kann unerwünschte Veränderungen an der Injektionsstelle verursachen. Des Weiteren kann auch die Wahl einer ungeeigneten Applikationsstelle unerwünschte Nebenwirkungen hervorrufen. Beim Rassegeflügel gibt es genetisch bedingte Impfstoffunverträglichkeiten. Dies ist bei der Immunisierung zu berücksichtigen (BÖNNER et al., 2003; JUNGBÄCK et al., 2005; LEMKE, 2014).

Systemische Nebenwirkungen können auftreten, wenn Bakterien oder Viren von latent infizierten bakteriämischen oder virämischen Tieren auf darauffolgende Impflinge übertragen werden. Dies kann vermieden werden, indem das Impfbesteck nur für eines der zu impfenden Tiere verwendet wird.

2.4 Das Immunsystem der Vögel

Von allen Vögeln sind über das Immunsystem des Huhnes die tiefgehendsten Informationen verfügbar. Die Funktionalität und Leistungsfähigkeit des Immunsystems ist genetisch festgelegt, da im natürlichen Lebensraum die Selektion eine wichtige Rolle spielt. In der Vogelhaltung werden häufig Mutationen herausgezüchtet, die verglichen mit ihren freilebenden Artgenossen, krankheitsanfälliger sein können.

Das Immunsystem kann fremde Organismen bzw. deren Zellen und Antigene von körpereigenen unterscheiden. Hierdurch schützt es zum einen den Körper vor invasiven Mikroorganismen, zum anderen beseitigt es kranke und alte Zellen. Das Immunsystem wird in die unspezifische und die spezifische Immunabwehr eingeteilt.

2.4.1 Die unspezifische Immunabwehr

Das Hautepithel und die Schleimhäute verfügen über eine natürliche Keimflora und einen spezifischen pH-Wert. Beides bewirkt, dass Bakterien und andere Keime abgewehrt werden, bevor diese in den Körper eindringen können (NEUMANN und KALETA, 1992; GERLACH, 1994). Darüber hinaus sind die Schleimhäute mit dem lymphoepithelialen System verbunden. Dies verbindet die unspezifische mit der spezifischen Abwehr. In der Mukosa befinden sich außerdem Immunglobuline und Lysozyme. Letztere sind von antibakterieller und antiviraler Wirkung.

Die Zellen des unspezifischen Abwehrsystems sind Abkömmlinge des mononukleären phagozytierenden Systems und entstammen dem Knochenmark (NEUMANN und KALETA, 1992).

Die heterophilen Granulozyten werden zu den Leukozyten gezählt. Die Heterophilen können Phagozytose betreiben und synthetisieren eine Vielzahl von Enzymen. Darüber hinaus können sie absterbende oder tote Zellen und nicht körpereigenes Material entfernen, ohne sie dem spezifischen Immunsystem als Antigene zu präsentieren. Hierbei kommt den Opsoninen eine Schlüsselfunktion zu. Als Opsonine können einzelne Blutproteine, Antikörper, Fibronectin, sowie C3b-Komplexe der Komplementsystemkaskade fungieren. Ferner synthetisieren heterophile Granulozyten freie Radikale, die bakterielle Oberflächenproteine oxidieren. Hieraus resultieren reaktionsfreudige und instabile Verbindungen, die bakterizide Hydroperoxide bilden.

Über die eosinophilen Granulozyten der Vögel ist noch wenig bekannt. Bei Säugetieren tritt eine Eosinophilie vor allem bei Parasitenbefall, Entzündungen, Allergien, Immunsuppression und Neoplasien auf. Beim Huhn hingegen ist sogar bei anaphylaktischen Reaktionen nur eine geringgradige oder keine Erhöhung dieser Zellen beschrieben.

Funktionell und morphologisch sind basophile Granulozyten identisch mit Mastzellen. Ihre Granula enthalten Proteine, vasoaktive Amine, Aktivatoren der Gerinnungskaskade und Antikoagulantien wie Heparin.

Die kernhaltigen Thrombozyten der Vögel sind im Gegensatz zu denen der Säuger zur Phagozytose befähigt (NEUMANN und KALETA, 1992; GERLACH, 1994). Es ist bisher noch nicht bekannt, ob diese Phagozytose mit derjenigen der heterophilen Granulozyten identisch ist.

Die Bildung von Makrophagen erfolgt im Knochenmark, wonach sie als Monozyten mit dem Blutstrom an ihre Einsatzorte gelangen (GERLACH, 1994). Aus Tabelle 4 ergibt sich, dass der Einsatzort der Makrophagen entscheidend für deren Morphologie und Funktionsweise ist.

Tabelle 4: Morphologie der Makrophagen und deren Funktion an unterschiedlichen Einsatzorten (GERLACH, 1994)

Morphologie	Funktion	Einsatzorte
Monozyten	Befähigung zur Phagozytose und Migration	Periphere Blutbahn
Histiozyten	Phagozytose	Verschiedene Gewebe
Multinukleäre Riesenzellen	Aufnahme von bzw. Zusammenschluss mit anderen Zellen	Granulomatöse Gewebe
Kupffer'sche Sternzellen	Entfernung von körpereigenen und fremden Stoffen durch Phagozytose	Lebersinus
Langerhans Riesenzellen	Aufnahme von bzw. Zusammenschluss mit anderen Zellen	Tuberkulöse Granulome
Epitheloidzellen	Phagozytose	Makrophagen mit intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen
Mikrogliazellen	Phagozytose	Gehirn

Beim Vogel findet man in der Lunge sogenannte Phagosomen, die den alveolären Makrophagen der Säuger analog sind. Die Lebensdauer der Makrophagen ist recht lang. Eine Ausnahme hiervon bilden Makrophagen, die durch Phagozytose viel Zelldebris aufgenommen haben (GERLACH, 1994). Makrophagen sind bei der Einleitung der spezifischen Immunantwort von großer Wichtigkeit. Nach der Phagozytose können sie

Infektionserreger enzymatisch zerlegen. Hiernach werden von den Abbauprodukten bestimmte Regionen ausgewählt, die daraufhin den T-Lymphozyten präsentiert werden. Darüber hinaus können Makrophagen mit anderen Zellen in Kontakt treten und weitere Abwehrprozesse in die Wege leiten. Auch Makrophagen selbst können, ähnlich den natürlichen Killerzellen (NKZ), antikörpermarkierte Zielzellen zerstören (NEUMANN und KALETA, 1992).

2.4.2 Die spezifische Abwehr

Die unspezifische und die spezifische Abwehr sind durch direkten Kontakt der Abwehrzellen und durch die Freisetzung von Botenstoffen funktionell miteinander verbunden (RAUTENSCHLEIN und KALETA, 2005). Anders als das unspezifische Immunsystem, verfügt die spezifische Abwehr durch die Bildung von Antikörpern über prophylaktische Möglichkeiten und durch Plasmazellen über eine Gedächtnisfunktion. Hierdurch kann der Körper sowohl vor Erstinfektionen als auch vor rezidivierenden Infektionen geschützt werden (GERLACH, 1994). Dadurch hat es die Fähigkeit, auf einen unbekanntem, körperfremden Stoff spezifisch zu reagieren. Folgende Punkte sind für die spezifische Immunantwort charakteristisch (NEUMANN und KALETA, 1992):

- a) Die Spezifität, das heißt das Erkennen der antigenen Determinanten des Antigens. Dies setzt Anpassungsfähigkeit und Variabilität des Immunsystems voraus (adaptives Immunsystem).
- b) Bis zur Ausbildung der spezifischen Abwehrmechanismen vergeht Zeit (Latenzzeit). Daher ist die unmittelbar wirkende unspezifische Abwehr von größter Wichtigkeit.
- c) Durch sein Erinnerungsvermögen reagiert das Immunsystem bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Antigen mit einer stärkeren Immunantwort, welche sich durch höhere Antikörpertiter, eine höhere Bindungsfähigkeit der spezifischen Antikörper an das

Antigen und eine verkürzte Latenzphase auszeichnet. Dieses immunologische Gedächtnis wird von lymphoiden Zellen („Gedächtniszellen“) getragen.

Das spezifische Immunsystem basiert auf B- und T-Lymphozyten. Diese können antigene Epitope erkennen und mit diesen reagieren. Darüber hinaus können sie Antikörper bilden und zellgesteuerte Reaktionen durchführen (zelluläres Immunsystem). Die spezifische Immunität wird in humorale und zelluläre Abwehr eingeteilt. Sowohl Vögel als auch Säuger verfügen über spezifische Mechanismen, die evolutionsbedingt manche Unterschiede aufweisen (RAUTENSCHLEIN und KALETA, 2005).

2.4.2.1 Die humorale Abwehr

Das Primärorgan der B-Zellentwicklung ist beim Säuger das Knochenmark. Beim Vogel hingegen entstehen die B-Zellen in der Bursa Fabricii, welche nur beim Vogel vorhanden ist (SHARMA, 1991; RAUTENSCHLEIN und KALETA, 2005). Die Einwanderung der basophilen Stammzellen in die Bursa Fabricii findet ungefähr am 8. Tag der Bebrütung statt. Rezeptoren in Form von Immunglobulinmolekülen an der Zelloberfläche können beim Huhn ab dem 8. (IgM) bzw. um den 14. (IgG) Bruttag nachgewiesen werden (SIEGMANN et al., 1974). Dies befähigt den Körper zur Einleitung der humoralen Immunantwort einschließlich Antikörperbildung. Das Binden von Antigenen kann ab dem 14. Tag beobachtet werden. In der Bursa Fabricii wird die Grundlage für die Antikörpervielfalt geschaffen (HAMMER, 1974; NEUMANN und KALETA, 1992; SCOTT, 2004). Antikörper sind chemisch gesehen Proteine aus der Klasse der Globuline. Daher werden sie auch Immunglobuline genannt. Ihre Rezeptoren können Verbindungen mit isotypenspezifischen Strukturen und Membranrezeptoren eingehen und das Komplementsystem aktivieren. Bei Vögeln konnten bisher 3 unterschiedliche Isotypen nachgewiesen werden: IgG, IgM und IgA (HAMMER, 1974; TIZARD, 1979; GERLACH, 1994;

RAUTENSCHLEIN und KALETA, 2005). Das IgE fehlt den Vögeln (HAMMER, 1974).

Immunglobulin G (IgG) ist der im Serum am häufigsten vorkommende Antikörper. Da er sich vom IgG des Säugers in Struktur und Molekulargewicht unterscheidet, wird das Vogel-IgG auch IgY genannt. Dieses Immunglobulin opsoniert, agglutiniert und präzipitiert Antigene. Obendrein kann IgG aufgrund seines geringen Molekulargewichtes Körperoberflächen penetrieren und in Gewebsräume eindringen. Beim Hühnerküken liegt die Halbwertszeit des IgG bei 4 bis 5 Tagen während beim erwachsenen Huhn die Halbwertszeit bei 3 bis 4 Tagen liegt (KALETA et al., 1977).

Die Übertragung von maternalen IgG-Antikörpern erfolgt vom Serum des Muttertiers über den Dotter auf den Embryo und somit auch auf das Küken (SIEGMANN und KALETA, 1973; SIEGMANN et al., 1974; GERLACH, 1994; RAUTENSCHLEIN und KALETA, 2005). Diese konnatale Immunität nimmt nach dem Schlupf linear ab, schützt das Küken aber in den ersten Lebenswochen (SIEGMANN et al., 1974). Die zeitlineare Elimination der maternalen Antikörper und die Halbwertszeit von 4 bis 5 Tagen im Serum der jungen Küken muss bei der zeitlichen Festlegung der ersten aktiven Immunisierung berücksichtigt werden (SIEGMANN und KALETA, 1973). Aus der Höhe der maternalen Antikörper während der ersten 3 Lebenstage und der Halbwertszeit kann der Zeitraum bis zur vollständigen Elimination und dadurch der optimale Zeitpunkt für die erste aktive Immunisierung errechnet werden (SIEGMANN et al., 1974).

Immunglobulin M (IgM) wird gebildet, wenn zuvor ein initialer Kontakt zu einem Antigen vorlag. Dieses Immunglobulin hält sich aufgrund seines großen Molekulargewichtes hauptsächlich im peripheren Blutstrom auf. Seine Hauptaufgaben sind Komplementsystemaktivierung, Agglutination, Präzipitation, Opsonierung und Virusneutralisation. Dabei ist IgM deutlich aktiver als IgG. Der spezifische Nachweis von IgM wird zur Diagnostik von Infektionen eingesetzt, die erst kurze Zeit zurückliegen (HAMMER, 1974;

TIZARD, 1979). Im Laufe von 2 bis 3 Wochen wird IgM durch IgG ersetzt (RAUTENSCHLEIN und KALETA, 2005).

Immunglobulin A (IgA) wird hauptsächlich auf Schleimhäuten vorgefunden. Weiterhin ist der Nachweis in der Kropfmilch von Tauben in hoher Konzentration gelungen. Nach dem Transport zur Leber wird dieser Antikörper in der Galle gespeichert und in das Darmlumen abgegeben. IgA kann zwar Viren neutralisieren und Antigene agglutinieren, allerdings kann IgA nicht opsonieren und das Komplementsystem aktivieren (RAUTENSCHLEIN und KALETA, 2005).

2.4.2.2 Die zelluläre Abwehr

Die spezifische zellvermittelte Immunität wird von den T-Zellen getragen. Die zelluläre Abwehr ist von größter Wichtigkeit hinsichtlich des Schutzes gegen Virusinfektionen. Darüber hinaus beseitigt sie virusinfizierte Zellen, intrazelluläre Antigene und manche Tumorzellen (GERLACH, 1994; ERF, 2004). Die T-Zellen entstehen beim Vogel, gleich den Säugetieren, primär im Thymus. Ab dem 14. Bruttag können T-zellspezifische Reaktionen des Immunsystems nachgewiesen werden. Nach dem Schlupf ist der Thymus, analog zur *Bursa Fabricii*, peripheres lymphatisches Organ (TIZARD, 1979; SHARMA, 1991; NEUMANN und KALETA, 1992; RAUTENSCHLEIN und KALETA, 2005).

Anders als bei den B-Zellen gibt es bei den T-Zellen viele Untergruppen: Die Effektor-/Helferzellen produzieren Lymphokine, die Suppressorzellen unterbinden die Antwort von anderen B- und T-Zellen. Charakteristisch für die T-Zell-Subpopulationen ist die Fähigkeit, Oberflächenmoleküle (CD1-11) zu exprimieren. Ferner verfügen sie über einen speziellen T-Zell-Antigenrezeptor. Zur Signalweiterleitung produzieren alle T-Zellen CD3-Moleküle, welche mit einem entsprechenden T-Zell-Rezeptor (TCR) verbunden sind (SHARMA, 1991; ERF, 2004). Der TCR kann in 2 Teile, einen antigenbindenden und einen CD3-bindenden Teil unterteilt werden (GÖBEL, 1996). Die Struktur eines jeden T-Zellrezeptorbereiches ist charakteristisch, gleicht den Immunglobulinen und besteht aus dem

extrazellulären, transmembranen und dem kleinen intrazellulären Anteil. Für die zellvermittelte Reaktion des Immunsystems sind sowohl im T-Zellsystem als auch im B-Zellsystem 3 miteinander interagierende Zelltypen notwendig: die CD4-Helferzelle, die Effektorzelle (sie präsentiert das CD8-Antigen) und die antigenpräsentierenden Makrophagen.

Die Erkennungsstrukturen für Klasse I- und Klasse II-Moleküle des Major Histokompatibilitätskomplexes (MHC) sind die CD4+- und CD8+-Moleküle. Die T-Zellen erkennen Antigene nur dann, wenn ihnen diese im Zusammenhang mit MHC-Molekülen vorgestellt werden (ERF, 2004). Das MHC-Molekül des Geflügels ist sehr viel kleiner als das der Säuger (minimal essential MHC). Weiterhin ist seine Genzahl reduziert und der Aufbau anders als das MHC des Menschen. Beim Geflügel wird die Intensität und Spezifität der Immunantwort auf ein Pathogen durch das dominant exprimierte MHC bestimmt. Dies stellt eine Besonderheit beim Geflügel dar (RAUTENSCHLEIN und KALETA, 2005).

2.4.2.2.1 CD8-T-Zellen

Das CD8-Antigen hat ein Molekulargewicht von 64 kDa und ist wie ein Dimer aufgebaut (DAVISON, 1996). Die Zellerkennung durch die Effektorzelle erfolgt nachdem sich das Klasse I MHC-Molekül fest mit dem Epitop des Antigens verbunden hat. Hiernach erfolgt die Ausschüttung von Interleukin 2, welches die Proliferation der T-Zellen stimuliert und die Herstellung von Gedächtniszellen und Effektorzellen anregt (LESSARD et al., 1997; DOHERTY und AHMED, 1997). Die Effektorzellen können verschiedene Lymphokine ausschütten und nach dem Kontakt mit fremden oder andersartigen Zellen toxische Reaktionen hervorrufen. Lymphokine können in mehrere Gruppen unterteilt werden. Es gibt regulatorische Faktoren (Il-2), Entzündungsmediatoren, die die vaskuläre Permeabilität erhöhen, zytotoxische Faktoren und den Fibroblastenstimulationsfaktor. Darüber hinaus gibt es Leukozyteninhibitionsmodulatoren, Migrationsinhibitionsmodulatoren und Makrophagenfusionsfaktoren, welche die Makrophagen aktivieren.

2.4.2.2.2 CD4-T-Zellen

Das CD4-Antigen ist ein 64 kDa großes monomeres Glykoprotein. Die CD4-T-Zellen funktionieren als Helferzellen. Die Bindung an Klasse II MHC-Moleküle erfolgt in vergleichbarer Weise wie bei den CD8-Zellen (DAVISON, 1996; ERF, 2004). Antigene werden durch Phagozytose in kleine Peptide aufgespalten. An diese Antigenfragmente binden Klasse II MHC-Moleküle, wenn diese Peptide eine Länge von 15 Aminosäuren nicht überschreiten. Diese werden an der Oberfläche exprimiert und mit dem nicht polymorphen Anteil werden CD4-T-Zellen gebunden. Anders als die CD8-Zellen besitzen sie die Fähigkeit Zytokine auszuschütten. Daher rührt der Name Helferzellen (LESSARD et al., 1997; DOHERTY und AHMED, 1997; ERF, 2004).

2.4.2.2.3 Zytokine

Zytokine sind niedermolekulare Peptide und Glykopeptide, die löslich sind (STAEHLI et al., 2001). Ihre Produktion erfolgt durch verschiedene Zellarten hämatopoetischer und nichthämatopoetischer Herkunft (KOGUT, 2000; QURESHI, 2003). Zytokine können auch in geringsten Konzentrationen eine große Wirkung haben. Während der Immunantwort agieren sie zwischen immunologisch aktiven Zellen als extrazelluläre Signale. Spezifische Immunreaktionen gegen invasive Erreger und Entzündungsreaktionen werden durch eine Vielzahl verschiedener Zytokine kontrolliert. Dabei werden durch Zytokine der Beginn und die Aufrechterhaltung der Abwehrmechanismen reguliert. Somit bestimmen sie sowohl den Reaktionstyp als auch die Effektormechanismen, die induziert werden, um Resistenz zu vermitteln. Um die Dauer und das Ausmaß einer Reaktion zu kontrollieren, werden Zytokine lokal und vorübergehend produziert (KOGUT, 2000). Obendrein sind sie in Reparaturprozesse und die Restauration der Homöostase eingebunden und spielen bei Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle. Zytokine werden zwar nach ihren Aufgaben eingeordnet und klassifiziert, dennoch muss beachtet werden, dass sich ihre Aufgabengebiete, antigenabhängig, vielfach überschneiden.

Anders als bei Hormonen ist ihre Wirkung lokal begrenzt (autokrin oder parakrin) (ENBERGS, 2005). Der Eintritt in den Blutkreislauf und damit eine systemische Verbreitung ist nur bei stärkeren Immunreaktionen zu beobachten.

2.4.2.2.4 Interferon- γ

Interferon- γ gehört zur heterogenen Gruppe der Zytokine. Dies sind Proteine, die von vielen Zellen des Körpers, in der Mehrzahl aber von Zellen der körpereigenen Immunabwehr gebildet werden. Da ihre biologische Aktivität sehr hoch ist, wirken sie bereits in niedrigen Konzentrationen im Pico- und Nano-Bereich (KAISER, 1996). Des Weiteren sind sie speziesspezifisch (SHARMA, 1991). Nach dem Kontakt mit einem viralen Antigen, aktivieren sie die antivirale Immunantwort (STAEHLI et al., 2001), sprich Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen. Durch Interferone wird sowohl die Entwicklung als auch Reifung des Immunsystems gefördert. Darüber hinaus begünstigen sie die Neutralisation und Elimination einer ganzen Reihe von extra- und intrazellulären viralen, parasitären und bakteriellen Schadfaktoren und Toxinen sowie von Tumorzellen und Fremdgewebe (TIZARD, 2000; ENBERGS, 2005). Dabei wird das effektive Zusammenspiel der verschiedenen Abwehrelemente ermöglicht und durch Steuerungs- und Effektorfunktionen stimuliert und reguliert. Bei einer Erkrankung ist es vom Antigen abhängig, welche Zytokine ausgeschüttet bzw. aktiviert werden.

An unterschiedlich alten Hühnern wurden die adjuvanten Eigenschaften von Interferon- und mehreren Lipopeptiden, bezüglich deren Effekt auf die humorale Immunität untersucht (ERHARD et al., 2000). Darüber hinaus wurde bei mit Kokzidien infizierten Hühnern mittels PCR das Verhalten von Interferon- γ getestet (STAEHLI et al., 2001).

Beim Menschen sind Struktur und Funktionen des Interferon- γ sehr gut erforscht. Seine Produktion erfolgt nach dem Stimulus antigenspezifisch innerhalb weniger Stunden in einer klonalen oder polyklonalen Weise durch Natürliche Killerzellen, lymphokinaktivierende Killerzellen, T-

Helferzellen (Th-, CD4+) und zytotoxischen T-Zellen (Tc, CD8+) (TIZARD, 2000; ENBERGS, 2005).

2.4.2.3 Zusammenwirken von humoraler und zellulärer Abwehr

Das Zusammenwirken von humoraler und zellulärer Abwehr ist zur Erregerabwehr bzw. Reaktion auf Impfstoffe notwendig. Eine Immunantwort ist wesentlich schneller und aggressiver, wenn CD4- und CD8-T-Zellen mit Antikörpern zusammengeschaltet sind, als wenn das zelluläre System nur teilweise arbeiten würde (TIZARD, 1979; SHARMA, 1991; DOHERTY und AHMED, 1997; ZINKERNAGEL, 1997; KAECH et al., 2002).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Wellensittiche für Zucht, Immunisierung und Belastungsinfektionen

Weil Wellensittiche das bedeutendste natürliche Reservoir des APV darstellen, wurden für die *in vivo*-Versuche adulte Wellensittiche im Alter von etwa 6 Monaten erworben. Da speziell für Tierversuche gezüchtete SPF-Wellensittiche weltweit nicht zur Verfügung stehen, stammen die für die eigenen Versuche benötigten Tiere aus der Privatzucht eines einheimischen Züchters. Der Grad der Verwandtschaft zwischen den Wellensittichen ist mir nicht bekannt. Insgesamt wurden 18 weibliche und 10 männliche Wellensittiche käuflich erworben.

Bei den 28 Wellensittichen handelt es sich um „Hansi-Bubi“-Wellensittiche, die am Kauftag zwischen 35 und 45 gr wogen. An Hand der Gefiederfarben konnten sie wie folgt unterteilt werden: 2 dunkelblaue, 2 hellblaue mit Gelbgesicht, 8 hellblaue, 4 hellgrüne, 2 olivgrüne, 3 grüne Schecken, 4 Lutinos, 1 violetter, 1 blaugescheckter und 1 opaliner Vogel (Tabelle 5). Außerdem konnten die Tiere anhand der Kennzeichnung mittels eines offenen Fußringes des Zentralverbandes Zoologischer Fachbetriebe e.V. unterschieden werden. Dieser enthielt neben der Ringgröße ($III = 5,5 \text{ mm}$) eine fortlaufende, für jeden Vogel unterschiedliche Kennzeichnungsnummer.

Bei der Auswahl der Vögel wurde eine sorgsame Anamnese erhoben und die auszuwählenden Tiere genau beobachtet und klinisch beurteilt. Bei der Erhebung der Anamnese wurde bekannt, dass der Bestand bisher keinerlei gesundheitliche Probleme aufwies und die gängigen Hygienemaßnahmen eingehalten wurden. Kot und Staub wurden regelmäßig entfernt, die Trink- und Wassernäpfe wurden täglich gereinigt. Alle Tiere des Bestandes reproduzierten regelmäßig und die Zahl der Todesfälle war sehr niedrig. Die Wellensittiche waren ihrem Wesen

entsprechend lebhaft und agil und ließen keine Federmissbildungen oder Verschmutzungen durch Kot im Gefieder, besonders nicht im Bereich der Kloake, erkennen. Darüber hinaus musste jeder Wellensittich „klare“ Augen ohne Anzeichen einer Konjunktivitis und freie Atemwege haben. Wachshaut und Ständer waren frei von Anzeichen einer Hyperkeratose bzw. der Knemidokoptesräude.

Wellensittiche vermehren sich in geeigneten Volieren in großer Zahl. Durch die problemlose Züchtbarkeit und die hohe Reproduktionsrate konnten sowohl der Nachweis maternaler Antikörper im Dotter sowie im Serum der geschlüpften Küken als auch die nach der Belastungsinfektion ggf. erkennbare Schutzwirkung der maternalen Antikörper untersucht werden.

Bis zum Beginn der Immunisierungen stand allen Wellensittichen eine Eingewöhnungszeit von einem Monat in einer geräumigen Voliere zur Verfügung. Während der gesamten Versuchszeit wurde handelsübliches Körnerfutter und Leitungswasser als Tränke und zum gelegentlichen Baden angeboten.

Tabelle 5: Gesamtzahl, Anzahl pro Geschlecht und Gefiederfarbe der adulten Wellensittiche

Gesamtzahl	Anzahl pro Geschlecht	Gefiederfarbe
4	Weiblich 4	Lutino
2	Weiblich 2	Dunkelblau
2	Weiblich 1 Männlich 1	Hellblau mit Gelbgesicht
8	Weiblich 6 Männlich 2	Hellblau
4	Weiblich 3 Männlich 1	Hellgrüne
2	Männlich 2	Olivgrüne
3	Weiblich 2 Männlich 1	Grüne Schecken
1	Männlich	Violett
1	Männlich	Blaugescheckt
1	Männlich	Opalin

3.1.2 Embryonierte SPF-Hühnereier für die Herstellung von HEF-Kulturen

Zur Herstellung von HEF-Kulturen wurden befruchtete SPF-Hühnereier von der Firma Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven, bezogen. Es wurden ausschließlich Bruteier mit der Bezeichnung „VALO SPF“ von dieser Firma erworben.

3.1.3 Aviäres Polyomavirus für Belastungsinfektion und VNTs

Verwendet wurde das Polyomavirusisolat BFDV-5, das von ENDERS et al. (1997) aus einem spontan gestorbenen Orangekeöpfchen (*Agapornis pullarius*) isoliert worden war. BFDV-5 wurde sowohl in VNTs als auch als infektiöses Virus für die Belastungsinfektion eingesetzt. Das für alle Untersuchungen verwendete Virus erwies sich als chloroformstabil, seine Vermehrung in HEF-Kulturen wurde durch den Zusatz von 50 µg/ml 5'-Jod-2'-Desoxyuridin (IUDR) zum Zellkulturmedium deutlich gehemmt.

Nach einer unbekanntem Zahl von Passagen auf primären HEF-Kulturen wurde von der letzten Passage der Infektiositätstiter des BFDV-5 nach der Formel von SPEARMAN und KAERBER (MAYR et al., 1974) als Kulturinfektiose Dosis₅₀/ml (KID₅₀/ml) berechnet. Die Aufbewahrung dieses Isolats erfolgte als virushaltige Zellkulturflüssigkeit bei -80 °C in der hiesigen Klinik.

3.1.4 Medien, Lösungen und Reagenzien

- Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), Fa. Merck, Darmstadt
 - 8,0 g/l (0,1370 M) NaCl
 - 0,4 g/l (0,0054 M) KCl
 - 1,15 g/l (0,0072 M) Na₂HPO₄
 - 0,2 g/l (0,0015 M) KH₂PO₄
- Trypsin-Versen, Fa. Biochrom AG, Berlin
- MEM-Earle`s mit 0,85 g/l NaHCO₃, 10 ml / L-Glutamin und ohne bzw. mit 10 % FKS; Fa. Biochrom AG, Berlin

3 Material und Methoden

- Enrofloxacin 2,5 % (Baytril® 2,5 % Injektionslösung), Fa. Bayer AG, Leverkusen; 0,3 ml pro 500 ml Zellkulturmedium
- Fetales Kälberserum (FKS), Mykoplasmen geprüft, Seromed, Fa. Biochrom, Berlin
- DNS Isolation Kit DNeasy Fa. Qiagen, Hilden
- Mastermix für APV-PCR (nach einem Protokoll von KATOH et al. (2008):
2,5 µl Puffer, 0,75 µl MgCl₂, 1 µl dnTP's, 0,5 µl Primer APV nde, 0,5 µl Primer APV sta, 1,5 µl Sybr Green, 1,5 µl Polymerase, 17,5 µl H₂O, 2 µl zu untersuchende Probe
- Primer: APV-stu: 5'-ctg ttt aag gcc ttc caa gat g-3'
APV-nde: 5'-caa gca tat gtc cct tta tcc c-3'. Fa. biomers.net, Ulm

3.1.5 Geräte und Verbrauchsmaterialien

- Zentrifuge: Hettich Rotanta/T, Fa. Hettich, Tuttlingen
- Stock-Zentrifuge: Fa. Wilhelm Stock Maschinenbau KG, Marburg
- Zentrifuge: Universal 32 R; Fa. Hettich, Marburg
- Zentrifuge: Mikro 12 – 24, Fa. Hettich, Marburg
- Hämatokritzentrifuge: Hettich Haemotokrit 210, Fa. Hettich, Marburg
- Vollautomatischer Brutapparat: Fa. Ing. W. Schumacher, Ladenbach
- Feinwaage: tomopol p80, Tomopol GmbH, Troisdorf
- Mikroskop: Modell 4325201, Fa. Carl Zeiss, Oberkochen
- Auflichtmikroskop: Diavert, Fa. Leitz, Wetzlar
- Heizblock Thermoblock: FALC, Fa. Renner, Dannstadt
- Inkubator: Cellstar, Fa. Nunc, Wiesbaden
- Kühlschranks: Profi Line, Fa. Liebherr, Biberach a. d. Riss
- Gefrierschranks (-20 °C): Fa. Liebherr, Biberach a. d. Riss
- Gefrierschranks (-80 °C): Ultra Low, Fa. Nunc, Wiesbaden
- Werkbank: Safe flow 1,2, Fa. Nunc, Wiesbaden
- Werkbank: Cleanspot PCR/ UV Work Station, Fa. Laboratory Products, USA

3 Material und Methoden

- Rüttler: IKA Vibrax VXR, Fa. Janke & Kunkel, Staufen
- Eppendorf-Pipetten: Fa. Eppendorf, Hamburg
- Pipettenspitzen mit Filtertip: Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
- Mikrotiterplatten: Microtest™ Tissue Culture Plate 96 Well, Becton Dickinson Labware Europe, Meylan Cedex, Frankreich
- Multikanalpipette: Multipipette 8, Fa. Matrix Techn., Hudson, USA
- Pipettierhilfe: Fa. Matrix Techn., Hudson, USA
- Wasserbad: Köttermann Labortechnik, Uelze
- DNS Isolation: Qia Cube und Dneasy Blood and Tissue Kit, Fa. Qiagen, Hilden
- Cycler: Rotor Gene Q, Fa. Qiagen, Hilden
- Software Rotor Gene Q, Series Software 1,7, Fa. Qiagen, Hilden
- Laptop: Fa. Fujitsu Siemens
- Quecksilberdampflampe: Fa. Karl Bohm Apparatebau, Hamburg
- Otoskop: Heine Standard N, Fa. Heine, Deutschland
- Hämatokrit-Kapillaren 75 µl: Hirschmann Laborgeräte, Deutschland
- Hämatokrit-Kapillarenwachs, Fa. Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim, Rhön
- Kodan® Tinktur Forte, Mayer GmbH, Norderstedt
- Kryogefäße: Cryo.s mit Schraubverschluss, steril, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
- Falcon® Röhrchen: Konische Röhrchen 15 ml und 100 ml, Becton Dickinson Labware Europe, Meylan Cedex, Frankreich
- Eppendorfgefäße 1, 5 ml: Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
- Sterile Wattestäbchen: Applimed SA, Châtel-Saint-Denis, Schweiz
- Schutzanzug: Protective Clothing Category III, AGKI GbR, Buchholz
- Einmalhandschuhe: Nobaglov-Latex, NOBA Verbandmittel Danz GmbH, Wetter
- Einmalspritze 0,5 ml: Omnican® 50, B.Braun Melsungen AG
- Einmalspritze 1 ml: Dispomed, Dipomed Witt oHG, Geinhausen
- Einmalspritzen 2 ml und 5 ml: BD Discardit II, Becton

Dickinson GmbH, Deutschland

- Einmalkanülen 27 G und 23 G: BD Microlane™3, Becton Dickinson GmbH, Deutschland

3.2 Methoden

Sämtliche Untersuchungen an den Wellensittichen und an den gewonnenen Blut- und Gewebeproben wurden in den Einrichtungen der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische der Justus-Liebig-Universität Gießen in der Zeit von Juli 2009 bis Juli 2010 durchgeführt.

3.2.1 Haltungsbedingungen der erworbenen Wellensittiche

Alle erworbenen Wellensittiche (18 Hennen und 10 Hähne) wurden nach dem Kauf in einer Voliere mit den Maßen 1,9 m x 1,9 m x 2,55 m (L x B x H) untergebracht. Somit standen je Wellensittich eine frei verfügbare Grundfläche von 1.289 cm² zur Verfügung. Tageslicht fiel durch 2 mit einem feinmaschigen Drahtgeflecht (10 mm x 10 mm) versehene, an einer Raumseite befindliche Fenster ein, die eine Größe von 172 cm x 72 cm und 82 cm x 70 cm hatten. In den Wintermonaten wurde die Voliere zusätzlich durch an der Decke montierte Neonlampen beleuchtet. Die Beleuchtungsdauer betrug hierbei 10 Stunden pro Tag. Durch die Ausstattung mit einem elektrisch betriebenen Heizkörper betrug die Temperatur in der Voliere im Winter 20 bis 22 °C. In den Sommermonaten wurde ohne Heizung ein Temperaturbereich von 20 bis 25 °C erreicht.

Es wurde handelsübliches Wellensittichfutter der Firma Versele Laga, Belgien, verfüttert. Die Tiere erhielten hiervon außerhalb der Brutzeit 4 Gramm pro Tier und Tag. Während der Brutzeit wurde *ad libitum* gefüttert und zusätzlich Eifutter der Firma Versele Laga gereicht. Ferner wurden mehrmals wöchentlich Salat, Gemüse und Obst gegeben. Trink- und Badewasser wurde in Trinkschalen *ad libitum* angeboten und täglich nach mechanischer Reinigung der Gefäße mit Leitungswasser erneuert.

3.2.2 Untersuchungen an den erworbenen adulten Wellensittichen

Den 28 adulten Wellensittichen wurden schon im Herkunftsbetrieb Blut- und Kloakentupferproben entnommen. Diese wurden im Labor serologisch bzw. mittels PCR auf PBFDV und APV mit negativem Ergebnis getestet. Außerdem wurden die 28 Tiere kulturell auf pathogene Bakterien (inkl. *Chlamydia psittaci*), Hefen, Schimmelpilze untersucht. In Direktausstrichen von Kropf- und Darminhalt wurden mikroskopisch niemals *Macrorhabdus ornithogaster* und makroskopisch keine Ekto- und Endoparasiten nachgewiesen.

3.2.3 Eigene Zucht mit den erworbenen 28 Wellensittichen

Zur Zucht wurden die 28 erworbenen Wellensittiche im Schwarm wie beschrieben in der oben erwähnten Voliere gehalten. Unmittelbar nach der letzten Blutentnahme wurde ad libitum gefüttert und Eifutter angeboten. Eine Woche nach der Futterumstellung wurden selbstgefertigte Nistkästen mit den Maßen 20 cm x 15 cm x 15 cm (L x B x H) an den Seitengittern der Voliere angebracht. Innerhalb von 2 Wochen hatten die Paare die Nistkästen bezogen und die Hennen die ersten Eier gelegt. Weitere Eiablagen erfolgten im Abstand von jeweils 2 Tagen, bis die Gelege mit maximal 8 Eiern vollständig waren. Die Küken schlüpften im Abstand von 2 Tagen und wurden von den Eltern gefüttert und gehudert (beim Hudern bergen und schützen die Elternvögel ihren Nachwuchs unter den Flügeln und wärmen die Küken mit ihrem Bauchgefieder). Mit 5 Wochen waren die Jungtiere flügge, verließen selbständig die Nistkästen und wurden noch weitere 7 Tage von den Elterntieren gefüttert und beschützt. Danach waren sie selbständig und konnten von den Elternvögeln getrennt werden. Insgesamt sind für den weiteren Verlauf des Impfversuches 37 Küken aus 80 Eiern geschlüpft und von den Eltern aufgezogen worden. Die 43 unbefruchteten Eier wurden für den Nachweis maternaler Antikörper im Eidotter verwendet. Für die später erfolgte Belastungsinfektion wurden weitere 25 Nestlinge gezüchtet.

Weitere Angaben zur Wellensittichzucht sind in Kapitel 2.1 und in der Fachliteratur (VINS, 1993 und 2008) zu finden.



Abbildung 1: Blick in einen Nistkasten mit jungen Wellensittichnestlingen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Die Nestlinge schlüpften in etwa zweitägigen Abständen, was sich deutlich in Größe und Gefiederentwicklung zeigt

3.2.4 Genehmigung des Tierversuchs und Bildung der Wellensittichgruppen für die Versuche

Die Impfversuche wurden vom Regierungspräsidium Gießen mit Schreiben vom 21.07.2009, Geschäftszeichen V 54 – 19 c 20 – 15 (1) GI 18/9 Nr. 27/2009 auf Grund meines Antrags genehmigt. Mein Zusatzantrag für die Genehmigung zur Durchführung der

Belastungsinfektion wurde mit Schreiben des Regierungspräsidiums Gießen vom 15.10.2009 ebenfalls zügig genehmigt.

Die Impfstudie umfasste 16 Wellensittichhennen, die bei Versuchsbeginn etwa 6 Monate alt waren. Diese wurden in 2 Gruppen zu je 8 Tieren aufgeteilt, wobei die Wellensittiche der 1. Gruppe mit 30 µg VLP-Antigen (siehe unten) subkutan immunisiert wurden. Die Tiere der 2. Gruppe wurden mit 120 µg VLP-Antigen subkutan immunisiert. 10 Wellensittichhähne und 2 Wellensittichhennen, die die gesamte Zeit über zusammen mit den geimpften Hennen gehalten wurden, dienten als Kontrollgruppe und wurden nicht immunisiert. Allen Tieren der Kontrollgruppe wurden in regelmäßigen Abständen Blut- und Kloakentupferproben entnommen, die serologisch bzw. mittels PCR auf PBFDV und APV ebenfalls mit negativen Ergebnissen getestet wurden. Zur Belastungsinfektion wurden 2 x 8 mit 30 µg bzw. 120 µg geimpfte weibliche, adulte Wellensittiche, als Kontrollgruppe n = 7 adulte Wellensittiche mit 0,2 ml des Polyomavirusisolats BFDV-5 intramuskulär infiziert. 25 Küken wurden mit je 0,05 ml desselben Virusisolats infiziert.

3.2.5 Herstellung des VLP-Impfantigens

Nach rekombinanter Expression des immunogenen Hauptstrukturproteins VP1 des APV, das aus einem *Agapornis pullarius* isoliert worden war (BFDV-5, bezeichnet als PV-3-LP; ENDERS et al., 1997), entstanden in einem Hefeexpressionssystem VLP, die in Größe und äußerer Struktur dem nativen voll virulenten aviären Polyomavirus gleichen. Diese VLP bestehen aus dem Hauptstrukturprotein VP1 und enthalten keine DNS, weshalb sie nicht infektiös sind (ZIELONKA, 2010). Die Arbeiten zur Herstellung und Prüfung der VLP erfolgten durch Frau Dr. A. Zielonka im Institut für Virologie der Universität Leipzig. Aufgrund der langjährigen Zusammenarbeit von Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. E. F. Kaleta (Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische, Klinikum Veterinärmedizin, Universität Gießen) und Herrn Prof. Dr. H. Müller (Institut für Virologie, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig) wurden mir für die

Durchführung der eigenen Versuche diese VLP dankenswerterweise zur Verfügung gestellt. Den VLP wurde keinerlei Adjuvanz und auch keine antibakteriell oder antimykotisch wirkenden Stoffe zugesetzt.

3.2.6 Zellkulturen

3.2.6.1 Herstellung der primären HEF-Kulturen

Die eingetroffenen SPF-Hühnerbruteier wurden für einen Tag bei Zimmertemperatur mit dem stumpfen Eipol nach obenweisend gelagert und danach in dieser Position in einen Brutschrank mit einer Gesamtkapazität von 700 Bruteiplätzen eingelegt. Innerhalb der folgenden 10 Tage wurden die Eier in zweistündigen Intervallen jeweils um 60 Grad automatisch gewendet. Die Bruttemperatur betrug 37,8 °C. Die Feuchtigkeit wurde mittels verdunstenden Wassers etwas erhöht und betrug 60 bis 70 % relative Luftfeuchte.

Am 10. Bruttag wurden alle SPF-Eier dem Brutschrank entnommen und die unbefruchteten Eier aussortiert. Die Befruchtungsrate lag stets über 90 % bezogen auf alle eingelegten Eier. Die befruchteten Eier mit lebenden Embryonen wurden für die Herstellung von primären HEF-Kulturen verwendet. Nach Eintauchen in Isopropanol und Abflammen der Eier am stumpfen Pol erfolgten die Eröffnung der Eier, die sterile Entnahme der Embryonen mit Exenteration der inneren Organe sowie die Abtrennung des Kopfes und der distalen Gliedmaßen.

In einer mit PBS gefüllten Petrischale (Durchmesser 10 cm) wurden die Rümpfe gesammelt und anschließend nochmals gut mit PBS gespült, um Blutreste zu entfernen. Dann wurden sie in eine weitere Petrischale überführt und darin mit einer sterilen Schere zu einer homogenen Masse zerkleinert. Dieses Embryogewebe wurde anschließend in einen Erlenmeyerkolben mit PBS überführt. Der Kolbeninhalt wurde durch leichtes Schütteln vermischt und 5 Minuten schräg stehen gelassen. Der Überstand wurde verworfen und zu der danach gewonnenen zellhaltigen Masse Trypsinlösung gegeben. Diese Mischung wurde für 5 bis 10 Minuten in

ein Wasserbad mit 37 °C gestellt und ab und zu durch Aufschütteln vermischt. Dann wurde der Kolben erneut für 5 Minuten schräg gestellt und danach der Überstand in ein Zentrifugenglas mit 1 ml FKS gegeben. Die Trypsinierung wurde noch ein- bis zweimal wiederholt. Alle in FKS gesammelten Überstände wurden durch eine doppelagige sterile Gaze gegeben. Dann wurde mit 1.000 x g für 10 Sekunden zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das zellhaltige Sediment wurde in 10 ml MEM mit 15 % FKS suspendiert und die Zelldichte auf ca. 10⁶ Zellen je ml eingestellt. Anschließend wurde die Zellsuspension je nach Verwendungszweck in Zellkulturflaschen bzw. Mikroliterplatten abgefüllt.

3.2.6.2 Subkultivieren der primären HEF-Kulturen

Zur Herstellung von Subkulturen wurde zunächst das Erhaltungsmedium der zu einem konfluenten Zellrasen ausgewachsenen Ausgangskultur entfernt und der Zellrasen in der Flasche mit 2 ml Trypsin-Versen-Lösung (TV-Lösung) gespült. Nach dem Abgießen der TV-Lösung wurde die Kultur wieder mit 2 ml TV-Lösung dünn überschichtet und für ca. 15 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die vom Flaschenboden abgelösten Zellen wurden in MEM mit 10 % FKS durch intensives Pipettieren resuspendiert. Anschließend wurde diese Zellsuspension in Zellkulturgefäße bzw. auf die Mikrotiterplatten gebracht.

3.2.7 Herstellung der Virusstammsuspension aus BFDV-5

Zunächst wurde eine 100 ml-Zellkulturflasche mit 0,2 ml der Stammvirussuspension BFDV-5, mit einem noch unbekanntem Infektiositätstiter, inokuliert und 6 Tage lang im CO₂-Brutschrank inkubiert, bis nahezu alle ursprünglich dicht und spindelförmig ausgewachsenen Zellen einen für das APV typisch erscheinenden zytopathischen Effekt (ZPE) zeigten. Der unmittelbar nach der Virusinokulation noch dicht geschlossene Zellrasen geht nach mehreren Tagen Inkubation in einen unterbrochenen Zellrasen über, in dem große, rund-ovale Zellkerne mit großem Nukleolus und randständigem Chromatin zu erkennen sind.

Um Zellmembranen und Zellkerne aufzubrechen, wurden die Kulturen mit deutlich erkennbarem ZPE im Gefrierschrank für 20 Minuten bei -18 °C eingefroren und anschließend aufgetaut. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Danach erfolgte eine Zentrifugation (10 Minuten bei 1.800 x g). Der virushaltige Überstand wurde zusätzlich mit einem Ultraschallgerät zum weiteren Aufschluss der HEF behandelt. Das aus Zellfragmenten bestehende Sediment wurde verworfen. Der Titer der erhaltenen Virussuspension wurde anhand von Titrationsen in 96-Well-Platten mit HEF bestimmt. Die erhaltene Virussuspension wurde in Kryogefäße aliquotiert und bei -80 °C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

3.2.8 Titration der Virussuspension des Stammes BFDV-5

Alle Verdünnungen der Virusstammsuspension BFDV-5 erfolgten in Zehnerlogarithmusschritten in Reagenzgläsern im Verhältnis von 0,2 ml Virus zu 1,8 ml MEM ohne FKS. Je 8 Kavitäten wurden 25 µl der erstellten Virusverdünnungen in Zellkulturplatten mit 96 Kavitäten pipettiert und anschließend 50 µl Zellsuspension hinzugefügt. Alle inokulierten Platten wurden für 6 Tage bei 37 °C in einer feuchtigkeitsgesättigten Atmosphäre bebrütet und die Ergebnisse mikroskopisch abgelesen. Die Berechnung der Infektiositätstiter erfolgte nach der von Spearman und Kärber publizierten Methodik (MAYR et al., 1974).

3.2.9 Herstellung der VLP-Vakzine aus APV-Isolat BFDV-5

Sämtliche Arbeiten zur Herstellung, Identitätsprüfung und Quantifizierung der VLP wurden in einer früheren Arbeit von ZIELONKA et al. (2005) beschrieben. Als Ausgangsvirus diente dieser Arbeitsgruppe das APV-Isolat PV-3-LP des BFDV-5 (ZIELONKA, 2010). Ursprünglich war dieses Isolat 1995 aus einem gestorbenen *Agapornis pullarius* isoliert worden (ENDERS et al., 1997).

3.2.10 Vakzination der adulten weiblichen Wellensittiche

Für die Vakzination der adulten Wellensittiche wurden VLP aus dem APV-Isolat BFDV-5 mit einer Konzentration von 1,5 µg/ml in 2 Antigendosierungen, 30 µg und 120 µg, gewählt. In vorhergehenden Versuchen der Arbeitsgruppe in Leipzig hatte sich zur Immunisierung von Kaninchen die VLP-Vakzine in einer Antigendosis je Kaninchen von 100 µg VLP in 0,5 ml PBS ohne Adjuvanz hinsichtlich Antikörperstimulation als wirksam erwiesen (ZIELONKA, 2010). Für die beiden eigenen Versuche wurden eine deutlich niedrigere und eine etwas höhere Dosis verwendet, die der Körpermasse der Wellensittiche angepasst sein sollte.

Zur Vakzination wurden 8 Wellensittichhennen eine Antigendosis von 30 µg in 200 ml PBS ohne Adjuvanz appliziert. Hierzu wurden 20 µl VLP mit 180 µl PBS ad 0,2 ml in einem Eppendorfgefäß vermischt und in Insulinspritzen aufgezogen, für die Vakzine mit einer Antigendosis von 120 µg wurden 80 µl VLP mit 120 µl PBS ad 0,2 ml vermischt. Auch mit der 120 µg VLP enthaltenden Vakzine wurden 8 Wellensittichhennen immunisiert.

Die beiden Vakzinen wurden bis zur Anwendung bei -20 °C gelagert, auf Eis aufgetaut und bis zur Verimpfung auf Eis gekühlt. Die gekühlte Vakzine wurde innerhalb einer Stunde nach Herstellung auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend sofort verimpft. Je 8 Wellensittichhennen wurden mit einer Antigendosis von 30 µg je Tier und weitere 8 mit einer Antigendosis von 120 µg je Tier immunisiert. Jede Henne wurde noch zweimal (nach 21 Tagen und nach 70 Tagen) mit der gleichen Antigendosis wie bei der 1. Immunisierung geimpft.

Die verbliebenen 10 männlichen und 2 weiblichen Wellensittiche lebten mit den 16 geimpften Hennen in einer Voliere, wobei die Hähne einerseits zur Befruchtung der Hennen dienten und andererseits als Kontaktkontrollen zum Aufspüren einer eventuellen APV-Infektion fungieren sollten.

Vor der Injektion der Impfstoffe wurden die Tiere mit Kodan®-Spray an der Injektionsstelle eingesprüht und das Gefieder an dieser Stelle gescheitelt.

Die 1. Immunisierung erfolgte subkutan links kaudo-lateral des Sternums mit einem Volumen von 0,2 ml und einem VLP-Gehalt von 30 bzw. 120 µg pro Tier. Die 2. Immunisierung erfolgte 21 Tage nach der 1. subkutanen Injektion rechts kaudo-lateral des Sternums mit dem gleichen Volumen. Die 3. Immunisierung erfolgte 70 Tage nach der 1. Immunisierung subkutan kaudal des Sternums ebenfalls mit 0,2 ml je Tier.

3.2.11 Überwachung der Impflinge hinsichtlich Impfreaktionen

Alle vakzinierten 16 weiblichen Wellensittiche und die 12 nicht geimpften Kontaktkontrolltiere wurden an den Tagen 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28 und 35 hinsichtlich ggf. erkennbarer Veränderungen des Allgemeinbefindens, der Stimmäußerungen, der Mauser und der Kotbeschaffenheit kontrolliert; die Injektionsstelle wurde während dieser Kontrollen palpatorisch und adspektorisch auf impfungsbedingte Reaktionen untersucht.

3.2.12 Blutentnahmen bei Wellensittichen und Serumgewinnung

3.2.12.1 Blutprobenentnahmen von allen adulten Wellensittichen

Um die 28 Wellensittiche vor der Unterbringung in der Isoliervoliere serologisch auf APV und PBFDV testen zu können, wurde allen Tieren noch im Herkunftsbestand venöses Blut entnommen. Darüber hinaus wurde den Wellensittichhennen 21 Tage nach der 1. Immunisierung, 14 Tage nach der 2. und 14 Tage nach 3. Immunisierung Blut aus der Halsvene entnommen, das zur Antikörperbestimmung mittels VNT verwendet wurde.

Zur Blutentnahme wurden die Tiere mit der linken Hand fixiert. Dabei wurde der Kopf mit Mittel- und Zeigefinger fixiert. Die rechte Halsseite wurde mit 2 Sprühstößen Kodan®-Spray eingesprüht und das Gefieder gescheitelt. Die Vena jugularis dextra wurde dargestellt und mit dem Daumen angestaut. Nun wurde eine mit einer 27 G Kanüle versehene 1 ml-Spritze genommen und mit der Kanülenspitze die gestaute Vene punktiert. Durch vorsichtiges Aspirieren konnten bis zu 0,4 ml Vollblut pro

adultem Wellensittich gewonnen und in Eppendorfgläser abgefüllt werden. Die Wellensittiche zeigten trotz wiederholter Blutentnahmen keine unerwünschten Reaktionen auf das Einfangen, Festhalten und Blutentnehmen. Auch größere Hämatome wurden an den punktierten Venen niemals festgestellt.

3.2.12.2 Serumgewinnung aus Vollblut adulter Wellensittiche

Nach der Entnahme wurde das Vollblut in den Eppendorfgläsern eine Stunde bei Raumtemperatur aufbewahrt. Danach wurden die Eppendorfgläser bei 3.500 U/min für 5 Minuten zentrifugiert (Universal-Zentrifuge). Der Serumüberstand wurde abpipettiert, in beschriftete Eppendorfgläser gegeben und bei -20 °C eingefroren. Wegen der geringen Serummengen wurde zur Testung im VNT jede Probe 1 : 4 verdünnt.

3.2.12.3 Blutprobenentnahmen bei Wellensittichküken

Zur Bestimmung maternaler, auf die Impfungen der Hennen zurückzuführender Antikörper, in der Blutzirkulation der 37 Wellensittichküken (18 von mit 30 µg geimpften Hennen, 19 von mit 120 µg geimpften Hennen) mittels VNT wurden die noch recht kleinen Wellensittichküken gewogen. An Tag 3, 8 und 13 nach dem Schlupf wurde Vollblut entnommen. Zur Blutentnahme wurden die Küken in der linken Hand gehalten und der Kopf mit Mittel- und Zeigefinger vorsichtig fixiert. Die Vena jugularis dextra wurde aufgesucht und mit dem Daumen angestaut. Danach wurde die Vene mit einer 27 G Kanüle punktiert und die austretenden Blutropfen mit einer Hämatokritkapillare aufgefangen (Abbildung 2, 3 und 4). Hierdurch konnte von den 3 Tage alten Küken bis zu 20 µl Vollblut gewonnen werden. Von den älteren, 8 und 13 Tage alten Küken konnte je 20 µl Vollblut entzogen werden. Die bluthaltigen Kapillaren wurden beidseits mit Kapillarenwachs dicht verschlossen.



Abbildung 2: Darstellung der rechten Vena jugularis zur Blutentnahme aus einem dreitägigen Wellensittichnestling



Abbildung 3: Wellensittichnestling im Alter von 3 Tagen. Aus der Vena jugularis dextra nach Punktion ausgetretenes Blut vor dem Auffangen mit einer Hämatokritkapillare



Abbildung 4: Wellensittichnestling im Alter von 3 Tagen: Auffangen des aus der rechten Vena jugularis ausgetretenen Vollbluts mittels Hämatokritkapillare

3.2.12.4 Serumgewinnung aus Vollblut von Wellensittichküken

Es erfolgten 3 Blutentnahmen je Küken am 3., 8. und 13. Lebenstag. Das venöse Vollblut wurde in den Hämatokritkapillaren aufgefangen und unmittelbar nach der Entnahme in einer Hämatokritzentrifuge bei 3.500 U/min für 2 Minuten zentrifugiert. Der erhaltene Blutserumüberstand wurde in eine frische Hämatokritkapillare pipettiert und mit Kapillarenknet verschlossen. Diese wurde in ein beschriftetes größeres Glasröhrchen gelegt und bei -20 °C eingefroren. Wegen der sehr geringen Blutserummengen musste zur Testung im VNT jede Probe 1 : 4 vorverdünnt werden.

3.2.13 Entnahme von Dotter aus unbefruchteten Eiern

Nach der 3. Immunisierung der weiblichen Wellensittiche wurden sämtliche Eier der Eltern bebrütet. 3 Tage nach Beginn der Bebrütung wurden die ca. 1 gr schweren Eier mit einer Otokoplampe geschiert (Abbildung 5 und 6). Bei befruchteten Eiern kann man zu diesem Zeitpunkt bereits die Chorioallantoismembran mit Blutgefäßen an Hand ihrer Vaskularisation unter der Eischale erkennen. Von der Impfgruppe mit einer Antigendosis von 30 µg wurden 26 Eidotterproben von insgesamt 7 Hennen untersucht. Aus der Impfgruppe mit 120 µg Impfstoff wurden 17 Eidotter von 8 Hennen untersucht. Die befruchteten Eier (n = 37, 18 aus der 30 µg-Gruppe, 19 aus der 120 µg-Gruppe) wurden den Hennen zur weiteren Bebrütung belassen. Nach dem Schlupf dienten die Nestlinge für den Nachweis maternaler Antikörper mittels VNT.

Unbefruchtete Eier wurden aus dem Nistkasten entfernt, deren Eischale wurde am stumpfen Pol vorsichtig aufgebrochen und möglichst viel Eidotter mit einer 1 ml-Spritze abgesaugt. Der Eidotter wurde in ein beschriftetes Eppendorfgesäß gegeben und bei -20 °C bis zur Untersuchung im VNT eingefroren.



Abbildung 5: Schieren eines Eies vom Wellensittich 10 Tage nach Beginn der Bebrütung zur Feststellung der Befruchtung. Der sich entwickelnde Embryo verhindert bereits das Durchleuchten des Eies



Abbildung 6: Ei eines Wellensittichs beim Durchleuchten mit einem Otoskop 3 Tage nach der Eiablage. Es ist keine beginnende Vaskularisierung unter der Eischale sichtbar

3.2.13.1 Aufbereitung der Dotterproben für die VNTs

Die Dotterproben wurden aufgetaut und in einem Verhältnis von 1 : 4 mit PBS verdünnt. Anschließend wurde der mit PBS verdünnte Dotter auf einem Rüttler für 10 Sekunden vermischt. Von diesem Gemisch wurden 0,25 µl für die VNTs verwendet. Der Rest wurde wieder bei -20 °C eingefroren.

3.2.14 Belastungsinfektionen

6 Monate nach der Impfstudie wurde wieder wie in 3.2.3 beschrieben mit der Zucht begonnen. Als erneut Küken (30 µg: n = 7 Küken; 120 µg: n = 9 Küken; nicht geimpft: n = 9) vorhanden waren, wurden alle Tiere wie im Folgenden geschildert mit BFDV-5 infiziert.

3.2.14.1 Belastungsinfektion der geimpften Wellensittichhennen

Die Belastungsinfektion erfolgte mit BFDV-5. Das Testvirus war virushaltiger Zellkultur-Überstand mit einem Infektiositätstiter von 4.5 KID₅₀ je ml, von dem jeweils 0,2 ml je Tier intramuskulär in den Brustmuskel injiziert wurden. Somit beträgt die tatsächlich je adultem Wellensittich verabreichte Virusdosis $\log_{10} = 3.8 \text{ KID}_{50}$.

Vor der Infektion (Tag 0) und an den Tagen 3, 5, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 und 70 nach der Infektion wurden den adulten Vögeln Kloakentupferproben entnommen, um die kloakale Virusausscheidung vor und nach der Infektion mittels PCR bestimmen zu können.

3.2.14.2 Belastungsinfektion der Küken von geimpften Hennen

Die Infektion mit jeweils 0,05 ml virushaltigem Zellkulturüberstand (Infektiositätstiter des Virus BFDV-5 von 4,5 KID₅₀ je ml) erfolgte bei den Küken intramuskulär in den linken Oberschenkelmuskel. Somit beträgt die tatsächlich jedem Wellensittichküken verabreichte Virusdosis ein Zwanzigstel eines Milliliters der Virusstamm suspension, d.h. $\log_{10} = 4.5$ minus \log_{10} von 20 entspricht 1,3010. Somit erhielt jeder Nestling eine Virusdosis von $\log_{10} = 4.5$ minus 1,3010 = 3.2 KID₅₀.

Vor der Infektion (Tag 0) wurden von allen Küken geimpfter Hennen (30 µg: n = 7 Küken; 120 µg: n = 9 Küken) Kloakentupferproben zum Nachweis einer Virusausscheidung entnommen und an den Tagen 3, 7 und 49 nach der Infektion. Außerdem wurden alle Wellensittichküken an den Tagen 0, 3, 5, 7, 14, 21, 28, 35, 42 und 49 gewogen, um deren Gewichtsverlauf zu überprüfen und zu beurteilen.

3.2.14.3 Positivkontrollen – nicht geimpfte Wellensittiche und Küken von nicht geimpften Hennen

7 ungeimpfte, adulte Wellensittiche, die zusammen mit den geimpften Tieren in einer Voliere lebten, wurden wie die geimpften Tiere infiziert. Kloakentupferentnahmen erfolgten wie unter 3.2.14.1 beschrieben. 9 Wellensittichküken von den ungeimpften Hennen wurden, wie in 3.2.14.2 beschrieben, ebenfalls in gleicher Weise infiziert, untersucht und beprobt.

3.2.14.4 Negativkontrollen – separat gehaltene, nicht geimpfte männliche Wellensittiche

Um nachzuweisen, dass kein Polyomavirus in den eigenen Bestand von außen eingetragen worden war, wurden 5 adulte Wellensittiche räumlich getrennt von allen anderen Tieren gehalten und unmittelbar vor und nach der Belastungsinfektion der anderen Tiere wie in 3.2.14.1 beschrieben beprobt.

3.2.14.5 Überwachung der infizierten Wellensittiche

Alle infizierten Wellensittiche wurden nach der Belastungsinfektion mehrmals täglich kontrolliert, um bei etwaigen perakuten Krankheitsfällen schnell eingreifen zu können. Die Haltungs- und Ernährungsbedingungen wurden nicht verändert und entsprachen den unter 3.2.1 beschriebenen.

3.2.15 Titration des Testvirus und VNT

Parallel zu jedem VNT wurden Virustitrationsen durchgeführt, um die Kultur-infektiöse Dosis₅₀ (KID₅₀) des BFDV-5-Isolats zu bestimmen und auf ca. 100 KID₅₀ in einem Volumen von 25 µl einzustellen. Hierzu wurden von 0,2 ml der aufgetauten Stammvirussuspension Verdünnungen in Zehnerlogarithmusschritten (von 10⁻¹ bis 10⁻⁸) in jeweils 1,8 ml MEM-Medium ohne Serumzusatz hergestellt und diese Verdünnungen auf je 10 Kavitäten je Virusverdünnung in Mikrotiterplatten verimpft. Pro Platte mit 96 Kavitäten benötigt man ca. 2,5 ml des auf ca. 100 KID₅₀ je 25 Mikroliter eingestellten Antigens.

3 Material und Methoden

Nach der Herstellung der Virusverdünnungsreihe wurden zur Bestimmung des Virustiters in jede Kavität einer 96er-Platte 25 µl MEM ohne FKS vorgelegt. In die komplette 1. senkrechte Reihe wurden als Zellkontrolle nochmals 25 µl MEM hinzugegeben. Hiernach wurde in alle Kavitäten der 2. senkrechten Reihe 25 µl der auf 100 KID₅₀ eingestellten Virussuspension gegeben. Mit allen weiteren Virusverdünnungen wurden ebenfalls 10 Kavitäten je Verdünnung inokuliert. Anschließend wurden in jede Kavität 50 µl frisch trypsinierte HEF (ca. eine Million Zellen je ml) aus primären HEF-Kulturen pipettiert. Die Platten wurden nun im Inkubator bei 37 °C und mit 5,0 % CO₂ bebrütet und nach 5 Tagen mikroskopisch bei 100facher Vergrößerung abgelesen. Die Berechnung der KID₅₀ erfolgte nach der Methodik von Spearman und Kärber (MAYR et al., 1974).

Die Ausführung des VNT erfolgte in der Alpha-Methode, d.h., die Virusmenge blieb konstant und die Seren wurden in log₂-Schritten verdünnt. 25 µl MEM ohne FKS wurden in jede Kavität einer zuvor beschrifteten 96-Wellplatte gegeben. In die komplette 1. senkrechte Reihe wurden als Zellkontrolle nochmals 25 µl MEM vorgelegt. In die 2. Reihe der Kavitäten wurden 25 µl des eingestellten Virusmaterials als Viruskontrolle pipettiert. In die 3. Kavität wurden 25 µl SPF-Hühnerserum (aus der klinikeigenen Serumkollektion) als Negativkontrolle gegeben und in die 4. 25 µl Kaninchenserum mit bekanntem Titer APV-neutralisierender Antikörper (ZIELONKA, 2000).

In die nachfolgenden oberen Kavitäten wurden jeweils 25 µl des zu testenden Serums in einer 1: 4 Verdünnung vorgelegt. Hiernach wurden die Seren mit einer Pipettierhilfe von oben nach unten in log₂-Schritten verdünnt. Danach wurden in alle Kavitäten mit Ausnahme der Zell- und Viruskontrollen 25 µl des auf 100 KID₅₀ je 25 µl eingestellten Virusmaterials hinzugefügt und die Platten für 60 Minuten zur Inkubation bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach Ablauf dieser Zeit wurden je Kavität 50 µl subkultivierte HEF (ca. eine Million Zellen je ml) hinzugegeben. Die Platten wurden im Inkubator bei 37 °C und 5,0 % CO₂ bebrütet und nach 5 Tagen mit Hilfe eines umgekehrten Mikroskops bei

100facher Vergrößerung abgelesen. Bei der Bestimmung des Antikörpertiters eines Serums bzw. einer Dotterprobe wurde die bereits erfolgte Vorverdünnung von 1 : 4 berücksichtigt, indem zu dem von den Platten abgelesenen \log_2 -Titer der \log_2 -Wert der erfolgten Vorverdünnung von 1 : 4 ($\log_2 = 2$) addiert wurde.

Eine verifizierte untere Spezifitätsgrenze der VNT-Titer mit aviärem Polyomavirus ist in der Literatur nicht dokumentiert. Mit Bezug zum Antikörpertiter des gleichfalls untersuchten SPF-Hühnerserums, das stets Werte unter $\log_2 < 2$ erbrachte, wurde die Spezifitätsgrenze der Titer der Serum- und Dotterproben bei dem Wert $\log_2 \geq 2$ festgelegt.

3.2.16 Aufbereitung der Organe zur Virusreisolierung

Am Ende des Versuchs wurden alle adulten Wellensittiche und alle Nestlinge euthanasiert und von allen Tieren Organproben entnommen. Dies geschah nach der letztmaligen Blut- und Tupferprobenentnahme, bei den adulten Tieren am Tag 70 und bei den Küken 49 Tage nach der Infektion mit Virus bzw. bereits früher nach deren Tod.

Entnommen wurden Haut, Federn, Muskulatur, Leber, Bursa Fabricii, Herz, Caecum, Nieren, Milz und Gehirn. Bei der Entnahme der Organe wurde adspektorisch auf pathologisch-anatomische Auffälligkeiten geachtet. Auffällige Organe wurden zusätzlich noch pathologisch-histologisch untersucht.

Für die Inokulation der Zellkulturen wurden die Proben von jedem Organ einzeln aufbereitet, wie im Folgenden beschrieben. Für die PCR zum Nachweis von Teilen des APV-Genoms wurden alle Organe von einem Wellensittich gepoolt.

Zum Virusnachweis per Zellkultur wurde von jedem Organ ein bis zu 3 mm x 3 mm x 3 mm großes Stück entnommen und mit einer zuvor in EtOH getauchten und über einer Bunsenbrennerflamme abgeflamnten Schere in feinste Stücke zerkleinert (homogenisiert). Das Homogenisat von jeder Organprobe wurde in ein verschließbares Reagenzglas mit 2 ml MEM gegeben. Hiernach wurden alle Proben dreimal für je 2 Sekunden

geschallt, um die Zellmembranen zu zerstören und um ggf. vorhandenes Virus frei zu setzen. Hiernach wurde jede Probe für 5 Minuten bei 3.000 Umdrehungen zentrifugiert. Danach wurden sie bei -20 °C eingefroren.

Nach dem Auftauen der aufbereiteten Organproben wurde von jedem Homogenisat 0,1 ml des Überstandes in je ein kleines Zellkulturschälchen (Durchmesser 35 mm) mit primären HEF gegeben. Die inokulierten Zellkulturen und ein nicht inokuliertes Kontrollschälchen wurden im Brutschrank bei 37 °C in 5, %iger CO₂-Atmosphäre bebrütet. Täglich erfolgten eine mikroskopische Untersuchung des Zellrasens in den Schälchen und eine Beurteilung im Vergleich zur Zellkontrolle. Geachtet wurde auf Veränderungen am Zellrasen und in den Zellen selbst (vgl. 3.2.6) sowie auf eine etwaige Verkeimung mit Bakterien oder Pilzen. Nach 7 Tagen wurde das bisherige Zellkulturmedium abgegossen und frisches Medium mit 10 % FKS und Baytril 2,5 % zugegeben.

Wurde ein polyomavirusähnlicher zytopathischer Effekt erkannt, wurden 0,1 ml des Zellkulturmediums dieser verdächtigen Kultur in ein frisches Schälchen mit HEF passagiert. Nach erneutem Auftreten eines identischen zytopathischen Effektes in diesen Zellkulturen konnte man von einem polyomavirusbedingten ZPE sprechen.

3.2.17 Real-Time PCR

3.2.17.1 Einstellung der Spezifitätsgrenze

Das Polyomavirusisolat BFDV-5 PV-3-LP aus einem *Agapornis pullarius* (ENDERS et al., 1997) wurde in 10er Stufen von 10⁰ bis 10⁻⁸ verdünnt wie in 3.2.8 beschrieben. Mit der Methodik von SPEARMAN und KÄRBER (MAYR et al., 1974) wurden 4,5 KID₅₀/ml errechnet. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 50 µl in je ein Eppendorfgefäß pipettiert. Hinzu kam jeweils eine Spitze eines sterilen Wattestäbchens. Nach dem Einfrieren und Auftauen konnte die Virus-DNS aus dem Wattestäbchen extrahiert werden.

3.2.17.2 Isolierung der viralen DNS

Die Wattestäbchen der Proben wurden in je ein Eppendorfgefäß gegeben, welchem zuvor je 100 μ l PBS zugegeben worden war. Nach gutem Durchmischen jeder Probe wurde die DNS mit dem DNeasy Blood and Tissue Kit und dem Qia Cube nach den Vorgaben des Herstellers isoliert. Die erhaltene DNS wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.2.17.3 Real-Time PCR

Zur Anwendung kam ein von KATOH et al. (2008) beschriebenes RT-PCR-Protokoll. Nach der Herstellung des Mastermixes wurden zu 23 μ l Mastermix je 2 μ l isolierte DNS gegeben. Folgendes, aus 3 Segmenten bestehende, APV real-time PCR-Protokoll wurde verwendet:

Segment 1 besteht aus einem Zyklus mit 10 Minuten bei einer Temperatur von $95\text{ }^{\circ}\text{C}$. **Segment 2** besteht aus 40 Zyklen mit je 30 Sekunden bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 Sekunden bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 30 Sekunden bei $72\text{ }^{\circ}\text{C}$. **Segment 3** besteht aus einem Zyklus mit einer Minute bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 Sekunden bei $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ und abschließend 30 Sekunden bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Als Positivkontrolle wurde die auf dem Plasmid pUL 84 (ZIELONKA, 2010) enthaltene DNS des t-Antigens von APV in einer Verdünnung von 1 : 1.000 und als Negativkontrolle Aqua bidestillata eingesetzt.

Der weitere Ablauf der PCR und die Auswertung erfolgten mittels der Bedienungsanleitung des Cyclers und der dazugehörigen Software nach den Angaben des Herstellers.

3.2.18 Histologische Untersuchung veränderter Organe

Die während der Sektionen makroskopisch als auffällig erkannten Organe wurden in gepuffertem 8 %igem Formalin fixiert und im hiesigen Institut für Veterinär-Pathologie dankenswerterweise nach Einbettung und Färbung mit Hämatoxylin-Eosin untersucht und befundet.

Folgende Organe wurden von adulten, infizierten Wellensittichen entnommen und histopathologisch untersucht:

3 Material und Methoden

- 2 Tiere ungeimpft: Milz bzw. Leber, Niere, Milz
- 2 Tiere mit 30 µg geimpft: Leber bzw. Milz
- 3 Tiere mit 120 µg geimpft: Leber bzw. Niere und Milz bzw. Leber und Niere

Nachfolgend sind die von infizierten Küken entnommenen und histopathologisch untersuchten Organe aufgelistet:

- 3 Küken von ungeimpfter Mutterhenne: Milz bzw. Niere bzw. Leber, Niere, Milz
- 3 Küken von mit 30 µg geimpfter Mutterhenne: Milz bzw. Leber bzw. Leber, Niere, Milz

3 Küken von mit 120 µg geimpfter Mutterhenne: Leber bzw. Milz bzw. Milz

3.3 Statistische Analyse

Die in dieser Arbeit angegebenen Graphen wurden mit Hilfe des Programms GraphPad PRISM Version 5.01 (GraphPad Software, Inc., 2236 Avenida de la Playa, La Jolla, CA 92037 USA) erstellt und die Ergebnisse damit statistisch analysiert. Für die Dezimaltrennzeichen der y-Achsenbeschriftungen verwendet das Programm Punkte, anstatt Kommata, was an seinem internationalen Ursprung (USA) liegt.

Zur Ermittlung der durchschnittlichen Höhe der Antikörpertiter wurden nur diejenigen Titer verwendet, die über der Spezifitätsgrenze von $\log_2 \geq 2$ liegen.

Alle Antikörpertiter wurden als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Die Antikörpertiter der 30 µg- und der 120 µg- Gruppe wurden je Immunisierungszeitpunkt auf die Signifikanz mittels t-test untersucht. Bei der Varianzanalyse (ANOVA) mit Dunnett post hoc test wurden alle Gruppen auf die niedrige (30 µg) Gruppe zum Zeitpunkt der 1. Immunisierung bezogen. Der Dunnett post hoc test wurde gewählt, da mit diesem Verfahren die Signifikanz von einer oder mehreren zu untersuchenden Gruppen auf eine Kontrollgruppe bestimmt werden kann (EVERETT und SHRONDAL, 2010). Diese wurde in dieser Arbeit beim Vergleich der durchschnittlichen Antikörpertiter der beiden Impfgruppen

3 Material und Methoden

und auch beim Vergleich der kloakalen Virusausscheidung der 3 Versuchsgruppen (ungeimpft, bzw. mit einer Antigendosis von 30 µg bzw. 120 µg geimpft) nach Infektion bestimmt.

4 Ergebnisse

4.1 Klinische Untersuchung der Wellensittiche nach Immunisierung

8 Wellensittichhennen wurden mit einer Antigendosis von 30 µg je Tier und 8 weitere Hennen mit einer Antigendosis von 120 µg je Tier mit der APV-VLP-Vakzine immunisiert. Jede Henne wurde noch zweimal (nach 21 Tagen und nach 70 Tagen) mit der gleichen Antigendosis wie bei der 1. Immunisierung geimpft. 12 Vögel wurden die ganze Zeit mit den Impfungen zusammen gehalten und dienten als Kontrollgruppe (vgl. 3.2.10).

4.1.1 Klinische Untersuchungen der adulten Wellensittiche

Alle 28 adulten Wellensittiche wurden an den Tagen 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28 und 35 post vaccinationem adspektorisch (Veränderungen des Allgemeinbefindens, der Stimmäußerungen, Mauser, Kotbeschaffenheit) und palpatorisch (Injektionsstelle) auf impfstoff- und impfungsbedingte Reaktionen untersucht. Zu keinem der genannten Zeitpunkte konnten klinisch manifeste lokale oder systemische Reaktionen beobachtet werden. Veränderungen durch andere Ursachen konnten ebenfalls nicht festgestellt werden. Das in Abschnitt 3.2.3 beschriebene Paarungs- und Brutverhalten war bei keiner der Zuchtgruppen auffällig.

4 Ergebnisse



Abbildung 7: Zur Zucht wurden mehrere Nistkästen in der Voliere angebracht, die von den Wellensittichen gut angenommen wurden



Abbildung 8: Adulte Wellensittichhenne (Lutino) mit ihren Nestlingen in unterschiedlichem Alter

4.1.2 Klinische Untersuchungen der Küken von immunisierten Hennen

Für die Untersuchung, ob maternale Impfantikörper auf Wellensittichküken übertragen werden, wurden 37 Küken gezüchtet (vgl. 3.2.3). Alle 37 Nestlinge (30 µg Gruppe n = 18; 120 µg Gruppe n= 19) wurden am jeweiligen Tag des Schlupfes (Tag 0) und an den Lebenstagen 3, 8, 13, 20, 27, 42 und 49 klinisch untersucht und einzeln gewogen, um durch die Ergebnisse der Wägungen ggf. Hinweise auf embryotoxische Effekte des Impfstoffes zu erhalten. Die folgenden Tabellen 6 und 7 enthalten die Einzelwerte je Nestling und die arithmetischen Mittelwerte je Gruppe. Die Einzel- und Mittelwertabweichungen zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Impfgruppen.

Tabelle 6: Bestimmung der Körpermassen der Nestlinge aus Eiern mit einer Antigenosis von 30 µg geimpfter Wellensittichweibchen

Dosis 30 µg	Lebensalter der Nestlinge (Tage), n = 18							
	0	3	8	13	20	27	42	49
Körpermasse der Nestlinge (Gramm)	1,1	3,5	15,0	23,1	49,7	55,0	49,9	46,8
	0,9	6,8	17,1	36,0	43,0	53,0	53,2	50,3
	1,2	4,1	12,9	26,3	44,6	49,9	49,2	46,9
	1,0	4,9	13,3	37,4	49,4	56,7	47,0	44,0
	1,0	5,1	13,9	38,9	51,5	55,6	47,9	43,8
	1,3	5,0	15,4	38,2	52,4	56,2	48,5	45,5
	1,0	4,7	14,5	39,2	43,2	46,9	48,2	48,9
	1,3	5,8	14,0	36,3	52,1	54,6	48,3	48,3
	0,9	3,9	17,6	25,6	42,1	48,3	45,2	42,4
	1,1	4,0	17,1	29,4	44,5	46,2	49,9	46,4
	1,1	4,4	13,0	29,0	48,5	51,0	48,6	44,9
	1,0	4,6	14,1	31,5	52,3	57,3	48,2	45,3
	1,1	5,2	14,7	36,0	52,9	56,9	40,9	41,2
	1,0	4,9	18,2	38,4	48,9	56,8	41,3	37,6
	0,9	4,8	17,9	39,4	49,0	56,1	48,8	49,8
	1,0	5,2	14,2	38,4	52,1	54,6	51,2	47,1
	1,4	6,3	18,0	27,2	53,9	56,2	47,3	44,5
	1,0	6,0	19,9	31,2	54,8	55,4	45,4	42,1
Mittelwert	1,1	5,0	15,6	33,4	49,2	53,7	47,7	45,3
Standardabweichung	0,1	0,9	2,1	5,5	4,0	3,6	3,0	3,2
Standardfehler	0,0	0,2	0,5	1,3	1,0	0,9	0,7	0,8

Tabelle 7: Bestimmung der Körpermassen der Nestlinge aus Eiern mit einer Antigenosis von 120 µg geimpfter Wellensittichweibchen

Dosis 120 µg	Lebensalter der Nestlinge (Tage), n = 19							
	0	3	8	13	20	27	42	49
Körpermasse der Nestlinge (Gramm)	1,0	4,6	14,9	38,3	48,3	57,3	52,2	50,6
	1,0	5,2	17,2	27,4	50,5	55,7	49,6	46,9
	1,1	5,0	12,3	38,4	53,0	57,8	53,1	50,6
	0,9	4,7	14,9	31,2	45,1	54,6	49,2	50,6
	0,9	5,2	14,5	34,6	54,6	55,3	49,0	45,2
	0,9	4,1	18,2	27,2	44,8	53,9	49,3	45,3
	1,0	4,9	18,9	31,2	47,3	54,8	48,2	49,1
	1,0	5,1	14,3	29,3	39,6	55,0	46,9	43,9
	1,4	5,2	15,3	38,1	52,3	52,6	41,9	38,5
	1,2	5,5	11,3	18,1	48,9	48,9	43,1	40,3
	1,3	6,3	16,2	34,1	42,0	57,7	50,2	47,3
	1,0	3,4	15,0	33,4	51,1	55,1	49,1	46,2
	1,0	4,9	18,2	32,3	47,9	51,9	49,0	51,2
	1,0	5,1	17,3	37,2	44,0	46,0	42,3	39,1
	1,0	4,9	13,4	38,6	45,6	53,9	46,7	45,6
	1,0	4,8	13,9	39,8	50,6	46,4	42,5	40,1
	1,1	5,8	14,9	37,0	52,3	53,9	46,9	43,8
	0,9	4,0	16,2	39,4	44,6	49,8	46,3	43,9
	0,9	3,9	16,8	38,6	49,4	46,2	41,7	42,2
1,1	4,4	15,3	39,1	52,3	50,4	37,5	39,1	
Mittelwert	1,0	4,9	15,5	34,2	48,2	52,9	46,7	45,0
Standardabweichung	0,1	0,7	2,0	5,6	4,0	3,7	4,0	4,2
Standardfehler	0,0	0,2	0,5	1,3	0,9	0,9	0,9	1,0



Abbildung 9: Wellensittichnestling im Alter von 3 Tagen. Beachte: noch keine Befiederung, noch geschlossene Augenlider, große Öffnung des äußeren Gehörgangs, hochgradig (aber physiologisch) gefüllter Kropf, Füße mit langen Krallen

4.2 Antikörperbildung der geimpften adulten Wellensittichhennen

4.2.1 Serokonversion der Wellensittichhennen

4.2.1.1 in der 30 µg-VLP-Gruppe

Die Ergebnisse von allen 8 Wellensittichhennen nach 3 sukzessiv durchgeführten Impfstoffinjektionen mit 30 µg-VLP-Impfstoff sind Tabelle 8 aufgeführt. Zum Errechnen der durchschnittlichen Antikörpertiter der Seren wurden nur diejenigen Titer verwendet, die über der festgelegten Spezifitätsgrenze von $\log_2 \geq 2$ liegen. Vor der 1. Impfung (Tag 0) besaß keine der 8 Wellensittichhennen spezifische neutralisierende Antikörper im Serum gegen die APV. 21 Tage nach der 1. Immunisierung hatten 4 der 8

4 Ergebnisse

(50,0 %) Wellensittichhennen einen durchschnittlichen Antikörpertiter von $\log_2 = 3,25$. Nach der 2. Immunisierung – 35 Tage nach der 1. VLP-Injektion – zeigten 8 von 8 Vögeln (100 %) einen durchschnittlichen Antikörpertiter von $\log_2 = 3,875$. Hierbei wurde allerdings bei 6 Hennen (Nr. 3, 8, 20, 21, 22 und 23) nur ein niedriger Antikörpertiter von $\log_2 = 2$ bzw. $\log_2 = 3$ detektiert. 2 Hennen reagierten gut auf die 2. Immunisierung und hatten einen Antikörpertiter von $\log_2 = 8$ (Nr. 1) und $\log_2 = 7$ (Nr. 24). Nach der 3. Immunisierung – 14 Tage nach der 3. VLP-Injektion – konnte bei allen 8 (100 %) Vögeln ein durchschnittlicher Antikörpertiter von $\log_2 = 5,0$ bestimmt werden. Auffällig ist, dass 3 Hennen (Nr. 3, 8 und 24) kaum auf die 3 Immunisierungen reagierten. Zudem sanken bei den Hennen Nr. 1 und 24 die Antikörpertiter nach der 3. Immunisierung wieder ab (Tabelle 8 und Abbildung 10).

Die Antikörpertiter in der 30 µg-VLP-Gruppe nach den 3 VLP-Injektionen wurden je Injektionszeitpunkt auf Signifikanz mittels t-test untersucht. Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied in Bezug zu den durchgeführten Impfungen errechnet werden.

Varianzanalysen (ANOVA) mit dem Dunett post hoc test, bei dem alle Gruppen auf die niedrige Gruppe zum Zeitpunkt der 1. Impfstoffinjektion bezogen wurden, ergaben ebenfalls keinen signifikanten Unterschied.

Tabelle 8: Immunisierung mit 30 µg Antigen und Serumneutralisationstiter der 8 adulten Wellensittichhennen. Angegeben sind die Antigendosis, die Tage der Blutentnahmen nach den vorangegangenen Immunisierungen und die Antikörpertiter nach 1., 2. und 3. Immunisierung mit VLP

WS Nr.	1. Immunisierung	Ag-Dosis (µg/ Vogel)	Blutentnahme (d p. 1. Vak.)	Ak-Titer (log ₂)	2. Immunisierung	Ag-Dosis (µg/ Vogel)	Blutentnahme (d p. 1. Vak./ 2. Vak.)	Ak-Titer (log ₂)	3. Immunisierung	Ag-Dosis (µg/ Vogel)	Blutentnahme (d p. 3. Vak.)	Ak-Titer (log ₂)
1	+	30	21	< 2	+	30	35/ 14	8	+	30	14	5
3	+	30	21	< 2	+	30	35/ 14	2	+	30	14	4
8	+	30	21	< 2	+	30	35/ 14	3	+	30	14	3
20	+	30	21	< 2	+	30	35/ 14	3	+	30	14	6
22	+	30	21	3	+	30	35/ 14	3	+	30	14	6
23	+	30	21	3	+	30	35/ 14	3	+	30	14	7
21	+	30	21	2	+	30	35/ 14	2	+	30	14	4
24	+	30	21	5	+	30	35/ 14	7	+	30	14	5

WS Nr.: Nummer der Wellensittiche, Ag-Dosis: Antigendosis je Vogel, p. 1. Vak.: post 1. Vakzinierung, Ak-Titer: Antikörpertiter

4.2.1.2 in der 120 µg-VLP-Gruppe

Die Antikörpertiter der 8 adulten Wellensittiche nach der Impfung mit 120 µg-VLP-Antigen sind in Tabelle 9 und Abbildung 10 dargestellt. Nach der 1. VLP-Injektion zeigten 5 von 8 Vögeln (62,5 %) einen Antikörpertiter von durchschnittlich $\log_2 = 3,2$. Zu beachten ist, dass bei 4 Wellensittiche (Nr. 11, 12, 19 und 28) nur ein niedriger Titer von $\log_2 = 2$ bzw. $\log_2 = 3$ bestimmt werden konnte. Nach der 2. VLP-Injektion zeigten 8 der 8 Tiere (100 %) einen Antikörpertiter von durchschnittlich $\log_2 = 2,875$. Hierbei ist auffällig, dass der Titer bei den Hennen Nr. 11 und 14 wieder sank.

4 Ergebnisse

Darüber hinaus konnte bei 6 Vögeln (Nr. 7, 9, 11, 12, 19 und 28 nur ein niedriger Titer von $\log_2 = 2$ bzw. $\log_2 = 3$ detektiert werden.

Nach der 3. VLP-Injektion konnte bei allen 8 (100 %) Wellensittichhennen ein durchschnittlicher Antikörpertiter von $\log_2 = 5,75$ errechnet werden. Der höchste Antikörpertiter wurde hierbei bei Henne Nr. 14 mit $\log_2 = 10$ festgestellt. Der Vogel Nr. 11 hatte auch nach der dritten Impfung einen niedrigen Titer von $\log_2 = 3$ (Tabelle 9 und Abbildung 10).

Tabelle 9: Immunisierung mit 120 μg Antigen und Neutralisationstiter der 8 adulten Wellensittichhennen. Angegeben sind die Antigendosis, die Tage der Blutentnahmen nach den vorangegangenen Immunisierungen und die Antikörpertiter nach 1., 2. und 3. Immunisierung mit VLP

WS Nr.	1. Immunisierung	Ag-Dosis ($\mu\text{g}/\text{Vogel}$)	Blutentnahme (d p. 1. Vak.)	Ak-Titer (\log_2)	2. Immunisierung	Ag-Dosis ($\mu\text{g}/\text{Vogel}$)	Blutentnahme (d p. 1. Vak./ 2. Vak.)	Ak-Titer (\log_2)	3. Immunisierung	Ag-Dosis ($\mu\text{g}/\text{Vogel}$)	Blutentnahme (d p. 3. Vak.)	Ak-Titer (\log_2)
14	+	120	21	5	+	120	35/ 14	4	+	120	14	10
7	+	120	21	< 2	+	120	35/ 14	2	+	120	14	4
9	+	120	21	< 2	+	120	35/ 14	3	+	120	14	4
11	+	120	21	3	+	120	35/ 14	2	+	120	14	3
12	+	120	21	3	+	120	35/ 14	3	+	120	14	7
15	+	120	21	< 2	+	120	35/ 14	4	+	120	14	6
19	+	120	21	3	+	120	35/ 14	3	+	120	14	8
28	+	120	21	2	+	120	35/ 14	2	+	120	14	4

WS Nr.: Wellensittichnummer, Ag-Dosis: Antigendosis je Vogel, p. 1. Vak.: post 1. Vakzinierung, Ak-Titer: Antikörpertiter

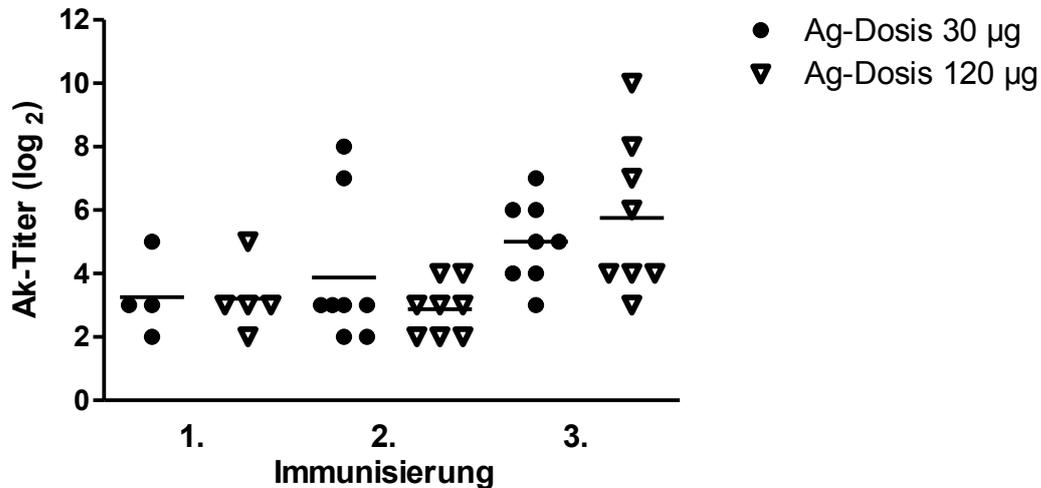


Abbildung 10: Individuelle Antikörpertiter im Serum der Wellensittichhennen nach 1., 2. und 3. Immunisierung mit VLP. Dargestellt sind die Einzelwerte je Henne (Symbole) und die errechneten Mittelwerte (horizontale Balken) aller Tiere je Untersuchungszeitpunkt, die über der festgelegten Spezifitätsgrenze von $\log_2 \geq 2$ liegen

Ak-Titer: Antikörpertiter; Ag-Dosis: Antigendosis pro Vogel

Ag-Dosis 30 µg: n = 8

Ag-Dosis 120 µg: n = 8

Eine direkt proportionale Beziehung zwischen der injizierten VLP-Antigenmenge und der Höhe der Antikörpertiter in den Seren konnte nicht errechnet werden. Somit führte eine vierfache Antigendosis nicht zur signifikanten Erhöhung der Antikörpertiter. Varianzanalysen (ANOVA) mit dem Dunnett post hoc test, bei dem alle Gruppen auf die niedrige Gruppe zum Zeitpunkt der 1. Impfstoffinjektion bezogen wurden, ergaben ebenfalls keinen signifikanten Unterschied.

4.3 Antikörpertiter im Dotter geimpfter Hennen

Die unbefruchteten Eier wurden aus den Nistkästen entnommen, um die Übertragung maternaler Impfantikörper auf den Eidotter nachweisen zu können (vgl. 3.2.13). Die Anzahl unbefruchteter Eier schwankte zwischen

4 Ergebnisse

1 und 7 Eiern je Henne. Henne Nr. 21 produzierte keine unbefruchteten Eier. 3 der 8 Hennen (30 µg Gruppe 1 Henne; 120 µg 2 Hennen) legten Eier ohne nachweisbare Antikörper. Auch Hennen, die mehrere Eier legten, produzierten alternierend Eier mit und ohne maternale Antikörper (Tabelle 10 und 11). In der 30 µg Gruppe wurden mehr unbefruchtete Eier (n = 26) als in der 120 µg Gruppe (n = 17) gelegt. Somit konnten in 18 von 26 (69,2 %) (30 µg Gruppe) bzw. 14 von 17 (82,4 %) (120 µg Gruppe) Eidottern maternale Antikörper nachgewiesen werden (Tabelle 10 und 11). Im Durchschnitt beträgt der Antikörpertiter $\log_2 = 3,89$ (30 µg-Gruppe), bzw. $\log_2 = 4,50$ (120 µg-Gruppe) (Abbildung 11).

Tabelle 10: Antikörpertiter im Dotter von 26 unbefruchteten Eiern geimpfter Wellensittichhennen (Antigendosis 30 µg)

Nummer Wellensittichhenne	Antikörpertiter im Dotter (\log_2)
1	≤ 2
3	$\leq 2, 5, 3, 3, 4, \leq 2, \leq 2$
8	$2, \leq 2, 3, 2$
20	$4, \leq 2, 3, \leq 2, 6, 6$
21	-
22	$7, 4, 4, 5$
23	$4, 2, 3$
24	≤ 2

Tabelle 11: Antikörpertiter im Dotter von 17 unbefruchteten Eiern geimpfter Wellensittichhennen (Antigendosis 120 µg)

Nummer Wellensittichhenne	Antikörpertiter Dotter (\log_2)
7	$4, 5$
9	$5, \leq 2, 7$
11	≤ 2
12	4
14	$4, 5$
15	≤ 2
19	$4, 3, 5$
28	$2, 5, 2, 8$

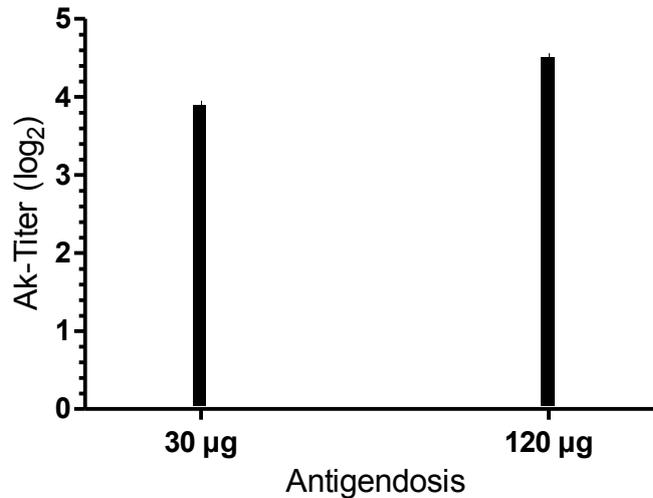


Abbildung 11: Höhe der durchschnittlichen Antikörpertiter im Dotter unbefruchteter Eier von geimpften Hennen

30 µg, n = 18, 120 µg, n = 14

4.4 Maternale Antikörpertiter in Seren der Wellensittichküken

Aus den etwa 1 Gramm wiegenden Eiern schlüpften klinisch gesund erscheinende Küken. Ein Einfluss der VLP-Impfdosis auf die Entwicklung der Küken während der Embryonalphase und während der Zeit nach dem Schlupf war nicht erkennbar.

Am Tag 3 nach dem Schlupf konnte in der **30 µg-Gruppe** bei einem von 18 (5,6%) Küken ein niedriger Antikörpertiter von $\log_2 = 3$ detektiert werden (Tabelle 12).

Auch in der **120 µg-Gruppe** konnte bei einem von 19 (5,3 %) Küken am 3. Tag nach dem Schlupf ein niedriger Antikörpertiter von $\log_2 = 3$ gemessen werden (Tabelle 13).

4 Ergebnisse

Tabelle 12: Titer maternalen Antikörper (Hennen dreimal immunisiert mit 30 µg) im Blutserum der 18 Küken. Dargestellt werden die Antikörpertiter der Küken am 3. Lebenstag

WS Nr.	Ak-Titer Küken (\log_2) 3 Tage nach dem Schlupf
1	keine Küken
3	≤ 2
	≤ 2
8	≤ 2
	≤ 2
	≤ 2
	3
	≤ 3
20	≤ 2
	≤ 2
	≤ 2
22	≤ 2
23	≤ 2
	≤ 2
24	≤ 2
	≤ 2

WS Nr.: Nummer der Mutterhenne, Ak-Titer: Antikörpertiter,
3. Vak.: 3. Vakzination

Tabelle 13: Titer maternaler Antikörper (Hennen dreimal immunisiert mit 120 µg) im Blutserum der 19 Küken. Dargestellt werden die Antikörpertiter der Küken am 3. Lebenstag

WS Nr.	Ak-Titer Küken (\log_2) 3 Tage nach dem Schlupf
7	≤ 2
	≤ 2
	≤ 2
9	≤ 2
	≤ 2
	≤ 2
11	≤ 3
12	≤ 2
14	≤ 2
	≤ 2
15	≤ 3
	3
19	≤ 2
	≤ 2
25	keine Küken
28	≤ 2
	≤ 2

WS Nr.: Nummer der Mutterhenne, Ak-Titer: Antikörpertiter,
3. Vak.: 3. Vakzination

4.5 Belastungsinfektion der adulten Wellensittiche mit dem APV-Isolat BFDV-5

6 Monate nach der Impfstudie wurde wieder wie in 3.2.3 beschrieben mit der Zucht begonnen. Als erneut Küken (30 µg: n = 7 Küken; 120 µg: n = 9 Küken; nicht geimpft: n = 9) vorhanden waren, wurden alle Tiere (adulte Vögel und Küken) mit BFDV-5 infiziert (vgl. 3.2.14).

Die intramuskuläre Belastungsinfektion der adulten Wellensittiche erfolgte mit 0,2 ml des APV-Isolats BFDV-5 in einer Dosis von $\log_{10} = 4.5 \text{ KID}_{50}$ je ml. Die Küken wurden mit 0,05 ml BFDV-5 mit demselben Infektiositätstiter

4 Ergebnisse

infiziert (vgl. 3.2.14.2). Die adulten Wellensittiche wurden nach der Infektion in einem Untersuchungszeitraum von 70 Tagen überwacht und keines der nicht immunisierten Tiere erschien nach dieser Infektion klinisch auffällig (Tabelle 14). Allerdings starb 1 Wellensittich, der mit 30 µg VLP immunisiert worden war, an den Folgen dieser Testinfektion. Alle 8 Tiere, die mit 120 µg VLP immunisiert wurden, blieben klinisch gesund und überlebten die Belastungsinfektion (Tabelle 14).

Tabelle 14: Anzahl der überlebenden und gestorbenen Vögel nach der Belastungsinfektion in Abhängigkeit von der Antigenosis

Tierzahl	VLP-Dosis	Belastungs- infektion mit*	Tierzahl lebend / tot
5 m 2 w	0	+	7 / 0
5 m	0	-	5 / 0
8 w	30	+	7 / 1
8 w	120	+	8 / 0

M = männlich; w = weiblich;

* 0.05 ml einer BFDV 5-Suspension mit einem Titer von 4.5 KID₅₀ je ml

4.5.1 Virusausscheidung nach der Belastungsinfektion

An den Tagen 3, 5, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 und 70 wurden von allen adulten Wellensittichen Kloakentupferproben zum Nachweis einer eventuellen APV-Ausscheidung entnommen (vgl. 3.2.14.1, 3.2.14.3, 3.2.14.4, 3.2.14.5).

4.5.1.1 Kloakale Ausscheidung des Testvirus bei nicht geimpften und nicht testinfizierten adulten männlichen Wellensittiche

Klinisch war keiner der 5 nicht geimpften und nicht testinfizierten männlichen Wellensittiche im Untersuchungszeitraum von 70 Tagen klinisch auffällig geworden (Tabelle 14). In dieser Kontrollgruppe konnte

4 Ergebnisse

bei keinem der 5 Vögel von Tag 0 bis Tag 70 p.i. das Testvirus mittels PCR (Tabelle 15) detektiert werden. Auch die Untersuchung der gepoolten Organe auf APV durch PCR am Tag 70 fiel bei jedem dieser 5 Tiere negativ aus.

Tabelle 15: Mittels PCR ermittelte kloakale Virusausscheidung und Viruspersistenz in gepoolten Organen nicht geimpfter und nicht testinfizierter adulter männlicher Wellensittiche

Lfd. Nr.	PCR-Ergebnis an Tagen post infectionem													PCR-Ergebnis Organe d 70
	0	3	5	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Lfd. Nr.: Laufende Nummer, -: negatives PCR-Ergebnis;
+: positives PCR-Ergebnis; n = 5

4.5.1.2 Kloakale APV-Ausscheidung bei ungeimpften und infizierten adulten Wellensittichen

Klinisch war keiner der 7 Wellensittiche im Untersuchungszeitraum auffällig geworden (Tabelle 14).

Am Tag der Infektion (d 0) war bei keinem der 7 untersuchten Wellensittiche eine kloakale Virusausscheidung nachzuweisen. Dies änderte sich 3 Tage (d 3) nach der Infektion, als bereits 4 von 7 Tieren (57,1 %) eine Virusausscheidung zeigten. Weiterhin war an d 5 bei 6 von 7 (85,7 %), an d 7 bei 4 von 7 (57,1 %), an d 14 bei 4 von 7 (57,1 %), an d 21 bei 4 von 7 (57,1 %) an d 28 bei 3 von 7 (42,9 %), an d 35, 42, 49. 56, 63 bei je 4 von 7 (57,1 %) und an d 70 bei 3 von 7 (42,9 %) Vögeln eine Virusausscheidung nachweisbar.

4 Ergebnisse

Das Minimum an Virusausscheidern war dabei an d 28 und d 70 (je 42,9 %), wohingegen der höchste Anteil am Tag 5 (85,7 %) nach der Infektion zu verzeichnen war. Ein Wellensittich (Nr. 6) schied an keinem der Untersuchungstage Virus aus (Tabelle 16, Abbildung 12).

In den am 70. Tag entnommenen, gepoolten Organproben konnte bei 7 von 7 Vögeln (100%) APV mittels PCR detektiert werden.

Tabelle 16: Mittels PCR ermittelte kloakale Virusausscheidung und Viruspersistenz in gepoolten Organen infizierter, aber nicht geimpfter adulter Wellensittiche

Lfd. Nr.	PCR-Ergebnis an Tagen post infectionem													PCR-Ergebnis Organe d 70	
	0	3	5	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70		
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
7	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
8	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
9	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
10	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
11	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+

Lfd. Nr.: Laufende Nummer, -: negatives PCR-Ergebnis;
+: positives PCR-Ergebnis; n = 7

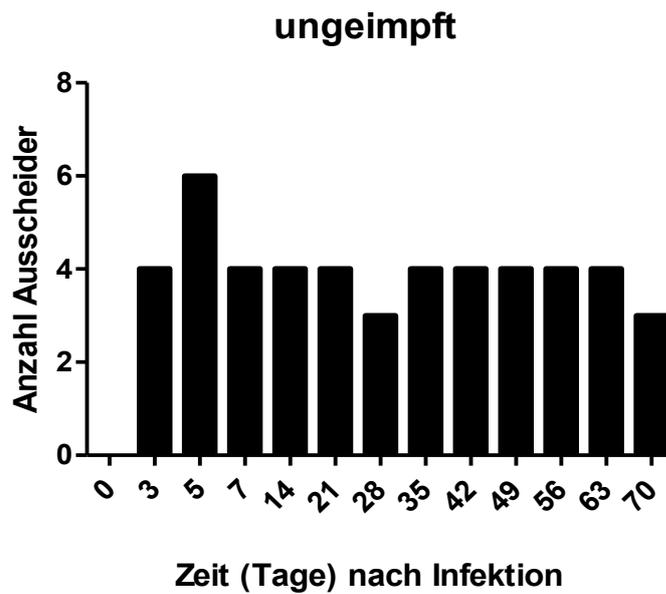


Abbildung 12: Dargestellt ist die Anzahl der kloakal virusausscheidenden ungeimpften Wellensittiche an Tagen nach der Infektion mit BFDV-5
n = 7

4.5.1.3 Kloakale Virusausscheidung der mit 30 µg VLP geimpften und testinfizierten weiblichen Wellensittiche

Klinisch blieben 7 der 8 infizierten weiblichen Wellensittiche während des 70tägigen Beobachtungszeitraums unauffällig. Allerdings starb eine Wellensittichhenne an den Folgen der Belastungsinfektion. Dieses Tier hatte bis zu diesem Tag kein Virus kloakal ausgeschieden (Tabelle 17, Abbildung 13). Am Tag der Infektion (d 0) schied keiner der 8 Vögel das Testvirus mit dem Kot aus. 3 Tage (d 3) nach der Infektion waren es 4 von 8 (50 %), an d 5 3 von 8 (37,5 %), an d 7 4 von 8 (50 %), an d 14 3 von 8 (37,5 %), an Tag 15 starb 1 Vogel, 4 von 7 (57,1 %) schieden an Tag 21 Virus aus, an d 28 6 von 7 (85,7 %), an d 35 6 von 7 (85,7 %) an d 42 3 von 7 (42,9 %), an d 49 5 von 7 (71,4 %), an d 56 5 von 7 (71,4 %), an d 63 4 von 7 (57,1 %), an d 70 5 von 7 (71,4 %).

Der niedrigste prozentuale Anteil von Virusausscheidern war an Tag 5 und 14 (je 37,5 %) nach Infektion zu sehen, wohingegen die höchsten Werte

4 Ergebnisse

an Tag 28, 35, 49, 56 und 70 (je 71,4 %) nach der Infektion zu detektieren waren (Tabelle 17, Abbildung 13).

In den gepoolten Organen der Wellensittiche konnte bei 8 von 8 (100 %) Wellensittichen APV mittels PCR detektiert werden. Dabei wurden die Organen von dem verstorbenen Vogel Nr. 20 am 15. Tag entnommen.

Tabelle 17: Mittels PCR ermittelte kloakale Virusausscheidung und Viruspersistenz in gepoolten Organen infizierter und mit einer Antigenosis von 30 µg geimpfter adulter Wellensittiche

Lfd. Nr.	PCR-Ergebnis an Tagen post infectionem													PCR-Ergebnis Organe d 70
	0	3	5	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	
13	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
14	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
15	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
16	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+
17	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
18	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
19	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	-	-	-	-	-	†								+

Lfd. Nr.: Laufende Nummer, -: negatives PCR-Ergebnis;
 +: positives PCR-Ergebnis; n = 8, ab Tag 21 n = 7
 †: an Tag 15 gestorben

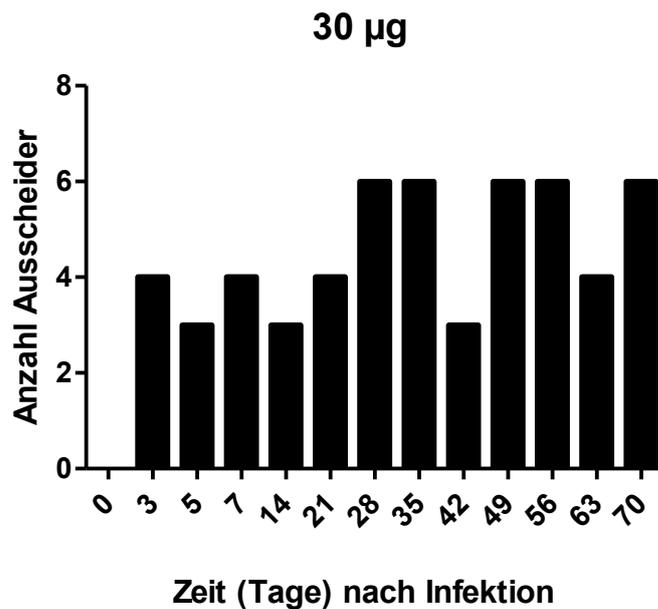


Abbildung 13: Anzahl der kloakal virusausscheidenden, mit einer Antigendosis von 30 µg VLP geimpften weiblichen Wellensittiche an Tagen nach der Infektion mit BFDV-5
n = 8 bis Tag 21, ab Tag 21 n = 7

4.5.1.4 Kloakale Virusausscheidung der mit 120 µg geimpften und testifizierten weiblichen Wellensittiche

Klinisch blieben alle 8 geimpften und testifizierten Wellensittichhennen unauffällig. Nur 3 dieser Hennen schieden intermittierend das Testvirus mit dem Kot aus (Tabelle 18, Abbildung 14). Am Tag der Infektion (d 0) und am Tag 3, 5, 14, 28, 35, 42, 49, 63 und 70 nach der Infektion schied keiner (0 %) der Vögel kloakal Virus aus. Am Tag 7 und 56 schied 1 von 8 (12,5 %) der Vögel kloakal Virus aus. Am 21. Tag nach der Belastungsinfektion waren es 2 von 8 (25 %) (Abbildung 14).

In den gepoolten Organen der 8 Wellensittiche konnte 70 Tage nach der Infektion nur bei 3 von 8 (37,5 %) Wellensittichen APV mittels PCR detektiert werden (Tabelle 18, Abbildung 14).

4 Ergebnisse

Tabelle 18: Mittels PCR ermittelte kloakale Virusausscheidung und Viruspersistenz in gepoolten Organen infizierter und mit einer Antigendosis von 120 µg geimpfter adulter Wellensittiche

Lfd. Nr.	PCR-Ergebnis an Tagen post infectionem													PCR-Ergebnis Organe d 70	
	0	3	5	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70		
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
22	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Lfd. Nr.: Laufende Nummer, -: negatives PCR-Ergebnis;
+: positives PCR-Ergebnis; n = 8

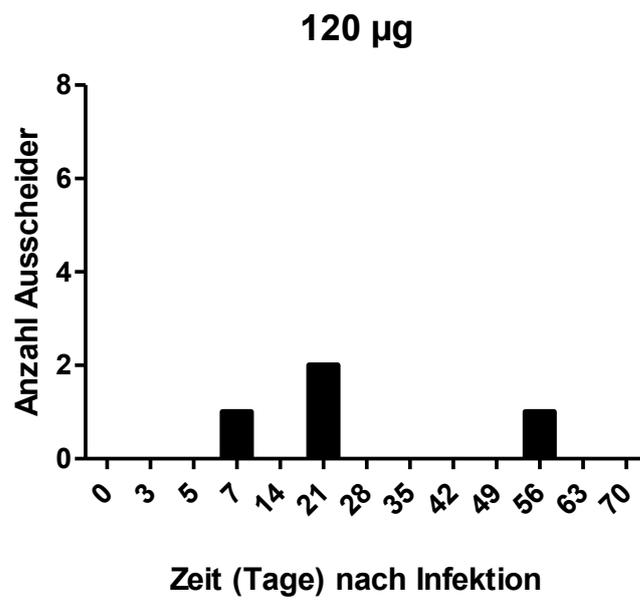


Abbildung 14: Anzahl der kloakal Virus ausscheidenden, mit einer Antigendosis von 120 µg geimpften 8 Wellensittichhennen an verschiedenen Tagen nach der Infektion mit BFDV-5

n = 8

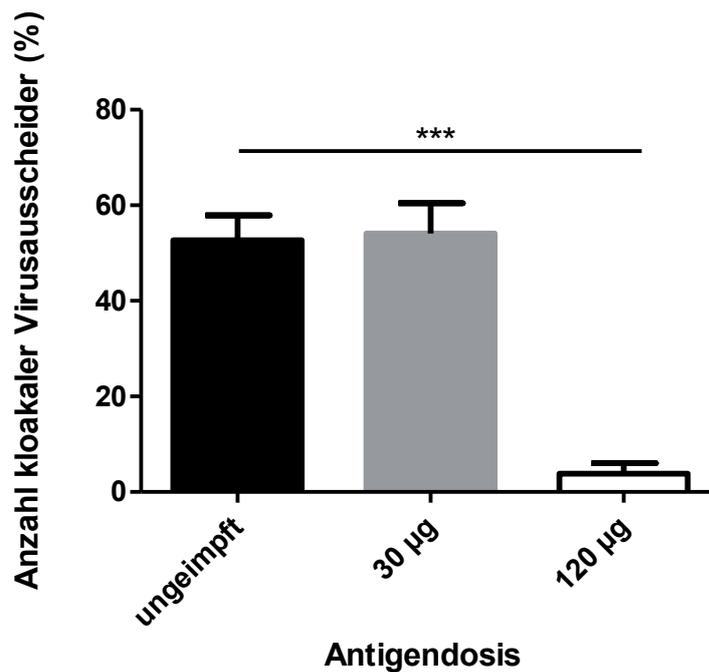


Abbildung 15: Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl von kloakalen Virusausscheidern in der ungeimpften, 30 µg Antigen und 120 µg Antigen Gruppe nach Infektion mit BFDV-5

Ungeimpft: n = 7

Impfung mit 30 µg: n = 8 bis Tag 21, ab Tag 21 n = 7

Impfung mit 120 µg: n = 8

***: p < 0,001

Die Varianzanalyse ANOVA mit dem Dunett post hoc test bei dem die niedrige (Antigendosis: 30 µg) und hohe Impfgruppe (Antigendosis: 120 µg) gegen die ungeimpften aber infizierten Tiere verglichen wurde, ergab eine Signifikanz von p < 0,001 (***) (Abbildung 15).

4.5.1.5 Kloakale Virusausscheidung und –persistenz der Küken ungeimpfter Hennen

Küken, die nach 6 Monaten Wartezeit zur Impfstudie geschlüpft waren, wurden in einem Untersuchungszeitraum von 49 Tagen nach Infektion auf die kloakale Virusausscheidung getestet. Keines von 9 (0 %) Küken ungeimpfter Hennen schied am Tag der Infektion (d 0) sowie an den

4 Ergebnisse

Tagen 3, 7 und 49 nach der Infektion das Virus aus. Allerdings war je 1 Küken an Tag 13, 14 und 17 nach der Infektion gestorben. Alle 3 Wellensittichküken schieden am Tag ihres Todes kloakal Virus aus. Darüber hinaus zeigten 2 Küken im Alter von 35 Tagen deutlich erkennbare Befiederungsstörungen und entwickelten sich nachfolgend zu „Renner“ (Abbildung 16, 17, 18 und 19).

In den gepoolten Organen der überlebenden Küken konnte bei 3 von 6 Küken (50 %, davon 1 Renner und 2 klinisch unauffällige Vögel) APV mittels PCR detektiert werden (Tabelle 19). Bei allen 3 gestorbenen Vögeln konnte am Todestag das Testvirus aus den gepoolten inneren Organen APV isoliert werden (Tabelle 19), was eine kausale Beziehung zwischen Testvirusnachweis und Tod vermuten lässt.

Tabelle 19: Mittels PCR ermittelte kloakale Virusausscheidung, Viruspersistenz in gepoolten Organen und Klinik von am dritten Lebenstag infizierten Küken von nicht geimpften Hennen

Lfd. Nr.	PCR-Ergebnis in Tagen post infectionem				PCR-Ergebnis gepoolter Organe Tag 49	Klinik
	0	3	7	49		
1	-	-	-	-	+	o.b.B.
2	-	-	-	† Tag 17	† Tag 17	† Tag 17
3	-	-	-	† Tag 14	† Tag 14	† Tag 14
4	-	-	-	+	-	o.b.B.
5	-	-	-	† Tag 13	† Tag 13	† Tag 13
6	-	-	-	-	+	Renner
7	-	-	-	-	-	Renner
8	-	-	-	-	-	o.b.B
9	-	-	-	-	+	o.b.B

Lfd. Nr.: laufende Nummer; o.b.B.: ohne besonderen Befund
†: verstorben; n = 9



Abbildung 16: Fehlende große Schwungfedern des linken Flügels als Folge einer Belastungsinfektion bei einem nicht geimpften Nestling im Alter von 38 Tagen



Abbildung 17: Wellensittich im Alter von 38 Tagen nach der Impfung mit 30 µg VLP und nachfolgender Testinfektion: Fehlentwicklung der langen Schwanzfedern und fehlende Schwanzfedern



Abbildung 18: Wellensittich, 38 Tage alt. Es fehlen teilweise die langen Schwungfedern an beiden Flügeln und die langen Federn am Schwanz. Typisches Bild eines „Hopsers“ oder „Renners“

4.5.1.6 Kloakale Ausscheidung und Viruspersistenz der Küken von Hennen, die mit 30 µg Antigen geimpft wurden

Keines von 7 (0 %) Küken der mit 30 µg Antigen geimpften Hennen schied am Tag der Infektion (d 0) sowie an den Tagen 3, 7 und 49 nach der Infektion Virus aus. Allerdings war 1 Tier an Tag 6 nach der Infektion gestorben. Eine kloakale Virusausscheidung konnte am Todestag nicht detektiert werden. Befiederungsstörungen konnten bei keinem der 7 Küken festgestellt werden (Tabelle 20, Abbildung 19).

In den gepoolten Organen der überlebenden Küken konnte bei 4 von 6 Küken (66,7%) APV mittels PCR detektiert werden (Tabelle 20). Zudem konnte aus den Organen des gestorbenen Kükens am Tag des Todes APV isoliert werden (Tabelle 20).

Tabelle 20: Mittels PCR ermittelte kloakale Virusausscheidung, Viruspersistenz in gepoolten Organen und Klinik von am dritten Lebenstag infizierten Küken von Hennen, die mit einer Antigendosis von 30 µg geimpft worden waren

Lfd. Nr.	PCR-Ergebnis in Tagen post infectionem				PCR-Ergebnis gepoolter Organe an Tag 49	Klinik
	0	3	7	49		
10	-	-	-	-	+	o.b.B.
11	-	-	-	-	+	o.b.B.
12	-	-	-	-	+	o.b.B.
13	-	-	-	-	+	o.b.B.
14	-	-	- † Tag 6	-	+	† Tag 6
15	-	-	-	-	-	o.b.B.
16	-	-	-	-	-	o.b.B.

Lfd. Nr.: laufende Nummer; o.b.B.: ohne besonderen Befund
†: verstorben; n = 7

4.5.1.7 Kloakale Ausscheidung und Viruspersistenz der Küken von Hennen, die mit 120 µg Antigen geimpft wurden

Am Tag der der Infektion (d 0) schied keines der Küken das Testvirus aus. 3 Tage nach der Infektion schieden 2 von 9 (22,2 %) Küken kloakal APV aus, an Tag 7 (d 7) 1 von 9 (11,1 %). 42 Tage nach der Infektion mit APV starb 1 Küken, das zu diesem Zeitpunkt auch Befiederungsstörungen aufwies und kloakal Virus ausschied (Tabelle 21, Abbildung 19). Von den übrigen 8 Küken konnte am Tag 49 (d 49) nach der Infektion bei 3 (37,5 %) Tieren eine APV-Ausscheidung detektiert werden. Befiederungsstörungen bei den weiteren überlebenden Tieren waren nicht zu beobachten (Tabelle 21, Abbildung 19).

In den gepoolten Organen der überlebenden Küken konnte bei 5 von 8 Küken (62,5 %) APV mittels PCR detektiert werden. Aus dem gestorbenen

4 Ergebnisse

Küken konnte am Todestag kein APV aus den gepoolten Organen isoliert werden.

Tabelle 21: Mittels PCR ermittelte kloakale Virusausscheidung, Viruspersistenz in gepoolten Organen und Klinik von am dritten Lebenstag infizierten Küken von Hennen, die mit einer Antigenosis von 120 µg geimpft worden waren

Lfd. Nr.	PCR-Ergebnis in Tagen post infectionem				PCR-Ergebnis gepoolter Organe Tag 49	Klinik
	0	3	7	49		
17	-	+	-	-	+	o.b.B.
18	-	+	-	-	-	o.b.B.
19	-	-	-	-	+	o.b.B.
20	-	-	-	+ † Tag 42	- Tag 42	Renner † Tag 42
21	-	-	+	-	-	o.b.B.
22	-	-	-	+	-	o.b.B.
23	-	-	-	-	+	o.b.B.
24	-	-	-	+	+	o.b.B.
25	-	-	-	+	+	o.b.B.

Lfd. Nr.: laufende Nummer; o.b.B.: ohne besonderen Befund
†: verstorben; n = 9

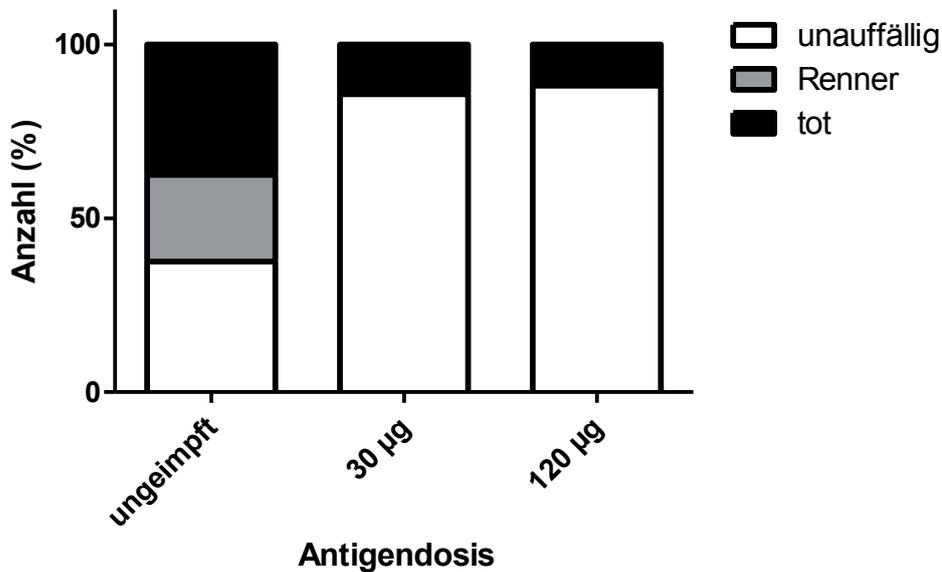


Abbildung 19: Dargestellt ist die prozentuale Anzahl klinisch unauffälliger Küken, Küken mit Befiederungsstörungen („Renner“) und gestorbener Küken, unterteilt nach ungeimpften, mit 30 µg Antigen und mit 120 µg Antigen geimpften Mutterhennen

Ungeimpft: n = 9; 30 µg Antigen: n = 7; 120 µg Antigen: n = 9
 Antigendosis: Antigendosis der Mutterhenne
 Totes Küken der 120 µg Gruppe war gleichzeitig Renner

4.5.2 Gewichtsentwicklung von Wellensittichküken nach Infektion mit BFDV-5

Alle geschlüpften Nestlinge der beiden Impfgruppen wurden einzeln gewogen, um durch die Ergebnisse der Wägungen ggf. Hinweise auf Unterschiede unter den Impfstoffgruppen oder im Vergleich zu Küken von ungeimpften Hennen zu erhalten. Die folgenden Tabellen 22, 23 und 24 enthalten die Einzelwerte je Nestling und die arithmetischen Mittelwerte je Gruppe. Die Einzel- und Mittelwertabweichungen sind den Tabellen 22, 23 und 24 zu entnehmen. Die Differenzen der Mittelwerte aller Gruppen sind nicht signifikant.

4 Ergebnisse

Interessanterweise wiegen die Küken von ungeimpften Hennen am Tag 21 weniger als in den beiden Vergleichsgruppen, obwohl die erkrankten Tiere bereits verstorben waren. Allerdings wurde auch in diesem Fall mittels t-Test kein signifikanter Unterschied nachgewiesen.

Table 22: Bestimmung der Körpermassen der infizierten Nestlinge aus Eiern mit einer Antigenosis von 30 µg geimpfter Wellensittichhennen

30 µg	Lebensalter der Nestlinge (Tage), n = 7									
	0	3	5	7	14	21	28	35	42	49
Körper- masse der Nestlinge (Gramm)	1,0	5,8	7,2	12,0	36,0	49,7	55,0	53,2	44,9	49,7
	1,0	3,9	9,3	14,1	26,3	43,0	53,0	53,6	49,8	49,8
	1,1	4,0	8,5	10,6	37,4	44,6	56,7	50,1	46,4	44,1
	1,1	4,4	9,1	10,9	38,9	49,4	55,6	53,6	51,2	42,6
	1,1	4,6	6,9	12,4	38,2	51,5	56,2	53,2	48,3	43,6
	0,9	5,2	9,6	12,5	39,3	52,4	46,9	42,2	52,6	40,9
	1,0	4,9	8,9							
Mittelwert	1,0	4,7	8,5	12,1	36,0	48,4	53,9	51,0	48,9	45,1
Standardab- weichung	0,1	0,7	1,1	1,3	4,9	3,8	3,7	4,5	2,9	3,8
Standard- Fehler	0,0	0,3	0,4	0,5	2,0	1,5	1,5	1,8	1,2	1,5

Tabelle 23: Bestimmung der Körpermassen der infizierten Nestlinge aus Eiern mit einer Antigenosis von 120 µg geimpfter Wellensittichhennen

120 µg	Lebensalter der Nestlinge (Tage), n = 9									
	0	3	5	7	14	21	28	35	42	49
Körper- masse der Nestlinge (Gramm)	1,1	4,6	9,1	11,9	38,3	48,3	57,3	55,1	51,6	39,8
	1,1	5,2	8,6	14,2	27,4	50,5	55,7	52,6	47,9	44,4
	1,0	5,0	7,0	9,3	38,4	53,0	57,8	56,1	52,9	43,9
	1,1	4,7	9,7	11,9	31,2	45,1	54,6	52,2	47,4	42,0
	1,0	5,2	9,1	11,5	34,6	54,6	55,3	52,0	48,9	46,9
	0,9	4,1	8,8	15,2	37,2	44,8	53,9	51,0	50,9	47,6
	1,0	4,9	9,0	15,9	31,2	47,3	54,8	51,2	43,6	42,1
	1,4	5,1	8,8	11,3	39,3	39,6	55,0	51,9	45,9	40,5
Mittelwert	1,1	4,9	8,6	12,6	35,1	48,4	55,2	51,6	48,6	43,4
Standardab- weichung	0,1	0,4	0,8	2,1	4,2	4,8	1,6	4,0	3,1	2,8
Standard- Fehler	0,0	0,1	0,3	0,7	1,4	1,6	0,5	1,3	1,0	1,0

Tabelle 24: Bestimmung der Körpermassen der infizierten Nestlinge aus Eiern ungeimpfter Wellensittichhennen

Ungeimpft	Lebensalter der Nestlinge (Tage), n = 9									
	0	3	5	7	14	21	28	35	42	49
Körper- masse der Nestlinge (Gramm)	1,1	3,5	7,1	11,5	36,0	49,7	55,0	53,2	52,4	41,1
	0,9	6,8	8,5	13,6	26,3	44,6	53,0	53,6	47,9	43,6
	1,2	4,1	8,9	10,9	37,4	49,4	49,9	50,1	49,8	39,1
	1,0	4,9	9,6	10,3	38,9	43,2	56,7	53,2	42,9	44,4
	1,0	5,1	7,3	11,9	38,2	52,1	55,6	53,6	49,7	41,0
	1,2	5,0	7,5	13,4	39,2	42,1	56,2	53,2	50,8	46,9
	1,0	4,7	8,3	12,5	36,3					
	1,3	5,8	8,9	12,0	25,6†					
Mittelwert	1,1	4,9	8,2	12,4	36,0	46,9	54,4	52,8	48,9	42,7
Standardab- weichung	0,1	1,0	0,8	1,6	4,5	4,1	2,6	1,3	3,3	2,8
Standard- Fehler	0,0	0,3	0,3	0,5	1,6	1,7	1,0	0,5	1,3	1,2

†: verstorben

4.5.3 Ergebnisse der histologischen Untersuchung von Organen

In keinem der untersuchten Organe konnten von den Veterinär-Pathologen der Universität Gießen Veränderungen festgestellt werden.

5 Diskussion

Der Wellensittich ist zweifellos der beliebteste und deshalb am häufigsten in privaten Haushalten gehaltene Vogel aus der Ordnung der Papageienvögel. Sein stets zutrauliches Wesen in Verbindung mit eher geringen Ansprüchen an Haltung und Ernährung verschafften dem Wellensittich viele Freunde bei Alt und Jung. In der Regel wird er bis zu 15 Jahre alt und erfüllt wegen seiner Langlebigkeit eine Art Brückenfunktion zwischen Senioren und Junioren innerhalb einer Familie. Bei guter, artgemäßer Pflege ist der „Hansi-Bubi“ ein robustes Haustier und wird selten krank. Aufgrund von Massenvermehrungen, schlechten hygienischen Zuständen in Züchtereien oder Zoogeschäften und mangelhafter Pflege wird er dennoch regelmäßig der praktizierenden Tierärzteschaft vorgestellt. Das klinische Bild einer APV-bedingten Krankheit zeigt sich in erhöhter Sterblichkeit der Embryonen im Ei und innerhalb der ersten Lebenswochen der Nestlinge. Bei älteren Wellensittichen dominieren Störungen der Federbildung bis hin zur völligen Flugunfähigkeit betroffener Vögel, die allgemein als „Hopser“ oder „Renner“ bezeichnet werden.

Zu den bedeutenden virusbedingten Krankheiten des Wellensittichs zählen die im Volksmund als „Französische Mauser“ bezeichnete Polyomavirusinfektion sowie die klinisch sehr ähnlich in Erscheinung tretende Befiederungsstörung, die durch ein Circovirus hervorgerufen wird und Psittacine Beak and Feather Disease Virus (PBFDV) genannt wird.

In dieser Arbeit wird erstmals über Untersuchungen zur Immunprophylaxe der Polyomavirusinfektion mittels VLP, die von ZIELONKA (2010) gentechnisch hergestellt wurden, berichtet.

Zur Wertbemessung der experimentell induzierten Immunität beim Wellensittich dienten folgende Kriterien: (i) lokale und systemische Verträglichkeit des Impfstoffes, (ii) mittels Virusneutralisationstest im zirkulierenden Blut der adulten Wellensittiche nachweisbare Antikörper, (iii) Detektion neutralisierender Antikörper im Dotter der von den geimpften

5 Diskussion

Wellensittichhennen gelegten Eier, (iv) Nachweis des Transfers von Antikörpern in der Blutzirkulation der aus den Eiern geschlüpften Nestlinge und (v) Nachweis von Grad und Dauer der kloakalen Ausscheidung des für die Belastungsinfektion verwendeten Testvirus von geimpften adulten Wellensittichen und deren Nachkommen.

Die erarbeiteten Daten wurden statistischen Analysen unterzogen, wobei der t-Test und die Varianzanalyse (ANOVA) mit Dunnett post hoc test verwendet wurden.

5.1 Eignung der Wellensittiche

Wellensittiche sind für die beschriebenen Versuche erforderlich, weil sie die am häufigsten vom aviären Polyomavirus (APV) betroffene Vogelart sind und das bedeutendste Reservoir für das APV darstellen (RITCHIE et al., 1998; JOHNE, 1999).

Da spezifisch pathogen-freie (SPF-) Wellensittiche weltweit nicht zur Verfügung stehen, wurden alle Vögel von einem privaten Züchter erworben, dessen Haltung als vorbildlich zu bezeichnen ist und bei dem der gesamte Wellensittichbestand bisher keinerlei klinische Auffälligkeiten im Sinne einer Polyomavirusinfektion zeigte. Sämtliche für die eigenen Arbeiten eingesetzten Tiere wurden noch im Herkunftsbestand klinisch, serologisch und molekularbiologisch auf die Abwesenheit von APV getestet. Die Abwesenheit von APV gewährleistet, dass nach der Immunisierung mit der VLP-Vakzine keine Kreuzreaktionen von impfstoffinduzierten mit bereits vorhandenen Antikörpern gegen ein Polyomafeldvirus auftraten. Bei den Wellensittichen konnten vor dem Erwerb weder Federveränderungen noch durch APV bedingte Todesfälle festgestellt werden. Das mittels PCR festgestellte Fehlen der kloakalen Ausscheidung von APV gewährleistete außerdem, dass die Vögel sich untereinander nicht anstecken konnten. Obendrein konnten keine Antikörper gegen das Circovirus der Psittacine Beak and Feather Disease Virus (PBFDV) und keine kloakale Virusausscheidung des PBFDV nachgewiesen werden. Daher war bei den Versuchstieren keine durch

PBFDV verursachte Immundepression und somit keine verminderten Immunreaktionen auf die Immunisierung mit den VLP zu erwarten.

Des Weiteren wurden die für die Versuche vorgesehenen Wellensittiche mikrobiologisch, mykologisch und parasitologisch mit negativem Ergebnis untersucht. Durch diese Untersuchungsergebnisse konnte ein mit hoher Wahrscheinlichkeit gesunder eigener Wellensittichbestand aufgebaut werden, der für die angestrebten Untersuchungen gut geeignet war.

Wellensittiche und andere Psittaziden wurden bereits mehrfach, allerdings nur mit geringem Erfolg, für die Evaluation von experimentell hergestellten Impfstoffen zur Prophylaxe von Polyomavirus-bedingten Krankheit verwendet (RITCHIE et al., 1993, PHALEN et al., 1995). Wegen geringer Schutzraten und ausgeprägter unerwünschter Nebenwirkungen erschien es angemessen, weitere Untersuchungen mit einem neuartigen Impfstoff zur Immunprophylaxe, insbesondere hinsichtlich besserer Wirksamkeit und Verträglichkeit durchzuführen.

5.2 Verträglichkeit des Impfstoffes

Beim Einsatz des hier erprobten VLP-Impfstoffes konnte eine klinische Beeinträchtigung der geimpften adulten Wellensittiche nicht festgestellt werden. Auch die Wellensittichküken von zuvor immunisierten Wellensittichhennen zeigten klinisch einschließlich der Zunahme der Körpermassen keine signifikanten Unterschiede zu ungeimpften Wellensittichküken. Hierin unterscheidet sich die VLP-Vakzine hinsichtlich bisher erprobter Inaktivatvakzinen, die auch ohne den Zusatz von Adjuvanzen Nebenwirkungen hervorriefen (RITCHIE et al., 1996). Allerdings erwies sich bei verschiedenen Papageienarten nach Angaben von RITCHIE et al. (1998) eine Inaktivatvakzine aus einem Polyomafeldvirus mit Aluminiumhydroxidgel als Adjuvanz als gut verträglich und wirksam. Diese Vakzine wurde aber bisher nicht an Wellensittichen, dem Reservoir des APV, getestet.

5.3 Antikörperbildung bei geimpften Wellensittichhennen

Da nach der 1. Immunisierung mit der VLP-Vakzine nur 50 % der Tiere aus der 30 µg-Gruppe und lediglich 62,5 % der Vögel aus der 120 µg-Gruppe niedrige Antikörpertiter zeigten, wurde die Erstimmunisierung mit beiden Dosierungen wiederholt. Nach der 2. Immunisierung konnten zwar bei allen Wellensittichhennen messbare Antikörper mittels VNT detektiert werden, die Titer waren jedoch immer noch niedrig. Erst nach der 3. Immunisierung mit 120 µg VLP stiegen die Antikörpertiter deutlich an.

Interessanterweise konnten in der 30 µg VLP-Antigen-Gruppe ein gleichmäßig ansteigender durchschnittlicher Antikörpertiter bestimmt werden, wohingegen in der 120 µg VLP-Antigen-Gruppe der durchschnittliche Titer neutralisierender Antikörper aller Tiere nach der 2. Immunisierung ($\log_2 = 2,875$) etwas niedriger war als nach der 1. Impfung ($\log_2 = 3,2$). Nach der 3. Immunisierung stieg der Titer allerdings auf den höchsten bisher erreichten Wert von durchschnittlich $\log_2 = 5,75$.

In der 30 µg Impfgruppe reagierten zudem 3 Hennen und in der 120 µg Impfgruppe 1 Henne kaum auf die 3 Immunisierungen.

Eine direkt proportionale Beziehung zwischen der Zahl der durchgeführten Impfstoffinjektionen und der Höhe der Antikörpertiter konnte nicht festgestellt werden. Auch die Werte der Antikörpertiter waren zwischen der 30 µg- und 120 µg-Gruppe statistisch nicht signifikant verschieden.

Bisher liegen noch keine Publikationen vor, die eine direkt proportionale Beziehung zwischen der Höhe der gemessenen Serumantikörpertiter und den erzielten Schutzraten nach experimenteller Infektion beweisen könnten. Folglich kann hier nur die zeitliche Kinetik der Antikörper in adulten und Vögeln beschrieben werden.

Da die 12 ungeimpften, adulten Wellensittiche während der gesamten Versuchsdauer keine klinischen Auffälligkeiten aufwiesen und die regelmäßigen Kontrollen auf BFDV und PBFDV in Blut- und Kloakentupferproben negativ ausfielen, konnte bewiesen werden, dass keine unbeabsichtigte Infektion und damit Verfälschung der Ergebnisse vorlagen.

5 Diskussion

Auf die Zucht mit den 2 ungeimpften Hennen wurde hier verzichtet, da ein Nachweis von maternalen Antikörpern gegen APV Feldvirus bei Küken dieser Tiere nicht zu erwarten war. Da diese beiden Hennen keine APV-spezifischen Antikörper gegen Feldvirus im Blutserum aufwiesen, konnte eine Übertragung von maternalen Antikörpern auf deren Küken ausgeschlossen werden. Alternativ hätte auch mit diesen 2 Hennen gezüchtet werden können, um den Eidotter von unbefruchteten Eiern bzw. das Blutserum derer Küken mittels VNT auf maternale Antikörper gegen APV zu testen.

5.4 Antikörpertiter im Dotter geimpfter Hennen

Weil zu erwarten ist, dass vom zirkulierenden Blut der Hennen virusneutralisierende Antikörper in den Dotter der Eier und nachfolgend auf die Küken übertragen werden, kommt dem Nachweis von Antikörpern im Dotter eine besondere Bedeutung bei der Etablierung einer Schutzfunktion zu. PHALEN et al. (1995) konnten bereits im Eidotter von geimpften Wellensittichhennen Antikörper gegen APV nachweisen. Diese Aussage wurde durch die eigenen Ergebnisse bestätigt.

Nach der Immunisierung mit der VLP-Vakzine konnten mit beiden Impfstoffdosierungen maternale Antikörper im Eidotter bei der Mehrzahl aller untersuchten Eier nachgewiesen werden. Dabei konnten in der Gruppe von Wellensittichhennen, die mit 120 µg VLP-Antigen geimpft wurden, in Eidottern mehr neutralisierende Antikörper gegen APV detektiert werden als in der Gruppe, die mit 30 µg VLP-Antigen geimpft wurden. Auch die durchschnittlichen Antikörpertiter waren in der 120 µg VLP-Gruppe höher als in der 30 µg VLP-Gruppe. Dies lässt erwarten, dass mit der höheren Impfdosis eine höhere Wahrscheinlichkeit besteht, dass protektive Antikörper aus der Blutzirkulation der Hennen über den Eidotter in die Küken gelangen und diese vor einer APV-Infektion in den ersten Lebenstagen, dem Zeitraum mit der höchsten Mortalität aufgrund akuter APV-Infektion, schützen. Allerdings waren in der Mehrzahl der Dotterproben beider Gruppen nur niedrige Antikörpertiter zu detektieren.

5.5 Maternale Antikörper im Blutserum der Küken

Im Blutserum der 3 Tage alten Küken konnte nur bei je einem Tier pro Impfgruppe ein niedriger Antikörpertiter von $\log_2 = 3$ festgestellt werden. Möglicherweise waren zu diesem Zeitpunkt die Antikörper mittels Abbau in der Leber und Verdünnung durch das enorm rasche Wachstum der Küken bereits unter die Spezifitätsgrenze abgesunken. Schon 1995 versuchten PHALEN et al. vergeblich, von der Mutterhenne weitergegebene neutralisierende Antikörper in der Blutzirkulation von Küken, die bereits 5 Tage alt waren, nachzuweisen.

Eintägige Wellensittichnestlinge wiegen weniger als 1 Gramm, sie steigern aber ihre Körpermasse innerhalb von nur vier Wochen auf 38 bis 54,9 Gramm (VINS, 1993). Dem enormen Wachstum der Küken geschuldet, wurde in dieser Arbeit Blut schon von 3 Tage alten Küken entnommen, um eine Verdünnung der in der Blutzirkulation vorhandenen Antikörper zu vermeiden. Darüber hinaus wurde hiermit umgegangen, dass die Antikörper von der Kükenleber eliminiert werden. Da der Dottersackinhalt von Wellensittichküken erst nach dem 2. Lebenstag aufgebraucht ist, wurde der 3. Lebenstag zur Blutentnahme gewählt, um den vermuteten höchst möglichen Antikörpertiter in der Blutzirkulation der Küken zu erreichen. Alternativ hätte Blut schon bei frisch geschlüpften (Tag des Schlupfes) Küken entnommen werden müssen, um zu vermeiden, dass Antikörper in den Folgetagen von der Kükenleber verstoffwechselt bzw. eliminiert werden und durch das enorme Wachstum und die Zunahme des Blutvolumens nicht mehr nachweisbar sind.

Darüber hinaus waren in den Dotterproben unbefruchteter Eier nur niedrige neutralisierende Antikörpertiter zu detektieren. Hierdurch und durch oben genannte Gründe ist es naheliegend, dass daher nur wenige Antikörper vom Eidotter in das Küken gelangen.

Zu bedenken ist ebenfalls, dass wegen der sehr kleinen entnehmbaren Blutmengen der nur wenige Gramm wiegenden Nestlinge erst ab einer Verdünnung von 1 : 4 das Blutserum untersucht werden konnte.

5.6 Gewichtsentwicklung von Wellensittichküken

Als Indiz für die Verträglichkeit des Impfstoffes nach der Immunisierung der Wellensittichhennen und die Belastung durch die Infektion der Küken mit BFDV-5 wurde die Gewichtsentwicklung der Küken herangezogen.

Allerdings ist hierbei zu beachten, dass die Tageszunahmen der Nestlinge durch viele Faktoren beeinflusst werden können. Hierzu gehören Art der Haltung, Klima, Jahreszeit, Futter, Alter und Gesundheitsstatus der Elterntiere und die Größe des Geleges. Daher sind unterschiedliche Zunahmen auch bei gesunden Küken und Jungtieren von ungeimpften Elterntieren festgestellt worden (VINS, 1993). Allerdings zeigen die Einzel- und Mittelwertabweichungen weder nach der Impfung noch nach der Infektion signifikante Unterschiede zwischen den Kükenversuchsgruppen.

5.7 Eignung des eingesetzten APV-Isolats BFDV-5

BFDV-5 wurde von ENDERS et al. (1997) aus einem akut erkrankten und gestorbenen Orangeköpfchen (*Agapornis pullarius*) isoliert und als ein aviäres Polyomavirus identifiziert und charakterisiert (JOHNE und MÜLLER, 1998). Dieses Isolat ist für die Herstellung der VLP, die die Grundlage für den bei dieser Arbeit verwendeten APV-Impfstoff bildeten, verwendet worden (ZIELONKA, 2010). Ferner wurde BFDV-5 auch als infektiöses Virus für die VNTs und die Belastungsversuche verwendet.

Als nachteilig für die Belastungsversuche hätte sich erweisen können, dass die Anzahl der Zellkulturpassagen des verwendeten BFDV-5 nicht bekannt war. Da durch eine häufige Passage des Ausgangsvirus in der Zellkultur die Virulenz abgeschwächt werden könnte, hätte das Isolat nach Infektion der Vögel keine oder nur stark abgeschwächte Symptome verursachen können. Dies hätte die Aussage über die Wirksamkeit des VLP-Impfstoffes nachhaltig verfälschen können. Allerdings konnte bei ungeimpften und mit 30 µg-VLP geimpften Vögeln nach der Infektion eine deutlich höhere Virusausscheidung als bei Wellensittichen, die mit 120 µg VLP immunisiert worden waren beobachtet werden.

Vor allem die Tatsache, dass einige Küken nach der Belastungsinfektion APV-typische Symptome zeigten, starben oder Federmissbildungen entwickelten, belegt die noch vorhandene Virulenz und damit die Eignung des verwendeten BFDV-5-Isolats für alle eigenen Untersuchungen einschließlich der Neutralisationstests und der Belastungsinfektion.

5.8 Kloakale Virusausscheidung und Viruspersistenz in Organen der adulten Wellensittiche nach der Belastungsinfektion

Die Infektion der Vögel wurde 6 Monate (vgl. 3.2.14 und 4.5) nach der letzten Immunisierung innerhalb eines Untersuchungszeitraums von 70 Tagen durchgeführt, um herauszufinden, ob nach einem halben Jahr noch eine signifikant verringerte Virusausscheidung im Untersuchungszeitraum beobachtet werden kann. Des Weiteren konnten die Küken der Immunisierungsstudie nicht zeitgleich für die Infektionsstudie verwendet werden, da die Infektion die Höhe der Antikörpertiter im Blutserum der Küken vermutlich verändert hätte. Die Küken konnten darüber hinaus auch nach der Beendigung des Immunisierungsabschnittes nicht mehr infiziert werden, weil sie bereits zu alt für die Infektionsstudie waren. Entscheidend für die Ausprägung des Krankheitsbildes ist das Alter der Vögel bei der ersten Infektion. Nach experimentellen Infektionen von Wellensittichen zwischen dem 3. und 10. Lebenstag sterben die Nestlinge, während andere, die am 25. Lebenstag infiziert wurden, klinisch unauffällig bleiben (KRAUTWALD et al., 1989). Daher hatte die Infektion mit APV bei jungen Nestlingen zu erfolgen. Andererseits hätte die Testinfektion unmittelbar nach der Immunisierung der 16 Hennen stattfinden können, da zu diesem Zeitpunkt der höchste Impfschutz bei adulten Vögeln und Jungtieren zu erwarten gewesen wäre.

Bei keinem der ungeimpften und nicht infizierten adulten Kontrolltiere konnte im Untersuchungszeitraum von 70 Tagen eine Virusausscheidung festgestellt werden. Keiner der infizierten Vögel schied am Tag der Infektion (d 0) kloakal das Testvirus aus. Dies bestätigt, dass nur Wellensittiche aus einem APV-freien Bestand für die eigenen

5 Diskussion

Untersuchungen ausgewählt wurden. Auch die versehentliche Kontamination und Infektion der Versuchstiere mit APV während der eigenen Tierhaltung kann hiermit ausgeschlossen werden.

Innerhalb dieser 70 Tage zeigten die infizierten Hennen, die dreimal mit 120 µg VLP-Antigen geimpft und dann testifiziert worden waren eine signifikant ($p < 0,001$; vgl. Abbildung 14 und 15, Tabelle 18) niedrigere kloakale Testvirusausscheidung als die Vögel der Vergleichsgruppen (ungeimpft und 30 µg Antigen).

Ein Todesfall mit APV-Nachweis in der Kloake trat nur in der 30 µg VLP-Antigen-Gruppe am Tag 15 nach der Infektion auf, was auf eine zu niedrige Impfdosis und dadurch auf einen ungenügenden Impfschutz schließen lässt.

Darüber hinaus wurde in der 120 µg Gruppe nur bei 37,5% der Vögel in gepoolten Organproben mittels PCR APV gefunden, wohingegen bei nicht immunisierten und mit 30 µg immunisierten Wellensittichen jeweils bei allen (100 %) Virus detektiert wurde.

5.9 Kloakale Virusausscheidung und Symptome der Wellensittichküken

Küken, die nach 6 Monaten Wartezeit geschlüpft waren, wurden in einem Untersuchungszeitraum von 49 Tagen nach Infektion auf die kloakale Virusausscheidung getestet.

Küken der mit 120 µg Antigen geimpften Hennen zeigten keine signifikant niedrigere Virusausscheidung als die Küken der ungeimpften und mit 30 µg Antigen geimpften Muttertiere. Außerdem starb auch in der 120 µg Gruppe ein Küken mit Federmissbildungen. Allerdings konnte bei Küken von ungeimpften Muttertieren 3 Todesfälle im Alter von ca. 2 Wochen beobachtet werden. Ein Küken der 30 µg Impfgruppe starb bereits 6 Tage nach der Infektion. Allerdings schied kein Küken dieser (30 µg) Gruppe an den untersuchten Tagen kloakal Virus aus.

Aufgrund des fehlenden Nachweises maternaler Antikörpertiter in der Blutzirkulation der Küken konnte auch durch diese Untersuchungen nicht

gesichert nachgewiesen werden, dass protektive maternale Antikörper in ausreichender Menge mit dem Eidotter auf das Küken übertragen werden. Auch die Wägung der infizierten Wellensittichküken ergab keine signifikant unterschiedliche Entwicklung der Körpermassen.

Möglicherweise werden Küken besser vor einer APV-Infektion geschützt, wenn Wellensittichhennen unmittelbar vor der Zucht mit höheren Antigen-dosen ($> 120 \mu\text{g}$) immunisiert werden. Zusätzlich sollte dieser Vakzine ein Adjuvanz (z.B. Aluminiumhydroxidgel, vgl. Tabelle 3) beigemischt werden.

5.10 Histologisch-pathologische Untersuchungen

Bei den histologisch-pathologischen Untersuchungen konnten weder bei ungeimpften noch bei geimpften Vögeln nach der Belastungsinfektion Veränderungen an den untersuchten Leber, Nieren und Milzen erkannt werden. Es wurden keine intranukleäre Einschlusskörperchen in Hepatozyten, und Epithelien der Nierentubuli von Wellensittichen nachgewiesen (LATIMER et al., 1993; PHALEN et al., 1991).

Auch die in der Literatur beschriebenen Veränderungen der Niere infolge vermuteter Autoimmunreaktionen (PHALEN et al., 1992; GERLACH et al., 1998; SANDMEIER et al., 1999) wurden nicht vorgefunden. Allerdings wurden die Präparate nicht mit Schiff'scher Base angefärbt. Möglicherweise hätten Untersuchungen der Monozyten im Blut Veränderungen gezeigt, wie sie schon bei APV-Infektionen von anderen Psittaziden vorgefunden worden waren (PHALEN et al., 1992).

5.11 Fazit

Die Ergebnisse geben Aufschluss darüber, dass auch nach 3 Immunisierungen mit der VLP-APV-Vakzine bei geimpften Wellensittichhennen teilweise nur niedrige Antikörpertiter in der Blutzirkulation festgestellt werden konnten. Auch im Eidotter unbefruchteter Eier waren häufig nur niedrige Antikörpertiter zu detektieren, was erklärt, dass im Serum von 3 Tage alten Küken der geimpften Hennen keine protektiven maternalen Antikörper gegen APV

5 Diskussion

nachgewiesen werden konnten. Daher starben auch Küken von geimpften Hennen nach einer APV-Infektion.

Die Ergebnisse geben weiterhin Aufschluss darüber, dass im Untersuchungszeitraum von 70 Tagen 6 Monate nach der Immunisierung mit der 120 µg VLP-Vakzine, die Anzahl der kloakalen Virusausscheider adulter Wellensittichhennen nach einer Infektion signifikant (vgl. Abbildung 14 und 15, Tabelle 18) verringert werden konnte.

Allerdings waren in meinen Versuchen hierzu 3 Vakzinationen pro Vogel notwendig. Dies könnte in der Praxis dazu führen, dass Wellensittichzüchter und –halter die Vakzine nur schlecht akzeptieren.

Durch die signifikant verminderte kloakale Virusausscheidung infizierter, adulter Wellensittiche nach einer Vakzination mit 120 µg Antigen könnte die Verbreitung von APV unter Wellensittichbeständen zwar nicht verhindert, aber verringert werden.

Darüber hinaus könnte eine Immunisierung von Wellensittichen mit einer noch höheren Antigendosis (> 120 µg) und der zukünftigen Verwendung eines Adjuvanz (z.B. Aluminiumhydroxidgel, vgl. Tabelle 3) die kloakale Virusausscheidung noch weiter verringern oder verhindern und somit Verbreitung und Ansteckung von APV unter Wellensittichbeständen vermieden werden. Weiterhin könnte hierdurch der Antikörpertiter geimpfter, adulter Wellensittiche erhöht werden und dieser möglicherweise zu einer messbaren Erhöhung protektiver, maternaler Antikörper im Eidotter und in der Blutzirkulation der Küken führen.

Da viele Papageien- und Vogelarten von einer APV-Infektion betroffen sein können und in vielen Wellensittichbeständen weitere Psittaziden und auch andere Zier- und Wildvögel gehalten werden, ist eine Immunisierung von anderen Papageien- und ggf. auch Vogelarten als sinnvoll zu erachten. Letztendlich könnte hierdurch nicht nur die Verbreitung von APV eingedämmt werden, sondern auch die Infektion anderer, auch seltener und vom Aussterben bedrohter, Vögel verhindert werden.

6 Zusammenfassung

In der ausführlichen Literaturübersicht werden Geschichte und Biologie der Wellensittichhaltung und –zucht dargelegt, sowie sämtliche Aspekte einer spontanen und experimentellen Infektion von Wellensittichen und anderen für aviäres Polyomavirus (APV) empfänglichen Vogelarten beschrieben. Auch die Eigenschaften des APV und Fragen der Diagnostik und Differenzialdiagnostik werden detailfreudig dargestellt. Darüber hinaus wird auf die Immunisierung von Vögeln mit Schwerpunkt auf Vakzinen zum Schutz gegen APV eingegangen. Die Entwicklung und Funktion des Immunsystems der Vögel und deren Berücksichtigung bei Immunisierungsversuchen werden erörtert.

Im experimentellen Teil dieser Arbeit werden Versuche zur Immunisierung von adulten Wellensittichen mit 2 Dosierungen (30 und 120 µg je Tier) in einer wässrigen Suspension von virus-like particles (VLP) dargestellt. Die VLP bestehen aus dem Strukturprotein VP1 und wurden von einer Arbeitsgruppe am Institut für Virologie, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig aus einem APV-Isolat generiert (ZIELONKA, 2006) und mir für die eigenen Versuche freundlicherweise überlassen. Das für die Herstellung der VLP, die VNTs und für die Belastungsinfektion verwendete APV-Isolat BFDV-5 stammt ursprünglich aus einem Orangeköpfchen (*Agapornis pullarius*), das von ENDERS et al. (1997) isoliert worden war.

Als Kriterien zur Wertbemessung der angestrebten Immunität dienten die klinisch festgestellte lokale und systemische Verträglichkeit des Impfstoffes, die im Virusneutralisationstest gemessene Serokonversion bei geimpften adulten Wellensittichen, der Grad der Reduzierung der kloakalen Ausscheidung des Testvirus, die Messung der APV-Antikörper im Dotter aus Eiern geimpfter Wellensittichhennen sowie die Häufigkeit der maternalen Antikörper im Blut der Nestlinge. Die mit 30 oder 120 µg VLP geimpften sowie die nicht geimpften Wellensittiche wurden einer intramuskulären Testinfektion mit BFDV-5 unterzogen (ENDERS et al., 1997).

Die Impfung adulter Wellensittiche mit VLP erwies sich als gut verträglich, führte bei der überwiegenden Zahl der Impfungen zur Serokonversion, zum Transfer maternalen Antikörper in den Eidotter, aber nur auf einzelne Nestlinge in sehr niedrigen Titern. Die Immunisierung mit 120 µg VLP führte zu einer signifikant verringerten kloakalen Ausscheidung des Testvirus. Die Dauer eines Schutzes durch VLP konnte im Rahmen dieser Arbeiten noch nicht bestimmt werden. Demzufolge wird die Fortsetzung der Arbeiten mit VLP empfohlen. Auch Studien zur Verstärkung der Immunantwort der adulten Wellensittiche mit einem potenten Adjuvanz sollten zukünftig noch durchgeführt werden.

7 Summary

KRAUT, STEFFEN. Clinical evaluation of applicability of virus-like particles (VLP) as a vaccine against Budgerigar Fledgling Disease of budgerigars (*Melopsittacus undulatus* SHAW, 1805)

In a detailed review of the scientific literature, history and biology of budgerigar husbandry and breeding are presented and all relevant aspects of spontaneous and experimental infections of budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) and other birds that are susceptible to avian polyomaviruses (APV) are described. Inherent properties of APV and questions relating to diagnostics and differential diagnostics are detailed.

Moreover immunisation of birds with emphasis on vaccines for protection against APV is reacted to.

Also, the development and function of the avian immune system and its importance for attempts to induce protective immunity are outlined.

The experimental part of this study is focused on immunisation of adult budgerigars using two doses of virus-like particles (VLP), containing the structural protein VP1 in an aqueous solution (30 and 120 µg per bird). The VLP were generated by ZIELONKA (2006) within a working group in the Institute of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, Leipzig (Germany) from an APV isolate and were kindly provided for my studies. For generation of VLP, VNTs and challenge APV isolate BFDV-5 was used which was originally isolated from a diseased Orange-faced Lovebird (*Agapornis pullarius*) by ENDERS et al. (1997).

The criteria for the evaluation of the desired immunity were the clinically determined innocuity, the absence of local and systemic undesirable side effects, the measured seroconversion in vaccinated adult budgerigars as determined in virusneutralisation tests, the degree of reduction of cloacal shedding of the challenge virus, the measurement of APV-directed antibodies in yolk of eggs produced by vaccinated hens and the frequency of maternal antibodies in the blood circulation of nestlings.

7 Summary

The budgerigars vaccinated with 30 or 120 µg VLP, not vaccinated birds and chicks of vaccinated and not vaccinated birds were all challenged with intramuscular injection of BFDV-5.

The vaccination of adult budgerigars, using both dosages, was well tolerated and the formation of circulating antibodies was seen in most of the birds. Transfer of maternal antibodies from parents to the yolk sac and to very few nestlings in very low titers was demonstrated. Cloacal shedding of testvirus was significantly decreased in adult birds vaccinated with 120 µg VLP.

The duration of circulation of maternal antibodies and the level of protection was not yet determined in this study. Consequently, the continuation of this work on VLPs is suggested. Also, studies on further enhancement of the obtained immunity by incorporation of an effective adjuvans to the VLP vaccine is recommended.

8 Literaturverzeichnis

- ABREY, A. (1984): Summary of avian post mortems of Allerton laboratory in the Natal Area of South Africa during the last 18 month. Newsletter of Association of Avian Veterinarians **5**, 98-99.
- ALLANDER, T., ANDREASSON, K., GUPTA, S., BJERKNER, A., BOGDANOVIC, G. und PERSSON, M. A. (2007): Identification of a third human polyomavirus. Journal of Virology **81**, 4130-4136.
- ALEXANDER, D. J. (1997): Newcastle disease and other avian paramyxoviridae infections. In: Calnek, B. W. (ed.). Diseases of poultry, 10th ed., Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. S. 541-569.
- BECK-SCHILDWÄCHTER, I. (2003): *In-ovo-* und *in-vivo*-Untersuchungen zur Verträglichkeit und Wirksamkeit von sieben ausgewählten Adjuvanzen zur Herstellung eines Paramyxovirus-3-Impfstoffes für australische und afrikanische Sittiche, Veterinärmedizinische Dissertation, Universität Gießen.
- BECKER, J. C., HOUBEN, R., UGUREL, S., TREFEZER, U., PFÖHLER, C. und SCHRAMA, D. (2009): MC polyomavirus is frequently present in Merkel cell carcinoma of European patients. Journal of Investigative Dermatology **129**, 248-50.
- BENNEWITZ, D. (1988): Zur Immunprophylaxe der Paramyxovirus-3-Infektion bei Wellensittichen und Kanarien. Veterinärmedizinische Dissertation, Universität Gießen.
- BERNÁTH, S., FARSANG, A., KOVACS, A., NAGY, E. und DOBOS-KOVACS, M. (2006): Pathology of goose haemorrhagic polyomavirus infection in goose embryos. Avian Pathology **35**, 49-52.
- BERNIER, G., MORIN, M. und MARSOLAIS, G. (1981): A generalized inclusion body disease in the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*) caused by a papova-like agent. Avian Diseases **25**, 1083-1092.
- BERNIER, G., MORIN, M. und MARSOLAIS, G. (1984): Papovavirus induced feather abnormalities and skin lesions in the budgerigar: clinical and pathological findings. The Canadian Veterinary Journal **25**, 307-310.
- BONNE, N., SHEARER, P., SHARP, M., CLARK, P. und RAIDAL, S. (2009): Assessment of recombinant beak and feather disease virus capsid protein as a vaccine for psittacine beak and feather disease. Journal of General Virology **90**, 640-647.

- BÖNNER, B., KÖHLER, K., REICHEL, U., BECK, I., JÄGER, S., BARBEITO, J., REDMANN, T. und KALETA, E. F. (2003): Undesirable reactions of domestic pigeons to vaccinations against paramyxovirus type 1. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* **110**, 403-406.
- BOZEMAN, L. H., DAVIS, R. B., GAUDRY, D., LUKERT, P. D., FLETCHER, O. J. und DYKSTRA, M. J. (1981): Characterisation of a papovavirus isolated from fledgling budgerigars. *Avian Diseases* **25**, 972-980.
- COLE, C. N. (1996): Polyomavirinae: The viruses and their replication. In: B. N. Fields, D. Knipe, M. Howley und Fields, P. M. (eds.). *Virology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa., pp. 1997-2025.
- CLUBB, S. L. und DAVIS, R. B. (1984): Outbreak of a papova-like viral infection in a psittacine nursery – a retrospective view. *Proceedings of the International Conference on Avian Medicine, Association of Avian Veterinarians, Toronto*, pp. 121-130.
- DAUBNEY, R., MANSI und W. ZAHARAN, G. (1949): Vaccination against fowl plague. *Journal of Comparative Pathology, Therapeutics* **59**, 1-18.
- DAVIS, R. B., BOZEMAN, L. H., GAUDRY, D., FLETCHER, O. J., LUKERT, P. D. und DYKSTRA, M. J. (1981): A viral disease of fledgling budgerigars. *Avian Diseases* **25**, 179-183.
- DAVIS, R. B. (1983): Budgerigar fledgling disease (BFD). *Proceedings of the 32nd Western Poultry Disease Conference, Davis, Cal.*, p. 104.
- DAVIS, R. B., LUKERT, P. D. und AVERY, P. (1984): An update on budgerigar fledgling disease (BFD). *Proceedings of the 33rd Western Poultry Disease Conference, Davis, Cal.*, pp. 96-98.
- DAVISON, T. F. (1996): Cell-mediated immunity: effector functions. *Poultry Science Symposium Series* **24**, 114-134.
- DIXON, W. J. (1993): *BMPD statistical software manual. Vol. 2*, University of California Press, Berkeley, Los Angeles
- DOHERTY, P. C. und AHMED, R. (1997): Immune response to viral infection. In: NATHANSON, N (ed.). *Viral pathogenesis*. Lippincott-Raven, Philadelphia, USA, pp. 143-161.
- DYKSTRA, M. J. und BOZEMAN, L. H. (1982): A light and electron microscopic examination of budgerigar fledgling disease virus in tissue and in cell culture. *Avian Pathology* **11**, 11-18.
- DYKSTRA, M. J., DYKSTRA, C. C., LUKERT, P. D. und BOZEMAN, L. H. (1984): Investigations of budgerigar fledgling disease virus. *American*

Journal of Veterinary Research **45**, 1883-1887.

- ENBERGS, H. (2005): Bedeutung von Interferon- γ als Schlüsselzytokin bei immunologischen Prozessen. *Biologische Tiermedizin* **22**, 6-10.
- ENDERLEIN, D. (2013): Untersuchungen zur Struktur und Funktion des akzessorischen Strukturproteins VP4 bei obligat pathogenen Polyomaviren. Dissertation, Fakultät Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie, Universität Leipzig.
- ENDERS, F., GRAVENDYCK, M., GERLACH, H. und KALETA, E. F. (1997): Fatal avian polyomavirus infection during quarantine in adult wild-caught red-faced lovebirds (*Agapornis pullaria*). *Avian Diseases* **41**, 496-498.
- ERF, G. F. (2004): Cell-mediated immunity in poultry. *Poultry Science* **83**, 580-590.
- ERHARD, M. H., SCHMIDT, P., ZINSMEISTER, P., HOFMANN, A., MÜNSTER, U., KASPERS, B., WIESMÜLLER, K. H., BESSLER, W. G. und STANGASSINGER, M. (2000): Adjuvant effect of various lipopolypeptides and interferon- γ on the humoral immune response of chickens. *Poultry Science* **79**, 1264-1270.
- EVERETT, B. S. und SHRONDAL, A. (2010) *The Cambridge Dictionary of Statistics*, 4e, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- FORSHAW, D., WYLIE, S. L. und PASS, D. A. (1988): Infection with a virus resembling papovavirus in Gouldian finches (*Erythura goldiae*). *Australian Veterinary Journal* **65**, 26-28.
- FRISQUE, R. J., BARBANTI-BRODANO, G., CRAWFORD, L. V., GARDNER, S. D., HOWLEY, P. M., ORTH, G., SHAH, K. V., VAN DER NOORDAA, G. und ZUR HAUSEN, H. (1995): *Papovaviridae*. In: A. Murphy, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martell, M. A. Mayo und Summers, M. D. (eds.). *Virus Taxonomy*, Eighth Report of the Committee on Taxonomy of Viruses. Springer Verlag, Wien, Austria, pp. 136-142.
- GARCIA, A. M., LATIMER, K. S., NIAGRO, F. D., NORTON, T. M., CAMPAGNOLI, R. P., HARMON, B. G., HOWERTH, E. W. und RITCHIE, B. W. (1994): Diagnosis of polyomavirus infection in seedcrackers (*Pyrenestes sp.*) and blue bills (*Spermophaga haematina*) using DNA in situ hybridisation. *Avian Pathology* **23**, 525-537.
- GARNESKI, K. M., WARCOLA, A. H., FENG, Q., KIVIAT, N. B., LEONHARD, J. H. und NGHIEM, P. (2009): Merkel cell polyomavirus is more frequently

- present in North American than Australian Merkel cell carcinoma tumors. *Journal of Investigative Dermatology* **129**, 246-248.
- GASKIN, J. M. (1989): Psittacine viral diseases: a perspective. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **20**, 249-264.
- GAYNOR, A. M., NISSEN, M. D., WHILEY, D. M., MACKAY, I. M., LAMBERT, S. B. und WU, G. (2007): Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathogens* **4**, e64.
- GEDVILAITE, A., FROMMEL, C., SASNAUSKAS, K., MICHEEL, B., OZEL, M., BEHSING, O., STANIULIS, J., JANDRIG, B., SCHERNECK, S. und ULRICH, R. (2000): Formation of immunogenic virus-like particles by inserting epitopes into surface-exposed regions of hamster polyomavirus major capsid protein. *Virology* **273**, 21-35.
- GEDVILAITE, A., DORN, D.C., SASNAUSKAS, K., PECHER, G., BULAVAITE, A., LAWATSCHECK, R., STANIULIS, J., DALIANIS, T., RAMQVIST, T., SCHONRICH, G., RAFTERY, M.J. und ULRICH, R. (2006b): Virus-like particles derived from major capsid protein VP1 of different polyomaviruses differ in their ability to induce maturation in human dendritic cells. *Virology* **354**, 252-260.
- GELFI, J., PAPPALARDO, M., CLAVERYS, C., PERALTA, B. und GUERIN, J. L. (2010): Safety and efficacy of an inactivated carbopol-adjuvanted goose haemorrhagic polyomavirus vaccine for domestic geese. *Avian Pathology* **39**, 111-116.
- GERLACH, H. (1994): Defence mechanisms of the avian host. In: B. W. Ritchie, G. J. Harrison und Harrison, L. R. (eds.). *Avian Medicine. Zoological Education Network*, pp. 109-120.
- GERLACH, H., ENDERS, F., CASARES, M., MÜLLER, H., JOHNE, R. und HÄNICHEN, T. (1998): Membranous glomerulopathy as an indicator of avian polyomavirus infection in Psittaciformes. *Journal of Avian Medicine and Surgery* **12**, 248-254.
- GÖBEL, T. W. F. (1996): The t-dependent immune system. In: T. F. Davison, T. R. Morris und Payne, L. N. (eds.). *Poultry Immunology. Poultry Science Symposium Series* **24**, 31-45.
- GOUGH, J. F. (1989): Outbreaks of budgerigar fledgling disease in three aviaries in Ontario. *The Canadian Veterinary Journal* **30**, 672-674.
- GOULD, J. (1840): *The Birds of Australia Vol. 5*. Pub. by the author, London.

- GROENEWOUD, M. J., FAGROUCH, Z., VAN GESSEL, S., NIPHIUS, H., BULAVAITA, A., WARREN, K. S., HEENEY, J. L. und VERSCHOOR, E. J. (2010): Characterization of novel polyomaviruses from Bornean and Sumatran Orang-utans. *Journal of General Virology* **91**, 653-658.
- GUERIN, J. L., GELFI, J., DUBOIS, L., VUILLAUME, A., BOUCRAUT-BARALON, C. und PINGRET, J. L. (2000): A novel polyomavirus (goose hemorrhagic polyomavirus) is the agent of hemorrhagic nephritis enteritis of geese. *Journal of Virology* **74**, 4523-4529.
- GUNDRY, C. N., VANDERSTEEN, J. G., REED, G. H., PRYOR, R. J., CHEN, J., WITWER, C. T. (2003): Amplicon Melting Analysis with Labeled Primers: A Closed-Tube Method for Differentiating Homozygotes and Heterozygotes *Clinical Chemistry March* **49 (3)**, 396-406.
- HAFEZ, H.M. (2011): Infektiöse Erkrankungen. In: E. F. Kaleta und Krautwald-Junghanns, M.-E. (Hrsg.). *Kompendium der Ziervogelkrankheiten*, 4. Aufl., Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG, Hannover. S. 183-286.
- HALAMI, M. Y., DORRESTEIN, G. M., COUTEEL, P., HECKEL, G., MÜLLER, H. und JOHNE, R. (2010): Whole-genome characterization of a novel polyomavirus detected in fatally diseased canary birds. *Journal General Virology* **91** 3016-3022.
- HEENEMANN, K., MÜLLER, H. and VAHLENKAMP, T. W. (2013). Detection of the goose haemorrhagic polyomavirus in wild swans. *Proceedings of the 1st International Conference on Avian, Herpetological and Exotic Mammal Medicine*, Wiesbaden, Germany, pp. 361-363.
- HAMMER, D. K. (1974): The immune system in chickens. *Avian Pathology* **3**, 65-78.
- HANKA, K. (2008): Untersuchungen zum Nachweis von *Macrorhabdus ornithogaster* bei Vögeln der Ordnungen Galliformes, Psittaciformes, Passeriformes, Anseriformes und Columbiformes sowie Versuche zur Anzucht des Erregers der Macrorhabdiose in vitro. Dissertation, Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische, Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- HIRAI, K., NONAKA, H., FUKUSHI, H., SHIMAKURA, S., MASEGI, T. und MIZOGUCHI, T. (1984): Isolation of a papova-like agent from young budgerigars with feather abnormalities. *The Journal of Veterinary Medical Science* **46**, 577-587.
- HOHMANN, C. (2009): Wirbel um Wirkverstärker. *Pharmazeutische Zeitung*

43, 1-3.

- HUNTER, R., GAGNON, A., ONDERKA, D., GOLTZ, J. und HOLMES, B. (1979): Viral hepatitis in budgerigars in Southern Ontario. *The Canadian Veterinary Journal* **20**, 176.
- ICTV (2016): EC 47, London, UK, July; Email ratification 2016 (MSL Nr. 30).
- IMPERIALE, M. J. und MAJOR, E. O. (2007): Polyomaviruses. In: D. M. Knipe und Howley, P. (eds.) *Fields Virology*, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 2263-2298.
- JACOBSON, E. R., HINES, S. A., QUESENBERRY, K., MLADINICH, C., DAVIS, R. B., KOLLIAS, G. V. und OLSEN, J. (1984): Papova-like virus associated diseases of psittacines. *Proceedings International Conference on Avian Medicine, Association of Avian Veterinarians*, pp. 131-132.
- JOHNE, R. und Müller, H. (1998): Avian polyomavirus in wild birds: genome analysis of isolates from Falconiformes and Psittaciformes. *Archives of Virology* **143**, 1501-1512.
- JOHNE, R. (1999): Untersuchungen zur Funktion von Agnoprotein 1a und Agnoprotein 1b des Aviären Polyomavirus (APV). *Veterinärmedizinische Dissertation, Universität Leipzig*.
- JOHNE, R., JUNGSMANN, A. und MÜLLER, H. (2000): Agnoprotein 1a and agnoprotein 1b of avian polyomavirus are apoptotic inducers. *Journal of Genetic Virology* **81**, 1183-1190.
- JOHNE, R. und MÜLLER, H. (2001): Avian polyomavirus agnoprotein 1a is incorporated into the virus particle as a fourth structural protein, VP4. *Journal of General Virology* **82**, 909-918.
- JOHNE, R. und MÜLLER, H. (2004): Nuclear localization of avian polyomavirus structural protein VP1 is a prerequisite for the formation of virus-like particles. *Journal of Virology* **78**, 930-937.
- JOHNE, R. und MÜLLER, H. (2007): Polyomaviruses of birds: Etiologic agents of inflammatory diseases in a tumor virus family. *Journal of Virology* **81**, 11554-11559.
- JOHNE, R., Buck, C. B., Allander, T., Atwood, W. J., Garcea, R. L., Imperiale, M. J., Major, E. O., Ramqvist, T. und Norkin, L. C. (2011): Taxonomical developments in the family Polyomaviridae. *Archives of Virology* **156**, 1627-1634.

- JUNGBÄCK, C., KALETA, E. F. und SIEGMANN, O. (2005): Spezielle Krankheits- und Seuchenvorbeuge. In: O. Siegmann und Neumann, U. (Hrsg.). Kompendium der Geflügelkrankheiten, 6. Aufl., Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG, Hannover. S. 72-79.
- KAECH, S. M., WHERRY, E. J. und AHMED, R. (2002): Effector and memory t-cell differentiation: implications for vaccine development. *Immunology* **2** (4) 251-262.
- KAISER, P. (1996): Avian cytokines. In: T. F. Davison, T. R. Morris und Payne, L. N. (eds.). *Poultry Immunology, Poultry Science Symposium Series* **24**, 84-114.
- KALETA, E. F., SIEGMANN, O., LAI, K. W. und AUSSUM, D. (1977): Kinetik der NDV-spezifischen Antikörper in Hühnern. VI. Elimination maternalen und per injectionem übertragener Antikörper. *Berliner und Münchener Wochenschrift* **90**, 131-134.
- KALETA, E. F., HERBST, W., KAUP, F. J., JANK-LADWIG, R., MARSCHALL, H. J., DROMMER, W. und KRAUTWALD, M.-E. (1984): Untersuchungen zur Virusätiologie einer mit Hepatitis und Befiederungsstörungen einhergehenden Krankheit bei Wellensittich-Nestlingen (*Melopsittacus undulatus*). *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, **31**, 219-224.
- KALETA, E. F. (1997): Epidemiology of avian diseases. *Acta Veterinaria Hungarica* **45**, 267-280.
- KALETA, E. F. (2011): Infektiöse Erkrankungen. In: E. F. Kaleta und Krautwald-Junghanns, M.-E. (Hrsg.). *Kompendium der Ziervogelkrankheiten*, 4. Aufl., Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG, Hannover. S. 183-286.
- KATOH, H., OHYA, K. und FUKUSHI, H. (2008): Development of novel real-time PCR assays for detecting DNA virus infections in psittaciform birds. *Journal of Virological Methods* **154**, 92-98.
- KE, G. M., CHENG, H. L., KE, L. Y., Ji, W. T., CHULU, J. L., LIAO, M. H., CHANG T. J. und LIU, H. J. (2006): Development of a quantitative light cycler real-time RT-PCR for detection of avian reovirus. *Journal of Virological Methods* **133** (1), 6-13.
- KHAN, M. S., JOHNE, R., BECK, I., PAWLITA, M., KALETA, E. F. und MÜLLER, H. (2000): Development of a blocking enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of avian polyomavirus-specific antibodies. *Journal of Virological Methods* **89**, 39-48.
- KOGUT, M. H. (2000): Cytokines and prevention of infectious diseases in

- poultry: a review. *Avian Pathology* **29**, 395-404.
- KOU, Z., ZHANG, Z., CHEN, S., FAN, Z., TANG, S., ZHAO, L. und LI, T. (2008): Molecular characterization of avian polyomavirus isolated from budgerigar in China. *Avian Diseases* **52**, 451-454.
- KRAUTWALD, M.-E. und KALETA, E. F. (1985): Relationship of French moult and early virus induced mortality in nestling budgerigars. Proceedings of the 8th International Congress of the World Veterinary Poultry Association, Jerusalem, Israel, pp. 115.
- KRAUTWALD, M.-E., MÜLLER, H. und KALETA, E. F. (1989): Polyomavirus infection in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*): clinical and aetiological studies. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* **36**, 459-467.
- KRAUTWALD-JUNGHANNS, M.-E. (2011): Infektiöse Erkrankungen. In: E. F. Kaleta und Krautwald-Junghanns, M.-E. (Hrsg.). *Kompendium der Ziervogelkrankheiten*, 4. Aufl., Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG, Hannover. S. 183-286.
- KRUMHOLZ, A., BININDA-EMONS, O. R., WUTZLER, P. und ZELL, R. (2009): Phylogenetics, evolution, and medical importance of polyomaviruses. *Infection, Genetics and Evolution* **5**, 784-799.
- KUMMERFELD, N. (2011): Infektiöse Erkrankungen. In: E. F. Kaleta und Krautwald-Junghanns, M.-E. (Hrsg.). *Kompendium der Ziervogelkrankheiten*, 4. Aufl., Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG, Hannover. S. 183-286.
- LACROUX, C., ANDREOLETTI, O., PAYRE, B., PINGRET, J. L., DISSAIS, A. und GUÉRIN, J. L. (2004): Pathology of spontaneous and experimental infections by Goose haemorrhagic polyomavirus. *Avian Pathology* **33**, 351-358.
- LAFFERTY, S. L., FUDGE, A. M., SCHMIDT, R. E., WILSON, V. G. und PHALEN, D. N. (1999): Avian polyomavirus infection and disease in a Green Aracari (*Pteroglossus viridis*). *Avian Diseases* **43**, 577-585.
- LATIMER, K. S., NIAGRO, F. D. und CAMPAGNOLI, R. P. (1993): Diagnosis of concurrent avian polyomavirus and psittacine beak and feather disease virus infections using DNA probes. *Journal of the Association of Avian Veterinarians* **7**, 141-146.
- LEHN, H. und MÜLLER, H. (1986): Cloning and characterization of budgerigar fledgling disease virus, an avian polyomavirus. *Virology* **151**, 362-370.

- LEMKE, I. (2014): Impfstoffe und Sera für Tiere. Tierärztliche Umschau, Verleger-Beilage zu Tierärztliche Umschau und Kleintiermedizin, 69. Jahrgang, August 2014.
- LESSARD, M., HUTCHINGS, D. und CAVE, N. A. (1997): Cell-mediated and humoral immune responses in broiler chickens maintained on diets containing different levels of vitamin A. Poultry Science **76**, 1368-1378.
- LINNAEUS, CAROLUS (1758): Systema naturae. Regnum animale, editio decima. Sumptibus Guiliemi Engelmann, Leipzig.
- LOWENSTEIN, L. J. (1984): Cockatoo feather disease. Proceedings of the 33rd Western Poultry Disease Conference, 27-29 February, 1984, Davis, California.
- LYNCH, J., SWINTON, J., PETTIT, J. und KEY, D. (1984): Isolation and experimental chicken-embryo-inoculation studies with budgerigar papovavirus. Avian Diseases **28**, 1135-1139.
- MACARTHUR, H. und WALTER, G. (1984): Monoclonal antibodies specific for the carboxy terminus of simian virus 40 large T antigen. Journal of Virology **52**, 483-491.
- MARSHALL, R. (1989): Papova-like virus in a finch aviary. Proceedings of the Association of Avian Veterinarians, Seattle, WA, pp. 203-207.
- MATHEY, W. J. und CHO, B. R. (1984): Tremor of nestling budgerigars with BFD. Proceedings of the 33rd Western Poultry Disease Conference, pp. 102-105.
- MATÓ, T., PÉNZES, Z., RUEDA, P., VELA, C., KARDI, V., ZOLNAI, A., MISÁK, F. und PALYA, V. (2009): Recombinant subunit vaccine elicits protection against goose haemorrhagic nephritis and enteritis. Avian Pathology **38**, 233-237.
- MATTHEW, R. E. F. (1982): Classification and nomenclature of viruses. Fourth Report of the International Committee on taxonomy of viruses. Karger, Basel.
- MATTIL-FRITZ, S., SCHARNER, D., PIUKO, K., THÖNES, N., GISSMANN, L., MÜLLER, H., MÜLLER, M. (2008): Immunotherapy of equine sarcoid: dose-escalation trial for the use of chimeric papillomavirus-like particles. Journal of General Virology **89**, 138-147.
- MAYR, A., BACHMANN, P. A., BIBRACK, B. und WITTMANN, G. (1974): Virologische Arbeitsmethoden, Band 1, Gustav Fischer Verlag, Jena.

- MODROW, S., FALKE, D. und TRUYEN, U. (2003): Polyomaviren. In: S. Modrow, D. Falke und Truyen, U. (eds.). *Molekulare Virologie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, S. 474-491.
- MÜLLER, H. und NITSCHKE, R. (1986): A polyoma-like virus associated with acute disease of fledgling budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Medical Microbiology and Immunology* **175**, 1-13.
- NEUMANN, U. und KALETA, E. F. (1992): Immunsystem und Immunreaktionen. In: Heider G. und Monreal, G. (Hrsg.). *Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels*, Gustav-Fischer-Verlag, Jena, Band II, S. 159-185.
- NIAGRO, F. D., RITCHIE, B. W. und LUKERT, P. D. (1991): Avian polyomavirus: Discordance between neutralizing antibody titres and viral shedding in an aviary. *Proceedings of the Association of Avian Veterinarians*, pp. 22-26.
- NIEMANN, H. (2014): *Wellensittiche: Alles fürs perfekte Zuhause*. Gräfe und Unzer Verlag GmbH, S. 6.
- NORKIN, L. C., ALLANDER, T., BUCK, W. B., GARCEA, R. L., IMPERIALE, M. J., JOHNE, R., MAJOR, E. O. PIPAS, J. M., und RAMQVIST, T. (2012): Family Polyomaviridae. In: A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens und Lefkowitz, E. J. (eds.). *Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp. 279-290.
- OGAWA, H., YAMAGUCHI, T. und FUKUSHI, H. (2005): Duplex shuttle PCR for differential diagnosis of budgerigar fledgling disease and psittacine beak and feather disease. *Microbiology and Immunology* **49**, 227-237.
- PALYA, V., MANICS, É., GLÁVITS, Á.D., MÁTO, T. und ZARKA, P. (2004): Epizootic occurrence of haemorrhagic nephritis enteritis virus infection of geese. *Avian Pathology* **33**, 244-250.
- PASCUCCI, S., MAESTRINI, N., MISCIATELLI, M. E. und GIOVANETTI, L. (1983): Malatti da virus papova-simile nel pappagallino ondulato (*Melopsittacus undulatus*). *Clinica Veterinaria, Milano* **106**, 38-41.
- PASS, D. A., PRUS, S. E. und RIDELL, C. (1987): A papova-like virus infection of splendid parakeets (*Neophema splendida*). *Avian Diseases* **31**, 680-684.
- PHALEN, D. N., WILSON, V. G. und GRAHAM, D. L. (1991): Polymerase chain reaction assay for avian polyomavirus. *Journal of Clinical Microbiology* **29**, 1030-1037.

- PHALEN, D. N., WILSON, V. G. und GRAHAM, D. L. (1992): Avian polyomavirus infection and disease: A complex phenomenon. Proceedings of the Association of Avian Veterinarians, pp. 5-10.
- PHALEN, D. N., WILSON, V. G. und GRAHAM, D. L. (1993): Avian polyomavirus biology and its clinical applications. Proceedings of the European Association of Avian Veterinarians, pp. 200-216.
- PHALEN, D. N., WILSON, V. G. und GRAHAM, D. L. (1994): A practitioner's guide to avian polyomavirus testing and disease. Proceedings of the Association of Avian Veterinarians, pp. 251-258.
- PHALEN, D. N., WILSON, V. G. und GRAHAM, D. L. (1995): Failure of maternally derived yolk IgG to reach detectable concentrations in the sera of nestling budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). Avian Diseases **39**, 700-708.
- PHALEN, D. N., WILSON, V. G., GASKIN, J. M., DERR, J. N. und GRAHAM, D. L. (1999): Genetic diversity in twenty variants of the avian polyomavirus. Avian Diseases **43**, 207-218.
- PHALEN, D. N., RADABAUGH, C. S., DAHLHAUSEN, R. D. und STYLES, D. K. (2000): Viremia, virus shedding, and antibody response during natural avian polyomavirus infection in parrots. Journal of the American Veterinarian Medical Association **217**, 32-36.
- PIPAS, J. M. (1992): Common and unique features of T antigens encoded by the polyomavirus group. Journal of Virology **66**, 3979-3985.
- PORTERFIELD, J. S. (1989). Andrewes' viruses of vertebrates, fifth edition. Baillière Tindall, London, pp. 346-370.
- QUERESHI, M. A. (2003): Avian macrophage and immune response: An overview. Poultry Science **82**, 691-698.
- RAETHEL, H. S. (1973): Krankheiten der Vögel, 3. Auflage. In: Das Vivarium, Franckh'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, S. 58-59.
- RAUTENSCHLEIN, S. und KALETA, E. F. (2005): Prophylaxe – Infektionsabwehr des Vogels. In: Kompendium der Geflügelkrankheiten. Siegmann, O. und Neumann, U. (Hrsg.), 6. Auflage, Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG, S. 68-71.
- REYNOLDS, D. L. und MARAQA, A. D. (2000): Protective immunity against Newcastle disease: The role of cell-mediated immunity. Avian Diseases **44**, 145-154.
- RIRIE, K. M., RASMUSSEN, R. P. und WITTEW, C. T. (1997): Product

- Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry* **245** (2), 154-160.
- RITCHIE, B. W., NIAGRO, F. D., LUKERT, P. D., STEFFENS, W. L. und LATIMER, S. (1989): Characterization of a new virus from cockatoos with psittacine beak and feather disease. *Virology* **171**, 83-88.
- RITCHIE, B. W., NIAGRO, F. D., LATIMER, K. S., PESTI, D., GREENACRE, C. und LUKERT, P. D. (1993): Efficacy of an inactivated avian polyomavirus vaccine. *Journal of the Association of Avian Veterinarians* **4**, 187-192.
- RITCHIE, B. W., NIAGRO, F. D., LATIMER, K. S., PRITCHARD, N., GREENACRE, C., CAMPAGNOLI, R. P. und LUKERT, P. D. (1994): Antibody response and local reactions to adjuvanted avian polyomavirus vaccines in psittacine birds. *Journal of the Association of Avian Veterinarians* **8**, 21-26.
- RITCHIE, B. W. (1995): Polyomaviruses. In: RITCHIE, B. W. (ed.). *Avian viruses – function and control*. Wingers Publishing Inc., Lake Worth, Florida, pp. 136-170.
- RITCHIE, B. W., NIAGRO, F. D., LATIMER, K. S., PRITCHARD, N., CAMPAGNOLI, R. P. und LUKERT, P. D. (1996): An inactivated avian polyomavirus vaccine is safe and immunogenic in various Psittaciformes. *Vaccine* **14**, 1103-1107.
- RITCHIE, B. W., LATIMER, K. S., PESTI, D., CAMPAGNOLI, R. und LUKERT, P. D. (1997): Vaccination to control polyomavirus in budgerigars. *Proceedings of the Association of Avian Veterinarians*, pp. 237-245.
- RITCHIE, B. W., VAUGHN, S. B., LEGER, J. S., RICH, G. A., RUIPIER, D. J., FORGEY, G., GREENACRE, C. B., LATIMER, K. S., PESTI, D., CAMPAGNOLI, R. und LUKERT, P. D. (1998): Use of an inactivated virus vaccine to control polyomavirus outbreaks in nine flocks of psittacine birds. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **5**, 685-690.
- ROTT, O., KRÖGER, M., MÜLLER, H. und HOBOM, G. (1988): The genome of budgerigar fledgling disease virus, an avian polyomavirus. *Virology* **165**, 74-86.
- SANDMEIER, P., GERLACH, H., JOHNE, R. und MÜLLER, H. (1999): Polyomavirusinfektionen bei exotischen Vögeln in der Schweiz. *Archiv für Tierheilkunde* **141**, 223-226.
- SASNAUSKAS, K., BULAVAITE, A., HALE, A., JIN, L., KNOWLES, W. A., GEDVI-

- LAITE, A., DARGEVICIŪTE, A., BARTKEVICIŪTE, D., ZVIRBLIENE, A., STANIULIS, J., BROWN, D. W. und ULRICH, R. (2002): Generation of recombinant virus-like particles of human and non-human polyomaviruses in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Intervirology* **45**, 308-317.
- SCHMITZ, S. (1996): *Der Wellensittich und seine Verwandten: Haltung und Pflege von Sittichen und Papageien*. BLV Verlagsgesellschaft mbH, München, Wien, Zürich, S. 44-45, 56-59.
- SCHÖNE, R. und ARNOLD, P. (1980): *Der Wellensittich – Heimtier und Patient*. Enke Verlag, Stuttgart, S. 111-112.
- SCOPE, A., (2011): Infektiöse Erkrankungen. In: E. F. Kaleta und Krautwald-Junghanns, M.-E. (Hrsg.). *Kompendium der Ziervogelkrankheiten*, 4. Aufl., Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG, Hannover. S. 183-286.
- SCOTT, T. R. (2004): Our current understanding of humoral immunity of poultry. *Poultry Science* **83**, 574-579.
- SEDLIK, C., DADAGLIO, G., SARON, M.F., DERIAUD, E., ROJAS, M., CASAL, S.I. und LECLERC, C. (2000): *In vivo* induction of a high-avidity, high-frequency cytotoxic T-lymphocyte response is associated with antiviral protective immunity. *Journal of Virology* **74**, 5769-5775.
- SHAH, K. V. (1996): Polyomaviruses. In: B. N. Fields, D. M. Knipe und Howley, P. M. (eds.). *Fields Virology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa., pp. 2027-2945.
- SHEETS, M. A., UNGER, B. A., GIGGLEMAN, G. F. JR. und TIZARD, I. R. (1991): Studies of the effect of acemannan on retrovirus infections: clinical stabilization of feline leukemia virus-infected cats. *Molecular Biotherapy* **3**, 41-45.
- SHARMA, J. M. (1991): Overview of the avian immune system. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **30**, 13-17.
- SHARMA, J. M. (1999): Introduction to poultry vaccines and immunity. *Advances in Veterinary Medicine* **41**, 481-494.
- SHAW, G. (1805): *The Naturalist's Miscellany*. Nodder & Co., London.
- SHEN, P. S., ENDERLEIN, D., NELSON, C. D. S., CARTER, W. S., KAWANO, M., XING, L., SWENSON, R. D., OLSON, N. H., BAKER, T. S., CHENG, R. H., ATWOOD, W. J., JOHNE, R. und BELNAP, D. M. (2011): The structure of avian polyomavirus reveals variably sized capsids, nonconserved inter-capsomere interactions, and a possible location

- of the minor capsid protein VP4. *Virology* 411, 142–152.
- SIEGMANN, O. (1971): Impfprophylaxe: Kontrolle der Vakzinationsergebnisse in der Massentierhaltung. *Der Praktische Tierarzt* **52**, 616-619.
- SIEGMANN, O. und KALETA, E. F. (1973): Bedeutung der connatalen Immunität gegen die Newcastle Disease. *Giornate Avicole Internazionali, Varese, Italy*, S. 27-39.
- SIEGMANN, O., KALETA, E. F. und LEIMBECK, R. (1974): Resorption und Elimination NDV-spezifischer, maternalen Antikörper sowie deren Bedeutung für Vaccinationen von Hühnerküken gegen die Newcastle Disease. *Zentralblatt für Veterinärmedizin, Reihe B* **21**, 3-13.
- SPACKMAN, E. und SWAYNE, D. E. (2013): Vaccination of gallinaceous poultry for H5N1 highly pathogenic avian influenza: Current questions and new technology. *Virus Research* **178**, 121-132.
- STAEHLI, P., PUEHLER, F., SCHNEIDER, K., GÖBEL, T. W. und KASPERS, B. (2001): Cytokines of birds: conserved functions – a largely different look. *Journal of Interferon and Cytokine Research* **21**, 993-1010.
- STOLL, R., LUO, D., KOUWENHOVEN, B., HOBOM, G. und MÜLLER, H. (1993): Molecular and biological characteristics of avian polyomaviruses from a distinct subgenus within the polyomavirus genus. *Journal of General Virology* **74**, 229-237.
- STOLL, R., HOBOM, G. und MÜLLER, H. (1994): Host restriction in the productive cycle of avian polyomavirus budgerigar fledgling disease virus type 3 depends on a single amino acid change in the common region of structural proteins VP2/VP3. *Journal of General Virology* **75**, 2261-2269.
- STRAUCH, D. und BÖHM, R. (2002) *Reinigung und Desinfektion in der Nutztierhaltung und Veredelungswirtschaft*. Enke-Verlag, Stuttgart.
- THIEL, H.-J., RÜMENAPF, T. und BECHER, P. (1997): *Allgemeine Virologie*. S. 84-92.
- TIZARD, I. (1979): Avian immune response: A brief review. *Avian Diseases* **23**, 290-298.
- TIZARD, I. (1991): Use of immunomodulators as an aid to clinical management of feline leukemia virus-infected cats. *Journal of the American Veterinary Medicine Association* **10**, 1482-1485.
- TIZARD, I. (2000): Cytokines and the immune system. In: Tizard, I. (ed.).

- Veterinary Immunology, 7th edition, Saunders (W.B.) Co Ltd., pp. 127-138.
- TRAUB, E. (1943a): Über einen Adsorbatimpfstoff zur aktiven Immunisierung gegen die atypische Geflügelpest. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift Jg. 1943, 39-42.
- TRAUB, E. (1943b): Aktive Immunisierung mit Hühnerembryo-Impfstoffen gegen die zur Zeit in Deutschland auftretende atypische Geflügelpest. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten der Tiere, Erste Abteilung, Originale **150**, 1-16.
- VANROMPAY, D., COX, E., VOLKAERT, G. und GODDEERIS, B. (1999): Protection of turkeys against *Chlamydia psittaci* challenge by gene gun-based DNA immunizations. *Vaccine* **17**, 2628-2635.
- VERSCHOOR, E. J., GROENEWOUD, M. J., FAGROUCH, Z., KEWALAPAT, A., VAN GESSEL, S., KIK, M. J. L. und HEENEY, J. L. (2008): Molecular characterization of the first polyomavirus from a New World primate: squirrel monkey polyomavirus. *Journal of General Virology* **89**, 130-137.
- VINS, T. (1993): Wellensittiche – 89 Farbschläge. Eugen Ulmer GmbH & Co. Verlag, Stuttgart, S. 11-15.
- VINS, T. (2008): Das Wellensittichbuch. Leitfaden für Schauwellensittichzüchter. PDV Sachbuchverlag GmbH, Alfeld.
- WESTFALL, L. W., SHEARER, M. H., JUMPER, C. A., WHITE, G. L., PAPIN, J. F., EBERLE, R., BUTEL, J. S., BRIGHT, R. K. und KENNEDY, R. C. (2008): Evidence of simian virus 40 exposure in a colony of captive baboons. *Virology* **377**, 54-62.
- WITTIG, K. (1996): Geschichtliche Entwicklung der Impfstoffe, Impfmethode und Impfkontrollen bei der Newcastle-Krankheit des Geflügels, sowie deren Anwendung in den Staaten der Europäischen Union. Veterinärmedizinische Dissertation, Universität Gießen.
- WITTIG, W., HOFFMANN, K., MÜLLER, H. und JOHNE, R. (2007): Detection of DNA of the finch polyomavirus in diseases of various types of birds in the order Passeriformes. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift **120**, 113-119.
- WOLTERS, H. E. (1975-1982): Die Vogelarten der Erde. Paul Parey Verlag, Hamburg und Berlin. S. 55-69.
- YUAN, X. H., XU, Z. Q., XIE, Z. P., GAO, H. C., ZHANG, R. F., SONG, J. R.,

- ZHENG, L.S.; LI, D. D., JIN, M., CHENG, W. X., JIN, Y., DUAN, Z. J. und HOU, Y. D. (2008): WU polyomavirus and KI polyomavirus detected in specimens from children with acute respiratory tract infection in China. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* **22**, 21-23.
- ZHANG, L.F., ZHOU, J., CHEN, S., CAI, L.L., BAO, Q. Y., ZHENG, F.Y., LU, J. Q., PADMANABHA, J., HENGST, K., MALCOLM, K. und FRAZER, I. H. (2000): HPV6b virus-like particles are potent immunogens without adjuvans in man. *Vaccine* **18**, 1051-1058.
- ZIELONKA, A., GEDVILAITE, A., ULRICH, R., LÜSCHOW, D., SASNAUSKAS, K., MÜLLER, H. und JOHNE, R. (2006): Generation of virus-like particles consisting of the major capsid protein VP1 of goose hemorrhagic polyomavirus and their application in serological tests. *Virus Research* **120**, 128-137.
- ZIELONKA, A., GEDVILAITE, A., SASNAUSKAS, K., MÜLLER, H. und JOHNE, R. (2007): Formation of virus-like particles (VLPs) consisting of the major capsid protein VP1 of avian- and non-human polyomaviruses in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Third European Congress of Virology, Nürnberg.
- ZIELONKA, A., GEDVILAITE, A., SASNAUSKAS, K., RÖSLER, U., MÜLLER, H. und JOHNE, R. (2008). Serological cross-reactions of antisera elicited in rabbits using virus-like particles of avian and non-human polyomaviruses. Poster. 6th Research Festival der Universität Leipzig, 14.12.2007.
- ZIELONKA, A. (2010): Herstellung und Charakterisierung von virusähnlichen Partikeln aus Strukturproteinen der Polyomaviren der Vögel und der Säuger. Dissertation, Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie, Universität Leipzig.
- ZIELONKA, A., GEDVILAITE, A., REETZ, J., RÖSLER, U., MÜLLER, H. und JOHNE, R. (2012): Serological cross-reactions between four polyomaviruses of birds using virus-like particles expressed in yeast. *Journal of General Virology* **93**, 2658-2667.
- ZINKERNAGEL, R. M. (1997): Virus-induced immunopathology. In: N. Nathanson (ed.). *Viral pathogenesis*. Lippincott-Raven, Philadelphia, USA, S. 163-171.
- ZÜNDORF, I. und DINGERMANN, T. (2009): Das leidige Adjuvans. *Deutsche Apotheker-Zeitung* **149**, 80-86.
- ZUR HAUSEN, H. (2009): The search for infectious causes of human cancers: Where and why. *Virology* **392 (1)**, 1-10.

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. **Erhard F. Kaleta** danke ich für das überlassene interessante Thema, für seine kontinuierliche Betreuung bei den Laborarbeiten und für seine hilfreiche, unermüdliche Unterstützung bei der Anfertigung und der Korrektur dieses Manuskripts.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. **H. Müller** und Frau Dr. **A. Petereit, geb. Zielonka**, Institut für Virologie, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig, für die Überlassung der VLP und für die intensiven Beratungen bei der Erstellung des Arbeitsprogramms zur Immunisierung der Wellensittiche.

Herrn Dr. **D. Enderlein**, Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische der Justus-Liebig-Universität Gießen, danke ich für seine hilfreiche Unterstützung bei der Ausführung der PCR zum Nachweis des Polyomavirus in Organ- und Kotproben und bei der kritischen Überprüfung meines Manuskripts.

Auch den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der oben genannten Klinik gilt mein Dank für mannigfache Ratschläge, gern gewährte Hilfen und viele praktische Hinweise.

Der Loro Parque Foundation, Teneriffa, Spanien danke ich für die finanzielle Unterstützung der Arbeit.

10 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig 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 Auskünften 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.

Steffen Kraut

11 Wissenschaftliche Beiträge

11.1 Kongressbeiträge

KRAUT, S., ZIELONKA, A., LIERZ, M., WAUGH, D., MÜLLER, H., CAPELLI, S., MÜLLER, H. und KALETA, E.F. (2009): Klinische Evaluation eines virus-like-Partikles enthaltenden Impfstoffes zur Vermeidung der Wellensittichnestlingskrankheit (aviäres Polyomavirus). Berichte 1. DVG-Tagung über Vogel- und Reptilienkrankheiten, 25.-27. September 2009, Leipzig, S. 131-133.

ZIELONKA, A., KRAUT, S., JOHNE, R und MÜLLER, H. (2009): Application of virus-like particles (VLPs) consisting of the major capsid protein VP1 of avian polyomavirus as a candidate vaccine in budgerigars. Proceedings 8th Research Festival for Life Sciences, Leipzig, S. 192.

KRAUT, S., ZIELONKA, A., ENDERLEIN, D., MÜLLER, H., KALETA, E. F. und LIERZ, M. (2011): Evaluation of a novel vaccine against Budgerigar Fledgling Disease Polyomavirus (BFPyV). Proceedings 11th Meeting of the European Association of Avian Veterinarians, Madrid, S. 207.

11.2 Preise

2. Platz beim 11th Meeting of the European Association of Avian Veterinarians 2011 in Madrid für den Vortrag: Evaluation of a novel vaccine against Budgerigar Fledgling Disease Polyomavirus (BFPyV).



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6530-0

