

DOMINIK FISCHER

UNTERSUCHUNGEN ZUR MINIMALEN INFEKTIONSDOSIS,
DIAGNOSTIK UND PATHOLOGIE DER ASPERGILLOSE BEI
GROßFALKEN (*FALCO* SPP.) VERSCHIEDENEN ALTERS
MITTELS EXPERIMENTELLER INFEKTION



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



édition scientifique 
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

Betreuer: Prof. Dr. Michael Lierz

**UNTERSUCHUNGEN ZUR MINIMALEN INFEKTIONSDOSIS,
DIAGNOSTIK UND PATHOLOGIE DER ASPERGILLOSE BEI
GROßFALKEN (*FALCO* SPP.) VERSCHIEDENEN ALTERS
MITTELS EXPERIMENTELLER INFEKTION**

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

Eingereicht von

Dominik Fischer

Tierarzt aus Hellenthal

Gießen, 2017

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

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

Gutachter: Prof. Dr. Michael Lierz

Prof. Dr. Christa Ewers

Tag der Disputation: 30.10.2017

Meiner Familie und Luisa

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Fachzeitschriften, Büchern bzw. Tagungsbänden von Fachkongressen veröffentlicht und als Vortrag präsentiert:

Publikationen in Zeitschriften mit Gutachtersystem:

VAN WAEYENBERGHE, L., **D. FISCHER**, A. GARMYN, T. COENYE, R. DUCATELLE, F. HAESBROUCK, F. PASMANS, M. LIERZ, A. MARTEL (2012): Susceptibility of adult pigeons and hybrid falcons to experimental aspergillosis. *Avian Pathology* **41(6)**, 563-567.

FISCHER, D., L. VAN WAEYENBERGHE, C. CRAY, M. GROSS, E. USLEBER, F. PASMANS, A. MARTEL, M. LIERZ (2014): Comparison of diagnostic tools for the detection of aspergillosis in blood samples of experimentally infected falcons. *Avian Diseases* **58 (4)**, 587-598.

FISCHER, D., M. LIERZ (2015): Diagnostic procedures and available techniques for the diagnosis of aspergillosis in birds. *Journal of Exotic Pet Medicine* **24**, 283-295.

LATIF, H., M. GROSS, **D. FISCHER**, M. LIERZ, E. USLEBER (2015): Immunochemical analysis of fumigaclavines in avian respiratory system tissue and in blood serum of birds with clinical aspergillosis. *Mycotoxin Research*. DOI 10.1007/s12550-015-0228-4.

FISCHER, D., L. VAN WAEYENBERGHE, K. FAILING, A. MARTEL, M. LIERZ (2017): Single tracheal inoculation of *Aspergillus fumigatus* conidia induced aspergillosis in juvenile falcons (*Falco* spp.). *Avian Pathology*. DOI 10.1080/03079457.2017.1360470.

Publikationen in Tagungsbänden:

FISCHER, D., L. VAN WAEYENBERGHE, F. PASMANS, M. LIERZ, A. MARTEL (2013): Intrinsic susceptibility of falcons and pigeons to experimental aspergillosis infection. *Proceedings of the 1st International Conference on Avian, Herpetological and Exotic Mammal Medicine*, ISBN 978-3-8359-6008-4, 20.-26.04.2013, Wiesbaden: 233-234.

GROSS, M., H. LATIF, **D. FISCHER**, M. LIERZ, L. VAN WAEYENBERGHE, A. MARTEL, E. USLEBER (2013): Immunochemical analysis of fumigaclavine A in avian respiratory system tissue and in blood of falcons with clinical aspergillosis. Conference Abstracts 35th Mycotoxin-Workshop, 22.-24.05.2013, Gent, Belgien: 183.

Vorträge:

FISCHER, D. (2011): Respiratory problems in falcons (*Falco* spp.). Student Workshop "Case reports" der European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians (EAZV), 7.-10.09.2011, Hannover.

FISCHER, D., L. VAN WAEYENBERGHE, F. PASMANS, M. LIERZ, A. MARTEL (2013): Intrinsic susceptibility of falcons and pigeons to experimental aspergillosis infection. Proceedings of the 1st International Conference on Avian, Herpetological and Exotic Mammal Medicine, 20.-26.04.2013, Wiesbaden.

GROSS, M., H. LATIF, **D. FISCHER**, M. LIERZ, L. VAN WAEYENBERGHE, A. MARTEL, E. USLEBER (2013): Immunochemical analysis of fumigaclavine A in avian respiratory system tissue and in blood of falcons with clinical aspergillosis. 35th Mycotoxin-Workshop, 22.-24.05.2013, Gent, Belgien.

Publikationen in Büchern:

LIERZ, M., **D. FISCHER** (2012): Falcon with respiratory problems – Case 2.9. Exotic Animal Medicine – Review and Test, J. Samour (eds.), Elsevier Ltd., Chapter 2-Birds, ISBN 9780702044441: 151-155.

I. Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht.....	5
2.1	Falken	5
2.1.1	Bedeutung und Nutzung der Großfalken	5
2.1.2	Hierofalkenartige	7
2.1.2.1	Sakerfalken (<i>Falco cherrug</i>)	8
2.1.2.2	Gerfalken (<i>Falco rusticolus</i>)	10
2.1.3	Zucht und Hybridisierung von Großfalken	11
2.1.4	Potenzielle Disposition der Falken für Aspergillose	12
2.2	Aspergillose.....	13
2.2.1	Ätiologie und Epidemiologie	14
2.2.1.1	Schimmelpilze	14
2.2.1.1.1	Gattung <i>Aspergillus</i> spp.	15
2.2.1.1.1.1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	16
2.2.2	Pathogenese	18
2.2.3	Verlaufsformen	21
2.2.3.1	Akute Aspergillose	21
2.2.3.2	Chronische Aspergillose.....	24
2.2.4	Manifestation und klinische Symptomatik.....	25
2.2.5	Diagnostisches Vorgehen bei Verdacht auf eine Aspergillose.....	27
2.2.5.1	Klinische Allgemeinuntersuchung	28
2.2.5.2	Bildgebende Untersuchungsverfahren	29
2.2.5.2.1	Nicht-invasive, bildgebende Verfahren.....	29
2.2.5.2.2	Invasives, bildgebendes Verfahren – Endoskopie.....	30
2.2.5.3	Hämatologische Untersuchung	31
2.2.5.4	Serumdiagnostik	32
2.2.5.4.1	Anti- <i>Aspergillus fumigatus</i> -Antikörper	32
2.2.5.4.2	<i>Aspergillus</i> -Antigen	34
2.2.5.4.3	<i>Aspergillus</i> -Toxin-Nachweis	35
2.2.5.4.4	Akute-Phase-Proteine	36
2.2.5.4.5	Serum-/Plasma-Proteinelektrophorese	37
2.2.5.5	Kulturelle Anzucht	38
2.2.5.6	<i>In-vitro</i> -Virulenztests.....	40
2.2.5.7	Pathologische Untersuchung	40
2.2.5.8	Histopathologische Untersuchung.....	41
2.2.5.9	Immunhistochemische Untersuchung	42
2.2.5.10	Molekularbiologische Untersuchung	42
2.2.6	Experimentelle Studien zur Aspergillose	43
2.2.6.1	Infektionsmethode.....	43
2.2.6.1.1	Inokulation über Inhalationskammern.....	43
2.2.6.1.2	Intratracheale Inokulation	44

2.2.6.1.3	Andere Inokulationsmethoden (intraaerosacculär, intrapulmonal, intravenös, intraperitoneal)	45
2.2.6.2	Ermittlung der minimalen Infektionsdosis	47
2.2.6.3	Altersabhängige Empfindlichkeitsunterschiede	48
2.3	Aufgabenstellung und Zielsetzung	50
3	Material und Methoden	53
3.1	Versuchsaufbau, -räume und -tiere	53
3.2	Untersuchungen vor Beginn der Versuche	56
3.2.1	Klinische Allgemeinuntersuchung	56
3.2.2	Hämagglutinationstest und hämatologische Diagnostik	57
3.2.3	Bildgebende Diagnostik	59
3.2.4	Parasitologische und mikrobiologische Kotuntersuchung	59
3.3	Inokulum und <i>Galleria mellonella</i> -Virulenztest	60
3.4	Einteilung der Infektionsgruppen und Infektion der Falken	62
3.5	Untersuchungen der Falken nach Inokulation von <i>Aspergillus fumigatus</i> -Konidien	65
3.5.1	Klinische Verlaufsuntersuchung	65
3.5.2	Narkose, Blutentnahme und Euthanasie der Tiere	68
3.5.3	Hämatologische Diagnostik	68
3.5.4	Pathologische Untersuchungen und Probenentnahme	68
3.5.5	Histologische Untersuchungen	69
3.5.6	Immunhistochemische Untersuchung	69
3.5.7	Bakteriologische und mykologische Untersuchung	70
3.5.8	Molekularbiologische Untersuchung	70
3.5.9	Serumdiagnostik	72
3.5.9.1	<i>Aspergillus</i> -Antikörper Diagnostik	72
3.5.9.1.1	Hämagglutinationstest	72
3.5.9.1.2	<i>Aspergillus</i> -Antikörper ELISA	72
3.5.9.2	<i>Aspergillus</i> -Antigen ELISA	73
3.5.9.3	<i>Aspergillus</i> -Toxin Fumigaclavin A (FuA)-Nachweis mittels EIA	74
3.5.9.4	Akute-Phase-Proteinmessung	75
3.5.9.5	Serum-/Plasma-Proteinelektrophorese	75
3.6	Statistische Methoden	76
3.6.1	Statistische Berechnung der Sensitivität und der Spezifität	76
3.6.2	Statistische Berechnung der Verfahren der Serumdiagnostik	78
3.6.3	Statistische Berechnung der minimalen Infektionsdosis	79
4	Ergebnisse	83
4.1	Umgebungsluftbeprobung	83
4.2	Untersuchungen vor Beginn der Versuche	83
4.2.1	Klinische Allgemeinuntersuchung	83
4.2.2	Hämagglutinationstest und hämatologische Diagnostik	83
4.2.3	Bildgebende Diagnostik	84
4.2.4	Parasitologische und mikrobiologische Kotuntersuchung	84

4.3	Inokulum und <i>Galleria mellonella</i> Virulenztest.....	84
4.4	Untersuchungen der Falken nach Inokulation von <i>Aspergillus fumigatus</i> -Konidien	85
4.4.1	Klinische Verlaufsuntersuchung	85
4.4.1.1	Versuchsteil A – Immature Falken.....	85
4.4.1.2	Versuchsteil B – Juvenile Falken	87
4.4.2	Hämatologische Befunde.....	93
4.4.3	Pathologisch-anatomische Befunde	95
4.4.3.1	Versuchsteil A – Immature Falken.....	95
4.4.3.2	Versuchsteil B – Juvenile Falken	96
4.4.4	Histologische und immunhistochemische Befunde.....	100
4.4.4.1	Versuchsteil A – Immature Falken.....	100
4.4.4.2	Versuchsteil B – Juvenile Falken	101
4.4.5	Bakteriologische und mykologische Befunde	103
4.4.5.1	Versuchsteil A – Immature Falken.....	103
4.4.5.2	Versuchsteil B – Juvenile Falken	104
4.4.6	Molekularbiologische Befunde.....	106
4.4.7	Befunde der Serumdiagnostik	107
4.4.7.1	Versuchsteil A – Immature Falken.....	107
4.4.7.1.1	<i>Aspergillus</i> -Antikörper Diagnostik	108
4.4.7.1.1.1	Hämagglutinationstests	108
4.4.7.1.1.2	<i>Aspergillus</i> -Antikörper ELISA	109
4.4.7.1.2	<i>Aspergillus</i> -Antigen ELISA	109
4.4.7.1.3	<i>Aspergillus</i> -Toxin Fumigaclavin A (FuA) Nachweis mittels EIA.....	110
4.4.7.1.4	Akute-Phase-Proteinmessung.....	110
4.4.7.1.4.1	Serumamyloid A.....	110
4.4.7.1.4.2	Haptoglobin	110
4.4.7.1.5	Serum-Protein-Elektrophorese	111
4.4.7.1.5.1	Totalprotein	111
4.4.7.1.5.2	Albumin	111
4.4.7.1.5.3	Präalbumin	112
4.4.7.1.5.4	Albumin-Globulin-Verhältnis.....	112
4.4.7.1.5.5	Alpha-1-Globulin	113
4.4.7.1.5.6	Alpha-2-Globulin	113
4.4.7.1.5.7	Beta-Globulin	114
4.4.7.1.5.8	Gamma-Globulin	114
4.4.7.2	Versuchsteil B – Juvenile Falken	118
4.4.7.2.1	<i>Aspergillus</i> -Antikörper ELISA	118
4.4.7.2.2	<i>Aspergillus</i> -Antigen ELISA	118
4.4.7.2.3	<i>Aspergillus</i> -Toxin Fumigaclavin A (FuA) Nachweis mittels EIA.....	119
4.4.7.2.4	Akute-Phase-Proteine	119
4.4.7.2.4.1	Serumamyloid A.....	119
4.4.7.2.4.2	Haptoglobin	119
4.4.7.2.5	Plasma-Proteinelektrophorese	120

4.4.7.2.5.1	Totalprotein	120
4.4.7.2.5.2	Albumin	120
4.4.7.2.5.3	Präalbumin	121
4.4.7.2.5.4	Albumin-Globulin-Verhältnis	121
4.4.7.2.5.5	Alpha-1-Globulin	122
4.4.7.2.5.6	Alpha-2-Globulin	122
4.4.7.2.5.7	Beta-Globulin	123
4.4.7.2.5.8	Gamma-Globulin	123
4.4.7.3	Zusammenfassung der Ergebnisse beider Versuchsteile	127
4.4.8	Bestimmung der minimalen Infektionsdosis	133
4.4.8.1	Versuchsteil A – Immature Falken	133
4.4.8.2	Versuchsteil B – Juvenile Falken	133
4.4.8.3	Statistischer Vergleich der immaturen und der juvenilen Falken ..	134
4.4.8.4	Umrechnung der minimalen Infektionsdosis auf eine Umgebungskonzentration	134
5	Diskussion	137
5.1	Ermittlung einer minimalen Infektionsdosis von <i>A. fumigatus</i> - Konidien und Untersuchung von altersspezifischen Unterschieden	137
5.2	<i>In-vivo</i> -Diagnostik zur Detektion der Aspergillose	155
5.2.1	Hämatologie	156
5.2.2	<i>Aspergillus</i> -Antikörperbestimmung	158
5.2.3	<i>Aspergillus</i> -Antigenbestimmung	161
5.2.4	Fumigaclavin A-Nachweis aus Blutproben	163
5.2.5	Akute-Phase-Proteine	164
5.2.6	Proteinelektrophorese	166
5.3	Schlussbetrachtung	169
6	Zusammenfassung	171
7	Summary	173
8	Literaturverzeichnis	175
9	Anhang	203
Anhang I	Übersicht zu experimentellen Studien über Aspergillose	203
Anhang II	Listen	221
II.I	Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	221
II.I.I	Reagenzien und Verbrauchsmaterial für die Aspergillosediagnostik und die Voruntersuchungen	221
II.I.II	Reagenzien und Verbrauchsmaterial für die Durchführung des Tierversuchs	225
II.I.III	Sonstiges Verbrauchsmaterial	2256
II.II	Liste der verwendeten Geräte	226
II.III	Liste der verwendeten Programme (Software)	229

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Braune Farbmorphe des Sakerfalken (<i>Falco cherrug</i>).....	9
Abbildung 2:	Farbmorphen des Gerfalken (<i>Falco rusticolus</i>).....	10
Abbildung 3:	Konidiogenese von <i>A. fumigatus</i>	15
Abbildung 4:	Kulturelle Anzucht und lichtmikroskopische Bilder von <i>Aspergillus fumigatus</i>	17
Abbildung 5:	Morphologische Unterscheidung der <i>Aspergillus</i> -Spezies anhand der Schimmelpilzkolonien	39
Abbildung 6:	Unterbringung der Falken im Versuchsraum	55
Abbildung 7:	Luftprobensammler zum Monitoring der <i>A. fumigatus</i> - Konidien-Konzentration in der Raumluft.	55
Abbildung 8:	<i>A. fumigatus</i> -Kultur mit aktivem Pilzmyzel und geerntete Konidien in Suspension.	61
Abbildung 9:	Intratracheale Inokulation der narkotisierten Falken	65
Abbildung 10:	Tägliches Wiegen und tägliches Füttern der Falken	66
Abbildung 11:	Gewichtsabnahme der immaturren Falken in Prozent	87
Abbildung 12:	Klinische Symptome von juvenilen Falken nach experimenteller Inokulation mit <i>A. fumigatus</i> -Konidien	89
Abbildung 13:	Durchschnittlichen Körpergewichte von juvenilen Falken vor und nach experimenteller Inokulation	90
Abbildung 14:	Pathologisch-anatomische Befunde eines immaturren Falken nachexperimenteller Inokulation mit <i>A. fumigatus</i> -Konidien.....	95
Abbildung 15:	Pathologisch-anatomische Befunde von juvenilen Falken nach experimenteller Inokulation mit <i>A. fumigatus</i> -Konidien... ..	100
Abbildung 16:	Bild eines histologischen Schnittes eines Pilzgranuloms aus dem Luftsack eines immaturren Falken, gefärbt	101

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Odds Ratio (OR) des erwarteten Wertes der an Aspergillose erkrankender Falken	63
Tabelle 2:	Übersicht der Inokulationsdosen und der Gruppen im Versuchsteil A (immature Falken)	63
Tabelle 3:	Übersicht der Inokulationsdosen und der Gruppen im Versuchsteil B (juvenile Falken)	64
Tabelle 4:	Definition der verwendeten Klinischen Scores (KS)	67
Tabelle 5:	Definition der pathologischen Scores (PS).....	69
Tabelle 6:	Vierfeldertafel zur Berechnung der Sensitivität und der Spezifität einer <i>Intra-vitam</i> -Detektion der Aspergillose	77
Tabelle 7:	Ergebnisse von Luftproben während der Versuchsphase	83
Tabelle 8:	Überlebensraten während des <i>In-vitro</i> -Virulenztests mit <i>Galleria mellonella</i> -Larven.....	85
Tabelle 9:	Übersicht über die klinischen Symptome der immaturen Falken.	86
Tabelle 10:	Übersicht über die Dyspnoe-Scores juveniler Falken.....	91
Tabelle 11:	Übersicht über die Klinischen Scores juveniler Falken	92
Tabelle 12:	Hämatologische Untersuchung von Blutproben juveniler Falken	94
Tabelle 13:	Übersicht über die pathologischen Befunde der immaturen Falken	96
Tabelle 14:	Übersicht über die pathologischen Läsionen juveniler Falken	99
Tabelle 15:	Histologischer Nachweis von Pilzhyphen in Organschnitten von juvenilen Falken.....	103
Tabelle 16:	Übersicht über die Ergebnisse der mykologischen Reisolierung aus den Organen von juvenilen Falken	105
Tabelle 17:	Übersicht über die molekularbiologische Bestätigung der Reisolate aus den Organen von juvenilen Falken	106
Tabelle 18:	Übersicht über die Ergebnisse eines humanmedizinischen Hämagglutinationstests zur Detektion von <i>Aspergillus</i> -spezifischen Antikörpern bei immaturen Falken	108
Tabelle 19:	Werte für Akute-Phase-Proteine, Anti- <i>Aspergillus</i> -Antikörper-Indizes sowie Serumproteinfraktionen von immaturen Falken ..	116
Tabelle 20:	Arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung, Minimum- und Maximum-Werte von immaturen Falken.....	117

Tabelle 21:	Werte für Akute-Phase-Proteine, Anti- <i>Aspergillus</i> -Antikörper-Indizes sowie Serumproteinfraktionen von juvenilen Falken	125
Tabelle 22:	Arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung, Minimum- und Maximum-Werte von juvenilen Falken.	126
Tabelle 23:	Ergebnisse der multiplen und der einfachen Regressionsanalyse und des Rangkoeffizienten nach Spearman zur Untersuchung der Einflüsse der Infektionsdosis und der Ausgangswerte auf die Blutparameter	130
Tabelle 24:	Untersuchung potenzieller Unterschiede zwischen inokulierten Falken mit Granulomen und inokulierten Falken ohne Granulome mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test	131
Tabelle 25:	Überblick über die veränderten Blutwerte aus Serum-/Plasmaproben von immaturren und juvenilen Falken ...	132

IV. Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Aspergillus</i>
A. fum.	<i>Aspergillus fumigatus</i>
A. flav.	<i>Aspergillus flavus</i>
AGID	Agar-Gel-Immun-Diffusionstests
Alb	Albumin
$\alpha 1$	Alpha-1-Globuline
$\alpha 2$	Alpha-2-Globuline
ähnl.	ähnlich
APP	Akute-Phase Protein
APPs	Akute-Phase Proteine
β	Beta Globuline
BG	(1-3)- β -D-Glucan
b. i.	before inoculation/infection (= Engl. für vor Inokulation/Infektion)
Bu	<i>Bursa cloacalis</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa / zirka
CT	computertomographische Untersuchung
DCP-MIA	Division of Comparative Pathology, University of Miami Miller School of Medicine, Miami, Florida, USA
dl	Deziliter
DNA	deoxyribonucleic acid (= Engl. für Desoxyribonukleinsäure)
d. p. i.	day/days post inoculation/infection (= Engl. für Tag/Tage nach Inokulation/Infektion)
DS	Dyspnoe-Score/Dyspnoe-Scores (von 0 bis 1)
EIA	Enzyme immunoassay (= Engl. für enzymgekoppelter Immuntest)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (= Engl. für Indirekter, enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
Engl.	Englisch
et al.	et alii (= Lat. für und andere)
Exp	Exposition, im Sinne von Expositionsdauer und -häufigkeit
FuA	Fumigaclavin A
γ	Gamma-Globuline
<i>g</i> (kursiv)	Mittlere Erdbeschleunigung (<i>g</i>)

g	Gramm
GIT	Gastrointestinaltrakt inklusive Speiseröhre
GM	Galactomannan
Histo	histologische Untersuchung
HP	Haptoglobin
h. p. i.	hours post inoculation/infection (= Engl. für Stunden nach Inokulation/Infektion)
HS	Histologische Scores
ID	Infektionsdosis/Inokulationsdosis
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IHA	Immun-Hämagglutinationstest
inkl.	inklusive
IPBAD	Institute for Pathology, Bacteriology and Avian Diseases, Ghent University, Gent, Belgien
ITNMK	Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen, Professur für Milchwissenschaften, Gießen
i. v.	intravenös
JLU	Justus-Liebig-Universität
KbE	koloniebildende Einheiten
kg	Kilogramm
KOH	Kaliumhydroxid
Kon	Konidien
KaLTI	kaudaler, linker, Thorakalluftsack
KaRTI	kaudaler, rechter, Thorakalluftsack
KrLTI	kranialer, linker, Thorakalluftsack
KrRTI	kranialer, rechter, Thorakalluftsack
KS	Klinischer Score/Klinische Scores (von 0 bis 4)
KVRAF	Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische
l	Liter
LAI	linker Abdominalluftsack
lat.	lateinisch
LD	Letale Dosis

LD ₅₀	Letale Dosis 50 %. Dosis, bei der 50 % der infizierten Individuen sterben
Le	Leber
Llu	linke Lunge
LS	Luftsack/Luftsäcke
m ³	Kubikmeter
Max	Maximum
Mean	Arithmetisches Mittel/Durchschnittswert
Mi	Milz
Min	Minimum
min	Minute/Minuten
ml	Milliliter
µm	Mikrometer
Morb	Morbidität
Mort	Mortalität
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	mykologische Scores
Myko	mykologische Untersuchung
n	Anzahl, z. B. Tierzahl
Na	Nase
NaCl	Kochsalzlösung
n. Chr.	nach Christi Geburt
Ni	Niere
nm	Nanometer
NK	Negativkontrolle
PA	Präalbumin
Patho	pathologische Untersuchung
PBS	Phosphate-buffered saline (= Engl. für phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (= Engl. für Polymerase-Kettenreaktion)
PEP	Proteinelektrophorese
Per	Perikard
p. i.	post inoculation/infection (= Engl. für nach Inokulation/Infektion)
plaqueähnl.	plaqueähnlich

PPEP	Plasma-Proteinelektrophorese
PS	Pathologischer Score/Pathologische Scores (von 0 bis 3)
RAI	rechter Abdominalluftsack
Range	Spannbreite/Bereich zwischen Minimum- und Maximumwert
Rlu	rechte Lunge
r_s	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman
SAA	Serumamyloid A
SD	Standard Deviation (= Engl. für Standardabweichung)
SPEP	Serum-Proteinelektrophorese
sp.	Spezies (Singular)
spp.	Spezies (Plural)
Std	Stunde/Stunden
Sy	Syrinx
SZT	experimenteller Splenozytentransfer zwischen Individuen
Tr	Trachea
u. a.	unter anderem
v. a.	vor allem
v. Chr.	vor Christi Geburt
WGF	Wright-Giemsa-Färbung
w. p. i.	week/weeks post inoculation/infection (= Engl. für Woche/Wochen nach Inokulation/Infektion)
z. B.	zum Beispiel
zit. n.	zitiert nach

1 Einleitung

Die Aspergillose ist eine der wichtigsten und bedeutendsten Erkrankungen bei Vögeln. Sie wird durch Schimmelpilze der Gattung *Aspergillus* spp. hervorgerufen, wobei auch respiratorische Erkrankungen durch Schimmelpilze anderer Gattungen (z. B. *Penicillium* spp. oder *Mucor* spp.) unter diesem Krankheitsbegriff zusammengefasst werden (LATGÉ, 1999, O'MEARA UND WITTER, 1971). Meist in Form einer Atemwegsmykose, doch teils auch in anderen Manifestationsformen, wurde die Aspergillose bei verschiedenen Vogelarten beschrieben, wobei tropische Papageien und Greifvögel vergleichsweise häufig betroffen zu sein scheinen (ARNÉ et al., 2011, BARTON et al., 1992, BEERNAERT et al., 2010, BROWN et al., 2008, CONVERSE, 2008, KUNKLE, 2003, MORRISEY, 1998, PARKER, 2011, PERELMAN UND KUTTIN, 1992, RICHARD et al., 1984, TELL, 2005, WALKER, 2012). Greifvögel erkranken dabei sowohl in menschlicher Obhut (COOPER, 1969, JOSEPH, 2000, KEYMER, 1972, REDIG, 2007, VAN CUTSEM et al., 1989) als auch in freier Wildbahn und sind dort neben den Wasservögeln als häufigste Vogelgruppe betroffen (CONVERSE, 2008, REDIG, 1993).

Atemnot, Abmagerung, Störungen des Allgemeinbefindens, zentralnervöse Symptome und Tod können sich im Verlauf der Erkrankung entwickeln und Individuen von teils streng geschützten Arten gefährden (BAILEY, 2008, BEYAZ et al., 2008, COON UND LOCKE, 1968, COOPER, 1973, FALANDYSZ UND SZEFER, 1983, FORBES, 1991, FRANSON et al., 1996, HÖFLE et al., 2001, JOSEPH, 1996, 2000, KALISINSKA et al., 2008, MIKAELIAN et al., 1997, NARDONI et al., 2006, O'MEARA UND WITTER, 1971, OLIAS et al., 2010a). Pathognomonische Symptome der aviären Aspergillose fehlen allerdings und zusätzlich kann das klinische Bild zwischen unterschiedlichen Vogelspezies stark variieren. Somit ist die Diagnosefindung schwierig, erfordert ein gezieltes diagnostisches Vorgehen und meist eine Kombination verschiedener Untersuchungsmethoden (FORBES et al., 1992, JONES UND OROSZ, 2000, JOSEPH, 2000).

Die Prävalenz der Aspergillose variiert von Einzeltiererkrankungen bis zu Bestandsproblemen mit Mortalitätsraten von 30 bis 100 Prozent (O'MEARA UND WITTER, 1971). Generell werden ein chronischer und ein akuter Verlauf der aviären

Aspergillose unterschieden, wobei erstgenannter weitaus häufiger auftritt. Beide Verläufe können sich lokal begrenzt, aber auch generalisiert manifestieren (REDIG, 1993, REDIG, 2007). Die chronische Aspergillose wird dabei im tierischen Organismus meist durch eine Kombination einer langfristigen Exposition mit mykotischen Erregern, im Sinne einer ubiquitären Hintergrundkonzentration, und multiplen Cofaktoren hervorgerufen (KRAUTWALD-JUNGHANNS, 2011, 2012, KUNKLE, 2003, McMILLAN UND PETRAK, 1989, RICHARD, 1997). Im Gegensatz dazu können bei der akuten Aspergillose ursprünglich gesunde Tiere nach kurzzeitiger Exposition mit einer sehr hohen Erregermenge erkranken (REDIG, 1993, REDIG, 2007).

Genauere Kenntnisse über die erforderliche Schimmelpilzsporendosis (minimale Infektionsdosis) oder die erforderliche Expositionshäufigkeit und -dauer sind jedoch weitestgehend unbekannt. Generell gibt es über die akute Aspergillose lediglich vereinzelte klinische und pathologische Fallberichte und auch experimentelle Studien wurden sehr limitiert und nur auf einzelne Vogelspezies beschränkt durchgeführt (BEERNAERT et al., 2008, CHAUDHARY UND SADANA, 1988, GÜMÜŞSOY et al., 2004, O'MEARA UND CHUTE, 1959, RICHARD et al., 1981). Diese Studien hatten überwiegend zum Ziel, die Aspergillose experimentell sicher zu induzieren, um nachfolgend Behandlungsmöglichkeiten oder spezifische Diagnostikverfahren zu evaluieren (BEERNAERT et al., 2009a, BEERNAERT et al., 2009b, BEERNAERT et al., 2009c). Eine minimale Infektionsdosis war hierbei jedoch nicht das Ziel der Untersuchungen. Diese Studien zeigten jedoch, dass die erforderlichen Erregerdosen zur Induktion einer akuten Aspergillose zwischen verschiedenen Vogelgattungen und -familien stark variieren, sodass von der Empfindlichkeit einer Gattung nicht auf die einer anderen geschlossen werden kann (ATASEVER UND GÜMÜŞSOY, 2004, GHORI UND EDGAR, 1973).

Unter den Greifvögeln scheinen Falkenspezies aus nordischen Regionen wie Gerfalken (*Falco rusticolus*) und Merline (*Falco columbarius*) sowie deren Hybriden besonders empfänglich für eine Aspergillose zu sein (HEIDENREICH, 2013a, NALDO UND SAMOUR, 2004, REDIG, 2007, SILVANOSE et al., 2006). Wissenschaftlich fundierte Beweise dieser Hypothese fehlen allerdings bisher. Unabhängig von der Speziesdisposition weisen einige Berichte bei Tauben und Hühnern auch daraufhin, dass juvenile Individuen empfindlicher gegenüber einer Aspergillose zu sein

scheinen als adulte (AUSTWICK, 1969, BEERNAERT et al., 2008), doch auch hier fehlt ein wissenschaftlicher Nachweis für die Verhältnisse bei Greifvögeln.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Ermittlung einer minimalen Infektionsdosis von *A. fumigatus*-Sporen zur Auslösung einer akuten Aspergillose bei Falken und die Klärung der Frage, ob eine einmalige Inokulation einer definierten Sporenmenge ausreicht, um eine akute Aspergillose in dieser Spezies auszulösen. Dabei wurde ein besonderer Fokus auf mögliche altersabhängige Unterschiede gelegt, indem juvenile und immature Gerfalkenhybriden vergleichend untersucht wurden. Hierdurch sollte nachfolgend die Formulierung von Haltungsempfehlungen für Großfalken und von Grenzwerten für Schimmelpilzsporenexpositionen ermöglicht werden, welche für juvenile und adulte Individuen gleichsam Gültigkeit hätten. Gleichzeitig sollte die wenig erforschte akute Aspergillose bei Großfalken untersucht werden, um somit spezifische klinische Symptome sowie serologische, pathologische, histopathologische und immunhistochemische Befunde zu ermitteln. Dies sollte zukünftig die Früherkennung und die Diagnostik der Aspergillose bei Greifvögeln verbessern. Vor allem die Evaluation von modernen serologischen Diagnostikmethoden, wie Serum-/Plasma-Proteinelektrophorese und die Messung von Akute-Phase-Proteinen, Anti-*Aspergillus*-Antikörpern, *Aspergillus*-Antigenen und *Aspergillus*-Toxinen, war Gegenstand dieses Forschungsvorhabens, um die bestehenden diagnostischen Möglichkeiten für den praktizierenden Tierarzt zu erweitern.

2 Literaturübersicht

2.1 Falken

Falken gehören zu den Greifvögeln und bilden neben den Habichtartigen (Accipitriformes), den Neuweltgeiern (Cathartiformes) und den Sekretären (Sagittariformes) eine eigenständige Ordnung (Falconiformes). Die Ordnung Falconiformes besteht aus einer Familie (Falconidae) mit 64 Arten, die in vier Unterfamilien eingeteilt werden: die Karakaras (Caracarinae), die Lachfalken, Waldfalken und Neuweltfalkchen (Herpetotherinae), die Zwergfalken (Polihieracinae) und die echten oder eigentlichen Falken (Falconinae) (FERGUSON-LEES UND CHRISTIE, 2001, 2009).

In der letztgenannten Unterfamilie Falconinae werden die 38 Spezies weiterhin in Klein- und Großfalken eingeteilt, wobei sich die Großfalken zudem in Wanderfalkenartige und Hierofalken (siehe 2.1.2) gliedern lassen.

Während systematische Einteilungen der Vögel in der Vergangenheit vor allem auf äußeren, morphologischen, karyologischen oder anatomischen Kriterien beruhten (DE BOER, 1975, GRIFFITHS, 1994, HAFNER UND HAFNER, 1977, SOLTI, 1981), so werden gegenwärtig molekularbiologische Verwandtschaftsanalysen zur Überprüfung dieser Einteilung durchgeführt (SIBLEY, 1994). Dabei unterstreichen Analysen von Chromosomen und des mitochondrialen Cytochrom b-Gens die lang vermutete Diversität der Falken von den Habichtartigen, den Neuweltgeiern und den Sekretären (NISHIDA et al., 2008, WINK et al., 1998). Andererseits wird mittels Mikrosatellitenanalyse und DNA-Sequenzierung die enge Verwandtschaft innerhalb der Gruppe der Hierofalken genetisch belegt (NITTINGER et al., 2005, NITTINGER et al., 2007, WINK et al., 2004).

2.1.1 Bedeutung und Nutzung der Großfalken

Falken faszinieren die Menschen bereits seit Jahrtausenden. Sie wurden in Ägypten in Gestalt von Horus als wichtige Gottheit (Himmelsgott) und als Symbol des Pharaos verehrt (BROCKHAUS, 1997b). Auch in der nordischen Mythologie trägt die Göttin Freyja ein Falkengewand, wodurch sie fliegen kann (BROCKHAUS, 1997a).

Diese Faszination teilten auch Naturbeobachter der Antike wie Aristoteles (384 - 322 v. Chr.) (ARISTOTELES, 1783), Plinius (23 n. Chr.) und Aelianus (2. Jh. n. Chr.) sowie Falkner aus verschiedenen Erdteilen, welche die Tiere fingen, abrichteten und zur Jagd nutzten (GLASIER, 1998, SCHLEGEL UND VAN WULVERHORST, 1999). Vermutlich leitet sich sogar der Begriff „Beizjagd“, welcher auch heute noch für die Jagd mit Greifvögeln gebräuchlich ist und im Mittelhochdeutschen „Beißjagd“ bedeutete, von der Jagd mit Falken ab. Diese töteten ihre Beute nämlich typischerweise durch einen Biss in den Hals. Kaiser Friedrich II. von Hohenstaufen (1194 - 1250) beschreibt die Jagd mit Falken ausführlich in seinem Buch „De arte venandi cum avibus“ (= aus dem Lateinischen: „Über die Kunst mit Vögeln zu jagen“), wobei er den Gerfalken als den höchsten und edelsten Falken darstellt (CIESIELSKI, 2007, HENNS, 1970). Ebenfalls detailliert werden bei Schlegel und Van Wulverhorst im 19. Jahrhundert das Fangen, Zähmen und Trainieren (Abtragen) sowie die Beizjagd mit einzelnen Falken, wie Gerfalken, Sakerfalken und Wanderfalken beschrieben (SCHLEGEL UND VAN WULVERHORST, 1999). Dabei wird deutlich dargestellt, dass Falken, und allen voran der Gerfalken, als sehr wertvoll galten und somit im Mittelalter und der Renaissance ausschließlich den höhergestellten Adligen und Klerikern zur Beizjagd vorbehalten waren. Bei den Herrschern der asiatischen Steppenvölker sowie bei den russischen Fürsten galten v. a. Ger- und Sakerfalken als Statussymbole, welche ab dem 10. - 11. Jahrhundert als wertvolle Mitgift und politische Geschenke dienten (CIESIELSKI, 2007). Im Dritten Reich beauftragte Reichsjägermeister Hermann Göring eigene Expeditionen, um weiße Gerfalken für ihn zu fangen (BARR, 2012). Der Fang von Ger- und Sakerfalken wurde auch nach dem Zweiten Weltkrieg rege betrieben (BÄR, 1997), bis diese Vögel ab der Mitte der 1970er Jahre in menschlicher Obhut gezüchtet wurden und ihre Entnahme aus der Natur sukzessiv verboten wurde (CIESIELSKI, 2007). Jagdlich wurden und werden Großfalken in verschiedenen Ländern der Erde als „Vögel des hohen Fluges“ zur Beizjagd auf fliegende Beutetiere (Flugwild) eingesetzt, wobei man zwischen der Jagd von der Faust (Faustfalke) und der Jagd aus dem hohen, kreisenden Segelflug (Anwarterfalke) unterscheidet (BRÜLL UND TROMMER, 1997, GLASIER, 1998, SCHÖNEBERG, 2009). Vor allem in den arabischen Ländern ist dabei die Stellung der Jagdfalken und ihr Einsatz zur Beizjagd unangetastet hoch (AL-TIMIMI, 1897, REMPLÉ UND GROSS, 1993), was

auch an der Wahl des Sakerfalken zum Nationalvogel der Vereinigten Arabischen Emirate zu sehen ist.

Neben der Jagd werden Falken heute auch zur Öffentlichkeitsarbeit und Umweltbildung in zoologischen Einrichtungen, Tierparks, Greifvogelstationen und Falkenhöfen gehalten (SCHWARTZ, 2013).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass sich die Nutzung und die hohe Wertschätzung für Großfalken durch verschiedene Zeitalter und Kulturkreise bis in die heutige Zeit ziehen. Hauptmotivation für die heutige Falkenhaltung stellen die Beizjagd und die Falkenzucht dar (siehe 2.1.3), wobei auch artenschützerische und umweltpädagogische Aspekte eine Rolle spielen. Somit ist die Haltung von Falken in menschlicher Obhut nach wie vor international bedeutend und die Gesunderhaltung dieser Tiere von großem Interesse.

2.1.2 Hierofalkenartige

Hierofalken wurden 1901 von Kleinschmidt als Gruppe von langschwänzigen Jagd- oder Edelfalken etabliert (KLEINSCHMIDT, 1901). Sie werden als mittelgroße, schnelle, wendige und ausdauernde Verfolgungsjäger von Vögeln und Kleinsäugetern im bodennahen Raum innerhalb der Großfalken von den kurzschwänzigeren und im Sturzflug jagenden Wanderfalken unterschieden (BAUMGART, 1991). Die Bezeichnung Hierofalke leitet sich vom griechischen Wort „hieros“, zu Deutsch „stark“, ab und entspricht nach heutigen Gesichtspunkten keiner wissenschaftlichen Taxonomie. Vielmehr entspricht sie einem Formenkreis und damit einem polyphyletischen Verbund phänotypisch sehr ähnlicher und die gleiche ökofunktionelle Position einnehmender Spezies (BAUMGART, 2013). Zu den Hierofalken zählen die Arten Gerfalke (*Falco rusticolus*), Lannerfalke (*F. biarmicus*), Luggerfalke (*F. jugger*) und Sakerfalke (*F. cherrug*), welche genetisch sehr eng verwandt sind (NITTINGER et al., 2005, NITTINGER et al., 2007, WINK et al., 2004). Als gemeinsames Merkmal haben die Jungvögel dieser Spezies blau gefärbte Füße, Nasenhäute und Augenlider, welche erst später gelb werden, während sie bei Wanderfalkenartigen meist, wenn auch nicht immer, bereits vom Schlupf an gelb gefärbt sind (MEBS UND SCHMIDT, 2014).

Ökofunktionell zählen auch der nordamerikanische Präriefalke (*F. mexicanus*) und der australische Rußfalke (*F. subniger*) zu den Hierofalken (BAUMGART, 1991, 2013), wobei genetische Analysen eher eine Zugehörigkeit zu den Wanderfalkenartigen bescheinigen (SEIBOLD et al., 1993) und den Ausschluss aus der Gruppe der Hierofalken nahelegen (NITTINGER et al., 2005, WINK et al., 2007).

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden Hybriden aus Sakerfalken und Gerfalken verwendet, da bei diesen eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Aspergillose vermutet wird (BAILEY, 2008, DEEM, 2003, FORBES, 1991, HEIDENREICH, 2013a, JOSEPH, 2000, NALDO UND SAMOUR, 2004, REDIG, 1993, REDIG, 2007). Es wurden keine Hybriden aus Gerfalken und Wanderfalken gewählt, da Wanderfalken eine vergleichsweise geringe Empfindlichkeit gegenüber Aspergillose aufweisen sollen (MÜLLER, 2009). Zudem sind Hybriden aus Saker- und Gerfalken häufig als Jagdvogel in den arabischen Ländern und in Europa anzutreffen, sodass sie repräsentativ für die in Europa gezüchteten und weltweit genutzten Großfalken stehen können. Auf diese beiden Arten, ihre Zucht und Hybridisierung wird im Folgenden genauer eingegangen.

2.1.2.1 Sakerfalken (*Falco cherrug*)

Der Saker- oder Würgfalke (*Falco cherrug*, GRAY 1834) kommt in zwei Unterarten in einzelnen Regionen Mittel- und Südosteuropas, Vorder- und Zentralasiens bis in die Mongolei und nach China vor und besiedelt dort Wüsten, Halbwüsten, Steppen, Hochgebirgsmassive und Waldgebiete (BARTHEL, 2011, BAUMGART, 1991). Die Tiere erreichen eine Körperlänge von ca. 47 cm (Männchen) bzw. ca. 55 cm (Weibchen), eine Spannweite von ca. 110 cm (Männchen) bzw. ca. 126 cm (Weibchen) und ein Körpergewicht von 700 - 900 g (Männchen) bzw. 970 - 1.300 g (Weibchen) (MEBS UND SCHMIDT, 2014). Adulte Tiere haben meist eine helle, verschieden stark gezeichnete Unterseite und eine braune Oberseite (siehe Abbildung 1 A), wobei verschiedene Farbmorphen von ganz hell bis ganz dunkel auftreten können (BAUMGART, 1991, EASTHAM et al., 2002). Jungvögel sind generell dunkler und weisen eine blaue Haut an den Füßen, der Nase

(Wachshaut) und den Augenlidern auf (siehe Abbildung 1 B), die sich beim adulten Tier gelblich färbt (MEBS UND SCHMIDT, 2014).

Sakerfalken ernähren sich überwiegend von tagaktiven Kleinsäugetern, wie Gerbils und Ziesel, sowie von kleinen bis mittelgroßen Vögeln, wie Tauben, Krähenvögeln und kleineren Greifvögeln (CHAVKO et al., 2014, NEDYALKOV et al., 2014, OBUCH UND CHAVKO, 1997, PUZOVIĆ, 2008).



Abbildung 1: Braune Formmorphe des Sakerfalken (*Falco cherrug*). Der Jungvogel (B) weist im Vergleich zum Altvogel (A) noch blaue Füße und eine blaue Färbung an Nase und Augenlidern auf.

Sie brüten in Felsnischen und verlassenen Nestern größerer Vögel sowie künstlichen Nestboxen (CHAVKO et al., 2014, PUZOVIĆ, 2008). Die 3 - 6 geschlüpften Jungvögel befinden sich 48 - 50 Tage in der Nestlingsphase und anschließend 4 - 6 Wochen in der Führungsphase durch die Eltern (Bettelflugphase) bis sie schließlich selbstständig werden (AUGST, 2001, MEBS UND SCHMIDT, 2014).

Die Sakerfalkenbestände werden weltweit mit negativem Entwicklungstrend auf 12.800 - 30.800 adulte Individuen geschätzt, weshalb die Art von der Internationalen Union für Naturschutz (IUCN = International Union for the Conservation of Nature) als gefährdet (endangered) eingestuft wird (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2015a). Andere Zahlen bleiben mit einem Gesamtbestand von 860 Brutpaaren in der Westpaläarktis sogar noch weit hinter den IUCN-Schätzungen zurück (MEBS UND SCHMIDT, 2014). Als Gründe für die

Bestandsrückgänge werden vor allem Lebensraumverarmung, schwindende Nahrungsgrundlagen, wie abnehmende Zieselbestände, Horstplünderungen und der illegale Vogelfang genannt (BÄR, 1997).

2.1.2.2 Gerfalken (*Falco rusticolus*)

Der Gerfalke (*Falco rusticolus*, LINNÉ 1757) kommt zirkumpolar in den arktischen Gebieten Eurasiens und Nordamerikas vor, wobei er in Island, Finnland, Schweden, Norwegen, Russland, Kanada, Alaska und Grönland brütet (MEBS UND SCHMIDT, 2014). Gerfalken sind die größten Vertreter der Familie Falconidae und erreichen eine Körperlänge von 50 - 60 cm, eine Spannweite von 110 - 115 cm (Männchen) bzw. 120 - 128 cm (Weibchen) und ein Gewicht von 960 - 1.300 g (Männchen) bzw. 1.400 - 2.000 g (Weibchen) (MEBS UND SCHMIDT, 2014). Es gibt drei Farbmorphen des Gerfalkens - eine dunkelbraun bis schwarze, eine graubraune und eine weiße (siehe Abbildung 2) (CIESIELSKI, 2007, JOHNSON UND BURNHAM, 2013, MEBS UND SCHMIDT, 2014).

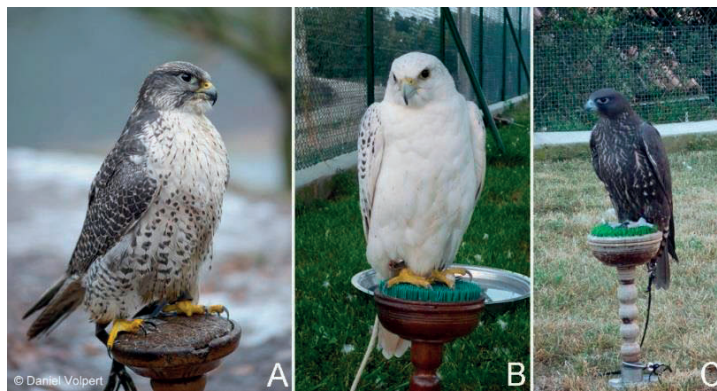


Abbildung 2: Graue (A), weiße (B) und schwarze (C) Farbmorphe des Gerfalken (*Falco rusticolus*).

Gerfalken ernähren sich überwiegend von Schneehühnern (NIELSEN, 1999, NYSTRÖM et al., 2005), obwohl sie generell eine Vielzahl von Vögeln, v. a. Wasservogel bis Gänse- und Kranichgröße, und Kleinsäuger wie Wühlmäuse und junge Schneehasen erbeuten können (BOOMS UND FULLER, 2003, NIELSEN UND CADE, 1990). Wettergeschützte Stellen in steilen Felswänden sowie Baumhorste in der Waldtundra werden als Brutplätze genutzt (BOOMS et al., 2011, BURNHAM et al., 2009, COULTON et al., 2013, MECHNIKOVA et al., 2010,

OBST, 1994). Die 3 - 4 Jungen befinden sich nach dem Schlupf 46 - 53 Tage in der Nestlingsphase und anschließend 6 Wochen in der Bettelflugphase bis sie selbstständig werden (JENKINS, 1978).

Die Bestände des Gerfalcken werden in der Westpaläarktis auf ca. 1.020 - 1.765 Brutpaare (MEBS UND SCHMIDT, 2014) und weltweit auf 46.700 adulte Individuen (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2015b) geschätzt, weshalb die Art von der IUCN derzeit als nicht gefährdet (least concern) eingestuft wird, nachdem sie Ende der 1980er Jahre noch als gefährdet galt.

2.1.3 Zucht und Hybridisierung von Großfalken

Die Zucht von Großfalken ist durch die bereits erwähnte, regional hohe gesellschaftliche Bedeutung und die hohe Nachfrage im arabischen Raum in Europa und Nordamerika wirtschaftlich bedeutend (KÜSPERT et al., 1993). Zudem ist die Zucht von Falken aus Gründen des Artenschutzes wichtig (BOND, 2006, SAAR et al., 1983).

Neben einer artenreinen Nachzucht verschiedener Falkenarten werden einige Arten, z. B. Ger- und Sakerfalken, auch züchterisch gekreuzt (hybridisiert) (HEIDENREICH et al., 1993, HEIDENREICH, 2013c). Eine genetisch belegbare Hybridisierung zwischen Ger- und Sakerfalken kann in der Natur ebenfalls stattfinden (NITTINGER et al., 2007, SEIBOLD et al., 1993, WINK et al., 2004). So scheint eine im zentralasiatischen Sajan- und Altaigebirge lebende Falkenmorphe, welche zuvor als Altaifalke, als Altai-Gerfalke oder als Altai-Sakerfalke (*Falco altaicus*) beschrieben wurde, das Resultat einer natürlichen Hybridisierung zwischen Ger- und Sakerfalken darzustellen (ELLIS, 1995, PFANDER, 1998). Die ursprüngliche Motivation für eine züchterische Hybridisierung resultierte in den Anfangsjahren der Falkenzucht wohl aus der mangelnden Verfügbarkeit von Zuchttieren (DURMAN-WALTERS, 1994). Ein anderer Beweggrund könnte in der Umgehung strenger Schutzbestimmungen für bestimmte, reine Greifvogelspezies liegen, wobei später die vermeintliche, züchterische „Verbesserung“ von Aussehen, Jagdeigenschaften oder Wesensmerkmalen und eine dadurch erzielte Wertsteigerung als Motivation hinzukamen (HEIDENREICH, 2013c). Neben Falkenhybriden aus natürlicher Anpaarung (MORRIS UND STEVENS, 1971) ermöglichte die Entwicklung der artifiziellen

Insemination (TEMPLE, 1972) die einfache und gezielte Erzeugung von Hybriden mit Ger- und Sakerfalken-Anteil (CADE UND WEAVER, 1976, HEIDENREICH et al., 1993).

2.1.4 Potenzielle Disposition der Falken für Aspergillose

Greifvögel zählen neben den Wasservögeln (u. a. Anatidae, Pelicanidae, Laridae, Spheniscidae) zu den Vogelgruppen bei denen Aspergillosefälle am häufigsten auftreten (CONVERSE, 2008, REDIG, 2007, REMPLÉ UND GROSS, 1993). Unter den Greifvögeln gelten die Falkenspezies aus nordischen Regionen, wie Gerfalken (*Falco rusticolus*), Merline (*Falco columbarius*) und deren Hybriden, als besonders gefährdet, gefolgt von Steinadlern (*Aquila chrysaetos*), Seeadlern (*Haliaeetus* spp.), Rotschwanzbussarden (*Buteo jamaicensis*), Raufußbussarden (*Buteo langopus*) und Habichten (*Accipiter* spp.) (BAILEY, 2008, DEEM, 2003, FORBES, 1991, HEIDENREICH, 2013a, JOSEPH, 2000, NALDO UND SAMOUR, 2004, REDIG, 1993, REDIG, 2007).

Diese potenziellen Speziesdispositionen sind jedoch in der Regel rein empirisch und beruhen auf der Häufigkeit, mit der bestimmte Arten mit Verdacht auf Aspergillose tierärztlich vorgestellt werden und bei denen eine Aspergillose diagnostiziert wird (MARTEL, 2016). So wurde bei einer retrospektiven Betrachtung von 1.516 Greifvogel- und Eulenpatienten einer amerikanischen Greifvogelklinik aus den Jahren 1974 - 1979 in 51 Fällen, darunter in 4/9 Gerfalken (= 44 %), 0/19 Wanderfalken, 1/35 Präriefalken und 0/6 Lannerfalken eine Aspergillose diagnostiziert (REDIG, 1980b).

Dabei wurde allerdings außer Acht gelassen, dass bestimmte Spezies häufiger in Menschenobhut gehalten oder häufiger in Auffangstationen gepflegt werden als andere und dass speziesspezifische Ansprüche an Management-, Trainings- und Haltungsbedingungen verschieden sein können. Letzteres kann unter Umständen in menschlicher Haltung nicht optimal realisiert werden (REDIG, 1980b).

Wissenschaftliche Studien, die eine spezifische Empfänglichkeit verschiedener Vogelarten und damit eine belegbare Speziesdisposition untersuchen, gibt es bei Greifvögeln bisher nicht und auch nur sehr vereinzelt in anderen Vogelfamilien. So wurde, bezogen auf die Gesamtmortalität und die Gewichtsverluste, bei

experimentell infiziertem Wirtschaftsgeflügel aus der Ordnung Galliformes eine absteigende Empfindlichkeit von Wachteln, über Puten hin zu Hühnern gegenüber *Aspergillus fumigatus*-Konidien festgestellt. Hierbei waren die pathologischen Läsionen bei Puten schwerwiegender als die bei Wachteln und Hühnern (GHORI UND EDGAR, 1973).

In der Studie erkrankten und starben Wachteln (67 % bzw. 93 %) deutlich häufiger an Aspergillose als Puten (60 % bzw. 80 %) und Hühner (20 % bzw. 60 %), nachdem sie mit zwei unterschiedlich hoch konzentrierten Sporenaerosolen über die Luft einer Inhalationskammer exponiert wurden. Bei einer sehr hohen Sporenkonzentration (so hoch, dass sie von den Untersuchern nicht mehr zählbar war) konnten allerdings statistisch keine Speziesunterschiede mehr detektiert werden, da 95 % der Hühner und jeweils 100 % der Wachteln und Puten innerhalb der ersten Woche nach Sporenexposition an einer Aspergillose verstarben. *In-vitro*-Studien mit Trachealzellkulturen, die aus Eintagsküken von Hühnern, Wachteln, Enten und Puten gewonnen wurden, postulieren zudem speziesspezifische Unterschiede in der zellulären Empfindlichkeit für durch *Aspergillus* spp. produziertes Aflatoxin B1. Diese nahm von Enten, über Puten und Wachteln zu Hühnern hin ab (COLWELL et al., 1973). Eine Studie an Hühnern zeigt zudem Empfindlichkeitsunterschiede zwischen einzelnen Hühnerlinien auf (FRIEND UND TRAINER, 1969). Bei Großfalken fehlen ähnliche Studien zu spezies- oder gattungsspezifischen Empfänglichkeitsunterschieden gänzlich.

2.2 Aspergillose

Die Aspergillose zählt mit zu den bedeutendsten und häufigsten Erkrankungen in der Vogelmedizin, wobei Individuen verschiedener Vogelfamilien weltweit betroffen sein können (BEERNAERT et al., 2010). Das klinische Bild der Aspergillose variiert von Einzeltiererekrankungen bis hin zu Bestandsproblemen mit hohen Mortalitätsraten (ARNÉ et al., 2011, BROWN UND REDIG, 1994, KUNKLE, 2003, O'MEARA UND WITTER, 1971, ZAFRA et al., 2008).

Ausgelöst wird die Erkrankung durch Schimmelpilze der Gattung *Aspergillus* spp., wobei häufig auch respiratorische Erkrankungen durch Schimmelpilze anderer Gattungen (z. B. *Penicillium* spp. oder *Mucor* spp.) unter diesem Krankheitsbegriff zusammengefasst werden (LATGÉ, 1999). Vor allem beim

chronischen Verlauf der Erkrankung können neben den Erregern selbst eine Reihe begünstigender Faktoren eine Rolle spielen (siehe 2.2.3.2). Sowohl die Erreger als auch die möglichen Cofaktoren einer Aspergillose werden im folgenden Kapitel behandelt.

2.2.1 Ätiologie und Epidemiologie

2.2.1.1 Schimmelpilze

Die Bezeichnung „Schimmelpilz“ ist kein Begriff für eine systematische Einheit sondern ein Sammelbegriff für Pilze mit ähnlichen Eigenschaften und morphologischen Kriterien. Schimmelpilze sind zellkerntragende (eukaryotische) Organismen mit Zellwänden aus dem Reich der Pilze (Fungi), die Chitosan, Chitin und Beta-Glykane, aber kein Chlorophyll enthalten (BAUER UND SCHWAIGER, 2011). Sie sind fadenförmig (filamentös) und zeichnen sich durch die Ausbildung von 2 - 10 µm breiten und bis zu einigen 100 µm langen Pilzfäden (Hyphen) aus (BAUER UND SCHWAIGER, 2011). Hyphen können durch Querwände (Septen) unterteilt sein, wobei es sich dabei um eine Aneinanderreihung von Einzelzellen handelt, welche durch eine zentrale Pore miteinander in Verbindung stehen. Außer diesem Hyphentypus gibt es auch querwandlose Hyphen, die mehrkernige, fadenförmige, mitunter verzweigte Zellen darstellen, und solche, die durch Einschnürungen stellenweise verengt und somit gegliedert sind (BAUER UND SCHWAIGER, 2011). Die meisten Schimmelpilze bilden watte- bis mehlartige, vielverzweigte, weiße oder farbige Hyphen (Fruktifikation). Gemeinsam bilden alle Hyphen ein Hyphengeflecht (Myzel), welches sich wiederum in ein ernährendes, ins Nährmedium eindringendes Substratmyzel und ein oberhalb davon entstehendes Luftmyzel unterteilen lässt (BAUER UND SCHWAIGER, 2011). Schimmelpilze zählen zur Gruppe der imperfekten Pilze (Deuteromycetes), welche kaum oder keine sexuelle Befruchtung betreiben, sondern sich fast ausschließlich durch asexuell gebildete Sporen (Konidien) und damit rein vegetativ fortpflanzen (BAUER UND SCHWAIGER, 2011, MÜCKE UND LEMMEN, 2004). Die Konidien gehen aus einem dicht stehenden Feld von speziell umgebildeten, säulenförmigen Hyphen (Konidiophoren oder Konidienträgern) hervor, welche aus einer vergrößerten Fußzelle und einem bläschenförmigen Ende (Vesikel)

bestehen. Auf dem Vesikel sitzen kurze, fertile Konidienmutterzellen (Sterigmen oder Phialiden), welche allseitig ausstrahlen und fortwährend Konidien abschnüren (BAUER UND SCHWAIGER, 2011, LATGÉ, 1999, MÜCKE UND LEMMEN, 2004) (siehe Abbildung 3). Einige Arten weisen zwischen den Konidiophoren und den Phialiden noch sogenannte Spitzsäulen (Metulae) auf. Die Form der Konidiophoren und der Abschnürungsmechanismus der Konidien (Konidiogenese) werden zur morphologischen Speziesdifferenzierung der Schimmelpilze herangezogen. Konidien können aerogen transportiert und von Tieren inhaliert werden und dann im tierischen Organismus auskeimen.

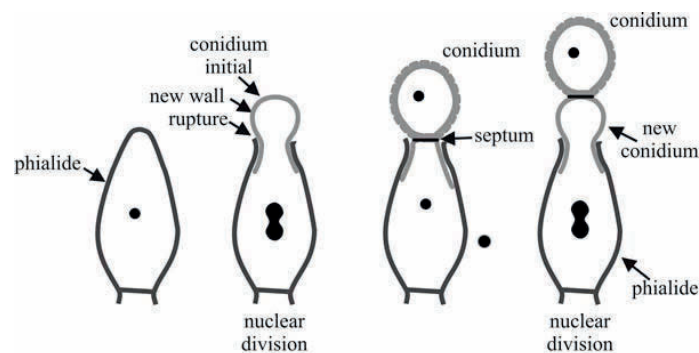


Abbildung 3: Konidiogenese von *A. fumigatus* (entnommen aus MOORE D. et al., 2011).

Vertreter der Gattungen *Aspergillus* spp., *Mucor* spp. und *Penicillium* spp. werden regelmäßig als Erreger von Systemmykosen bei verschiedenen Tierarten beschrieben (BAUER UND SCHWAIGER, 2011). Beim Vogel sind dabei mit Abstand am häufigsten Arten der Gattung *Aspergillus* spp. vertreten, weshalb sich im Folgenden auf diese Gattung beschränkt wird.

2.2.1.1.1 Gattung *Aspergillus* spp.

Schimmelpilze der Gattung *Aspergillus* spp. sind opportunistische und ubiquitär vorkommende Bodensaprophyten, die in der Außenwelt tote organische Substanz nutzen und nach Inhalation im tierischen Organismus pathogenes und angio-invasives Potential aufweisen können (DAHLHAUSEN, 2006, KUNKLE, 2003). Da sie fakultativ thermophil sind und ihr Temperaturoptimum zwischen 30 - 40 °C (Wachstumsbereich 0 - 55 °C, überlebensfähig bis 70 °C) liegt, können sie sich auch im Körperinneren von Säugetieren und Vögeln vermehren und dort die Aspergillose verursachen (LATGÉ, 1999, MARTEL, 2016). Da Schimmelpilze der

Gattung *Aspergillus* sauerstoffabhängig (obligat aerob) wachsen, werden bevorzugt belüftete Hohlräume wie die Atemwege oder die Hautoberflächen besiedelt, wobei auch tieferliegende Gewebeschichten befallen und mit Hyphen durchsetzt werden können (BAUER UND SCHWAIGER, 2011).

Bei Vögeln wird mit Abstand am häufigsten die Spezies *Aspergillus fumigatus* als Erreger isoliert, wobei in einigen Fällen auch *A. flavus*, *A. niger*, *A. glaucus*, *A. nidulans*, *A. terreus*, *A. clavatus*, *A. oryzae*, *A. ustus* und *A. versicolor* nachgewiesen werden (ARNÉ et al., 2011, BAILEY et al., 2005, BEERNAERT et al., 2010, JONES UND OROSZ, 2000, MARTEL, 2016, NALDO UND SAMOUR, 2004). So wiesen im Rahmen eines 16-wöchigen Surveillance-Programmes für Aspergillose 17 von 32 (55 %) pathologisch untersuchten Puten *A. fumigatus* mit insgesamt 114 verschiedenen Isolaten auf (LAIR-FULLERINGER et al., 2003). Zudem wurden aus verschiedenen Wildvögeln in 45/68 Aspergillosefällen *A. fumigatus*, in 3/68 Fällen *A. flavus* und 1/68 Fällen *A. nidulans* isoliert (AINSWORTH UND REWELL, 1949). Auch bei 101 pathologisch untersuchten, juvenilen Weißstörchen stellte *A. fumigatus* mit 48,9 % die am häufigsten aus entzündlich veränderten Lungen isolierte Schimmelpilzart dar (OLIAS et al., 2010a). Zudem wurde *A. fumigatus* bei wildlebenden Habichten aus 26 von 49 (53 %) Trachealabstrichen sowie bei allen pathologisch und histologisch bestätigten Aspergillosefällen nachgewiesen (REDIG et al., 1980). Insgesamt wird die Häufigkeit der im Zuge der aviären Aspergillose isolierten Schimmelpilzspezies für *A. fumigatus* mit 95 % angegeben (TELL, 2005), weshalb im Folgenden ausschließlich auf *A. fumigatus* Bezug genommen wird.

2.2.1.1.1 *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus wurde von Fresenius erstmals im 19. Jahrhundert aus menschlichen Lungen und aus den Atemwegen einer Großtrappe (*Otis tarda*) des Frankfurter Zoos isoliert und nachfolgend beschrieben (FRESENIUS, 1863). Es ist die Schimmelpilzart mit dem größten pathogenen Potential, die schwere Mykosen, Allergien und Intoxikationen hervorrufen kann (LATGÉ, 1999, MÜCKE UND LEMMEN, 2004). Dies konnte auch bei Infektionsversuchen mit Puten gezeigt werden, in welchen nach Infektion mit *A. fumigatus* eine signifikant höhere Mortalität und deutlichere Lungenläsionen festgestellt wurden als durch *A. flavus* (RICHARD et al., 1981, RICHARD et al., 1984). Gleichzeitig ist *A. fumigatus* der

häufigste ubiquitäre Schimmelpilz, der aerogen transportierbare Sporen bildet (MULLINS et al., 1976, MULLINS et al., 1984).

Aspergillus fumigatus kann morphologisch bestimmt werden (TAYLOR, 2006). Mikroskopisch sind die dunkelblau-grün bis schwarz gefärbten, 2,0 - 3,5 µm durchmessenden Konidien sichtbar, die in Ketten angeordnet, basipetal aus einem dicht stehenden Feld von säulenförmigen, grünen, 5 - 9 µm langen und 2 - 3 µm breiten Phialiden auf 15 - 30 µm durchmessenden Vesikeln hervorgehen (LATGÉ, 1999, MARTEL, 2016, MÜCKE UND LEMMEN, 2004). Metulae fehlen bei *A. fumigatus* zwischen den Konidienträgern (Konidiophoren) und den Konidienmutterzellen (Phialiden). Auf Nährmedien wie dem Sabouraud Dextrose Agar (SAB) sind die makroskopisch sichtbaren Pilzkolonien ebenfalls grünlich gefärbt (siehe Abbildung 4). Auf Grund der charakteristischen Form der Konidienabschnürung werden Pilze der Gattung *Aspergillus* spp. auch als Gießkannenschimmel bezeichnet (siehe Abbildung 4).

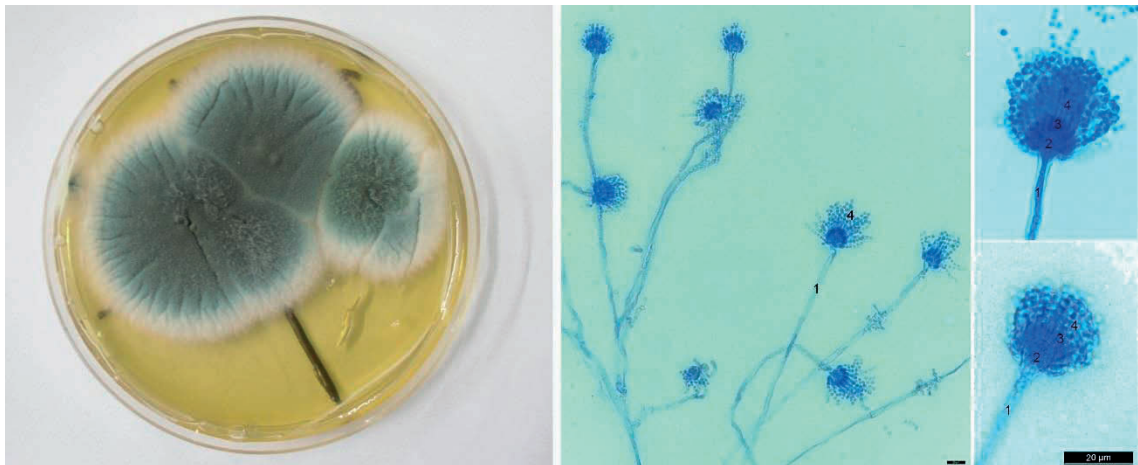


Abbildung 4: Links: Kulturelle Anzucht von *Aspergillus fumigatus* auf einem Sabouraud Dextrose Agar. Rechts: Hyphe (1) mit Konidiophore (2), Phialiden (3) und sich abschnürenden Konidien (4) von *Aspergillus fumigatus* nach Anfärbung mit Lactophenolblau. Wegen der Form der Konidienabschnürung wird *Aspergillus* spp. als Gießkannenschimmel bezeichnet (20x (links) 1000x (rechts) Vergrößerung, Breite des Maßstabsbalkens 20 µm).

2.2.2 Pathogenese

Den Hauptinfektionsweg der Aspergillose beim Vogel stellt die Inhalation von im Entwicklungszyklus der Schimmelpilze gebildeten und aerogen transportierten Sporen (Konidien) dar (NARDONI et al., 2006, WERNERY et al., 2004b). In selteneren Fällen führt der direkte Kontakt mit *A. fumigatus* zu lokal manifestierten Infektionen des Auges (BECKMAN et al., 1994, HOPPES et al., 2000) oder der Haut (ABRAMS et al., 2001, STOUTE et al., 2009, SUEDEMEYER et al., 2002). Daneben sind alimentär aufgenommene Konidien und Toxine eher zu vernachlässigen, da sie nach Ingestion vornehmlich zum Krankheitsbild der Mykotoxikose, nicht aber zu einer respiratorischen Aspergillose führen (CHUTE et al., 1965). Eine Erregerübertragung von Tier zu Tier oder eine Pilzausscheidung über Se- und Exkrete wird weitestgehend ausgeschlossen (BEERNAERT et al., 2010, CONVERSE, 2008).

Inhalierte Konidien können zu einer Besiedlung und Infektion des Atemtraktes führen, wenn sie nicht zuvor durch das Immunsystem inaktiviert werden (LATGÉ, 1999, MAINA UND COWLEY, 1998, TELL, 2005, VAN WAEYENBERGHE et al., 2012b). Für die Infektion scheint es begünstigend zu sein, dass Vögel im Vergleich zu Säugetieren eine höhere Körpertemperatur aufweisen und weniger anatomische und zelluläre Barrieren für die Schimmelpilzkonidien haben (MARTEL, 2016). So finden sich nur sehr vereinzelt hochprismatische Zilienzellen im respiratorischen Epithel und es fehlen eine Epiglottis und ein Zwerchfell, wodurch kaum Filterwirkung besteht bzw. kein effektiver Hustenreflex erfolgen kann (TELL, 2005). Zusätzlich scheint der einseitig gerichtete Luftstrom in der Lunge parallel zum bidirektionalen Luftstrom in den Luftsäcken eine Beseitigung von inhalierten Konidien zu erschweren (FEDDE, 1998, TOTH, 2000). Ein weiterer begünstigender Faktor ist, dass Vögel einen sehr geringen Gehalt an respiratorischen Makrophagen besitzen (MAINA, 2002). Die stattdessen vorliegenden heterophilen Granulozyten gelten zudem als weniger effektiv als die neutrophilen Granulozyten von Säugetieren, da sie mit weniger wirksameren Hydrolasen, Lysozymen und kationischen Proteinen anstelle von Myeloperoxidasen und Oxidasen arbeiten (HARMON, 1998, KLIKA et al., 1996, NGANPIEP UND MAINA, 2002). Allerdings wurde gezeigt, dass die vergleichsweise geringere Anzahl respiratorischer Makrophagen die inhalierten Konidien zu großen Teilen

phagozytieren und dadurch unschädlich machen können (MAINA UND COWLEY, 1998, MAINA, 2002, RICHARD et al., 1981, VAN WAEYENBERGHE et al., 2012b). Jedoch ist von Laborsäugertieren bekannt, dass einige Konidien auch innerhalb von Makrophagen auskeimen, diese dadurch schädigen und somit der eigenen Phagozytose entgehen können (BEHNSEN et al., 2007, KURUP, 1984). Ein Auskeimen von *A. fumigatus* Konidien konnte in 5 % der respiratorischen Makrophagen von Tauben beobachtet werden, wodurch diese zytotoxisch auf die Makrophagen wirkten und sich dann frei im Zytoplasma entwickeln konnten (VAN WAEYENBERGHE et al., 2012b). Bei der Entstehung der Aspergillose wird eine Überlastung der Makrophagenkapazität durch eine zu hohe Konidienmenge angenommen (VAN WAEYENBERGHE et al., 2012b), wobei Parallelerkrankungen, Stress oder andersartige Immunsuppressionen ebenfalls infektionsbegünstigend wirken können. Zudem können die von *A. fumigatus* gebildeten Mykotoxine, wie das Mykotoxin T-2, die antimykotische Makrophagenaktivität beeinträchtigen und durch Initiation einer Stressantwort zur Verschlimmerung der Erkrankung führen (LI et al., 2013, LI et al., 2015).

Nicht-inaktivierte, ausgekeimte Konidien vermehren sich nach Beendigung der Keimruhe (Dormanz) vegetativ durch mitotische Teilung im tierischen Organismus. Sie verstoffwechseln dazu tierische Zellen und Gewebe und nutzen diese zum Pilzhyphenaufbau (Primärstoffwechsel in der Trophophase am Primärherd) (MOMANY UND TAYLOR, 2000, MÜCKE UND LEMMEN, 2004). Aus einzelligen Konidien entstehen so die mehrzelligen Hyphen. Mit der Umstellung auf den Sekundärstoffwechsel (Idiophase), welche meist durch eine Verarmung der Nährmedien oder Veränderungen der Lebensbedingungen im Wirtsorganismus (z. B. pilzassoziierte Entzündungsprozesse) initiiert wird, bilden die Hyphen am Primärherd Vermehrungsorgane (Konidiophoren mit Fußzelle, Vesikel und Phialiden) und ein Luftmyzel (Fruktifikation), welches fortwährend Konidien abschnürt (MÜCKE UND LEMMEN, 2004). Dabei scheint es einzigartig für die aviäre Aspergillose zu sein, dass einige *Aspergillus*-Spezies neben den für Schimmelpilze typischen asexuellen Vermehrungsstadien (RICHARD et al., 1981, STEDHAM et al., 1968) parallel auch seltene, sexuelle Vermehrungsstadien innerhalb des aviären Gewebes aufweisen (STEDHAM et al., 1968). Das Vorhandensein kaverner Luftsäcke, die hohe Körpertemperatur der Vögel und

eine hohe Empfindlichkeit des Organismus gegenüber häufig immunsuppressiv und somit infektionsbegünstigend wirkenden Mykotoxinen wird als Begründung für diese günstigen Vermehrungsbedingungen im Vogelorganismus angenommen (DAHLHAUSEN, 2006, GEDEK, 2002, TELL, 2005, WERNERY et al., 2004b).

Innerhalb des Vogelorganismus neu gebildete und nachfolgend auskeimende Konidien können kontinuierlich innerhalb der Atemwege (*per continuitatem*) gestreut werden, wobei auch eine Erregerverteilung durch Kontakt der besiedelten Respirationsorgane zu angrenzenden Organen und Geweben (*per contiguitatem*) möglich ist (CACCIUTTOLO et al., 2009, NARDONI et al., 2006). Vornehmlich werden auf diese Weise Luftsäcke und Lunge besiedelt, von denen aus die Schimmelpilze in anliegende Organe und den gesamten Körper streuen können (REDIG, 1993). Nach einem Einbruch in Gefäßwände können Pilzbestandteile, Hyphen oder Konidien zudem mit dem Blutstrom (*hämatogen*) verteilt werden (FEMENIA et al., 2007, HASEGAWA et al., 1971, RICHARD UND THURSTON, 1983). Dabei können Herz, Gehirn, Knochenmark, Niere und andere Gewebe besiedelt werden (BROWN et al., 2008, KUNKLE, 2003).

Die Wirkung der Schimmelpilze im tierischen Organismus und die im Zuge einer Infektion aktivierten Abwehrmechanismen gegen diese Erreger sind die Ursache für die Entstehung typischer Aspergilloseläsionen (MARTEL, 2016). Das Auskeimen der Konidien führt oft zur Zerstörung der befallenen Zelle (Zellnekrose) (VAN WAEYENBERGHE et al., 2012b). Gewebsinvasionen von Pilzhyphen führen zu Gewebsnekrosen sowie Plaqueformation und damit zur Verlegung von luftleitenden Wegen (BEN-AMI et al., 2010, OGLESBEE, 1997). Zudem fördern die von Aspergillen gebildeten Gliotoxine und die Oxalsäure ebenfalls die Entstehung von Gewebsnekrosen (RICHARD et al., 1994, RICHARD et al., 1996, RICHARD, 1997, TELL, 2005, WOBESER UND SAUNDERS, 1975). Doch auch die Phagozytose durch Makrophagen oder Granulozyten als Abwehrreaktion des Körpers geht im Vogelorganismus meist mit starken, invasiven, zellulären und/oder mit granulomatösen Entzündungsprozessen einher (BEERNAERT et al., 2010, O'MEARA UND WITTER, 1971, OGLESBEE, 1997). Diese Entzündungsläsionen können auf wenige Bereiche wie die Trachea oder die Syrinx beschränkt bleiben oder in multiplen Organsystemen vorkommen (SINGH

et al., 1993, STROUD UND DUNCAN, 1982, VESELSKY et al., 1984). Zusätzlich zu den Gewebnekrosen und -läsionen können Mykotoxine (z. B. Aflatoxine) als potente Giftstoffe bereits in kleinen Konzentrationen schädigend auf unterschiedliche Organsysteme wirken und vornehmlich die Funktionen von Niere und Leber negativ beeinflussen (MORI et al., 1998).

2.2.3 Verlaufsformen

Je nach Erregerausbreitung und Fortschreiten der Infektion unterscheidet man klinisch den häufigeren und gut bekannten chronischen und den selteneren akuten Verlauf der Aspergillose.

2.2.3.1 Akute Aspergillose

Bei der akuten Verlaufsform entwickelt sich eine Aspergillose innerhalb von wenigen Tagen bis wenigen Wochen (3 - 14 Tage). Sie kann als Folge einer sehr hohen Exposition mit Schimmelpilzsporen entstehen, welche die Kapazität der Makrophagen und gänzlich die Immunkompetenz des Vogels überlasten (HEIDENREICH, 2013a, JONES UND OROSZ, 2000, REDIG, 1980b, 2007). Was in diesem Zusammenhang unter sehr hoher Sporenkonzentration zu verstehen ist, bleibt oft unklar, da die Quantifizierung der inhalierten Konidienmenge in klinischen Fallberichten meist fehlt. Es finden sich aber Angaben in Untersuchungen bei Steppenmöwen (*Larus cachinnans micaellis*), in denen acht bestätigte Aspergillosefälle mit einer Pilzkonzentration von 450 - 525 koloniebildenden Einheiten (KbE) pro Kubikmeter Luft in der Umgebung einer Auffangstation auftraten (NARDONI et al., 2006). Eine weitere Studie, in der eine Quantifizierung der Konidienmenge durchgeführt wurde, betrifft einen Putenbestand mit hohen Verlusten durch akute Aspergillose. In diesem wurden 100.000 (1×10^5) bzw. 2.500.000 Organismen ($2,5 \times 10^6$) pro Gramm Einstreumaterial als Auslöser ermittelt (DYAR et al., 1984). In experimentellen Studien an Eintagsküken von Hühnern, Wachteln und Puten waren Expositionsdosen von 3.258 - 9.840 Sporen pro Kubikmeter Luft ausreichend, um eine Aspergillose mit erhöhter Mortalität zu induzieren (GHORI UND EDGAR, 1973). Hierzu wurden die Tiere über sechs Stunden mit sporulierten *A. fumigatus*

Kolonien exponiert. In einer anderen Studie wurden bei Puten durch zehnmütige Exposition mit 72 mg/m^3 bzw. 144 mg/m^3 *A. fumigatus*-Sporen in Inhalationskammern eine Mortalität von 50 % und deutliche Lungenläsionen erzielt (RICHARD et al., 1981, RICHARD et al., 1984). Bei Falken gibt es lediglich einzelne Fallbeschreibungen, in denen Tiere im Anschluss an eine erhöhte Sporenexposition durch Einstreuwechsel, Erntearbeiten, Kompostumschichtung oder Volierenreinigung akut an einer Aspergillose verstarben (REDIG, 1980b, 2007). In diesen Berichten wurde jedoch nicht angegeben, wie hoch die Sporenkonzentration in den jeweiligen Fällen war.

Unter natürlichen Bedingungen kann eine hohe Schimmelpilzsporenexposition im Zusammenhang mit Pilzwachstum in Futterresten (KHOSRAVI et al., 2008) und Einstreumaterial (z. B. Stroh, Bagasse oder Heu), in Kompost, Exkrementen und Abfall auftreten (DYAR et al., 1984, GLARE et al., 2014, HADRICH et al., 2013, HUTTON, 1966, MILLNER et al., 1977, REDIG, 1980b). Auch auf feuchten Böden oder in Silagegruben (FRIEND, 1999) ist dies möglich. Heu und Stroh können dabei beträchtliche Mengen an Pilzsporen von 10^5 - 10^6 Sporen/g enthalten (GREGORY UND LACEY, 1963, HACKING UND BLANDFORD, 1971, LACEY UND LACEY, 1964). In der Umwelt entsteht ein erhöhter Schimmelpilzsporengehalt in der Luft oft, wenn eine Überschwemmung oder ähnliche Feuchtperioden von einer Trockenperiode gefolgt werden (DYKSTRA et al., 1997, FRIEND, 1999, JOSEPH, 1996). Dadurch scheint ein initiales Wachstum und eine anschließende Sporulation der Schimmelpilze begünstigt zu werden.

Bei der akuten Aspergillose scheinen neben der Konidiendosis keine Immunsuppression oder begünstigenden Cofaktoren zur Auslösung der Erkrankung notwendig zu sein (REDIG, 1980b, REDIG, 1993). Allerdings wird vermutet, dass Stress, z. B. im Zusammenhang mit Fang, Transport, Training und Unterbringung von Wildvögeln (AINSWORTH UND REWELL, 1949, FRIEND UND TRAINER, 1969, REDIG, 1980b), oder eine fehlende Immunkompetenz bei sehr jungen Individuen, den klinischen Verlauf erschweren können (OLIAS et al., 2010a, REDIG, 1980a). Ob zur Induktion der akuten Aspergillose eine einmalige Schimmelpilzsporenexposition ausreicht, wie lange die Expositionszeit und wie hoch die Konidienmenge hierfür sein müssen, ist noch weitestgehend unerforscht. Somit kann hierüber für die meisten Vogelspezies keine Aussage getroffen werden.

Fallbeschreibungen der akuten Aspergillose erfolgten bei verschiedenen Vogelfamilien, wie Papageien (VAN DER HEYDEN, 1993), Enten (ADRIAN et al., 1978, BAIR et al., 1988), Straußen (PERELMAN UND KUTTIN, 1992), Möwen (FRIEND UND TRAINER, 1969), Pinguinen (CARRASCO et al., 2001, FLACH et al., 1990) und Störchen (OLIAS et al., 2010a). Anorexie, Stimmverlust, Zyanosen, hochgradige Dyspnoe, Giemen, Erschöpfung, gesträubtes Gefieder, Lethargie, grünlich-wässrige Durchfälle und plötzlicher Tod können als unspezifische, klinische Symptome auftreten (ATASEVER UND GMSOY, 2004, CHAUDHARY UND SADANA, 1988, DAHLHAUSEN, 2006, GMSOY et al., 2004, PANDITA et al., 1991). Dabei können die klinischen Symptome bereits 24 Stunden nach Sporeninhalation auftreten und von einem schnellen Tod innerhalb der nächsten Tage gefolgt werden (JOSEPH, 1996, PANDITA et al., 1991). So zeigten Wachteln 24 Stunden nach der experimentellen Inokulation mit *A. fumigatus*-Sporen Anorexie, Schwäche, Dyspnoe und Tod mit einer Gesamtmortalität von 20 % (CHAUDHARY UND SADANA, 1988). Die Mortalität der akuten Aspergillose kann aber auch deutlich höher sein (KUNKLE, 2003). Sie wird in Wirtschaftsgeflgelbestnden mit bis zu 50 % angegeben (KRAUTWALD-JUNGHANNS, 2012, RICHARD et al., 1981). Experimentell wurde sogar eine Mortalität von 100 % bei Wachteln und immunsupprimierten Tauben beschrieben (BEERNAERT et al., 2008, GMSOY et al., 2004). In einer experimentellen Studie mit Staren verstarben 6/18 Tiere innerhalb der ersten zwei Tage nach Inokulation mit *A. fumigatus*-Sporen und alle 18/18 inokulierten Individuen innerhalb von sechs Tagen (ATASEVER UND GMSOY, 2004). Doch auch Berichte von Wildvögeln belegen, dass Fälle von Massenmortalitt bei Küken sowie bei adulten Individuen unter natürlichen Bedingungen auftreten können (FRIEND, 1999, OLIAS et al., 2010a), wobei bei einer erhöhten Sporenexposition vor allem Wassergeflügel betroffen zu sein scheint (FRIEND, 1999).

In der Regel sind bei der akuten Aspergillose vor allem die Lungen betroffen, die sich in der Sektion als gerötet, dematisiert und mit multiplen, kleinen weißen Knötchen durchsetzt darstellen (ADRIAN et al., 1978, BAIR et al., 1988, HACKING UND BLANDFORD, 1971, McMILLAN UND PETRAK, 1989, REDIG, 1980b). Bei akuten bis subakuten Verläufen, bei denen sich die Symptome über 1 - 2 Wochen (akut) bzw. 1 - 4 Wochen (subakut) entwickeln, können ebenfalls Läsionen in der

Trachea, in der Syrinx, in den Bronchien, dem Myokard oder den Luftsäcken auftreten (GÜMÜŞSOY et al., 2004, REDIG, 1980a). So zeigten experimentell infizierte Stare 2 - 6 Tage nach Infektion bereits gelbliche, käsige, granulomatöse Läsionen in Lunge und Luftsäcken (ATASEVER UND GÜMÜŞSOY, 2004). Es waren aber auch im Myokard, auf der Brustwand und auf den serösen Häuten Granulome sichtbar, in denen histologisch heterophile Granulozyten, Makrophagen, mehrkernige Riesenzellen und Pilzhyphen nachweisbar waren (ATASEVER UND GÜMÜŞSOY, 2004). Im Atemtrakt von experimentell infizierten Puten traten erste Granulome bereits 24 Stunden nach Sporeninokulation auf (KUNKLE UND RIMLER, 1996). Dabei nahm über einen Beobachtungszeitraum von fünf Tagen der Schweregrad der Läsionen täglich zu (FEMENIA et al., 2007). Zudem wurden in experimentell infizierten Eintagshühnerküken 2 - 8 Tage nach Sporeninokulation (d. p. i.) atelektastische und fibrotische Pneumonien, Aszites, Rechtsherzhypertrophien sowie Rechtsherzdilatationen im Sinne eines *Cor pulmonale* festgestellt. Diese entwickelten sich vermutlich als Folge von Klappeninsuffizienzen und pulmonaler Hypertonie (JULIAN UND GORYO, 1990).

2.2.3.2 Chronische Aspergillose

Am häufigsten verläuft die Aspergillose als chronische Erkrankung, also mit einer Erkrankungsdauer über vier Wochen. Sie hat meist eine langfristige Erreger-Exposition in Kombination mit synergistisch wirkenden Cofaktoren zur Ursache (BEERNAERT et al., 2010). Als Cofaktoren können dabei eine zu geringe Ventilation, suboptimale Umgebungstemperaturen, eine zu hohe Luftfeuchtigkeit bzw. sehr trockene Luft fungieren (RICH, 1991, TELL, 2005). Zudem können eine erhöhte Staub- oder Rauchexposition, Ernährungsmängel (z. B. Hypovitaminose A) sowie mangelnde Fütterungs- und Haltungshygiene die Clearance-Mechanismen der Atemwege hemmen und das respiratorische Epithel schädigen (FRIEND, 1999, GIRLING, 2005, RICH, 1991, TELL, 2005). Eine langandauernde antibiotische Therapie sowie das Vorliegen einer Immunsuppression erleichtern die Infektion und die Ausbreitung der mykotischen Erreger im aviären Organismus (GIRLING, 2005). Iatrogen induzierte Immunsuppressionen durch Kortikosteroid-behandlungen zählen ebenfalls zu den Cofaktoren einer

Aspergillose (VERSTAPPEN UND DORRESTEIN, 2005). Gleichsam fördern Sekundärinfektionen mit bakteriellen (KALINER UND COOPER, 1973, VAN CUTSEM UND FRANSEN, 1987), parasitären (CALIENDO UND MCKINNEY, 2013, YOUNG et al., 1998) oder viralen (RAUTENSCHLEIN UND LEGLER, 2006) Erregern die Entstehung der chronischen Aspergillose. Auch Vergiftungen durch Schwermetalle, Insektizide oder Rauchgase (JUNG et al., 2009, SOUZA UND DEGERNES, 2005) können durch ihre Beanspruchung und Schädigung des Immunsystems als Cofaktoren wirken. Gleichsam wurden Vorerkrankungen, Traumata, Verölung nach Ölkatastrophen, Jagdverletzungen oder das Fangen von Wildvögeln, ebenso wie ein hoher Personenverkehr in Haltungseinrichtungen sowie ein häufiger Transport als wegbereitende Cofaktoren beschrieben (FRIEND, 1999, JONES UND OROSZ, 2000, KAPLAN et al., 1975, WARD et al., 1970).

Im Zuge einer chronischen Aspergillose treten klassischer Weise fibrinöse, exsudative, granulomatöse oder nekrotisierende Entzündungen von Lunge und Luftsäcken auf, wobei meist auch andere Organsysteme durch die Ausbreitung der Erreger oder deren toxischer Stoffwechselprodukte in Mitleidenschaft gezogen werden können (BROWN et al., 2008, CONVERSE, 2008, KUNKLE, 2003, O'MEARA UND WITTER, 1971).

Im Gegensatz zum langsamen Entstehungsprozess der Erkrankung werden Vogelpatienten mit chronischer Aspergillose meist mit dem Vorbericht eines akuten Krankheitsgeschehens vorgestellt, da die Erkrankung in den meisten Fällen für den Halter lange Zeit unentdeckt bleibt. Dies ist meist der Fall, da die Symptome einer Aspergillose vor dem Einsetzen deutlicher respiratorischer Krankheitsanzeichen entweder gänzlich fehlen oder unspezifisch sein können. Neben respiratorischen Symptomen können Fressunlust, Würgen, Erbrechen gastrointestinale Symptome wie Diarrhoe sowie zentralnervöse Symptome wie Krämpfe oder Tortikollis auftreten.

2.2.4 Manifestation und klinische Symptomatik

Generell können drei Manifestationen der Aspergillose unterschieden werden: eine respiratorische Manifestation mit granulomatösen Entzündungen in Lunge und Luftsäcken, eine lokal begrenzte Manifestation (z. B. tracheale Aspergillose) und eine generalisierte Manifestation, bei der sich die Krankheit vom

Respirationstrakt invasiv auf andere Organsysteme ausbreitet (REDIG, 1993). Es kann dabei nahezu jedes Organ infiziert werden (BEERNAERT et al., 2010).

Die respiratorische Manifestation ist durch Atemwegssymptome wie Tachypnoe, Zyanose, Dyspnoe, Stridores oder Aufblähen des *Sinus infraorbitalis* gekennzeichnet, wobei im Vorfeld meist ausschließlich unspezifische Symptome wie Leistungsabfall, Schwäche, Apathie, Anorexie, Gewichtsverlust und struppiges, glanzloses oder aufgeplustertes Gefieder auftreten (GIRLING, 2005, JONES UND OROSZ, 2000). Dyspnoe kann mit einer deutlichen, atemsynchronen Hebung und Senkung der Bauchdecke (forcierte Abdominalatmung), der Flügel und des Schwanzes (atemsynchrones Schwanzwippen) sowie mit einer Atmung mit geöffnetem Schnabel (Schnabelatmung) einhergehen. Eine doppelte Pumpbewegung der Bauchdecke kann auf einen aspergilloseassoziierten, gestörten Luftstrom im Bereich der abdominalen Luftsäcke hindeuten (BAILEY, 2008). Bei der Auskultation von Trachea, Luftsäcken und Lunge mittels Phonendoskop können inspiratorische Stridores mit Läsionen in der Trachea oder im oberen Respirationstrakt assoziiert sein, während expiratorische Atemgeräusche eher auf Manifestationen in den unteren Atemwegen hindeuten können (RICH, 1991, TULLY UND HARRISON, 1994). Ein ein- oder beidseitiges Hängenlassen der Schwingen nach mykotischer Infektion des pneumatisierten Humerus, des vorderen Brustluftsackes oder des Klavikularluftsackes wurde ebenfalls beschrieben (FORBES, 1991). Durch eine Schädigung der Lunge kann ein Bluthochdruck im Lungenkreislauf entstehen (*pulmonale Hypertension*), welche dilatative Veränderungen des rechten Herzens (*Cor pulmonale*), Aszites, Stauungen in der Lunge und Herzversagen nach sich ziehen kann (JULIAN UND GORYO, 1990).

Lokale Manifestationen der Aspergillose finden sich regelmäßig im Bereich der *Trachea* und der *Syrinx* (REDIG, 1993, REDIG, 2007), wobei neben Stridores und Dyspnoe, Stimmveränderungen und Stimmverlust sowie plötzliches Versterben zu den häufigen Symptomen zählen (BAILEY, 2008, BARTON et al., 1992, DAHLHAUSEN, 2006, SINGH et al., 1993, VESELSKY et al., 1984). Zu den selten auftretenden lokalen Manifestationen einer Erkrankung durch *Aspergillus* spp. zählen Dermatitis und Blepharitis (ABRAMS et al., 2001), epidermale Zysten

(SUEDMEYER et al., 2002), Pododermatitis (STOUTE et al., 2009), Omphalitis (CORTES et al., 2005), Rhinitis (FITZGERALD UND MOISAN, 1995, TSAI et al., 1992), Arthritis (OLIAS et al., 2010b) und Federinfektionen (DAVIDSON et al., 1989, TUDOR, 1983). Letztere können dabei in Federschädigung und Federrupfen resultieren (DAVIDSON et al., 1989, TUDOR, 1983). Auch Keratitiden mit intraokulären Pilzinvasionen wurden beschrieben, die sich klinisch in Blepharospasmus, geschwollenen und verklebten Augenlidern, periokulären Schwellungen, Photophobie, Hornhauttrübung und eitrigem Augenausfluss äußern können (BECKMAN et al., 1994, HOPPES et al., 2000).

Bei der generalisierten Manifestation der Aspergillose variieren die klinischen Symptome je nach betroffenem Organsystem von respiratorischen Symptomen, über Durchfall und Erbrechen oder Flugunfähigkeit bis hin zu plötzlichem Tod (BAILEY, 2008, DAHLHAUSEN, 2006, OGLESBEE, 1997, VAN VEEN et al., 1999). Bei Greifvögeln wurde zusätzlich das Auftreten von mintgrün gefärbtem Urin beobachtet, welches als Biliverdinurie bezeichnet und als Zeichen einer sekundären Leberschädigung gedeutet werden kann (BAILEY, 2008). Darüber hinaus können zentralnervöse Symptome nach aspergilloseassoziiertes (Meningo-) Enzephalitis (HUBBEN, 1958, OZMEN UND DORRESTEIN, 2004) sowie Paresen und Paralysen nach mykotischer Schädigung von Rückenmark oder peripherer Nerven auftreten (BARNETT et al., 2011, BYGRAVE, 1981, GREENACRE et al., 1992, VAN VEEN et al., 1999).

2.2.5 Diagnostisches Vorgehen bei Verdacht auf eine Aspergillose

Im Gegensatz zu verschiedenen etablierten postmortalen Nachweismethoden ist die *Intra-vitam*-Diagnose der aviären Aspergillose schwierig und erfordert die Kombination verschiedener Untersuchungsmethoden und -techniken (FORBES et al., 1992, FUDGE UND SPEER, 2001, JONES UND OROSZ, 2000). Eine gezielte Anamnese kann im Vorfeld der Untersuchungen erste Hinweise geben, jedoch nicht allein zur Diagnose führen (RICH, 1991). Die klinische Ausprägung der Aspergillose ist sehr variabel und für einige Vogelarten noch unbekannt. Auf Grund dessen und da pathognomonische Symptome der Aspergillose fehlen, ist vor

allem deren Früherkennung sehr schwierig (BEERNAERT et al., 2010, FLACH et al., 1990). Deshalb wird in der Humanmedizin und der Tiermedizin daran geforscht, die Entwicklung und Verfeinerung schnellerer und weniger oder nicht-invasiver Testverfahren zum *Intra-vitam*-Nachweis der Aspergillose voranzutreiben (AYDOGAN et al., 2010, BARTON, 2013, MELLOUL et al., 2014, SUSEVER UND YEGENOGLU, 2011). Gegenwärtig stehen nach einer fokussierten, klinischen Allgemeinuntersuchung verschiedene bildgebende, serologische, hämatologische, mikrobiologische, histologische, immunhistochemische und molekularbiologische Verfahren zur Auswahl, die auf unterschiedliche Art zur Diagnosefindung beitragen können (JONES UND OROSZ, 2000). Die Anwendbarkeit und Interpretation der verfügbaren diagnostischen Tests variiert jedoch zwischen verschiedenen Vogelspezies (CRAY et al., 2009b). Deshalb stehen die Vogelpraktiker in Bezug auf die *Intra-vitam*-Diagnose der Aspergillose bisher noch vor großen Herausforderungen und ein dringender Forschungsbedarf auf diesem Gebiet ist begründet. Speziell für Großfalken sind viele Aspekte zur Diagnose der Aspergillose noch unerforscht.

2.2.5.1 Klinische Allgemeinuntersuchung

Nach einer generellen klinischen Allgemeinuntersuchung, in der auf Haltung, Verhalten, Grad der Gefiedersträubung sowie Kot- und Urinabsatz geachtet wird, folgt die auf Aspergillose ausgerichtete Erweiterung zur klinischen Allgemeinuntersuchung (GIRLING, 2005). Dabei wird zuerst die Atmung eines Tieres in Ruhe und aus der Distanz evaluiert, um die Atmung nicht durch Aufregung zu beeinflussen (GIRLING, 2005). Die Ruheatemfrequenz bei Raumtemperatur sollte bei gesunden Falken zwischen 12 - 24 Atemzüge pro Minute betragen (KAISER UND BUCHER, 1985). Bei der nachfolgenden Adspektion aus der Nähe werden die oberen Atemwege (die Nase, die beiden *Sinus infraorbitales*, die Choanen, der Rachen und die Glottis) aus der Nähe adspiziert sowie die Luftröhre, die Lunge und die Luftsäcke phonendoskopisch auskultiert. Hierbei wird auf aspergillose-assoziierte Läsionen und Störungen der Atmung geachtet. Zudem wird eine ausreichende Venenfüllung überprüft und das Herz auskultiert, um differentialdiagnostisch ähnliche Herzkreislaufdefizienzen abzuklären. Im Rahmen von

Ausdauer- und Stresstests, sogenannte „Stresstests“, wird die Atmung tiefergehend untersucht, wobei die Atemfrequenz und die Erholungszeit der Tiere bewertet werden (TULLY UND HARRISON, 1994). Zur Durchführung eines Stresstests bei falknerisch trainierten Greifvögeln sollte der Vogel 30 Sekunden lang mit den Flügeln schlagen, was durch ein schnelles auf und ab Bewegen des Falknerhandschuhs erreicht werden kann, auf welchem die Tiere stehen und Balance zu halten versuchen (BAILEY, 2008). Es wird auf eine Erhöhung der Erholungszeit sowie der Atemfrequenz geachtet, welche hinweisend auf eine Aspergillose sein können. Die Erholungszeit ist dabei die Zeit, die benötigt wird, um eine belastungsbedingt erhöhte Atemfrequenz wieder auf den Ausgangswert zu senken und den normalen Ruheatemtyp zu erreichen. Unter Ruheatemtyp versteht man einen physiologischen kosto-sternalen Atemtyp mit geschlossenem Schnabel, der von außen kaum sichtbar ist und der sich von den verstärkten Atemtypen (z. B. betont abdominale Atmung) unterscheidet. Eine doppelte Pumpbewegung der Bauchdecke kann auf einen gestörten Luftstrom im Bereich der abdominalen Luftsäcke und damit auch auf eine Aspergillose hindeuten (BAILEY, 2008).

2.2.5.2 Bildgebende Untersuchungsverfahren

Bildgebende Untersuchungsverfahren bieten den Vorteil, dass die aspergillose-assoziierten Läsionen direkt oder indirekt visualisiert und somit diagnostisch nachgewiesen werden können. Je nach Untersuchungsmethode kann somit das Ausmaß der Erkrankung besser abgeschätzt werden, wobei jedes Verfahren seine Limitationen aufweist. Es wird zwischen nicht-invasiven und invasiven Methoden unterschieden.

2.2.5.2.1 Nicht-invasive, bildgebende Verfahren

Röntgenologische, computertomographische (CT) und magnetresonanztomographische Untersuchungen (MRT) sind nicht-invasive, bildgebende Verfahren, die im Rahmen der Aspergillosediagnostik verwendet werden können. Dabei sind CT und MRT auf Grund ihrer dreidimensionalen Darstellung besser geeignet als die Röntgenuntersuchung, um die Ausmaße und die exakten Lokalisationen von Pilzläsionen darzustellen (KRAUTWALD-JUNGHANNS et al., 1993, PHALEN, 2000,

PYE et al., 2000, SCHWARZ et al., 2015). Im Gegensatz zur Röntgenuntersuchung erfordern CT und MRT jedoch eine Narkose und höhere Untersuchungskosten, die neben der eingeschränkten Geräteverfügbarkeit deren Einsatz limitieren.

Röntgenaufnahmen werden in dorsoventraler und laterolateraler Ebene zur Untersuchung auf Entzündungsanzeichen (z. .B. Schwellung von Milz- und/oder Leber) oder Granulome (z. B. in Form von rundliche Verschattungen) in den Atemwegen empfohlen (GIRLING, 2005, JONES UND OROSZ, 2000, NEWELL et al., 1997). Häufige Anzeichen für eine Aspergillose sind eine deutliche parabronchiale Zeichnung als Befund einer Bronchiopneumonie, eine Asymmetrie der Luftsäcke, eine Verdickung der Luftsackwände, eine Verwaschung der Organ-grenzen sowie querverlaufende Linien im Bereich der Luftsäcke (sogenannte „Luftsackspangen“) (GIRLING, 2005, McMILLAN UND PETRAK, 1989, PHALEN, 2000). Zusätzlich können Überblähungen der Luftsäcke sichtbar werden, wenn Atemwegläsionen eine Ventilstenose an den Eingängen der Luftsäcke verursacht haben (sogenanntes „Airtrapping“). Röntgenologisch feststellbare Veränderungen bei Falken können allerdings auch sehr geringfügig sein und lediglich in einer schlechten Abgrenzbarkeit der Herzsilhouette sowie einer erhöhten Röntgendichte der kaudalen Lungengrenze bestehen (VORBRÜGGEN et al., 2013).

Folglich kann eine röntgenologische Untersuchung nur Hinweise auf eine Aspergillose liefern und keine definitive Diagnosestellung erlauben, da die festgestellten Läsionen auch diverse andere Ursachen haben können.

2.2.5.2.2 Invasives, bildgebendes Verfahren – Endoskopie

Bei der endoskopischen Untersuchung können mittels einer in die Atemwege eingeführten Kamera diese und andere innere Organe direkt begutachtet werden. Dabei können die Trachea (Tracheoskopie) und die Körperluftsäcke (endoskopische Laparoskopie) untersucht werden (LIERZ, 2008). In der Tracheoskopie kann sich eine Aspergillose als schleimig-zähe, fibrinöse bis granulomatöse Verlegung der Bronchen, meist im Bereich der Bifurkation, oder als Tracheitis darstellen (LIERZ, 2008). Zur endoskopischen Laparoskopie ist eine Inzision der Haut erforderlich, weshalb dies eine invasive Maßnahme im engeren Sinne darstellt (LIERZ, 2008). Neben der Inspektion sind mikrobiologische, zytologische und histologische Probenentnahmen möglich, die eine definitive

Diagnose der Aspergillose ermöglichen (CAMPBELL UND ELLIS, 2007, JONES UND OROSZ, 2000, LIERZ, 2007, TAYLOR, 1997). Trübe, verdickte und vermehrt vaskularisierte Luftsackwände deuten neben dem Vorliegen von weißlich-gelben, knotigen, granulomatösen bis konfluierenden oder plaque-ähnlichen Läsionen und einem aktiven Schimmelpilzmyzel auf eine Aspergillose hin (BAILEY, 2008). Lungenformen der Aspergillose oder Infektionen der nicht inspizierten Luftsäcke könnten durch die endoskopische Untersuchung allein übersehen werden. Deshalb sollten weitere Diagnostika im Falle eines unauffälligen Endoskopieergebnisses angeschlossen werden.

2.2.5.3 Hämatologische Untersuchung

Die hämatologische Untersuchung im Rahmen der Diagnostik einer Aspergillose beinhaltet die Evaluation des weißen und roten Blutbildes. So wird die Verteilung, die Anzahl, der Reaktionsstatus und der Zustand der Blutzellen sowie deren Anteil am Gesamtblut beurteilt (CAMPBELL UND ELLIS, 2007). Beim Vogel wurden diverse Veränderungen des Blutbildes und der Zellmorphologie im Zusammenhang mit einer Schimmelpilzinfektion beschrieben, die allerdings auch im Zuge anderer Erkrankungen und Infektionen auftreten können. Eine Leukozytose mit Heterophilie, Lymphopenie und Monozytose sowie eine nicht-regenerative Anämie kann im Zusammenhang mit einer Aspergillose entstehen (CAMPBELL UND ELLIS, 2007, JONES UND OROSZ, 2000, PANDITA et al., 1991, PENDL, 2008b). Lymphozyten und heterophile Granulozyten können aktiviert sein, was sich in Anzeichen reaktiver und vergrößerter Granula und einer Verdunkelung des Zytoplasmas äußert (PENDL, 2008a, b). Experimentelle Studien, in denen die hämatologischen Veränderungen unter definierten Bedingungen im Zuge einer Aspergillose beschrieben werden, wurden bisher nur bei Wachteln durchgeführt (PANDITA et al., 1991). Dort war eine heterophile Leukozytose mit Lymphopenie auffällig, während Mittelwerte von Hämoglobin, Erythrozytenzahl und Hämatokrit im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert waren (PANDITA et al., 1991). Ähnliche Studien fehlen bei Greifvögeln.

Da hämatologische Veränderungen stets unspezifisch sind und keine definitive Diagnose der Aspergillose erlauben, sollte die Hämatologie immer im

Zusammenhang mit anderen klinischen und diagnostischen Befunden interpretiert werden (JONES UND OROSZ, 2000).

2.2.5.4 Serumdiagnostik

Serum oder Plasma eignet sich als Untersuchungsmaterial für eine Vielzahl verschiedener Untersuchungen im Rahmen der Aspergillosediagnostik (JONES UND OROSZ, 2000). Die Probenentnahme ist verhältnismäßig schnell und einfach, weshalb der Einsatz von sensitiven und spezifischen serumdiagnostischen Nachweisverfahren einen großen Vorteil für die tiermedizinische Diagnostik bieten kann. Es können aspergillosespezifische Antikörper (Anti-*A. fumigatus*-Antikörper), spezifische Antigene und Toxine detektiert werden (BEERNAERT et al., 2010, JONES UND OROSZ, 2000). Ebenfalls können Entzündungsmarker, wie die Akute-Phase-Proteine (APPs) und Serum-/Plasma-Proteinfraktionen mittels Elektrophorese bestimmt werden, um zu ermitteln, ob die Proteinprofile bestimmten Krankheitsbildern zugeordnet werden können (CRAY UND TATUM, 1998, CRAY et al., 2007, CRAY, 2012). Dies erfolgte bisher erst für wenige Vogelspezies. Für Falken sind diese Testsysteme größtenteils weder etabliert noch validiert.

2.2.5.4.1 Anti-*Aspergillus fumigatus*-Antikörper

Anti-*A. fumigatus*-Antikörper können vom tierischen Organismus als Reaktion auf die Infektion mit *A. fumigatus* produziert werden (humorale Immunantwort). Antikörper bedeuten dabei allerdings nicht immer einen effektiven Schutz gegen die Erreger, da hohe Antikörperspiegel eventuell initial sogar progressiv für eine Aspergillose zu wirken scheinen (BLANCO UND GARCIA, 2008, SHOHAM UND LEVITZ, 2005). Allerdings spielt neben der humoralen Immunantwort die zelluläre Immunantwort bei der Abwehr gegen *Aspergillus* spp. eine wichtige Rolle, weshalb die Antikörperantwort individuell sehr unterschiedlich hoch ausfallen kann (PEDEN UND RHOADES, 1992). Bei immunsupprimierten Tieren kann die Antikörperproduktion verringert sein, sodass ein negativer Antikörpernachweis eine Infektion nicht ausschließt (MARTEL, 2016). Andererseits kann eine ausbleibende Antikörperproduktion auch die Folge einer sich mit der Zeit entwickelten Immuntoleranz gegen *A. fumigatus* sein (GERMAN et al., 2002). Eine

solche „Lokale orale/nasale Schleimhauttoleranz“ wurde nach Applikation verschiedener Antigene auf die Schleimhäute beschrieben, was nachfolgend ein Ausbleiben der systemischen Antikörperantwort auf diese Antigene zur Folge hatte (WEINER et al., 2011).

Generell ist ein messbarer Antikörperanstieg oft um 10 - 14 Tage verzögert zum Infektionszeitpunkt festzustellen, was für die Diagnosestellung bei der akuten Aspergillose nachteilig sein kann und innerhalb dieses Zeitraumes zu falsch negativen Testergebnissen führen könnte (MARTEL, 2016).

Zur Detektion von Anti-*A. fumigatus*-Antikörpern wurden Agar-Gel-Diffusionstests (AGID) und indirekte enzymgekoppelte Immunadsorptionstests (ELISA) bei Hühnern (FRANÇA et al., 2012), Puten (PEDEN UND RHOADES, 1992), Tauben (MARTINEZ-QUESADA et al., 1993), Enten (BUXTON UND SOMMER, 1980), Papageien (CRAY et al., 2009b, GEISSLER UND GERINGER, 1977, IVEY, 2000), Nandus (GEISSLER UND GERINGER, 1977), Pinguinen (CRAY et al., 2009b, GERMAN et al., 2002, GRACZYK UND COCKREM, 1995, GRACZYK et al., 1998, REIDARSON UND MCBAIN, 1995), Greifvögeln und Eulen (CRAY et al., 2009b, MORISHITA et al., 1998, REDIG et al., 1997) beschrieben.

Bei Greifvögeln wurde ein kommerzieller Immundiffusionstest bei freilebenden Präriefalken (*Falco mexicanus*) verwendet, mit dem fehlende Antikörpertiter bei den getesteten Falkennestlingen attestiert wurden (MORISHITA et al., 1998). In den Vereinigten Staaten wurde ein indirekter ELISA-Test entwickelt, der speziesspezifische, sekundäre Antikörperkonjugate anti-Falke, anti-Pute, und anti-Papagei verwendet. Er wurde bei Gerfalken (*Falco rusticolus*), Wanderfalken (*F. peregrinus*), Präriefalken (*F. mexicanus*), Merlinen (*F. columbarius*), Buntfalken (*F. sparverius*), Hybridfalken, Habichten (*Accipiter gentilis*) und Rundschwanz-sperbern (*A. cooperii*) erfolgreich getestet (BROWN UND REDIG, 1994, JONES UND OROSZ, 2000, REDIG et al., 1997). Auf diese Weise wurden bei klinisch und subklinisch an Aspergillose erkrankten Greifvögeln Anti-*A. fumigatus*-Antikörper detektiert, wobei kein Zusammenhang zwischen der Antikörpermenge und der klinischen Prognose gezeigt werden konnte. In einer anderen Studie wurden *Aspergillus*-spezifische Antikörper bei *A. fumigatus*-infizierten Greifvögeln festgestellt (CRAY et al., 2009b). Jedoch waren diese Antikörper auch bei gesunden Individuen in gleicher Weise vorhanden, was die Aussagekraft eines positiven ELISA-Testergebnisses relativierte. Als Ursache

hierfür wurde von den Autoren eine wiederholte und erhöhte *Aspergillus*-Antigenexposition diskutiert, die im Zusammenhang mit Haltung, Unterbringung und Umwelt aufgetreten sein könnte, ohne zu einer klinischen Erkrankung bei den Tieren zu führen (CRAY et al., 2009b). Experimentelle Evaluationen von Anti-*A. fumigatus*-Antikörpern unter kontrollierten Bedingungen anhand von experimentell infizierten Greifvögeln fehlen zur Validierung der Testergebnisse, sodass diese gegenwärtig bezüglich einer Aspergillose mit Vorsicht interpretiert werden müssen.

2.2.5.4.2 *Aspergillus*-Antigen

Nahezu 100 verschiedene (Glyko-) Proteine von *A. fumigatus* sind als Antigene und teils als Virulenzfaktoren bekannt (LATGÉ, 1999). Insgesamt können die virulenzassoziierten Antigene von *A. fumigatus* in die Gruppen der Adhäsine (fördern die Interaktion zwischen Pilz und Wirtszelle), der Pigmente (inhibieren die Phagozytose der Konidien), der toxischen Moleküle (wirken immunsuppressiv und können zu Zytolyse der Wirtszellen führen) und der Enzyme (unterstützen u.a. die invasive Verbreitung des Pilzes) eingeteilt werden (DENIKUS, 2004). Darunter wurden einzelne Antigene von *A. fumigatus* genauer untersucht und charakterisiert, sodass sie in der Humanmedizin routinemäßig für die Aspergillosediagnostik genutzt werden konnten (DENIKUS, 2004). Dabei wurde als erstes Antigen das zellwandassoziierte Polysaccharid Galactomannan (GM) charakterisiert, das zuerst in experimentell infizierten Kaninchen mit invasiver Aspergillose nachgewiesen wurde (ANDREWS UND WEINER, 1981, LEHMANN UND REISS, 1978, REISS UND LEHMANN, 1979). Beta-(1,3)-D-Glucan (BG) wurde ebenfalls als zellwandassoziiertes Polysaccharid von *Aspergillus* spp. und vielen anderen pathogenen Pilzen charakterisiert und für die Diagnosestellung bei Menschen mit invasiver Aspergillose genutzt (MARTY UND KOO, 2009). Als Vorteil des Antigennachweises wird dabei die geringere Invasivität und die höhere Schnelligkeit dieses Tests im Vergleich zu einer klassischen Biopotentnahme mit nachfolgender kultureller Anzucht des Erregers herausgestellt (DE VLIJGER et al., 2011).

Auch bei Vögeln wurden GM und BG als spezifische *Aspergillus*-Antigene im Rahmen der Aspergillosediagnostik getestet (ARCA-RUIBAL et al., 2006, BURCO et al., 2011, CRAY et al., 2009a, CRAY et al., 2009c). Dabei wurde die Detektion von

GM in zwei Studien bei Papageienvögeln als spezifisches Diagnostikum dargestellt, da mittels eines kommerziellen ELISA-Kits in 67 % (CRAY et al., 2009c) bzw. in 83 % (CRAY et al., 2009a) der bestätigten Aspergillosefälle auch GM im Blut nachgewiesen werden konnte. Im Vergleich zu gesunden Tieren wiesen Papageien mit Aspergillose dabei um den Faktor 2,6 erhöhte GM-Werte auf (CRAY et al., 2009a). Bei Großfalken konnte im Gegensatz nur eine niedrige Sensitivität von 12 % in einem kommerziellen GM-Sandwich ELISA festgestellt werden (ARCA-RUIBAL et al., 2006).

Im Vergleich zu aspergillosen negativen Tieren konnten signifikant erhöhte BG-Werte mittels des kommerziellen Testsystems Fungitell® (Beacon Diagnostics, East Falmouth, MA, USA) im Plasma verschiedener aspergillose positiver Vögel demonstriert werden. Dabei wurden die höchsten Durchschnittswerte in infizierten Seevögeln gemessen, gefolgt von Ziervögeln und Greifvögeln (BURCO et al., 2011). Die generelle Spezifität des verwendeten BG-Tests wurde mit 92,7 % und die generelle Sensitivität mit 60 % angegeben.

Antigentestsysteme scheinen potenziell einen nützlichen Beitrag für die Diagnostik einer Aspergillose leisten zu können, wobei es Hinweise auf deutliche Unterschiede zwischen den untersuchten Vogelfamilien gibt. Für Falken scheinen die ersten Ergebnisse nicht vielversprechend zu sein, jedoch mangelt es an weitergehender Forschung im Greifvogelbereich und einer Bestätigung der ersten Testergebnisse für GM im Rahmen einer experimentellen Infektionsstudie.

2.2.5.4.3 *Aspergillus*-Toxin-Nachweis

Wie andere Schimmelpilze auch können *Aspergillus* spp. verschiedene Giftstoffe (Mykotoxine) wie die immunsuppressiven Gliotoxine, die antibiotisch aktiven Fumigacine, das hämorrhagisch wirkende Emodin und Clavin-Alkaloide mit unterschiedlichen toxischen Wirkungen bilden (ABAD et al., 2010, ABRAMS et al., 2001, MÜCKE UND LEMMEN, 2004, RICHARD, 1997). Mykotoxine sind Metaboliten des Sekundärstoffwechsels der Pilze, welcher auch im Verlauf einer Aspergillose im Vogelkörper stattfindet. Fumigaclavin A (FuA), das nah verwandte Fumigaclavin B (deacetyliertes-FuA bzw. FuB) und Fumigaclavin C (FuC) zählen dabei zu den Indolalkaloiden aus der Gruppe der Clavin-Alkaloide oder Ergoline (COLE et al., 1977, SPILSBURY UND WILKINSON, 1961). Die Clavin-Alkaloide können antagonistisch oder partiell antagonistisch an Serotoninrezeptoren wirken und

somit neurologische Symptome hervorrufen (PERTZ, 1996). Des Weiteren können Stoffwechselprozesse gestört und Organe (v.a. die Leber und die Niere) geschädigt werden. Einige Toxine können auch von Antikörpern gebunden werden, sodass sie wie die oben genannten Polysaccharide auch als Antigene fungieren können (DENIKUS, 2004).

Systeme zum Nachweis von Mykotoxinen beim Vogel sind gegenwärtig noch limitiert und *Intra-vitam*-Methoden fehlen bisher gänzlich. Für die postmortale Aspergillosediagnostik wurde ein enzymgekoppelter Immuntest (EIA) zur erfolgreichen Detektion des Toxins Fumigaclavin A (FuA) in Luftsack- und Lungenproben von natürlich an Aspergillose erkrankten Papageien, Pinguinen und Greifvögeln beschrieben (GROSS et al., 2013, LATIF, 2010). Eine Diagnostik unter Nutzung von endoskopisch entnommenen Luftsackabstrichen oder von Blutproben wurde bisher jedoch noch nicht mit diesem Test evaluiert, sodass dessen Eignung für eine *Intra-vitam*-Aspergillosediagnostik gegenwärtig unerforscht ist.

2.2.5.4.4 Akute-Phase-Proteine

Akute-Phase-Proteine (APP) können als Reaktion des Körpers auf Infektionen, Entzündungen, Traumata, Neoplasien oder Stress ausgeschüttet werden, wobei sie verschiedene biologische, homöostatische und antimikrobielle Funktionen aufweisen (MURATA et al., 2004). Die zugrundeliegenden Mechanismen zur Initiierung und zur Regulierung der „Akute-Phase-Antwort“, ihre biologischen Funktionen und ihre Rolle im Rahmen des angeborenen Immunsystems wurden in den letzten Jahren in verschiedenen Organismen erforscht, nicht zuletzt um deren möglichen Nutzen in der Human- und Tiermedizin und deren diagnostischen Wert besser zu verstehen und auszubauen (CRAY, 2012, MURATA et al., 2004). Auch bei Vögeln gibt es hierzu erste Studien. So wurden die APP Haptoglobin (Hp), Ceruloplasmin, Serumamyloid A (SAA) und Fibrinogen beim Wirtschaftsgeflügel im Zusammenhang mit verschiedenen Infektionskrankungen erforscht (CHAMANZA et al., 1999a, CHAMANZA et al., 1999b, NAZIFI et al., 2010). Dabei wiesen Hühner, die mit dem Infektiösen Bursitisvirus (Gumborovirus) infiziert waren, signifikant höhere SAA-Werte und signifikant erniedrigte Ceruloplasmin-Werte im Vergleich zu gesunden Tieren auf (NAZIFI et al., 2010). Die Unterschiede wurden mit zunehmender klinischer Symptomatik

sogar deutlicher. Auch bei einer *Staphylococcus*-Infektion reagierten Hühner mit einem SAA-Anstieg (CHAMANZA et al., 1999a). Im Zusammenhang mit Aspergillose wurden in einem Infektionsversuch mit Wachteln niedrigere HP-Werte neben höheren Plasmaleveln von Ceruloplasmin, Eisen, latenter und totaler Eisenbindungskapazität festgestellt. Die SAA-Werte blieben jedoch im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrolltieren unverändert (GOETTING et al., 2013). Dabei bestand ein linearer Zusammenhang zwischen der Menge der koloniebildenden Einheiten von *A. fumigatus*, welche aus den Lungen der infizierten Wachteln reisoliert werden konnten, und den Plasmawerten von Ceruloplasmin, latenter Eisenbindungskapazität und totaler Eisenbindungskapazität (GOETTING et al., 2013). Im Rahmen einer zweiten Studie wurde der SAA-Spiegel von 259 klinisch vorgestellten Falken untersucht (CALIENDO et al., 2013). Dabei konnte festgestellt werden, dass die Werte der 20 Individuen mit nachgewiesener Atemwegsmykose signifikant anstiegen und bei zwei chronisch erkrankten Tieren auch dauerhaft (über 30 Tage) erhöht waren (CALIENDO et al., 2013). Experimentelle Studien bei Greifvögeln zur Erforschung der APP generell und besonders im Zusammenhang mit einer Aspergillose fehlen allerdings bisher.

2.2.5.4.5 Serum-/Plasma-Proteinelektrophorese

Bei der Serum-Proteinelektrophorese (SPEP) und Plasma-Proteinelektrophorese (PPEP) werden Proteine im Serum bzw. im Plasma durch die Wirkung eines elektrischen Spannungsfeldes in die sechs verschiedenen Fraktionen Präalbumin (PA), Albumin, alpha-1- (α_1), alpha-2- (α_2), beta- (β) und gamma- (γ) Globuline aufgeteilt. Die Profile der Serum-/ Plasmaproteine, also ihre Menge und ihr Verteilungsmuster, können auf spezifische Erkrankungen, Stoffwechselsituationen oder Belastungen hinweisen, weshalb sie beim Menschen und unterschiedlichen Säugetier- und Vogelarten eingesetzt werden (CRAY UND TATUM, 1998, TOTHOVA et al., 2016). Neben den potenziellen Veränderungen durch Erkrankungen zeigten sich jedoch bei Vögeln spezies-, alters- und geschlechtsspezifische Unterschiede (CRAY et al., 2007, WERNER UND REAVILL, 1999). Somit ist eine spezies- und erkrankungsspezifische Forschung notwendig. So wurden in ersten Studien über SPEP bei klinisch gesunden Greifvögeln Orientierungswerte für zehn verschiedene Greifvogel- und Eulenarten erhoben (TATUM et al., 2000).

Im Rahmen der Diagnostik einer Aspergillose wurde die PEP bereits bei Papageien, Greifvögeln und Pinguinen eingesetzt, wobei Änderungen von Präalbumin (PA), Albumin, α 1-, α 2-, β - und γ -Globulinen beschrieben wurden (CRAY UND TATUM, 1998, CRAY et al., 2007, CRAY et al., 2009a, CRAY et al., 2009c, CRAY et al., 2011, IVEY, 2000, KUMMROW et al., 2012, REIDARSON UND MCBAIN, 1995). Bei 32 aspergillosepositiven Falken wurde von signifikant erniedrigten PA-Werten im Vergleich zu 73 klinisch gesunden Falken berichtet (KUMMROW et al., 2012). Neben dieser klinischen Studie, welche auf dem Patientengut einer Klinik über den Zeitraum von drei Jahren beruht, fehlen experimentelle Studien bei Greifvögeln. Insbesondere mangelt es an einem Vergleich von Werten vor und nach einer Infektion bei identischen Individuen.

2.2.5.5 Kulturelle Anzucht

Eine kulturelle Anzucht von *Aspergillus* spp. aus verdächtigen Läsionen ist als Erregernachweis neben histopathologischen und molekularbiologischen Methoden für die Stellung einer definitiven Diagnose einer Aspergillose möglich (DAHLHAUSEN, 2006, RICKERTS et al., 2007). Um das Ergebnis nicht durch Kontamination mit Umwelterregern zu verfälschen, muss auf eine gezielte und kontaminationsfreie Entnahme und einen ordnungsgemäßen Transport des Probenmaterials geachtet werden (KUNKLE, 2003). Aussagen über eine systemische Mykose und über Veränderungen in den unteren Atemwegen können auf Grund der Gefahr von Umweltkontaminationen während der Beprobung von Nase, Rachen oder Trachea nicht getroffen werden. Die während einer Endoskopie, einer Laparotomie oder einer Sektion gezielt entnommenen Tupfer oder aseptisch rückgewonnenen Lavageflüssigkeiten aus der Lunge oder den Luftsäcken können dagegen diagnostisch wertvoll sein (CAMPBELL UND ELLIS, 2007).

Als Nährböden für *Aspergillus* spp. eignen sich Nährmedien mit Säure- oder Antibiotikazusätzen, die ein unerwünschtes Bakterienwachstum verhindern sollen. Pilznährböden weisen meist eine relativ hohe Kohlenhydratkonzentration (2 - 4 %), z. B. Maltose oder Dextrose, als Energiequelle und einen niedrigen pH-Wert von 5,6 auf (BAUER UND SCHWAIGER, 2011). *Aspergillus fumigatus* hat sein Wachstumsoptimum zwischen 37 - 43 °C (MÜCKE UND LEMMEN, 2004). Shi-Agar,

Sabouraud Dextrose Agar, Czapek's Agar, Kimmig-Agar oder Tomaten-Dextrose-Agar können beispielsweise verwendet werden, um die Erreger bei 37 °C über 48 - 72 Stunden im Inkubator zu kultivieren (KUNKLE, 2003). Nachfolgend kann die Kulturmorphologie beurteilt und zur Differenzierung genutzt werden, wobei bereits anhand der Färbung der 3 - 4 cm großen Kolonien eine erste Speziesdifferenzierung erfolgen kann (SCHMIDT UND WOLFF, 1997) (siehe Abbildung 5).

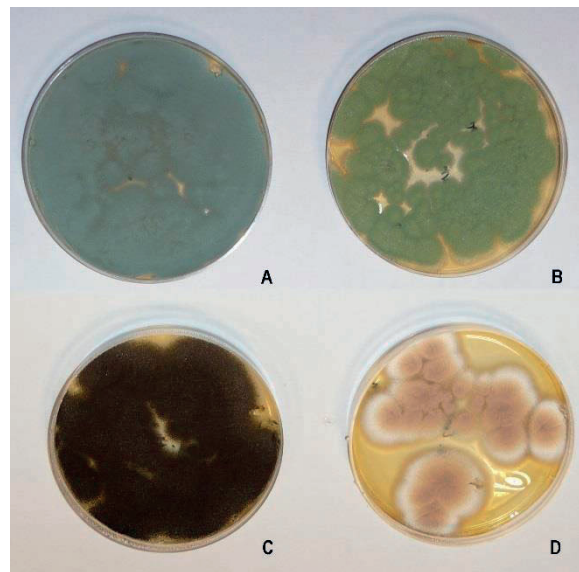


Abbildung 5: Anhand der Farbe der Schimmelpilzkolonien kann eine erste Unterscheidung der *Aspergillus*-Spezies erfolgen. *Aspergillus fumigatus* ist dunkelgrün (A), *A. flavus* hellgrün-gelblich (B), *A. niger* bräunlich-schwarz (C) und *A. terreus* hellbraun-beige (D) gefärbt.

Eine *A. fumigatus*-Kolonie ist anfänglich weiß, färbt sich anschließend mit zunehmender Sporulation grün bis dunkelgrün-bläulich und im Zuge der Reifung grün-gräulich, wobei die Randbereiche immer weiß gefärbt bleiben (MARTEL, 2016). Mittels eines Tesafilmstreifens kann vom Pilzmyzel vorsichtig etwas Material abgenommen (Tesafilmabklatschpräparat) und mikroskopisch untersucht werden, um 5 - 10 µm dicke Hyphen mit geraden, parallelverlaufenden Seiten, kugelförmigen Enden und im 45 °-Winkel abgehenden Ästen darzustellen (CAMPBELL UND ELLIS, 2007). Zur besseren Kontrastierung können Farbstoffe wie Methyleneblau oder Lactophenolblau während der Mikroskopie genutzt werden (BAUER UND SCHWAIGER, 2011).

2.2.5.6 *In-vitro*-Virulenztests

Die Einschätzung der Virulenz ist für die Bewertung des pathogenen Potentials eines *Aspergillus*-Isolates im Rahmen der Aspergillose-diagnostik wichtig. So deuten vorangegangene Studien bei Puten, Hühnern, Weißstörchen und Mäusen auf Virulenzunterschiede zwischen verschiedenen *A. fumigatus*-Stämmen hin (AUFBAUVRE-BROWN et al., 1998, MONDON et al., 1996, OLIAS et al., 2011a, PEDEN UND RHOADES, 1992). Als Virulenztests für Pilze sind alternativ zu klassischen Nagetiermodellen (CLEMONS UND STEVENS, 2005) und embryonierten Hühner-eiern (JACOBSEN et al., 2010, OLIAS et al., 2011a) Insektenmodelle als *In-vitro*-Tests etabliert (LIONAKIS UND KONTOYIANNIS, 2005). So werden Fruchtfliegen (*Drosophila melanogaster*) und große Wachsmottenlarven (*Galleria mellonella*) häufig zur Virulenzuntersuchung von Pilzen genutzt (BRENNAN et al., 2002, COTTER et al., 2000, KAVANAGH UND REEVES, 2004). Dabei wurden die Virulenz von *Aspergillus*-Spezies und verschiedenen *A. fumigatus*-Mutanten sowie deren Stoffwechsel-produkten in großen Wachsmottenlarven untersucht (MAERKER et al., 2005, REEVES et al., 2004). Virulenzuntersuchungen von *Aspergillus*-Isolaten aus Greifvögeln im Zusammenhang mit Infektionsversuchen fehlen bisher gänzlich.

2.2.5.7 Pathologische Untersuchung

Eine vollständige pathologisch-anatomische Untersuchung beim Vogel schließt nach einer äußeren Adspektion und einer Untersuchung der Körperöffnungen die adspektorische Untersuchung der Körperhöhlen, aller Organe und Organ-systeme ein (KEYMER, 2007). Dazu gehört immer eine Untersuchung des gesamten Respirationstraktes, inklusive von Luftsäcken, Lunge, Trachea, Nase und *Sinus infraorbitalis*, um Läsionen einer Aspergillose zu detektieren (KEYMER, 2007).

Die pathologisch-anatomischen Befunde einer aviären Aspergillose können dabei vielfältig sein (BEERNAERT et al., 2010, BROWN et al., 2008, CONVERSE, 2008, KUNKLE, 2003, MCDIARMID, 1955, O'MEARA UND WITTER, 1971, REDIG, 1993, REDIG, 2007). Unter anderem sind weiß-gelbliche, käsige bis gelatinöse, knotige oder konfluierend-diphtheroide Auflagerungen beschrieben, welche von einem

flauschigen, pigmentierten Pilzmyzel überlagert sein können. Diese Läsionen sind granulomatös, infiltrativ oder diffus, oberflächlich und nicht-abgekapselt oder eine Mischung daraus (BEERNAERT et al., 2010, CACCIUTTOLO et al., 2009).

Bei der respiratorischen Manifestation wurden Läsionen, welche den gesamten Respirationstrakt betreffen, meist im Zusammenhang mit einem chronischen Krankheitsverlauf beobachtet, wohingegen auf die Lunge und die oberen Atemwege beschränkte Läsionen eher mit akuten Verlaufsformen assoziiert wurden (REDIG, 1993, REDIG, 2007).

Bei invasiven und systemischen Manifestationen der Aspergillose können neben dem Respirationstrakt verschiedene und unterschiedlich viele Organe infiziert werden, wobei nur selten der gesamte Körper betroffen ist. Im Gegensatz dazu beschränken sich die Läsionen bei lokalen Manifestationen auf das jeweils betroffene Organ bzw. Organsystem (ABRAMS et al., 2001, BARNETT et al., 2011, BARTON et al., 1992, BECKMAN et al., 1994, BYGRAVE, 1981, CORTES et al., 2005, FITZGERALD UND MOISAN, 1995, GREENACRE et al., 1992, HOPPES et al., 2000, HUBBEN, 1958, JULIAN UND GORYO, 1990, OLIAS et al., 2010b, OZMEN UND DORRESTEIN, 2004, STOUTE et al., 2009, STROUD UND DUNCAN, 1982, TSAI et al., 1992).

2.2.5.8 Histopathologische Untersuchung

Der histopathologische Nachweis von mykotischen Strukturen, meist Pilzhyphen oder Konidien, innerhalb von Läsionen stellt eine definitive Diagnose der Aspergillose dar. Zur besseren Visualisierung der Hyphen im histologischen Schnitt werden häufig die Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS-Reaktion), die Grocott- oder die Gridley-Färbung verwendet (BEYTUT et al., 2004, KUNKLE, 2003, OZMEN UND DORRESTEIN, 2004). Dabei ist es entscheidend, die mykotischen Strukturen in Assoziation mit den Läsionen darzustellen, um eine Verwechslung mit postmortalen Kontaminationen und Autolyseprozessen auszuschließen. Typische Aspergillome weisen in der Histopathologie einen zentralen, meist nekrotischen Kern mit Pilzhyphen und Zelldetritus auf. Dieser ist von granulom-ähnlich angeordneten, konzentrisch geschichteten, heterophilen Granulozyten, Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen umgeben. In späteren Stadien

ergänzen mehrkernige Riesenzellen und äußere fibrinöse Kapseln das histologische Bild (BEYTUT et al., 2004).

2.2.5.9 Immunhistochemische Untersuchung

Immunhistochemische Techniken können zur besseren Darstellung von histologisch teils schwer darstellbaren Pilzstrukturen (CARRASCO et al., 1993) und zur genaueren Differenzierung der Pilze genutzt werden (BEYTUT et al., 2004, BEYTUT, 2007, JENSEN et al., 1997). Monoklonale Antikörper verbesserten nach Markierung mit einem Demavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex bei Gösseln (*Anser anser f. domestica*) und bei Puten den Nachweis von *Aspergillus*-Hyphen in nekrotischen Zentren von Aspergillomen, wobei Hyphen sogar innerhalb von Makrophagen und Riesenzellen dargestellt werden konnten (BEYTUT et al., 2004, BEYTUT, 2007). Neben *Aspergillus* spp. können auch Antikörper gegen Mucoraceen und andere Jochpilze (Zygomyceten) sowie gegen Schlauchpilze (Ascomyceten) wie *Candida* spp., *Geotrichum* spp., *Fusarium* spp. und *Scedosporium* spp. in einem Testset kombiniert werden (JENSEN et al., 1997). Das erhöht die Sensitivität der Pilzdiagnostik im Rahmen der histologischen Untersuchung.

2.2.5.10 Molekularbiologische Untersuchung

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde bereits bei verschiedenen Vogelfamilien wie Straußen, Pinguinen, Falken, Puten und Störchen erfolgreich zur Diagnostik einer Aspergillose eingesetzt (ALVAREZ-PEREZ et al., 2010, OLIAS et al., 2010a, OLIAS et al., 2010b, VAN WAEYENBERGHE et al., 2011). Dabei sind spezies- und genuspezifische Protokolle zur Pilzidentifizierung verfügbar (DAHLHAUSEN, 2006), welche auch dann noch eine gezielte Diagnose ermöglichen, wenn eine mykologische Anzucht des Isolates scheitert. Aus Pilzläsionen und Granulomen sowie aus histopathologischen Präparaten können mittels Laser-Mikrodissektion einzelne Pilzstrukturen separiert und molekularbiologisch differenziert werden (OLIAS et al., 2011b). Dabei liegt der Vorteil des *Aspergillus*-DNA-Nachweises darin, dass auch fixierte oder kryokonservierte Proben noch zur Speziesdifferenzierung sowie zur Feststellung von Verwandtschaftsgraden verschiedener Pilzisolate genutzt werden können. So konnte

belegt werden, dass bei mykotischen Pneumonien bei Vögeln häufig verschiedene *A. fumigatus*-Isolate parallel nachweisbar waren (OLIAS et al., 2011b).

Im Rahmen der Untersuchung von invasiven Aspergilloseformen wurden auch Blutproben von Menschen (KAMI et al., 2001) und einzelnen Vogelspezies (DAHLHAUSEN et al., 2004) molekulardiagnostisch auf Schimmelpilzgensequenzen untersucht. Diese Methoden befinden sich bei Vögeln jedoch noch in der Testung und sind bisher nicht etabliert.

Molekularbiologische Techniken wurden zudem erfolgreich zur Detektion und Abschätzung mykotischer Kontaminationen in Geflügelbeständen sowie zur Herkunftsbestimmung der Erreger in Weißstorchnestern eingesetzt (OLIAS et al., 2011b, VIEGAS et al., 2014, WANG et al., 2012). Dabei konnten einzelne Isolate mittels Mikrosatelliten-Längen-Polymorphismus gemäß etablierter Methoden verglichen werden, sodass eine Identifikation der Erregerquelle und von Verwandtschaftsgraden möglich war (VAN WAEYENBERGHE et al., 2011). Mikrosatelliten oder sogenannte Short Tandem Repeats (STAR) sind spezifische, 2 - 6 Basenpaare lange, sich kurz nacheinander wiederholende Genabschnitte, die ein isolatspezifisches Profil ergeben und so als genetischer Fingerabdruck des Erregers gewertet werden können.

2.2.6 Experimentelle Studien zur Aspergillose

Die experimentelle Induktion der Aspergillose wurde in vorangegangenen Studien auf unterschiedliche Weise und mit verschiedenen Zielsetzungen durchgeführt. Eine Übersicht zu den bei Vögeln durchgeführten experimentellen Studien findet sich in der Tabelle im Anhang I.

2.2.6.1 Infektionsmethode

2.2.6.1.1 Inokulation über Inhalationskammern

Inhalationskammern wurden genutzt, um via pilzsporenangereichertem Aerosol eine Aspergillose bei Hühnern (JULIAN UND GORYO, 1990, O'MEARA UND CHUTE, 1959, TAYLOR UND BURROUGHS, 1973) und Puten (RICHARD et al., 1981, RICHARD UND THURSTON, 1983) zu induzieren. Dabei ging es um die grundlegende

Erforschung der klinischen Symptome, des Verlaufes und der pathologischen Befunde einer aviären Aspergillose beim Wirtschaftsgeflügel (JULIAN UND GORYO, 1990, O'MEARA UND CHUTE, 1959). Zudem hatten diese Studien eine Aufklärung der antigenetischen Repräsentanz des Erregers im Vogel und der Immunantwort des Tieres auf *Aspergillus* spp. zum Ziel (TAYLOR UND BURROUGHS, 1973). Außerdem wurden Virulenzunterschiede zwischen unterschiedlichen Pilzspezies sowie zwischen unterschiedlichen Stämmen einer *Aspergillus*-Spezies im Vogelorganismus untersucht (RICHARD et al., 1981), wobei die Invasivität und Dissemination der Schimmelpilze und die dabei involvierten zellulären Mechanismen im Fokus standen (RICHARD UND THURSTON, 1983). Über die Inhalation sollte in diesen Studien ein annähernd natürlicher Infektionsweg simuliert werden, um Feldinfektionen mit *Aspergillus* spp. bestmöglich darstellen zu können. Dabei erfolgte jedoch keine exakte Quantifizierung der inhalierten Sporenmenge, was für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit essentiell war.

2.2.6.1.2 Intratracheale Inokulation

Als weitere Infektionsroute wurde eine intratracheale Applikation bei Enten (GRACZYK et al., 1998), Wachteln (CHAUDHARY UND SADANA, 1988, GÜMÜŞSOY et al., 2004, TELL et al., 2010, WLAZ et al., 2015), Staren (ATASEVER UND GÜMÜŞSOY, 2004), Tauben (BEERNAERT et al., 2008), Puten, Rotschwanzbussarden und Breitflügelbussarden (*Buteo platypterus*) (REDIG, 1980a, REDIG, 1980b) durchgeführt. Diese Studien zielten auf die Untersuchung von *Aspergillus* spp. spezifischen Antigenen sowie anti-*Aspergillus* spp. spezifischen Antikörpern (IgG) sowie ihre mögliche protektive Wirkung (GRACZYK et al., 1998). Die Wirksamkeit von Antimykotika im Rahmen der Behandlung einer Aspergillose (GÜMÜŞSOY et al., 2004, REDIG, 1980b, TELL et al., 2010, WLAZ et al., 2015) sowie der diagnostische Wert von blutchemischen und serologischen Parametern für die Aspergillosediagnostik wurden in weiteren Studien evaluiert (GRACZYK et al., 1998, REDIG, 1980b). Allerdings wurden auch grundlegende klinische, pathologische, histologische und hämatologische Veränderungen im Zuge einer Infektion bei Wachteln (CHAUDHARY UND SADANA, 1988, GÜMÜŞSOY et al., 2004), Bussarden (REDIG, 1980a, REDIG, 1980b) und Staren (ATASEVER UND GÜMÜŞSOY, 2004) untersucht. Somit ging es zusammenfassend in diesen Studien um eine sichere experimentelle Erzeugung der Aspergillose, um nachfolgend die

eintretenden Veränderungen im Körper des Tieres sowie die diagnostischen und therapeutischen Ansatzpunkte zu erforschen.

Zur Entwicklung und Optimierung eines experimentellen *In-vivo*-Modells für die aviäre Aspergillose wurde die intratracheale Applikation bei Tauben nachfolgend mit verschiedenen anderen Applikationswegen und Induktionsmethoden vergleichend evaluiert (BEERNAERT et al., 2008). Nach intratrachealer Applikation konnte dabei eine Aspergillose mit deutlichen Symptomen induziert werden, wobei dies bei immunsupprimierten Tieren begünstigt war. Somit wurde die Luftröhreninokulation als geeigneter Inokulationsweg der Aspergillose im Taubenmodell dargestellt (BEERNAERT et al., 2008). Da zudem nur für die intratracheale Applikation Erfahrungen bei Greifvögeln vorliegen (REDIG, 1980a, REDIG, 1980b) und nur bei dieser Applikationsart eine exakte *A. fumigatus*-Konidien Infektionsdosis ermittelt werden konnte (CHAUDHARY UND SADANA, 1988), wurde die intratracheale Applikation als geeignetste Inokulationsart zur Beantwortung der Fragestellung in der vorliegenden Studie angesehen.

2.2.6.1.3 Andere Inokulationsmethoden (intraaerosacculär, intrapulmonal, intravenös, intraperitoneal)

Eine Installation von Sporensuspensionen in den Luftsack wurde bei Tauben (BEERNAERT et al., 2008), Puten (FEMENIA et al., 2007, KUNKLE UND RIMLER, 1996, KUNKLE et al., 1999, PEDEN UND RHOADES, 1992) und Hühnern (CHUTE UND O'MEARA, 1958) durchgeführt. Eine Injektion in die Lungen erfolgte hingegen nur bei Puten (PERELMAN, 1993). Dabei dienten diese Studien der Überprüfung der Pathogenität und der Virulenz von Pilzisolaten sowie deren potenzieller Toxinbildung (CHUTE UND O'MEARA, 1958, PEDEN UND RHOADES, 1992). Außerdem sollte die protektive Wirkung einer Splenozytenübertragung von rekonvaleszenten auf naive Puten vor einer experimentellen, intravenösen und intraaerosacculären *A. fumigatus*-Inokulation ermittelt (KUNKLE et al., 1999) sowie antimykotisch wirkende Arzneimittel evaluiert werden (PERELMAN, 1993).

Ein Vergleich von Injektionen in den thorakalen Luftsack und in die Lunge mit der intratrachealen Applikation erfolgte bei Tauben, wobei zusätzlich eine Immunsuppression mittels Kortisongabe bei einigen Tieren durchgeführt wurde (BEERNAERT et al., 2008). Die Taube sollte hierbei zur Erforschung von Erreger-Wirts-Interaktionen und von diagnostisch nutzbaren Messparametern genutzt

werden (BEERNAERT et al., 2009a, BEERNAERT et al., 2009b, BEERNAERT et al., 2009c), wobei die Eignung verschiedener Infektionsrouten, die Belastung der jeweiligen Infektionsroute für das Tier sowie der Schweregrad der experimentell induzierten Aspergillose im Vordergrund standen (BEERNAERT et al., 2008). Der Vergleich ergab, dass die schwerste und schnellste Entwicklung der Aspergillose bei immunkompetenten Tauben über eine Luftsackapplikation und bei mittels Dexamethason immunsupprimierten Tauben sowohl über eine Luftsack- als auch eine Lungenapplikation von *Aspergillus*-Konidien beobachtet werden konnte. Diese Applikation wurde jedoch allesamt als sehr invasiv und stark vom natürlichen Infektionsweg abweichend gewertet, da stets eine Penetration von Haut, Muskulatur und Lungen- bzw. Luftsackgewebe notwendig war (BEERNAERT et al., 2008).

Eine intravenöse Applikation von *Aspergillus*-Sporen erfolgte ebenfalls bei Tauben (ELMUBARAK UND FADLELMULA, 1991, VAN CUTSEM et al., 1989) und eine intraperitoneale Inokulation bei Hühnern (OKOYE UND OKEKE, 1986), mit dem Ziel eine Aspergillose experimentell zu erzeugen und deren pathologische und histopathologische Veränderungen zu beschreiben (ELMUBARAK UND FADLELMULA, 1991, OKOYE UND OKEKE, 1986) bzw. antimykotische Wirkstoffe *in vivo* zu testen (VAN CUTSEM et al., 1989).

Zusammenfassend konnte über intravenöse, intraperitoneale, intrapulmonale und intraaerosacculäre Inokulationsmethoden jeweils eine Aspergillose erzeugt werden. Jedoch unterschieden sich diese Inokulationsmethoden im Gegensatz zur Inhalation oder zur intratrachealen Applikation stark vom natürlichen Infektionsweg über die oberen Atemwege. Zudem waren sie vergleichsweise invasiver, da hierzu ein chirurgischer Zugang zu Organen, zur Körperhöhle oder zu Gefäßen erforderlich war. Die Ermittlung einer minimalen Infektionsdosis erfolgte lediglich in einer Studie mit intratrachealer Inokulationsart (CHAUDHARY UND SADANA, 1988) und wurde bisher in keiner der Studien mit intravenösen, intraperitonealen, intrapulmonalen oder intraaerosacculären Inokulationsmethoden durchgeführt. Daher erschien lediglich die intratracheale Inokulationsart für die vorliegende Studie geeignet.

2.2.6.2 Ermittlung der minimalen Infektionsdosis

Versuche zur Ermittlung einer „Minimalen Infektionsdosis“ (MID) von *A. fumigatus*-Konidien gibt es bisher kaum und bei Greifvögeln fehlen diese gänzlich. In bisherigen Studien wurde die Dosis an inokulierten *Aspergillus*-Konidien in vielen Fällen überhaupt nicht quantifiziert, sodass auch retrospektiv eine minimale Infektionsdosis nicht abschätzbar ist (JULIAN UND GORYO, 1990). Orientierende Dosisangaben finden sich nur zum Teil in Inhalationskammerstudien, wo jeweils am Ende der Expositionsphasen eine Expositions-dosis durch Messung eines kommerziellen Luftprobensammlers bestimmt und als Sporendosen pro Kubikmeter Luft berechnet wurde (GHORI UND EDGAR, 1973). In einzelnen Teilexperimenten war mit dieser Methode eine Dosis allerdings nicht näher bestimmbar und zudem fehlen Angaben, ob die berechnete Sporen-Expositions-konzentrationen während der gesamten Expositionsphase und in allen Bereichen der Inhalationskammer gleichmäßig gegeben waren. Somit bleibt unklar, welches Tier welche Sporenmenge tatsächlich inhaliert hat, sodass diese Methode zur Ermittlung der Infektionsdosis ungeeignet scheint (FEMENIA et al., 2007).

In Studien mit Luftsack-, Lungen- und intravenösen Applikationen wurden hingegen teils genaue, individuell applizierte Sporenmengen ermittelt. Bei Puten wurde eine Aspergillose durch Luftsack-Applikation von Suspensionen mit 10^6 - 10^7 *A. fumigatus*-Sporen erzeugt (FEMENIA et al., 2007, PEDEN UND RHOADES, 1992, REDIG, 1980a). Bei Tauben war eine Applikation von $0,2 \times 10^6$ bzw. $0,2 \times 10^8$ *A. fumigatus*-Konidien in die kraniale, rechte Lunge (BEERNAERT et al., 2008) sowie von 1×10^6 Konidien in die Vene (ELMUBARAK UND FADLELMULA, 1991) ausreichend, um eine Aspergillose auszulösen. Somit könnten auf diesem Wege die inokulierte Konidienmenge exakt und individuell bestimmt werden, wobei diese Inokulationswege keine natürlichen Infektionsrouten sondern invasive Maßnahmen darstellten.

In Studien, in denen eine intratracheale Inokulation verwendet wurde, war die applizierte Konidienmenge je Individuum ebenfalls genau quantifiziert. So erkrankten und starben 18/18 Stare nach intratrachealer Eingabe von $1,35 \times 10^6$ *A. fumigatus*-Sporen (ATASEVER UND GÜMÜŞSOY, 2004). Bei 3/5 vier Wochen alten Pekingenten (*Anas platyrhynchos f. domestica*) wurden 35 Tage

nach Inokulation von $3,5 \times 10^4$ *Aspergillus* spp.-Sporen histopathologische Belege für eine Aspergillose in Form von granulomatösen Entzündungen mit Hyphen und Konidien beobachtet (GRACZYK et al., 1998). Auch bei fünf Wochen alten Puten wurde nach intratrachealer Gabe von 1×10^7 Sporen/kg eine akute Aspergillose ausgelöst (REDIG, 1980b). Bei amerikanischen Breitflügelbussarden wurde eine Aspergillose nach mehrmaliger (dreimalig im Abstand von 48 Stunden) intratrachealer Applikation von $8,6 \times 10^4$ Konidien/kg (REDIG, 1980b) und bei Rotschwanzbussarden nach einmaliger Applikation von 10^5 Konidien/kg induziert (REDIG, 1980a). In verschiedenen Studien bei Wachteln führten zwischen $2,7$ und 50×10^6 *A. fumigatus*-Konidien zu Erkrankung und Tod (BURCO et al., 2011, CHAUDHARY UND SADANA, 1988, GÜMÜŞSOY et al., 2004, TELL et al., 2010). Andererseits reichte in Tauben die Inokulation von $0,2 \times 10^8$ Konidien nicht aus, um bei adulten Individuen Symptome und Erkrankung zu induzieren (BEERNAERT et al., 2008).

Zusammenfassend war durch die intratracheale Applikation eine Abstufung zwischen den individuell applizierten Dosen unter gleichen Bedingungen und somit eine Kalkulation von exakten Infektionsdosen möglich. Dementsprechend erfolgte sowohl eine Quantifizierung der applizierten Konidienmengen als auch die Berechnung einer Infektionsdosis in Form der Letalen Dosis 50 % (LD 50). Diese betrug bei Wachteln $12,03 \times 10^6$ intratracheal inokulierte *A. fumigatus*-Konidien (CHAUDHARY UND SADANA, 1988). Hinzukommend bot die intratracheale Applikation eine gute Möglichkeit eine natürliche Infektion über die oberen Atemwege experimentell nachzustellen. Dies war darüber hinaus im Vergleich zu Infektionsrouten über eine chirurgische Lungen-, Luftsack- und Veneninokulation weniger invasiv (CHAUDHARY UND SADANA, 1988).

2.2.6.3 Altersabhängige Empfindlichkeitsunterschiede

Klinische Beobachtungen (ARNÉ et al., 2011, FLACH et al., 1990, SOUZA UND DEGERNES, 2005) und experimentelle Studien (AUSTWICK, 1969, BEERNAERT et al., 2008) weisen darauf hin, dass Jungvögel meist empfindlicher auf Schimmelpilzsporen zu reagieren scheinen als adulte Individuen. Dabei belegen retrospektive Daten, die bei Eselspinguinen (*Pygoscelis papua*) aus dem Edinburgher Zoo erhoben wurden, dass zwischen 1964 und 1988 deutlich mehr

Küken und Jungvögel (2 - 3 Monate alt) an Aspergillose verstarben als erwachsene Tiere (FLACH et al., 1990). Sporadische Todesfälle durch Aspergillose bei adulten standen einer durchschnittlichen Mortalität von 14 % bei juvenilen Pinguinen gegenüber (FLACH et al., 1990). Bei Trompeterschwänen (*Cygnus buccinator*) und Pfeifschwänen (*Cygnus columbianus*) waren in den Wintern der Jahre 2000 und 2001 doppelt so viele Jungtiere (< 1 Jahr alt) betroffen als Subadulte und Adulte (SOUZA UND DEGERNES, 2005).

In experimentellen Studien an Eintagshühnerküken konnte bereits mit einer Dosis von 5×10^6 Sporen eine Aspergillose induziert werden, während bei adulten Hühnern hierfür mehr als $1,7 \times 10^7$ Sporen nötig waren (AUSTWICK, 1969). Beim Vergleich verschiedener Studien mit Wachteln kann ebenfalls ein Alterseinfluss vermutet werden, da jüngere Tiere schneller klinische Symptome zeigen als ältere. So traten bei zwei Wochen alten Wachteln bereits 24 Stunden nach der experimentellen Inokulation von *A. fumigatus*-Sporen Anorexie, Schwäche, Dyspnoe und Tod und eine Mortalität von 20 % auf (CHAUDHARY UND SADANA, 1988, PANDITA et al., 1991), während drei Wochen alte Wachteln erste klinische Symptome erst 48 Stunden nach Inokulation zeigten (GÜMÜŞSOY et al., 2004). Allerdings wurde bei letzteren eine hundertprozentige Mortalität beobachtet und die verwendeten Pilzisolat und Versuchsbedingungen waren nicht identisch, weshalb die Gültigkeit dieser Aussage in Bezug auf den Vergleich dieser beiden Studien hinterfragt werden muss (GÜMÜŞSOY et al., 2004). Zudem ist der Unterschied zwischen zwei und drei Wochen alten Tieren wahrscheinlich zu gering, um daraus signifikante Unterschiede ableiten zu können. Eine Altersabhängigkeit der Infektionsempfänglichkeit wird allerdings gestützt durch eine Studie an Tauben (BEERNAERT et al., 2008). So führte die Applikation einer identischen Infektionsdosis von $0,2 \times 10^8$ *A. fumigatus*-Konidien bei 6/6 adulten Tieren nicht zu einer Erkrankung, während sie bei 8/8 4 - 5 Wochen alten Individuen eine akute Form der Aspergillose auslöste, die bei 5/8 Individuen zum Tod führte (BEERNAERT et al., 2008).

Wohl auch aus diesem Grund, dass die Jungtiere die empfindlichste Altersgruppe der jeweiligen Vogelspezies darstellen und in diesen eine Aspergillose leichter und sicherer induziert werden konnte, wurden in vielen Studien bei Hühnern, Puten, Wachteln und Enten Jungtiere verwendet. Sie befanden sich teils im Alter von 1 - 10 Tagen (BURCO et al., 2011, FEMENIA et al., 2007, GHORI UND EDGAR,

1973, JULIAN UND GORYO, 1990, TAYLOR UND BURROUGHS, 1973, WLAZ et al., 2015), von 2 - 3 Wochen (CHAUDHARY UND SADANA, 1988, GÜMÜŞSOY et al., 2004, PEDEN UND RHOADES, 1992, RICHARD et al., 1981, RICHARD et al., 1984) oder von 4 - 5 Wochen (BEERNAERT et al., 2008, CHAMANZA et al., 1999b, ELMUBARAK UND FADLELMULA, 1991, GRACZYK et al., 1998, REDIG, 1980b, RICHARD et al., 1973). Bei Greifvögeln, insbesondere bei Großfalken, fehlen Untersuchungen zur altersassoziierten Empfänglichkeit gegenüber Infektionen mit *A. fumigatus* sowie zur Ermittlung einer Infektionsdosis gänzlich, sowohl bei juvenilen als auch bei adulten Tieren.

2.3 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel eine minimale Infektionsdosis von *Aspergillus fumigatus*-Sporen zur Auslösung einer Aspergillose bei Großfalken zu ermitteln. Hierbei sollte explizit eine einmalige Inokulation verwendet werden. Auf den Ergebnissen zu diesen Untersuchungen basierend sollen Empfehlungen zur Haltung von Großfalken und Grenzwerte für Schimmelpilzsporenexpositionen in Greifvogelhaltungen etabliert werden. Dies verfolgt den Zweck, die Unterbringung und das Management dieser Tiere in menschlicher Haltung zu optimieren, die Inzidenz von Neuerkrankungen zu senken und das Risikopotential von Pilzsporen für Individuen besser einzuschätzen. Die Etablierung von Grenzwerten könnte zukünftig die objektive Kontrolle und Beurteilung von Greifvogelhaltungen durch amtliche Tierärzte ermöglichen.

Da die verwendeten Gerfalkenhybriden unter den Greifvögeln als vergleichsweise empfindlich angesehen werden, können die aus den Erkenntnissen dieser Arbeit erstellten Werte voraussichtlich auch als Grenzwert für die Haltung anderer Greifvogelarten Verwendung finden.

Gleichsam war es Ziel der Untersuchungen zu überprüfen, ob sich die vielmals vermuteten Empfindlichkeitsunterschiede zwischen juvenilen und adulten Individuen auch bei Großfalken wissenschaftlich beweisen lassen.

Im Anschluss an die experimentelle Infektion sollten die klinischen, serologischen, pathologischen, histopathologischen und immunhistochemischen Befunde zusammengetragen und die verschiedenen Diagnostikmethoden evaluiert werden. In diesem Rahmen wurde ein besonderer Fokus auf die

Hämatologie, die Serum-/Plasma-Proteinelektrophorese sowie die Bestimmung von Akute-Phase-Proteinen, Anti-*Aspergillus*-Antikörpern, *Aspergillus*-Antigenen und *Aspergillus*-Toxinen gelegt. Dadurch sollten die bisher bestehenden, limitierten diagnostischen Möglichkeiten der *In-vivo*-Diagnostik der Aspergillose für den praktizierenden Tierarzt erweitert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchsaufbau, -räume und -tiere

Es wurden zwei aufeinanderfolgende Versuche (Versuchsteile A und B) über jeweils 28 Tage durchgeführt. Versuchsteil A wurde dabei mit 18 immaturren (10 Monate alten), männlichen Ger-Saker-Hybridfalken und Versuchsteil B mit 21 juvenilen (7 - 8 Wochen alten), männlichen Ger-Saker-Hybridfalken durchgeführt.

Die Falken in beiden Versuchsteilen stammten aus einem kommerziellen Falkenzuchtbetrieb. Die Tiere wurden beim Züchter aneinander und an den Menschen gewöhnt, wie dies mit Tieren dieses Betriebes regelmäßig zur Verkaufsvorbereitung durchgeführt wird. Nach dort etablierten, falknerischen Standardmethoden wurden die Tiere ebenfalls an die falknerische Anbindehaltung, die Fütterung aus der Hand des Menschen sowie an das Aufziehen der Falkenhaube („Verhauben“) gewöhnt (SCHÖNEBERG, 2009). Währenddessen wurde die Gesundheit der Tiere durch die Falkner und den bestandsbetreuenden Tierarzt überwacht, wobei auch regelmäßige parasitologische Kotuntersuchungen und antiparasitäre Behandlungen bei Bedarf durchgeführt wurden. Es erfolgten mehrere Bestandsbesuche im Zuchtbetrieb und es gab einen engen Austausch mit dem bestandsbetreuenden Tierarzt inklusive Einsicht in alle Laborergebnisse und Untersuchungsprotokolle. Dadurch konnten Mängel in der Haltungsumgebung, der Ernährung, der Fütterungs- und Haltungshygiene sowie medikamentelle Vorbehandlungen, Vergiftungen, auffällige Stressoren oder Quellen einer potenziellen Schimmelsporenemission bestmöglich ausgeschlossen werden.

Nach dem Transport wurden alle Falken klinisch (siehe 3.2.1), röntgenologisch und endoskopisch (siehe 3.2.3) untersucht. Das Blut der Tiere wurde per Hämagglutinationstest auf Anti-*Aspergillus*-Antikörper (nur Versuchsteil A) getestet bzw. ein Blutausschrieb hämatologisch (nur Versuchsteil B) ausgewertet (siehe 3.2.2). Von allen Tieren wurden Kotproben parasitologisch und Tupferproben mikrobiologisch (siehe 3.2.4) untersucht. Diese Untersuchungen wurden durchgeführt, um die Gesundheit der Tiere zu bestätigen und Vorerkrankungen, insbesondere eine Aspergillose, auszuschließen.

Nach einer Eingewöhnung von drei Tagen erfolgte die Inokulation mit einer definierten *A. fumigatus*-Konidienmenge (siehe 3.4). Dabei wurden basierend auf den Erfahrungen aus Versuchsteil A die Gruppengröße sowie die Inokulationsdosen im Versuchsteil B angepasst, um den Bereich der Infektionsdosen feiner abzustufen. Im Versuchsteil A wurden drei Infektionsgruppen (Gruppen A1 - A3) mit jeweils fünf immaturren Falken sowie eine Kontrollgruppe (Gruppe A4) mit drei immaturren Falken verwendet, während im Versuchsteil B sechs Infektionsgruppen (Gruppen B1 - B6) mit jeweils drei juvenilen Falken sowie einer Kontrollgruppe (B7) mit drei juvenilen Falken gebildet wurden (siehe 3.4). Die Gruppenzusammenstellung der Tiere erfolgte verblindet per Losverfahren.

In beiden Versuchsteilen wurde der experimentellen Inokulation eine 28-tägige Versuchsphase angeschlossen, die damit definitionsgemäß dem Zeitraum einer akuten (3 - 14 Tage) bzw. einer subakuten (14 - 28 Tage) Erkrankung entsprach. Im Versuchsteil A wurden die Vögel in der Tierversuchseinrichtung des Instituts für Pathologie, Bakteriologie und Vogelkrankheiten der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Gent in Merelbeke, Belgien (IPBAD) in zwei 6,5 m langen, 8,5 m breiten und 4,0 m hohen, identisch ausgestatteten Versuchsräumen untergebracht. Im Versuchsteil B wurden die Falken in einem 6,3 m langen, 4,5 m breiten x 2,9 m hohen Versuchsraum der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische der Justus-Liebig-Universität Gießen (KVRAF) untergebracht. In den Räumen wurden die Falken bei einer 12-stündigen Lichtphase in falknerischer Anbindehaltung auf der hohen Reck (SCHÖNEBERG, 2009) gehalten (siehe Abbildung 6). Die Räume wurden zuvor gemäß Herstellerangaben gereinigt und mit fungiziden Sprüh-Desinfektionsmitteln (F10™, Health & Hygiene, Florida Hills, Südafrika und Neopredisan-135®, Menno Chemie Vertrieb GmbH, Norderstedt) und einer fungiziden Rauchbombe (Mold Bomb™, Bio Cide Laboratories, Cumming, CA, USA) desinfiziert. Der Boden wurde mit Papiertischdecken (Papstar®, Kall) ausgelegt, welche einmal täglich gewechselt wurden. Die Falken wurden zweimal täglich adspektorisch untersucht und einmal täglich, immer zur gleichen Tageszeit, gefüttert und gewogen (siehe 3.5.1). Die Fütterung der Vögel erfolgte aus der Hand der Betreuungsperson mit kommerziell erworbenen Eintagshühnerküken *ad libitum*. Den Falken wurde temporär, vor allem während Reinigungsarbeiten oder der Fütterung anderer Tiere, die Falkenhaube aufgesetzt, um sie vor visuellen Reizen abzuschirmen und nicht zu beunruhigen.



Abbildung 6: Unterbringung der Falken im Versuchsaum. Die Tiere sind mit Falkenhauben temporär verhaubt und befinden sich in falknerischer Anbindehaltung.

Zum Ausschluss einer potenziellen Umgebungskontamination, welche neben der experimentellen Inokulation als mögliche Eintragsquelle für *Aspergillus* spp. bedacht werden musste, wurden vor der Inokulation sowohl im leeren als auch im besetzten Raum und während des Versuches zweimal wöchentlich 100 l-Raumluft mittels eines kommerziellen Luftprobensammlers (MAS-100 Eco, Merck-Ehitehouse Station, New Jersey, USA; 100l Luft/min) (siehe Abbildung 7) entnommen und auf Sabouraud Dextrose Agar (SAB; Oxid Deutschland GmbH, Wesel) bei 37 °C nach Standardmethoden kultiviert (siehe 3.5.7).



Abbildung 7: Luftprobensammler zum Monitoring der *Aspergillus fumigatus*-Konidien-Konzentration in der Raumluft.

Am Versuchsende (28. d. p. i.) bzw. beim Erreichen der tierschutzrechtlichen Abbruchkriterien wurden die Tiere narkotisiert (siehe 3.5.2) und ihnen wurde Blut für eine hämatologische Untersuchung (siehe 3.5.3) und weiterführende Serumuntersuchungen (siehe 3.5.9) entnommen. Im Anschluss wurden sie durch Injektion

von 0,5 ml T61 (Intervet Deutschland GmbH - MSD Tiergesundheit, Unterschleißheim) in die *Vena basilica* euthanasiert.

Als Abbruchkriterien wurden zentralnervöse Symptome, starke Dyspnoe oder anhaltende Tachypnoe sowie das mehrtägige Auftreten einer Apathie oder Anorexie mit starkem Aufplustern oder/und Aufkrümmung des Steißes definiert.

Anschließend wurden die Tierkörper einer pathologischen Untersuchung zugeführt (siehe 3.5.4), in deren Rahmen Proben von 14 Organen (Nares, Trachea/Syrinx, Lunge, Luftsäcke, Leber, Milz, Niere, Herz, Drüsenmagen, Muskelmagen, Darm, Brustmuskel, *Bursa cloacalis* und Gehirn) und von makroskopisch sichtbaren, granulomatösen Läsionen entnommen wurden. Abstriche von diesen Organen und Läsionen wurden auf mykologischen Nährböden und ausgewählte Organabstriche (Herzblut, Leber und Lunge) zusätzlich auf bakteriologischen Nährböden ausgestrichen und am IPBAD einer mikrobiologischen Untersuchung (siehe 3.5.7) mit anschließender molekularbiologischer Untersuchung (siehe 3.5.8) zugeführt. Gewebeproben wurden in phosphatgepufferter Formaldehydlösung fixiert, geschnitten und zur histopathologischen (siehe 3.5.5) sowie zu immunhistochemischen Untersuchung (siehe 3.5.6) an das IPBAD weitergeleitet.

Der Tierversuch im Versuchsteil A und alle dazu notwendigen Maßnahmen wurden von der Ethikkommission der Tiermedizinischen Fakultät der Universität Gent in Merelbeke, Belgien mit der Genehmigungsnummer EC 2010/111 genehmigt. Der Tierversuch im Versuchsteil B und alle dazu notwendigen Maßnahmen wurden von der Tierschutzkommission des Regierungspräsidiums Gießen mit der Genehmigungsnummer GI18/9 Nr. 69/2011 genehmigt.

3.2 Untersuchungen vor Beginn der Versuche

3.2.1 Klinische Allgemeinuntersuchung

Bei allen verwendeten Tieren wurde zum Ausschluss einer potenziellen Vor-erkrankung eine klinische Allgemeinuntersuchung durchgeführt, welche aus einer äußeren Adspektion, Auskultation von Herztönen und Atemgeräuschen sowie Palpation von Brust, Bauch und Gliedmaßen bestand. Zudem wurde ein Ausdauerstest ("Stresstest") durchgeführt (BAILEY, 2008), wobei die verhaubten und auf dem Falknerhandschuh stehenden Vögel 30 Sekunden lang durch eine schnelle

Auf- und Abbewegung des Falknerhandschuhs zum Flügelschlagen animiert wurden. Dabei wurde die Atemfrequenz sowie der Atemtyp während der Belastung und die Erholungszeit der Tiere evaluiert (TULLY UND HARRISON, 1994). Die Ruheatemfrequenz sollte zwischen 12 - 24 Atemzügen/min liegen (KAISER UND BUCHER, 1985) und auch bei/kurz nach Belastung immer unter 280 Atemzügen/min bleiben, um einer physiologischen Erhöhung der Ruheatemfrequenz zu entsprechen (HART UND ROY, 1966). Die Erholungszeit sollte unter 3 Minuten liegen (BAILEY, 2008). Der Atemtyp sollte kosto-sternal bleiben und keine doppelte Pumpbewegung der Bauchdecke aufweisen (BAILEY, 2008). Falken, deren Werte von den genannten Normalparametern abwichen, wurden vom Versuch ausgeschlossen.

3.2.2 Hämagglutinationstest und hämatologische Diagnostik

Zur Durchführung eines Hämagglutinationstests auf Anti-*Aspergillus*-Antikörper (nur Versuchsteil A) bzw. einer hämatologischen Untersuchung (nur Versuchsteil B) wurden 2 - 2,5 ml Blut bei allen Falken unter Isofluran-Inhalationsnarkose (Einleitung 5 %, Erhaltung 2,5 - 3 % via Maske) (LIERZ UND KORBEL, 2012) aus der Ulnarvene (*Vena basilica*) medial in der Ellenbeuge mittels 25G-Kanüle (Außendurchmesser 0,50 x 40 mm) entnommen.

Um das potenzielle Vorhandensein von Anti-*Aspergillus*-Antikörpern zu überprüfen, wurde 1 ml des Blutes der immaturen Falken (Versuchsteil A) zur Durchführung eines kommerziellen Hämagglutinationstests (Hemkit® *Aspergillus* IHA, Ravo Diagnostika, Freiburg) zurückgestellt, der am Institut für Pilzkrankheiten, Prof. Dr. Hans-Jürgen Tietz in Berlin mit Serum durchgeführt wurde. Das Testsystem wies gemäß den Angaben des Herstellers Titer $\leq 1:40$ als negativ, $> 1:40$ bis $< 1:320$ als unklar/fraglich und $\geq 1:320$ als positiv aus. Allerdings wurde dieser für die Humanmedizin entwickelte Hämagglutinationstest in einer nachfolgend in der KVRAF durchgeführten Evaluation an 154 Falken, deren Aspergillosestatus durch klinische, endoskopische bzw. pathologische Untersuchungen überprüft wurde, als nicht aussagekräftig eingestuft (FISCHER et al., unveröffentlichte Daten). Deshalb wurde im Versuchsteil B auf diesen Test verzichtet und stattdessen eine hämatologische Untersuchung der Tiere durchgeführt.

Zur Durchführung der hämatologischen Untersuchung wurden im Versuchsteil B aus dem frisch entnommenen Blut drei Blutausrichthe angefertigt, luftgetrocknet, nach Wright-Giemsa-Färbung (Shandon™ Wright-Giemsa Stain Kit, Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, USA) angefärbt und gemäß Standardmethoden evaluiert (PENDL, 2008a). Zur Schätzung der Gesamtzahl der Leukozyten pro Mikroliter Blut wurden alle Leukozyten in 20 Gesichtsfeldern in der 1000er Vergrößerung mit Ölimmersion gezählt (PENDL, 2008a). Nachfolgend wurde der prozentuale Anteil der einzelnen Leukozytenfraktionen (heterophile Granulozyten, basophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten) anhand der Auszählung von 100 Leukozyten in der 1000er Vergrößerung mit Ölimmersion ermittelt (PENDL, 2008b). Die ermittelten Werte wurden daraufhin mit publizierten Werten für Falken verglichen (DEL PILAR LANZAROT et al., 2001, HAWKINS et al., 2013, HEIDENREICH, 2013b, WERNERY et al., 2004a). Falken, die hämatologisch deutliche Hinweise auf ein Entzündungsgeschehen aufwiesen (z. B. Leukozytose) oder auf andere Weise deutlich von den Normalwerten abwichen, wurden vom Versuch ausgeschlossen.

Nachfolgend wurde das restliche Blut aus Versuchsteil A in Serumröhren (Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg) bzw. aus Versuchsteil B in Lithium-Heparin-Röhrchen (Mikro-Probengefäß 1,3ml LH, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) gesichert, zentrifugiert und das Serum (Versuchsteil A) bzw. Plasma (Versuchsteil B) aller Falken zu weiterführenden, serumdiagnostischen Untersuchung (siehe 3.5.9) an das Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen, Professur für Milchwissenschaften, Prof. Dr. Dr. habil. Ewald Usleber (ITNMK) und die Division of Comparative Pathology, University of Miami Miller School of Medicine, Prof. Carolyn Cray, Miami, Florida, USA (DCP-MIA) weitergeleitet.

Die Verwendung von Plasma an Stelle von Serum im Versuchsteil B erklärt sich aus den Rückmeldungen von Mitarbeitern beider Labore im Anschluss an den Versuchsteil A. Diese hatten anhand von eingesandten Diagnostikproben Serum und Plasmaproben vergleichend überprüft und eine zuvor nicht erwartete, bessere Eignung von Plasma zur Durchführung der Untersuchungen ermittelt (CAROLYN CRAY, persönliche Mitteilung; MADELEINE GROSS persönliche Mitteilung).

3.2.3 Bildgebende Diagnostik

Bei allen Falken wurden röntgenologische Aufnahmen angefertigt und eine endoskopische Untersuchung durchgeführt. Dies erfolgte unter Isofluran-Inhalationsnarkose (LIERZ UND KORBEL, 2012). Die röntgenologischen Untersuchungen der Tiere erfolgten im latero-lateralen und ventro-dorsalen Strahlengang. Dabei wurde besonderes auf aspergillosetypische Befunde (parabronchiale Zeichnung, Asymmetrie der Luftsäcke, Verdickung der Luftsackwände, Verwaschung der Organgrenzen, Luftsackspangen, rundliche Verschattungen in Lunge und Luftsäcken, Airtrapping, schlechte Abgrenzbarkeit der Herzsilhouette, erhöhte Röntgendichte der kaudalen Lungengrenze) geachtet.

Die endoskopische Untersuchung wurde bei allen Tieren gemäß Standardmethoden durchgeführt (LIERZ, 2008). Das Endoskop wurde beidseitig jeweils kaudal der letzten Rippe, ventral des Beckens (*Synsacrum*) und kranial des vorderen Oberschenkelmuskels (*Musculus iliotibialis cranialis*) in die kaudalen Brustluftsäcke (*Sacci thoracales caudales*) eingeführt. Von dort wurde es in die kranialen Brustluftsäcke (*Sacci thoracales craniales*) und die Bauchluftsäcke (*Sacci abdominales*) vorgeschoben (LIERZ, 2008). Die sichtbaren Organe (Herzbeutel, Lunge, Leber, Milz, Niere, Nebennieren, Gonaden, Magen und Darm) wurden hierbei inspiziert.

Falken, bei denen röntgenologische oder endoskopische Hinweise auf eine Erkrankung, insbesondere auf eine Aspergillose bestanden, wurden vom Versuch ausgeschlossen.

3.2.4 Parasitologische und mikrobiologische Kotuntersuchung

Über drei Tage wurden Sammelkotproben von jedem Tier direkt nach der Ankunft in den Versuchseinrichtungen gesammelt und dieser Pool parasitologisch und mikrobiologisch im Labor des IPBAD (Versuchsteil A) bzw. der KVRAF (Versuchsteil B) untersucht.

Für die parasitologische Untersuchung wurden Kotproben aller Falken nativ ausgestrichen und nach Anreicherung im Flotationsverfahren gemäß Standardmethoden mikroskopisch untersucht (MEHLHORN et al., 1993).

Zur Detektion von *Salmonella* spp. wurde der Kot aller Falken direkt auf Brilliantgrünagar (Oxoid Deutschland GmbH, Wesel) ausgestrichen und bei 37 °C über 48 Stunden angezüchtet. Parallel wurde 10 g Kot in 50 ml gepuffertem Peptonwasser (Oxoid) über 24 Stunden bei 37 °C bebrütet. Nachfolgend wurden 10 ml dieser Voranreicherung in 100 ml Brilliantgrün-Tetrathionat-Bouillon (Oxoid) überführt und bei 42 °C über 24 Stunden inkubiert. Zur Anzucht einer Subkultur wurde nun diese Anreicherung auf Brilliantgrünagar ausgestrichen und über 48 Stunden bei 37 °C bebrütet. Beim Ablesen der Platten würden *Salmonella* spp. weiße bis rote Kolonien mit roten Zonen aufweisen, während coliforme Enterobacteriaceae mit gelben bis grünlichen Kolonien und gleichfarbiger, umgebender Zone wachsen würden. Falken, bei denen Hinweise auf eine Endoparasitose oder eine Salmonellose bestanden, wurden von den Versuchen ausgeschlossen.

3.3 Inokulum und *Galleria mellonella*-Virulenztest

Als Inokulum wurde der *A. fumigatus*-Stamm K125 verwendet, welcher am 21.01.2011 an der KVRAF aus einem Lungengranulom eines Ger-Saker-Hybridfalken (*Falco rusticolus* x *F. cherrug*) isoliert wurde. Am IPBAD wurde eine 643 Nukleotide lange Gensequenz dieses Stammes für die Gene der ribosomalen Ribonukleinsäuren (5.8S, 18S und 28S rRNA) und der intergenetischen Spacerregionen (ITS1 und ITS2) unter der Nummer HE864321 im European Nucleotide Archive hinterlegt. Bis zur Verwendung wurde das Isolat im IPBAD bei -80 °C in Microbank™ Speicherbehältnissen (Pro-Lab Diagnostics, Vovolab, Belgien) aufbewahrt.

Die Virulenz des Isolates wurde vor den Infektionsversuchen an den Falken durch einen Virulenztest in Larven der großen Wachsmotte (*Galleria mellonella*) überprüft (COTTER et al., 2000). Diese wurden vor Beginn des Virulenztests über 7 - 10 Tage dunkel, bei 15 °C in Holzspänen gehalten (REEVES et al., 2004). Nachfolgend wurden im Dreifachansatz (Versuchsgruppe 1 - 3) 10 µl PBS mit 1×10^6 *A. fumigatus*-Konidien mittels Insulinspritze ins Hämözöl von jeweils sechs Larven injiziert (COTTER et al., 2000), die sich im Nymphenstadium befanden. Die Injektion erfolgte durch das letzte, linke Bauchbein (Afterfuß). Als Kontrollgruppen wurden sechs Larven auf gleiche Weise mit 10 µl PBS injiziert (Kontrollgruppe 1) und sechs weitere Larven blieben unbehandelt (Kontrollgruppe 2). Nachfolgend wurden die

Larven der drei Versuchsgruppen und der beiden Kontrollgruppen in dunklen Plastikboxen, bei Raumtemperatur inkubiert, täglich über 3 Tage untersucht und die Anzahl der toten Larven täglich notiert. Das gänzliche Fehlen von Bewegungen und die Entwicklung von dunklen Verfärbungen der Larve wurden hierbei als Todesanzeichen gewertet (BRENNAN et al., 2002, COTTER et al., 2000). Die durchschnittliche Überlebensrate der Larven in den Versuchsgruppen wurde nach 24, 48 und 72 Stunden evaluiert und mit der in den Kontrollgruppen verglichen (COTTER et al., 2000). Virulente Stämme sollten nach spätestens 48 h eine durchschnittliche Überlebensrate von weniger als 10 % aufweisen, während in den Kontrollgruppen keine toten Larven auftreten sollten.

Zur Inokulumpräparation wurde K125 auf SAB fünf Tage lang bei 37 °C bebrütet. Anschließend wurden die Kulturen in 5 ml 0,01 % TWEEN® 20 und Hank's balanced salt solution (HBSS) gewaschen, um die Konidien zu ernten (siehe Abbildung 8). Die somit abgespülten Konidien wurden daraufhin dreimalig in 0,01 % TWEEN® 20 und HBSS gewaschen, was jeweils eine 10-minütige Zentrifugation bei 3200 x g und 4 °C sowie das nachträgliche Verwerfen des Flüssigkeitsüberstandes beinhaltete. Nachfolgend wurde die Konidiendichte mittels Hämozytometer (Neubauer Zählkammer) bestimmt und durch Verdünnung mit HBSS auf definierte Konidienkonzentrationen eingestellt, welche zur Inokulation genutzt wurden. Diese waren im Versuchsteil A 10^3 , 10^5 und 10^7 und im Versuchsteil B 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 und 10^7 Konidien pro 0,5 ml Flüssigkeit.



Abbildung 8: A) *Aspergillus fumigatus*-Kultur mit aktivem Pilzmyzel. B) Durch Waschung mit 0,01% TWEEN® 20 und Hank's balanced salt solution geerntete Konidien in Suspension.

Im Anschluss an die experimentelle Inokulation der Falken wurde aus diesen zur Inokulation verwendeten Suspensionen der Anteil an lebensfähigen (viablen) Konidien mittels einer dezimalen Verdünnungsreihe (10^{-1} bis 10^{-10}) bestimmt. Hierzu wurden entsprechende Verdünnungen der Inokulationssuspensionen mit 0,01 % TWEEN® 20 und HBSS angefertigt und 0,5 ml einer jeden Verdünnungsstufe auf SAB für 20 Stunden bei 37 °C inkubiert. Durch Zählung der Kolonien und Rückrechnung der Verdünnungsstufe wurde die tatsächliche Konzentration der viablen, koloniebildenden Einheiten (KbE) von *A. fumigatus* in KbE/0,5 ml Inokulations-suspension bestimmt.

3.4 Einteilung der Infektionsgruppen und Infektion der Falken

Die Festlegung der Gruppen sowie die Berechnung der Anzahl der benötigten Falken pro Gruppe erfolgten in Absprache mit Herrn Dr. rer. nat. Klaus Failing, Leiter der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Hierzu kam das Programm BiAS, Modul „Studienplanung/Logistische Regression mit einer Kovariablen“ zum Einsatz (ACKERMANN, 2010). Der Berechnung der Anzahl der für das Versuchsvorhaben benötigten Tierzahlen wurde ein logistisches Regressionsmodell zugrunde gelegt. Die abhängige Variable bildete dabei das Auftreten einer Aspergillose, während als Kovariable der Logarithmus der Infektionsdosis angesehen wurde. Ziel war es mit Hilfe der logistischen Regressionsgleichung die Dosis-Wirkungs-Beziehung zu beschreiben und aus ihr die minimale Infektionsdosis zu schätzen.

Es wurden hierzu folgende Parameterwerte angenommen:

α (Fehlerwahrscheinlichkeit 1. Art) = 0,05 bei einseitiger Fragestellung

β (Fehlerwahrscheinlichkeit 2. Art) = 0,1

Die Fehlerwahrscheinlichkeit 1. Art von 0,05 galt hier bei einseitiger Fragestellung, wobei einseitig bedeutete, dass nur ein wachsender Anteil erkrankter Tiere mit wachsender Infektionsdosis zu erwarten und von Interesse war.

Außerdem lag der Fallzahlab-schätzung folgende ungefähr zu erwartende Häufigkeitstabelle (siehe Tabelle 1) für den Anteil klinisch an Aspergillose erkrankter Vögel

zugrunde, in der davon ausgegangen wurde, dass bei Inokulation einer Menge zwischen 10^4 und 10^5 Sporen ungefähr die Hälfte der Vögel erkranken würde. Dies wurde aus Versuchen mit Puten und Breitflügelbussarden abgeleitet (REDIG, 1980b). Für die Tabelle 1 wurde eine Odds Ratio (OR) vom ungefähren Wert 4 angesetzt, der den erwarteten Anteilen der klinisch an Aspergillose erkrankten Vögel auf Grund von Literaturdaten entspricht (REDIG, 1980b).

Tabelle 1: Odds Ratio (OR) des erwarteten Wertes

Lg (Dosis) zur Basis 10	Kontrolle	2	3	4	5	6	7
Chance zu erkranken („=Odds“)	0 : ∞	3 : 97	11,1 : 88,9	33,3 : 66,7	66,7 : 33,3	88,9 : 11,1	97 : 3
Wahrscheinlichkeit		0,03	0,111	0,333	0,667	0,889	0,97

Im Versuchsteil A wies BiAS für den Fall des Nachweises des Einflusses der Infektionsdosis auf den Anteil der erkrankten Vögel einen Stichprobenumfang von insgesamt $n = 15$ aus (Kontrolle hierbei noch nicht miteinbezogen). Diese Anzahl von Tieren wurde auf die drei zu prüfenden Infektionsdosen 10^3 , 10^5 bis 10^7 gleichmäßig verteilt, sodass im Versuchsteil A drei Infektionsgruppen (Gruppen A1 - A3) mit jeweils fünf immaturren Falken sowie eine Kontrollgruppe (Gruppe A4) mit drei immaturren Falken verwendet wurden (siehe Tabelle 2). Die einzelnen Individuen wurden innerhalb der Infektionsgruppen fortlaufend durchnummeriert, z. B. A1.1, A1.2, A1.3, A1.4 und A1.5 für die Gruppe A1 und entsprechend für andere Gruppen.

Tabelle 2: Übersicht der Inokulationsdosen und der Gruppen im Versuchsteil A (immaturre Falken)

Gruppe A1 (n = 5)	10^7 KbE/0,5 ml
Gruppe A2 (n = 5)	10^5 KbE/0,5 ml
Gruppe A3 (n = 5)	10^3 KbE/0,5 ml
Gruppe A4 (n = 3)	0 KbE/0,5 ml (Kontrolle)

Legende: KbE/ml = Koloniebildende Einheiten pro 0,5 Milliliter Trägerflüssigkeit; n = Anzahl

Im Versuchsteil B sollte der Dosisbereich zwischen 10^2 und 10^7 eingehender untersucht werden, weshalb mehr Inokulationsdosen in kleineren Abstufungen

zueinander verwendet wurden. BiAS wies für diesen Fall des Nachweises des Einflusses der Infektionsdosis auf den Anteil der erkrankten Vögel einen Stichprobenumfang von insgesamt $n = 18$ aus (Kontrolle hierbei wieder nicht miteinbezogen). Diese Anzahl von Tieren wurde auf die zu prüfenden, verschiedenen Infektionsdosen im Bereich von 10^2 bis 10^7 möglichst gleichmäßig verteilt. So wurden für die sechs verschiedenen Infektionsdosen von 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 jeweils drei Tiere und zusätzlich drei Kontrolltiere benötigt. Folglich wurden im Versuchsteil B sechs Infektionsgruppen (Gruppen B1 - B6) mit jeweils drei juvenilen Falken sowie eine Kontrollgruppe (B7) ebenfalls mit drei juvenilen Falken verwendet. Die einzelnen Individuen wurden innerhalb der Infektionsgruppen in gleicher Weise fortlaufend durchnummeriert, z. B. B1.1, B1.2 und B1.3 für die Gruppe B1 und entsprechend für andere Gruppen (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Übersicht der Inokulationsdosen und der Gruppen im Versuchsteil B (juvenile Falken)

Gruppe B1 (n = 3)	10^7 KbE/0,5 ml
Gruppe B2 (n = 3)	10^6 KbE/0,5 ml
Gruppe B3 (n = 3)	10^5 KbE/0,5 ml
Gruppe B4 (n = 3)	10^4 KbE/0,5 ml
Gruppe B5 (n = 3)	10^3 KbE/0,5 ml
Gruppe B6 (n = 3)	10^2 KbE/0,5 ml
Gruppe B7 (n = 3)	0 KbE/0,5 ml (Kontrolle)

Legende: KbE/ml = Koloniebildende Einheiten pro 0,5 Milliliter Trägerflüssigkeit; n = Anzahl

Die *A. fumigatus*-Konidien wurden je Tier mit 0,5 ml der entsprechend eingestellten Inokulationssuspension intratracheal appliziert, wobei den Kontrolltieren lediglich 0,5 ml HBSS eingegeben wurde (siehe Abbildung 9). Dabei erfolgte die Inokulation jeweils über einen 2,5 mm durchmessenden, 16,5 cm langen, flexiblen, pädiatrischen Endotrachealtubus (Vygon, Ecoen, Frankreich). Dieser wurde jeweils unter tiefer Isofluran-Inhalationsnarkose (Isoflo[®], Medini NV, Oostkamp, Belgien), nach Erreichen des Toleranzstadiums (LIERZ UND KORBEL, 2012) in die Trachea der Tiere eingeführt und bis zum Stimmknorpel (*Syrinx*) an der Luftröhrenaufteilung (*Bifurcation tracheae*) vorgeschoben.



Abbildung 9: Intratracheale Inokulation der narkotisierten Falken

Nach Abgabe der Inokulationsdosis wurde der Tubus mit 5 ml Luft nachgespült und das Tier extubiert. Anschließend wurden die Falken während der Aufwachphase verhaubt, in ein Handtuch gehüllt und von einer Person in aufgerichteter Position für drei Minuten gehalten, damit das Inokulum nicht herauslaufen und die Tiere sich nicht verletzen konnten. Die Falken, die nach dieser Zeit noch nicht vollständig aufgewacht waren, wurden zur Überwachung auf eine gepolsterte Bodenmatte gelegt, bis sie wieder bei Bewusstsein waren und aufrecht standen. Anschließend wurden die Tiere in die Versuchsräume verbracht.

3.5 Untersuchungen der Falken nach Inokulation von *Aspergillus fumigatus*-Konidien

3.5.1 Klinische Verlaufsuntersuchung

Die Tiere wurden täglich in Anlehnung an vorangegangene Studien klinisch untersucht (BEERNAERT et al., 2008), wobei der Untersucher keine Kenntnis darüber hatte, welches Tier zu welcher Infektions- bzw. Kontrollgruppe gehörte (verblindete Auswertung). Dabei wurde das Verhalten, die Futteraufnahme, die Haltung, die Exkreme, das Gefieder und die Atmung beurteilt. Zudem wurde täglich immer zur gleichen Zeit, vor der Fütterung, das Körpergewicht mittels einer Waage (MTB 20, Adam Equipment, Kingston, UK) mit Sitzstange bestimmt (Abbildung 10 A).

Zur Beurteilung des Verhaltens wurde eine Zahlenkodierung verwendet. Es erfolgte eine Einteilung des Verhaltens in ruhig und aufmerksam (1), nervös (2), ängstlich und ruhelos (3), schläfrig (4), apathisch (5) und anderweitig auffällig (z. B. zentralnervöse Symptome) (6).

Bei der Fütterung (siehe Abbildung 10 B) wurde die Menge der aufgenommenen Eintagshühnerküken sowie das Fressverhalten notiert. Dieses wurde ebenfalls mit Zahlen kodiert und in schnell und vollständig (1), zögerlich, aber ausreichend (2), insuffizient (nur wenig), aber selbstständig (3), nicht vorhanden (Inappetenz) (4) und unselbstständig (assistierte Fütterung mit kleinen Futterstücken, wenn eine Inappetenz über zwei Tage bestand) (5) unterteilt.



Abbildung 10: A) Tägliches Wiegen der Falken. B) Tägliches Füttern der Falken.

Die Haltung wurde ebenfalls kodiert und als aufrecht stehend mit angelegten Flügeln (1), leicht gebeugt mit leicht hängenden Flügelspitzen (2), gebeugt, breitbeinig stehend mit hängenden Flügeln (3) und liegend (4) eingeteilt.

Bei der Begutachtung der Exkremente wurde auf Verfärbungen, vor allem auf Grünfärbungen des Urinanteils und auf das Vorliegen von Diarrhoe (eingeteilt in gering-, mittel- und hochgradig) geachtet. Somit sollten eine Reaktion des Magen-darmtrakts auf die Erreger und Anzeichen einer Biliverdinurie berücksichtigt werden, die mit einer Grünfärbung des Urinanteils einhergehen und Folge einer potenziell mit Aspergillose assoziierten Leberschädigung sein könnte.

Für den Grad der Aufplusterung des Gefieders wurden Scores von 1 bis 4 vergeben, wobei 1 als unauffällig, 2 als leicht aufgeplustert, 3 als betont aufgeplustert und 4 als stark aufgeplustert gewertet wurde.

Bei der Beurteilung der Atmung wurden für abdominale Atmung und Schwanzwippen jeweils Scores von 0 bis 1 vergeben, wobei 0 als abwesende, 0,2 als schwach sichtbare, 0,4 als geringgradige/leichte, 0,6 als mittelgradige/moderate, 0,8 als hochgradige/verstärkte und 1 als höchstgradige abdominale Atmung bzw. Schwanzbewegung eingeteilt wurde (BEERNAERT et al., 2008).

Da im Versuchsteil A auffiel, dass durch die oben genannte Einteilung von Einzelparametern keine zufriedenstellende statistische Auswertung über den gesamten Versuchsverlauf möglich war, wurden im Versuchsteil B zusätzlich Dyspnoe-Scores (DS) und Klinische Scores (KS) ermittelt und statistisch ausgewertet. Der DS wurden als Mittelwert der einzelnen Scores für abdominale Atmung und für Schwanzwippen errechnet. Neben dem DS wurde eine Atmung mit offenem Schnabel, eine atemsynchrone Bewegung der Flügel sowie die Präsenz von Stridores als Dyspnoeanzeichen vermerkt. Alle oben genannten Parameter (Haltung, Verhalten, Fressverhalten, Aufplusterung des Gefieders und DS) wurden in einem KS von 1 bis 4 zusammengefasst und dokumentiert, wobei eine Verschlechterung des klinischen Zustandes mit einer Erhöhung des KS dargestellt wurde. Der höchste KS (KS 4) entsprach der Indikation zum Abbruch des Tierversuches für das jeweilige Individuum und der Euthanasie des Falken. Die Definition der Klinischen Scores wird in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Definition der verwendeten Klinischen Scores (KS)

Klinischer Score (KS)	
KS 0	DS < 0,4, Haltung 1, Verhalten 1 - 2, FA 1 und Gefieder 1
KS 1	≥ 0,4 DS < 0,6 und/oder einer der folgenden Punkte: Haltung 2, Verhalten 3 - 4, FA 2, Gefieder 2 - 3
KS 2	≥ 0,6 DS < 0,8 und/oder zwei der folgenden Punkte: Haltung 2, Verhalten 3 - 4, FA 2, Gefieder 2 - 3
KS 3	≥ 0,8 DS < 1 und/oder einer der folgenden Punkte: Haltung 3, Verhalten 5, FA 3 - 5, Vomitus, Gefieder 4, Stridores, Atmung mit geöffnetem Schnabel
KS 4	DS 1 und/oder Haltung 4 und/oder Verhalten 6 oder mehrtägig Verhalten 5 und/oder FA mehrtägig 4 - 5

Legende: DS (Dyspnoe-Score), KS (Klinischer Score), Haltung (Körperhaltung), FA (Futteraufnahme); KS 4 (Euthanasie-Indikation bzw. verstorben)

3.5.2 Narkose, Blutentnahme und Euthanasie der Tiere

Am Versuchsende (28 d. p. i.) bzw. beim Erreichen der tierschutzrechtlichen Abbruchkriterien wurden die Tiere mit Isofluran-Inhalationsnarkose anästhesiert (LIERZ UND KORBEL, 2012) und ihnen wurde Blut abgenommen (siehe 3.2.2). Anschließend wurden sie durch eine intravenöse Injektion von 0,5 ml T61 in die *Vena basilica* euthanasiert.

Die anschließende Blutprobenbearbeitung zu Serum- bzw. Plasmaproben entsprach dem Vorgehen im Rahmen der Voruntersuchungen (siehe 3.2.2).

3.5.3 Hämatologische Diagnostik

Die hämatologische Untersuchung von Blutproben juveniler Falken im Versuchsteil B zum Ende des Versuchs entsprach dem Vorgehen im Rahmen der Voruntersuchungen (siehe 3.2.2). Es wurden die Werte zum Anfang und zum Ende des Versuchs je Individuum und im Gruppenvergleich gegenübergestellt.

3.5.4 Pathologische Untersuchungen und Probenentnahme

Es wurde eine vollständige pathologisch-anatomische Untersuchung der Tierkörper aller Falken (KEYMER, 2007) am IPBAD (Versuchsteil A) bzw. an der KVRAF (Versuchsteil B) durchgeführt, in deren Rahmen Proben für weiterführende Untersuchungen entnommen wurden. Je Tier wurden Gewebeproben und Abstriche von 14 Organen (Nares, Trachea/Syrinx, Lunge, Luftsäcke, Leber, Milz, Niere, Herz, Drüsenmagen, Muskelmagen, Darm, Brustmuskel, *Bursa cloacalis* und Gehirn) sowie von makroskopisch sichtbaren, granulomatösen Läsionen entnommen und histopathologischen, immunhistochemischen, mikrobiologischen und molekularbiologischen Untersuchungen zugeführt.

Die pathologisch-anatomischen Läsionen wurden in Pathologischen Scores (PS) dokumentiert. Eine Definition der Scores befindet sich in Tabelle 5.

Tabelle 5: Definition der pathologischen Scores (PS)

Pathologische Scores (PS)	
PS 0	Ohne besonderen Befund
PS 1	Geringgradige, unspezifische Veränderungen ohne Hinweis auf eine Aspergillose
PS 2	Gering- bis mittelgradige Läsionen wie Luftsacktrübungen oder -verdickungen mit Gefäßeinsprossung, die mit einer Aspergillose assoziiert sein können, exklusive granulomatöser Veränderungen
PS 3	Granulomatöse Läsionen oder andere hochgradige, entzündliche Läsionen, die regelmäßig mit einer Aspergillose assoziiert sind, z. B. Pilzmyzel

3.5.5 Histologische Untersuchungen

Gewebeproben wurden in phosphatgepufferter, 10 %-iger Formaldehydlösung (Merck KgaA, Darmstadt) fixiert. Die histologischen Schnitte wurden am IPBAD angefertigt und mittels Hämatoxylin und Eosin (Merck KgaA) sowie mittels PAS-Reaktion (Merck KgaA) gefärbt, um mykotische Strukturen wie Hyphen oder Konidien sichtbar zu machen. Nachfolgend wurde dokumentiert, ob und wo mykotische Strukturen innerhalb von Läsionen oder Geweben nachweisbar waren.

3.5.6 Immunhistochemische Untersuchung

Zur Darstellung respiratorischer Makrophagen in Lungen, Luftsäcken und granulomatösen Läsionen wurde eine Concanavalin A-Färbung (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) gemäß etablierter Protokolle am IPBAD durchgeführt (GREENFIELD et al., 1988). Eine Schnellerhitzung wurde unter Druck durchgeführt, um in deparaffinierten Schnitten von Lunge, Luftsäcken und granulomatösen Läsionen Antigene wiederzufinden, versteckte Antigenbindungsstellen freizulegen und die durch Formalinfixierungen geformten Proteinquervernetzungen aufzubrechen (NORTON et al., 1994). Die Schnitte wurden für 15 Minuten bei 850 Watt und weitere 15 Minuten bei 300 Watt in einer Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurden sie über 20 Minuten abgekühlt. Nachfolgend wurden sie mit 3 %-igem Wasserstoffperoxid in Methanol für 5 Minuten bei Raumtemperatur behandelt, um die endogene Peroxidaseaktivität zu blocken.

Nach kurzem Abspülen der Schnitte mit PBS wurden sie für 60 Minuten mit 20 µg/ml Concanavalin A in einer Feuchtekammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Abspülen mit PBS wurde das Reaktionsprodukt für 5 Minuten mit Wasserstoffperoxid und Diaminobenzidin-Lösung inkubiert, welche gemäß Herstellerangaben hergestellt wurde. Abschließend wurden die Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt und zur weiteren Untersuchung eingedeckelt.

3.5.7 Bakteriologische und mykologische Untersuchung

Abstriche von Herzblut, Leber und Lunge wurden auf Schafblutagar (Oxoid Deutschland GmbH, Wesel) und Gassnermedium (Oxoid Deutschland GmbH) ausgestrichen und über 48 Stunden bei 37 °C am IPBAD (Versuchsteil A) bzw. an der KVRAF (Versuchsteil B) unter aeroben Bedingungen inkubiert.

Abstriche von Trachea, Syrinx, Lunge, diversen Luftsäcken (kraniale und kaudale Thorakalluftsäcke sowie Abdominalluftsäcke), Herzblut, Perikard, Leber, Niere, Gehirn, Brustmuskel, Zölonhöhle und granulomatösen Läsionen wurden auf Sabouraud Dextrose Agarplatten (SAB; Oxoid Deutschland GmbH) über 72 Stunden bei 37 °C und unter aeroben Bedingungen inkubiert. Nach Identifizierung der isolierten Schimmelpilze wurde Material von jeder Kolonie zur molekularbiologischen Untersuchung ans IPBAD weitergeleitet (VAN WAEYENBERGHE et al., 2011).

3.5.8 Molekularbiologische Untersuchung

Jede reisolierte Pilzkolonie wurde am IPBAD mittels Mikrosatelliten-Längen-Polymorphismus gemäß etablierter Methoden untersucht (VAN WAEYENBERGHE et al., 2011). Dabei wurden die Mikrosatelliten bzw. Short Tandem Repeats (STAR), als isolatspezifische, sich mehrfach wiederholende DNA-Abschnitte ausgewertet. Zur Untersuchung wurden die Kolonien drei Tage auf SAB (Oxoid Deutschland GmbH) bei 37 °C, aerob kultiviert. Zur Bestätigung der morphologischen Speziesdiagnose wurde eine partielle DNA Sequenzierung des *rodletA* und des β -tubulins von *A. fumigatus* nach etablierten Protokollen durchgeführt (ALCAZAR-FUOLI et al., 2008). Hierzu wurde die DNA extrahiert und präpariert indem ein Myzelstück der Schimmelpilzkolonie aus dem Agarmedium herausgeschnitten und der Agar bei

56 °C über 10 Minuten geschmolzen wurde (BEERNAERT et al., 2008). Um die DNA der Zellen freizulegen, wurde das Myzel nachfolgend manuell zerrieben, für 2,5 Minuten zentrifugiert (16.100 x g) und der Überstand mittels PCR untersucht. Die Primer für die Short Tandem Repeats STRA f 2, STRA f 3 und STRA f 4 sowie die notwendigen Amplifikationsschritte wurden gemäß DE VALK et al. (2005) gewählt. Allerdings wurden dabei andere Fluoreszenzmarker für die Amplifikationsprimer verwendet (VIC statt FAM, NED statt HEX und PET statt TET). Die Allelleitern (allelic ladders) entsprachen dabei den Fluoreszenz- und Trinukleotid-Markierungen aus dem Protokoll für STRA f 3 aus einer Folgestudie der gleichen Arbeitsgruppe (DE VALK et al., 2009). Die PCR-Produkte wurden anschließend 10-fach mit destilliertem Wasser verdünnt. 2 μ l dieser Lösung wurden mit 12 ml Formamid und 1 ml GS 500 LIZ Längenstandard versetzt. Nach erfolgter Denaturierung der Proben bei 95 °C für zwei Minuten und Schnellabkühlung auf 0 °C für 30 Minuten wurden sie in einen ABI Prism 3100 Genetic Analyzer gegeben (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Mittels des Programms Genemapper v3.5 (Applied Biosystems) wurde die Größe jedes Amplifikatfragmentes bestimmt und die Mikrosatellitenlänge notiert. Die Mikrosatellitenlängen im STRA f 3-Ansatz wurden durch Vergleich mit der Allelleiter bestimmt. Die Mikrosatellitenlängen der STRA f 2 und STRA f 4 Ansätze wurden mit Bezug auf Referenzgrößen aus der Literatur ermittelt, welche durch Untersuchungen von Referenzisolaten bekannter Genotypen validiert worden waren (DE VALK et al., 2005). Die Typisierungsdaten wurden in die BioNumerics Software Version 6 (Applied Maths, St-Martens-Latem, Belgien) importiert und analysiert, um unter Nutzung des mehrstufigen, kategorischen Ähnlichkeitskoeffizienten (categorical multistate similarity coefficient) mit UPGMA clustering (unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) phylogenetische Verwandtschaften zu ermitteln (VAN WAEYENBERGHE et al., 2011). Die ermittelten Genotypen wurden zunächst mit dem Genotyp des Inokulationsisolates abgeglichen. Im Falle einer fehlenden Übereinstimmung wurde ein Abgleich mit einer Datenbank durchgeführt, die 2.514 Genotypen humanen Ursprungs sowie Umweltisolate von *A. fumigatus* aus Europa und den USA enthält (VAN WAEYENBERGHE et al., 2011).

3.5.9 Serumdiagnostik

Die vor Beginn des Versuches und am Versuchsende entnommenen Serum- (Versuchsteil A) bzw. Plasmaproben (Versuchsteil B) wurden bei allen Falken beider Versuchsteile vergleichend untersucht. In Ermangelung an Vergleichsproben bzw. Werten für Großfalken wurden im Rahmen der Serumdiagnostik Proben vor Versuchsbeginn als Referenz für potenzielle Veränderungen nach der Inokulation herangezogen. Dies betraf die Menge und die Verteilung von Proteinen (Protein-Elektrophorese sowie Akute-Phase-Proteinbestimmung), *A. fumigatus*-Antigenen und Anti-*A. fumigatus*-Antikörpern im Serum (Versuchsteil A) bzw. Plasma (Versuchsteil B), die im Zusammenhang mit der Inokulation und/oder der experimentell induzierten Erkrankung stehen könnten.

3.5.9.1 *Aspergillus*-Antikörper Diagnostik

3.5.9.1.1 Hämagglutinationstest

Der kommerzielle Hämagglutinationstest auf Anti-*Aspergillus*-Antikörper (Hemkit® *Aspergillus* IHA, Ravo Diagnostika) von Blutproben immaturer Falken (Versuchsteil A) entsprach dem Vorgehen im Rahmen der Voruntersuchungen (siehe 3.2.2). Es wurden die Werte zum Anfang und zum Ende des Versuchs je Individuum und im Gruppenvergleich gegenübergestellt.

3.5.9.1.2 *Aspergillus*-Antikörper ELISA

Zum Ausschluss bzw. Nachweis von aspergilluspezifischen Antikörpern wurde ein indirekter Antikörper-ELISA (GERMAN et al., 2002) an der DCP-MIA gemäß vorheriger Studien modifiziert und verwendet (CRAY et al., 2009b). Hierzu wurden Nunc Maxisorp™ ELISA Platten (Thermo Fisher Scientific) mit einem unfraktionierten *A. fumigatus*-Antigen (Immunomycologics) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Platte mit PBS gewaschen und mit 10 %-iger Kaseinlösung (Sigma-Aldrich) für zwei Stunden bei Raumtemperatur beschichtet, um freie Bindungsstellen zu blockieren und somit das unspezifische Hintergrundsignal zu reduzieren. Nach einer erneuten Waschung mit PBS wurden die Platten bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Anschließend wurden je Vertiefung 50 µl der mit PBS verdünnten Serum- bzw. Plasmaproben eingefüllt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Hiernach wurden die Kavitäten mit einer 0,05 %-igen NaCl-Tween®

20-Lösung (Sigma-Aldrich) dreimalig gewaschen, bevor mit Meerrettich-Peroxidase konjugiertes Anti-Huhn-IgG (Sigma) für 30 Minuten bei 37 °C hinzugegeben wurde. Für dieses Anti-Huhn-IgG (Sigma-Aldrich) war in vorangegangenen Studien eine geeignete Kreuzreaktivität mit Plasmaproben verschiedener Vogelspezies aus 21 Ordnungen gezeigt worden, wobei auch Plasmaproben von anderen Greifvögeln wie Turmfalken (*Falco tinnunculus*) evaluiert wurden (CRAY UND VILLAR, 2008). Nach weiteren Waschschritten mit NaCl-Tween®-Lösung wurde 2,29-Azino-bis-3-Ethylbenzthiazolin-6-Schwefelsäure (Kirkegaard & Perry, Gaithersburg, MD, USA) hinzugegeben, um auf der Platte eine grüne Farbreaktion zu erzeugen, die bei 405 nm mittels eines Plattenlesegerätes ausgewertet werden konnte (Molecular Devices Llc, Sunnyvale, CA, USA). Parallel zu den Proben wurden Positiv- und Negativkontrollen gemessen, wobei letztere gemittelt wurden. Durch Division der Adsorptionswerte der Probe durch die Durchschnittsadsorption der Negativkontrollen wurde ein Index kalkuliert. Aus den Erfahrungen von Studien mit Psittazidenplasma von aspergillosepositiven Tieren (CRAY et al., 2009b) wurde ein Index $\geq 1,4$ als positiv angesehen.

3.5.9.2 Aspergillus-Antigen ELISA

Ein kommerzielles Platelia™ ELISA Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) wurde zur Detektion des *Aspergillus*-Antigens Galactomannan (GM) an der DCP-MIA eingesetzt. Dabei wurde der ELISA gemäß einer vorangegangenen Studie im Vergleich zu den Herstellerangaben modifiziert (CRAY et al., 2009a). Es wurden wegen des begrenzten Probenvolumens 60 µl anstelle von 300 µl Serum bzw. Plasma für den Test verwendet, wobei diese Veränderungen durch die Inklusion von positiven und negativen Proben aus der laboreigenen Probensammlung sowie durch zusätzliche, mit GM gespickte Proben validiert wurden (CAROLYN CRAY, persönliche Mitteilung). Die Testresultate wurden als Berechnung eines Indexes aus positiven, negativen und Cut-off-Proben dargestellt, wobei dieser Index die Reaktion der Serum- bzw. Plasmaproben in Relation zu den Cut-off-Kontrollen darstellt. Gemäß Herstellerangaben wurde ein Index $\geq 0,5$ als positiv angesehen.

3.5.9.3 *Aspergillus*-Toxin Fumigaclavin A (FuA)-Nachweis mittels EIA

Plasma- bzw. Serumproben der Falken wurden mittels eines kompetitiven, indirekten, enzymgekoppelten Immuntests (EIA) am ITNMK (LATIF et al., 2009) auf das Vorkommen von FuA untersucht. Dieser EIA wurde in vorangegangenen Studien erfolgreich zur Detektion von FuA in Luftsack- und Lungenproben von natürlich an Aspergillose erkrankten Papageien, Pinguinen und Greifvögeln genutzt (GROSS et al., 2013, LATIF, 2010). Zur Vorbereitung des EIA wurden 250 µl der Proben mit 200 µl PBS (pH 7,4) und 50 µl einer Glucuronidase-Sulfatase-Lösung (100 Einheiten/ml) für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert, um potenzielle FuA-Metaboliten zu spalten. Zur Durchführung des EIA wurde ein Konjugat aus FuA (ALX-630-110, Alexis Biochemicals, Lausen, Schweiz) und Bovinem Serum A 1:2000 mit Natriumcarbonatpuffer (0.05 mmol/l, pH 9,6) verdünnt und nachfolgend zur Beschichtung von Mikrotiterplatten genutzt. Verbliebene freie Bindungsstellen wurden mittels 2 %-igem Kasein in PBS (pH 7,4) geblockt. Danach wurden 50 µl der vorbereiteten Serum- bzw. Plasmaprobe unverdünnt und in den Verdünnungen 1:2, 1:6, 1:24 und 1:120 in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten gegeben. In der gleichen Verdünnungsreihe wurden 50 µl der FuA-Standard-Lösung (200 ng/ml in Methanol und 1:6 in 10 %-iger Methanol-PBS-Lösung) in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten pipettiert. Nachfolgend wurden 50 µl Anti-FuA-Antiserum von Kaninchen hinzugegeben, welches am ITNMK gemäß LATIF et al. (2009) gewonnen worden war. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Überstand entfernt und die Platte gewaschen, wonach 100 µl anti-Kaninchen IgG-Meerrettich-Peroxidase-Lösung (Dako A/S, Glostrup, Dänemark) in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte gefüllt wurden. Im Anschluss erfolgten eine erneute Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur sowie ein erneuter Waschschrift der Platte, wonach 100 µl einer Substrat-Chromogen-Lösung (GALLATI UND PRACHT, 1985) je Vertiefung addiert wurden, um eine Farbreaktion zu erzeugen. Die Farbreaktion wurde nach 15 Minuten durch die Zugabe von 100 µl Schwefelsäure (1 mol/l) gestoppt und nachfolgend wurde in Anlehnung an frühere Studien (THAL et al., 2011) die Adsorption bei einer Wellenlänge von 450 nm mittels eines kommerziellen Plattenlesers gemessen und mit Hilfe der Magellan-EIA-Computersoftware (Tecan Group Ltd., Männendorf, Schweiz) ausgewertet.

Zur Überprüfung, ob der in dieser Studie verwendete *A. fumigatus*-Stamm K125 FuA in den inokulierten Falken bildete, wurden im Anschluss an die pathologische

Untersuchung Gewebeproben aus dem Respirationstrakt (Lunge und Luftsack) von einzelnen Falken entnommen und mittels EIA am ITNMK nach beschriebenen Methoden untersucht (GROSS et al., 2013, LATIF, 2010). Hierzu wurden 1 g Gewebe über 10 Minuten mit 10 ml PBS (pH 7,4) und 10 %-igem Methanol (v/v) in einem peristaltischen Laborhomogenisator homogenisiert und das Homogenat bei 3.000 g über 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und erneut bei 11.000 g über 15 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das so entstandene Extrakt wurde in drei Verdünnungsstufen in 10 %-igem Methanol/PBS verdünnt und der EIA in gleicher Weise wie bei den Blutproben durchgeführt. Als Cut-off-Wert wurde $\geq 1,5$ ng FuA/g Gewebe als positiv gewertet.

3.5.9.4 Akute-Phase-Proteinmessung

Als Akute-Phase-Proteine (APPs) wurden Serum-Amyloid A (SAA) und Haptoglobin (HP) an der DCP-MIA bestimmt. SAA wurde turbidimetrisch in Anlehnung an frühere Studien bei Falken (CALIENDO et al., 2013) mittels des Eiken™ SAA Kits (Eiken Chemical Co Ltd., Tokio, Japan) unter Verwendung eines Randox™ Daytona Analysegerätes (Randox Laboratories, Kearneysville, VA, USA) quantifiziert. Dieser Test basiert auf dem Latexagglutinationsprinzip, dass SAA an eine mit Latex konjugierte Mixtur aus polyklonalen Kaninchen und monoklonalen Maus-anti-Mensch-SAA-Antikörpern bindet und so ein Präzipitat formt, welches turbidimetrisch gemessen werden kann.

Zur Quantifizierung von HP wurde das Tridelta™ Phase HP Kit (Tridelta, Boston, NY, USA) gemäß Herstellerangaben verwendet. Damit wurde HP entsprechend dem Erhalt der Peroxidase-Aktivität des Hämoglobins gemessen, welcher direkt proportional zum Gehalt an HP ist (NAZIFI et al., 2010). Die analytische Sensitivität des Tests wurde vom Hersteller mit 0,0156 mg/ml angegeben.

3.5.9.5 Serum-/Plasma-Proteinelektrophorese

Die Serum- bzw. Plasma-Proteinelektrophorese wurde mittels Farbdichtemessung (Densitometrie) gemäß früherer Studien (CRAY et al., 2011) unter Verwendung eines Helena SPIFE 3000 Systems (Helena Laboratories, Beaumont, TX, USA) und eines Split Beta Gels (Helena Laboratories) an der DCP-MIA durchgeführt. Das System wurde 10 Minuten bei 650 Volt laufen gelassen, bevor Barbitalpuffer und

Coomassie-Brillant-Blau-Färbung (Rocket Stain - Coomassie Acid Blue, Helena Laboratories) zur Proteinfärbung genutzt wurden. Es wurden Präalbumin, Albumin sowie die Globulinfractionen alpha 1, alpha 2, beta und gamma bestimmt und die Gesamtheit aller Proteine als Gesamtprotein- oder Totalprotein (TP) ermittelt. Die TP-Konzentration wurde mittels Biuret-Methode unter Verwendung eines Ortho Vitros 250 Analysegerätes (Ortho Clinical Diagnostics, Rochester, NY, USA) durchgeführt. Anhand der TP-Konzentration berechnete die Software des Gerätes die Konzentrationen der Globulinfractionen alpha 1, alpha 2, beta und gamma in der Einheit g/dl sowie deren prozentualen Anteil am TP in Prozent. Das Verhältnis von Albumin zu Globulin (A/G-Verhältnis) wurde aus der Summe von Präalbumin und Albumin, geteilt durch die Summe der Globuline ermittelt.

3.6 Statistische Methoden

3.6.1 Statistische Berechnung der Sensitivität und der Spezifität

Um diagnostische Verfahren zu beurteilen, können die Sensitivität und die Spezifität als Maßzahl der deskriptiven Statistik herangezogen werden. Die Sensitivität eines diagnostischen Testverfahrens gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit welcher an Aspergillose erkrankte (aspergillosepositive) Falken durch die Anwendung des Tests tatsächlich erkannt werden. Die Spezifität eines diagnostischen Testverfahrens gibt hingegen die Wahrscheinlichkeit an, mit der tatsächlich gesunde (aspergillosenegative) Falken im jeweiligen Testverfahren auch als gesund erkannt werden.

Für eine Testmethode zur *Intra-vitam*-Detektion der Aspergillose ist deshalb eine möglichst hohe Sensitivität erstrebenswert, damit möglichst viele aspergillosepositive Tiere auch mittels der jeweiligen Testmethode erkannt werden. Dies ist vor allem für den Einsatz des Testverfahrens als Screeningmethode bzw. als Suchtest wichtig, um möglichst wenige Aspergillosefälle zu übersehen und somit z. B. therapeutische Maßnahmen gezielt und frühzeitig initiieren zu können. Andererseits sollen gesunde Tiere durch ein Testverfahren nicht fälschlich als aspergillosepositiv bewertet werden, um z. B. zu verhindern, dass eine Therapie unnötig initiiert wird. Somit ist gleichsam eine hohe Spezifität der Testmethode erstrebenswert, um gesunde (aspergillosenegative) Tiere auch mit hoher Wahrscheinlichkeit als negativ

zu erkennen und die Diagnose „aspergillosepositiv“ mit entsprechend großer Sicherheit stellen zu können.

Die Berechnung der Sensitivitäten und Spezifitäten einer *Intra-vitam*-Detektion der Aspergillose für die einzelnen Diagnostikmethoden und Tests erfolgte nach dem System der Vierfeldertafel (Tabelle 6). Hierzu wurden auf Basis der verwendeten Tierzahlen unten stehende Formeln angewendet.

Tabelle 6: Vierfeldertafel zur Berechnung der Sensitivität und der Spezifität einer *Intra-vitam*-Detektion der Aspergillose für die jeweiligen Tests

	Gesunde (Aspergillosenegative)	Kranke (Aspergillosepositive)	
Test-negative	richtig negativ	falsch negativ	Summe Test-negativer
Test-positive	falsch positiv	richtig positiv	Summe Test-positiver
	Summe Gesunde (Aspergillosenegative)	Summe Kranke (Aspergillosepositive)	

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{Anzahl der richtig positiven}}{(\text{Anzahl der richtig positiven} + \text{Anzahl der falsch negativen})}$$

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{Anzahl der richtig negativen}}{(\text{Anzahl der richtig negativen} + \text{Anzahl der falsch positiven})}$$

Zur Berechnung wurde das Programm BiAS Version 9.14 für Windows genutzt, um neben der Spezifität und der Sensitivität auch das zugehörige 95 %-Konfidenzintervall zu ermitteln (SACHS, 2013).

Die auf diese Weise berechneten Sensitivitäten und Spezifitäten beziehen sich jeweils auf die *Intra-vitam*-Detektion einer nachfolgend pathologisch und histologisch bestätigten Aspergillose im Rahmen dieser Studie. Demgemäß wurden als Referenz für die Einteilung in Gesunde (aspergillosenegative) und Kranke (aspergillosepositive) die Ergebnisse der histopathologischen Untersuchung herangezogen. Dabei wurde für die *Intra-vitam*-Detektion der Aspergillose eine hohe Sensitivität als wichtig angesehen, um die Testmethode als mögliche Screeningmethode zu bewerten und aspergillosepositive Falken möglichst gut klinisch zu

erkennen. Eine hohe Spezifität eines Tests wäre jedoch ebenfalls wünschenswert, um den Ausschluss einer Aspergillose mittels der Testmethode möglichst sicher zu ermöglichen. Dies war jedoch zweitrangig, da die Histologie als Referenzmethode selbst nur eine eingeschränkte Aussage bezüglich der Freiheit von Aspergillose erlaubte. Eine Infektion könnte nämlich eventuell auch an nicht untersuchten Stellen stattgefunden haben, wodurch eine Aspergillose in diesem Fall übersehen würde. Im positiven Fall ist ein histologischer Nachweis der Infektion hingegen beweisend für eine Aspergillose.

Diese Berechnungen der Sensitivität und Spezifität wurden nur für standardmäßig anwendbare Testverfahren durchgeführt und nicht für hochvariable Parameter wie klinische Symptome. Für diese könnte rechnerisch natürlich auch Spezifitäten und Sensitivitäten berechnet werden, diese wären aber wenig aussagekräftig, da klinische Symptome in der Regel durch viele verschiedene Ursachen hervorgerufen werden können, die durch die Ergebnisse nicht erfasst werden könnten.

Zusammenfassend soll mittels der berechneten Spezifitäten und Sensitivitäten also die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens bzw. der Abwesenheit einer Aspergillose auf Grundlage der Testergebnisse beschrieben werden. Sie erlauben allerdings keine Bewertung der Qualität mit der ein Testverfahren einen diagnostischen Zielparameter detektiert. Diese würde beispielsweise durch den Vergleich zweier Testverfahren zur Detektion der gleichen Substanzen geschehen, wie die zur Evaluation eines neuen Testverfahrens anhand des Goldstandard-Verfahrens geschehen kann. Demnach kann beispielsweise von den berechneten Spezifitäten und Sensitivitäten des *Aspergillus*-Antikörper-ELISAs nicht auf die Qualität bzw. auf die Verlässlichkeit der Quantitätsangabe geschlossen werden, mit der dieses Testverfahren Antikörper gegen *Aspergillus* spp. erkennen kann. Diesbezüglich kann auch kein Vergleich zwischen den beiden Testverfahren zur Detektion von Anti-*Aspergillus*-Antikörpern auf Grundlage dieser Berechnungen durchgeführt und keine methodisch-diagnostische Qualität des Testverfahrens an sich abgeleitet werden.

3.6.2 Statistische Berechnung der Verfahren der Serumdiagnostik

Um die potenziellen Einflüsse einer Aspergillose auf die Werte von GM, Anti-*Aspergillus*-Antikörpern, APPs und Plasma-/Serumproteine darzustellen, wurden die Werte der Serumdiagnostik am Ende des Infektionsversuchs (p. i.-Werte) mittels

Multipler Regressionsanalyse unter Verwendung des Programms BMDP1 evaluiert (DIXON, 1993). Dabei wurden die Einflüsse der Infektionsdosis und die individuellen Einflüsse der Tiere, gemessen an den individuellen Ausgangswerten vor Infektion (b. i.-Werte), separat für die immaturren (Versuchsteil A) und die juvenilen (Versuchsteil B) Falken untersucht. Da in Vortests kein Einfluss der b. i.- auf die p. i.-Werte erkennbar war, wurde zusätzlich eine einfache Regressionsanalyse mittels des Programmes BMDP6D durchgeführt, um sich ausschließlich auf die Einflüsse der Infektionsdosis zu fokussieren.

Da es sich bei der Dosis um eine ordinal skalierte Variable handelt, wurde zusätzlich der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (r_s) mittels des Programmes BMDP3D berechnet (DIXON, 1993).

Um p. i.-Werte von aspergillosepositiven Falken, welche histologisch bestätigte Pilzgranulome während des Versuches entwickelten, und aspergillosenegativen Falken, welche keine Pilzgranulome entwickelten, zu vergleichen und um potenzielle Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen festzustellen, wurde zudem der Wilcoxon-Mann-Whitney Test angewendet.

3.6.3 Statistische Berechnung der minimalen Infektionsdosis

In beiden Versuchsteilen wurden zur statistischen Analyse die Softwarepakete BMDP (DIXON, 1993) und StatXact (CYTEL INC., 2010) genutzt. Um potenzielle Korrelationen der Infektionsdosis (ID) mit dem Klinischen Score (KS) bzw. dem Dyspnoe-Score (DS) aufzudecken, wurde im Programm BMDP6D die Fläche unter der Kurve (Area under the curve - AUC) beider Scores über die gesamte Versuchszeit gegen die Infektionsdosis mit bivariaten Scatter-Plots aufgetragen. Da beide Scores (KS und DS) ordinal skalierte Variablen darstellten, konnte der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (r_s) von beiden Scores und der ID mit dem Programm BMD3D berechnet werden. Zudem wurden zweidimensionale Häufigkeitstabellen der ID in Relation zu pathologischen Läsionen (kategorisiert mit Pathologischen Scores 2 und 3) mit dem Programm BMDP4F erstellt. Zusätzlich wurde der entsprechende r_s und die zugehörigen p-Werte für den Zusammenhang der ID mit den pathologischen Läsionen, den histologischen Befunden sowie den mykologischen Befunden bezogen auf einzelne Organe und den gesamten Tierkörper mit dem Programm StatXact 9 berechnet.

Die Berechnung der minimalen Infektionsdosis für *A. fumigatus*-Konidien erfolgte mittels des Programms BMDP5E (DIXON, 1993). Dabei wurde die Methodik der logistischen Regression angewandt, welche eine genauere Schätzung des Odds Ratio sowie eine Berechnung der Minimalen Infektionsdosis 10 % (MID₁₀), der Minimalen Infektionsdosis 50 % (MID₅₀), der Minimalen Infektionsdosis 90 % (MID₉₀) sowie der zugehörigen logarithmischen, asymptotischen Standardfehler (SE) ermöglichte. Die abhängige Variable bildete dabei das Auftreten einer histologisch bestätigten Aspergillose, während als Kovariable der Logarithmus der Infektionsdosis angesehen wurde.

Die MID₁₀, MID₅₀ und MID₉₀ der immaturen und der juvenilen Falken wurden anschließend unter Nutzung des asymptotischen t-Tests auf der Basis der im logistischen Modell geschätzten MIDs in Verbindung mit deren Standardfehler verglichen.

Um im Sinne einer Risikoberechnung einen Bezug zu einer für eine Infektion notwendigen Konidienkonzentration in der Umgebungsluft herzustellen, mussten die berechneten MIDs mit dem Atemzeitvolumen der Tiere in Relation gesetzt werden. Dieses wird für einen 1 kg-schweren Vogel in Ruhe mit circa 230 ml/min angegeben (SCHMIDT-NIELSEN, 1997), wobei der Vogel bei dieser Berechnung nicht genauer spezifiziert wurde. Andere Autoren geben an, dass Atemzeitvolumina bei Vögeln familien- und teils gattungsspezifisch stark variieren können, weshalb auf Studien bei identischen oder nah verwandten Spezies zurückgegriffen werden sollte (SCHEID UND PIIPER, 1987). Wenn solche spezifischen Angaben gänzlich fehlen, kann annäherungsweise eine allometrische Berechnung der Atemparameter bezogen auf das Körpergewicht der Tiere erfolgen (FRAPPELL et al., 2001). Diese ist jedoch nur eingeschränkt möglich, deckt familien- und gattungsspezifische Unterschiede nur teilweise ab und setzt eine konstante Außentemperatur für eine ordnungsgemäße Berechnung voraus. Genauer ist es demnach Werte für eine möglichst nah verwandte und ähnlich große Spezies zum Vergleich heranzuziehen, um die Variationen zwischen den verschiedenen Vogeltaxa zu berücksichtigen. Da spezifische Daten zu Atemminutenvolumina für Gerfalken fehlen, aber Daten von verwandten amerikanischen Präriefalken (*Falco mexicanus*) vorhanden waren, wurden diese zum Vergleich herangezogen (KAISER UND BUCHER, 1985). Diese werden je nach Außentemperatur (Temperaturbereich 0 - 42 °C) mit 108,1 - 677,2 ml/min für männliche Präriefalken (Gewicht: 444 - 532 g;

Atemfrequenz: 13,8 - 183,4/min) und mit 155,4 - 717,5 ml/min für weibliche Präriefalken (Gewicht: 712 - 800 g; Atemfrequenz: 13,6 - 137,3/min) angegeben (KAISER UND BUCHER, 1985). Da weibliche Präriefalken in Bezug auf ihr Körpergewicht und ihre Größe den verwendeten Ger-Hybridfalken am ähnlichsten sind wurden deren Atemzeitvolumina für die Berechnung angesetzt.

Um nun die Umgebungskonzentration mit der zugehörigen Expositionszeit zu ermitteln, ab der die empfindlichste Gruppe der Falken potenziell erkrankte (Maximaler Sicherheitsbereich), wurde die niedrigste MID der potenziell empfindlicheren, juvenilen Falken (MID_{10}) und das maximale Atemzeitvolumen von weiblichen Präriefalken ($AZM = 0,7175 \text{ l/min}$ bzw. $0,0007 \text{ m}^3/\text{min}$) zur Berechnung genutzt.

Die MID_{10} wurde hierzu in einem ersten Schritt durch das maximale Atemzeitvolumen (Atemstundenvolumen bzw. Atemtagesvolumen) dividiert, um einen Wert für die Umgebungskonzentration pro Zeiteinheit (Stunde bzw. Tag) zu erhalten. Dabei wurde die Expositionszeit von einer Stunde (Stundenexposition) verwendet, da eine Stunde eine akute, einmalige und kurze Belastung gut darstellt, wie diese z. B. während Stroh- bzw. Einstreuwechsel vorkommen kann (REDIG, 1980b, 2007). Zudem wurden 24 Stunden/ein Tag (Tagesexposition) als Zeiteinheit verwendet, da diese unter Feldbedingungen als realistische und nachvollziehbare Bezugsgröße für eine kurzzeitige, temporär-konstante Exposition (z. B. ein Tag mit Erntearbeiten) angesehen wird. Demnach wurde das maximale Atemvolumen pro Stunde (= $42,960 \text{ l/h}$ bzw. $0,0431 \text{ m}^3/\text{h}$) bzw. pro Tag (= $1,0332 \text{ l/d}$ bzw. $1,0332 \text{ m}^3/\text{d}$) in folgende Formel eingesetzt, um die Umgebungskonzentration pro Liter bzw. Kubikmeter Luft zu berechnen, die ein Falke über eine bzw. 24 Stunden inhalieren müsste, um die MID_{10} über die Umgebungsluft aufzunehmen.

$$\text{Umgebungskonzentration} = \frac{MID\ 10\ \% [KBE]}{\text{max. Atemzeitvolumen} \left[\frac{\text{Volumeneinheit}}{\text{Zeiteinheit}} \right]}$$

$$\triangleq \text{Umgebungskonzentration} = \frac{MID\ 10\ \% [KBE]}{\text{max. Atemzeitvolumen} [\text{Volumeneinheit}]} * [\text{Zeiteinheit}]$$

$$\triangleq \left[\frac{\text{Umgebungskonzentration}}{\text{Zeiteinheit}} \right] = \frac{MID\ 10\ \% [KBE]}{\text{max. Atemzeitvolumen} [\text{Volumeneinheit}]}$$

Um die Werte auf fliegende Falken in Volieren zu beziehen, musste im Tagesverlauf zeitweise eine Erhöhung des Atemminutenvolumens bedacht werden. In Ermangelung falkenspezifischer Studien musste auf die Werte für andere Vogelfamilien zurückgegriffen werden, die eine 2,5 - 20-fache Erhöhung des Atemminutenvolumens während des Fluges angeben (HART UND ROY, 1966, TORREBUENO, 1978). Für die 1 kg schweren Falken kann dabei eine flugbedingte, 12-fache Erhöhung des Atemminutenvolumens angenommen werden.

Die Flugzeit bei freilebenden Greifvögeln wurde in Modellen auf ca. 20 % des Tages, also 4,8 Stunden, geschätzt (KOPLIN et al., 1980), sie kann jedoch auch individuell, speziesspezifisch und tageszeitlich unterschiedlich sein (BUNN et al., 1995, JENKINS, 1995). Bei freilebenden Präriefalken und Wanderfalken wurden deutlich niedrigere Median- bzw. Mittelwerte für die Flugzeit mit 84 Minuten (HAAK, 1982) bzw. $97 \pm 64,6$ Minuten (CRAIG, 1997) pro Tag angegeben, während sich für Gerfalken in der Natur und bei in menschlicher Obhut gehaltenen Falken keine genauen Daten finden. Eine Annahme von zwei Stunden Flugzeit pro Tag wird daher als realistischer Ansatz angesehen. Sie deckt sich auch mit eigenen Beobachtungen von jungen Großfalken in Rundvolieren, die während Bestandsbesuchen in Falkenzuchtbetrieben gemacht wurden.

Demnach wurden zur Berücksichtigung der täglichen Flugaktivität die berechneten Umgebungskonzentrationen pro Stunde (Stundenexposition) über 22 Stunden zu einer über zwei Stunden 12-fach erhöhten Stundenexposition addiert und mittels folgender Formel berechnet:

(X = Umgebungskonzentration bei Flugaktivität pro Tag):

$$X = \frac{MID\ 10\ \% [KBE]}{\left(\frac{\text{max. Atemvolumen [Volumeneinheit]}}{\text{Stunde [h]}} * 22\ h \right) + \left(\frac{\text{max. Atemvolumen [Volumeneinheit]}}{\text{Stunde [h]}} * 2\ h * 12 \right)}$$

$$\triangleq X = \frac{MID\ 10\ \% [KBE]}{(\text{max. Atemvolumen [Volumeneinheit]} * 22h) + (\text{max. Atemvolumen [Volumeneinheit]} * 24h)}$$

Wenn diese auf eine anteilige Flugaktivität hin modifizierte Tagesexposition nachfolgend durch 1/24 dividiert wird, so ergibt sich eine Stundenexposition, bei welcher eine anteilige Steigerung durch Flugaktivität berücksichtigt wird. Beide letztgenannten Expositionswerte bieten somit für eine Risikoabschätzung in Falkenhaltungen die größtmögliche Sicherheit, da mit juvenilen Falken die empfindlichste Altersgruppe, mit der MID₁₀ die niedrigste Infektionsdosis und das höchste angegebene Atemzeitvolumen berücksichtigt wurde.

4 Ergebnisse

4.1 Umgebungsluftbeprobung

In insgesamt acht Messungen der Umgebungsluft im Versuchsteil A wurden durchschnittlich $117,14 \pm 65,84$ (Raum 1) bzw. $108,75 \pm 75,38$ (Raum 2) *A. fumigatus*-Konidien/m³ Raumluft detektiert. Im Versuchsteil B waren es bei acht Messungen durchschnittlich $91,43 \pm 32,70$ *A. fumigatus*-Konidien/m³ Raumluft (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Ergebnisse von 8 Umgebungsluftproben während der 28-tägigen Versuchsphase

Messzeitpunkt (d. p. i.)	Raum 1 (Versuch A) KbE/100 l Luftvolumen	Raum 2 (Versuch A) KbE/100 l Luftvolumen	Raum (Versuch B) KbE/100 l Luftvolumen
0	4	4	5
4	21	18	13
8	8	22	8
12	14	22	11
16	21	5	14
20	5	5	6
24	9	11	7
	$\bar{x} = 11,714 \pm 6,584$ (= 117,14 KbE/m ³)	$= 10,875 \pm 7,538$ (=108,75 KbE/m ³)	$= 9,143 \pm 3,270$ (= 91,43 KbE/m ³)

Legende: KbE (Koloniebildende Einheiten von *Aspergillus fumigatus*, entsprechen *A. fumigatus*-Konidien); d. p. i. (Tage nach der Inokulation)

4.2 Untersuchungen vor Beginn der Versuche

4.2.1 Klinische Allgemeinuntersuchung

Keines der Versuchstiere zeigte im Rahmen der klinischen Allgemeinuntersuchung vor Beginn der Versuche Auffälligkeiten oder Krankheitssymptome, vor allem keine aspergilloseassoziierten Symptome. Im Stresstest lag die Atemfrequenz bei allen Tieren zu jedem Zeitpunkt unter 280/min, der Atemtyp war jeweils physiologisch und die Erholungszeit betrug nach Belastung jeweils unter 3 Minuten. Die Körpergewichte lagen zwischen 836 g und 1.003 g.

4.2.2 Hämagglutinationstest und hämatologische Diagnostik

Keiner der immaturren Falken aus Versuchsteil A wies vor dem Versuch ein positives Testergebnis im Hämagglutinationstest für *Aspergillus* spp.-Antikörper auf. Bei

17/18 Tieren wurden Antikörper-Titer mit 1:80 bzw. 1:160 und bei 1/18 Falken mit 1:40 detektiert. Damit wurden sie gemäß Herstellerangaben als unklar/fraglich bzw. als negativ ausgewiesen. Eine Übersicht über die Ergebnisse des Hämagglutinationstests befindet sich in Tabelle 18.

In der hämatologischen Voruntersuchung im Versuchsteil B waren bei 6/21 Falken (B6.1, B5.1, B5.2, B4.1, B2.3, B1.3) geringgradig erhöhte Leukozytenzahlen (von 14.875/ μ l bis 18.375/ μ l) im Vergleich zu publizierten Referenzwerten (oberer Referenzwert 14.580/ μ l) (WERNERY et al., 2004a) feststellbar. Zudem gab es bei 8/21 Falken (B6.3, B5.2, B5.3, B4.3, B3.1, B3.3, B2.2, B1.3) eine geringgradige Verschiebung des Anteils der heterophilen Granulozyten (4x Anteil um 2 %, 3 %, 6 % bzw. 15 % erniedrigt, 2x Anteil um 2 % bzw. 3 % erhöht) und der Lymphozyten (6x Anteil um 2 %, 3 %, 4 %, 7 % bzw. 17 % erhöht). Bei allen anderen Falken waren die hämatologischen Untersuchungen unauffällig. Eine Übersicht über die hämatologischen Untersuchungen befindet sich in Tabelle 12.

4.2.3 Bildgebende Diagnostik

Keines der Tiere wies in der röntgenologischen Untersuchung aspergillose-typische oder anderweitig pathologische Befunde auf.

In der endoskopischen Untersuchung wurden bei keinem der Falken Trübungen, Auflagerungen oder Gefäßeinsprossungen auf bzw. in den Luftsackmembranen festgestellt. Zudem wies keiner der Falken sonstige Anzeichen einer Erkrankung oder von pathologischen Veränderungen auf. Somit konnten alle Tiere in den Versuch inkludiert werden.

4.2.4 Parasitologische und mikrobiologische Kotuntersuchung

Es wurden keine endoparasitären Stadien im Kot der Tiere festgestellt und keine Salmonellen angezüchtet.

4.3 Inokulum und *Galleria mellonella* Virulenztest

Das Inokulum erwies sich im *In-vitro*-Virulenztest mit *Galleria mellonella* als virulent, da die durchschnittliche Überlebensrate nach 48 Stunden mit 5,6 % unter der 10 %-

Grenze lag (COTTER et al., 2000). Insgesamt starben alle sechs Larven der drei Versuchsgruppen innerhalb von 72 Stunden nach Injektion (siehe Tabelle 8). Parallel verstarben keine Larven aus den beiden Kontrollgruppen während einer siebentägigen Inkubation.

Tabelle 8: Überlebensraten während des *In-vitro*-Virulenztests mit *Galleria mellonella*-Larven

Zeitpunkt	VG 1	VG 2	VG 3	̄	KG 1	KG 2
24 h. p. i.	2/6 (33,3 %)	1/6 (16,7 %)	2/6 (33,3 %)	5/18 (27,8 %)	6/6 (100 %)	6/6 (100 %)
48 h. p. i.	1/6 (16,7 %)	0/6 (0 %)	0/6 (0 %)	1/18 (5,6 %)	6/6 (100 %)	6/6 (100 %)
72 h. p. i.	0/6 (0 %)	0/6 (0 %)	0/6 (0 %)	0/18 (0 %)	6/6 (100 %)	6/6 (100 %)

Legende: Überlebensrate (Anzahl der lebenden Larven durch Larvengesamtanzahl); h. p. i. (Stunden nach Injektion); VG (Versuchsgruppe); ̄ (Durchschnitt über die 3 Versuchsgruppen); KG 1 (Kontrollgruppe 1: Injektion mit PBS); KG 2 (Kontrollgruppe 2: keine Injektion).

Die Konzentration der viablen, koloniebildenden Einheiten (KbE) von *Aspergillus fumigatus* pro 0,5 ml Lösung lag im Versuchsteil A bei $2,25 \times 10^3$, $1,89 \times 10^5$ und $2,5 \times 10^7$ KbE/0,5 ml und im Versuchsteil B bei $1,50 \times 10^2$, $0,80 \times 10^3$, $0,66 \times 10^4$, $0,88 \times 10^5$, $0,78 \times 10^6$ und $1,20 \times 10^7$ KbE/0,5 ml.

4.4 Untersuchungen der Falken nach Inokulation von *Aspergillus fumigatus*-Konidien

4.4.1 Klinische Verlaufsuntersuchung

4.4.1.1 Versuchsteil A – Immature Falken

Ausschließlich bei den Individuen der Gruppen A1 (10^7 *A. fumigatus*-Konidien) und A2 (10^5 *A. fumigatus*-Konidien) wurden klinische Symptome wie Inappetenz, Vomitus und eine Grünverfärbung des Urinanteils der Exkremente beobachtet.

Deutliche Dyspnoeanzeichen wie eine Atmung mit geöffnetem Schnabel (Schnabelatmung), Stridores oder deutlich sichtbare, atemsynchrone Bewegungen von Bauchdecke (Bauchatmung), Flügeln und/oder Schwanz fehlten aber. Die

klinischen Symptome der immaturren Tiere während des Versuchs werden in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Übersicht über die klinischen Symptome der Falken in Versuchsteil A während der 28-tägigen Versuchsperiode. Die Zahlen in der Tabelle geben die jeweilige Anzahl der Tiere an.

Symptome	Gruppe A1 (n = 5)	Gruppe A2 (n = 5)	Gruppe A3 (n = 5)	Gruppe A4 (n = 3)
Inappetenz	4	1	0	0
Erbrechen	4	1	0	0
Urinverfärbung	3	1	0	0
Dyspnoe	0	0	0	0
Mortalität	0	0	0	0

Legende: Gruppe A1 (inokuliert mit 10^7 Konidien), Gruppe A2 (inokuliert mit 10^5 Konidien), Gruppe A3 (inokuliert mit 10^3 Konidien), Gruppe A4 (Kontrollgruppe); n (Anzahl der Tiere).

Genauer betrachtet zeigten 4/5 Tieren der Gruppe A1 (A1.1, A1.2, A1.3, A1.5) bereits ab dem zweiten Tag nach Inokulation (d. p. i.) über zwei bis drei Tage Vomitus und Inappetenz und erbrachen sich zeitweise auch noch später (A1.1: 13. - 28. d. p. i.; A1.3: 20. - 28. d. p. i.; A1.5: 10. - 14. d. p. i.). Zusätzlich wiesen 3/5 Falken (A1.1, A1.3, A1.5) eine Grünverfärbung des Urinanteils der Exkreme auf.

Aus der Gruppe A2 wurde bei 1/5 Tieren (A2.3) am 17. und 18. d. p. i. Vomitus und zwischen dem 18. und 22. d. p. i. eine reduzierte Futteraufnahme beobachtet. Eine Grünverfärbung des Urins wurde bei demselben Tier zwischen Tag 19 und 21 p. i. festgestellt.

Das Verhalten variierte bei den Falken zwischen aufmerksam und nervös. Die Körperhaltung variierte zwischen aufrecht stehend mit angelegten Flügeln und einer leicht gebeugten Haltung mit leicht hängenden Flügelspitzen. Das Gefieder war nicht oder nur geringgradig aufgeplustert und die Atmung war schwach sichtbar (Score 0 - 0,2) oder zeitweise geringgradig erschwert (Score 0,4) mit einem leichten atemsynchronen Schwanz- und/oder Flügelwippen. Demnach wurden diese klinischen Parameter als "unauffällig" dokumentiert und ergaben keine Indikation für eine Euthanasie. Es verstarb keines der Tiere während des Versuches.

Die Entwicklung der Körpergewichte wird in Abbildung 11 dargestellt. Insgesamt haben 4/5 Individuen aus Gruppe A1, 1/5 Individuen aus Gruppe A2, 2/5 Individuen aus Gruppe A3 und 1/3 Individuen aus Gruppe A4 abgenommen, wobei die

prozentuale Abnahme lediglich in den Gruppen A1 und A2 den Wert von 3 % überschritt und bis zu einem Wert von 17 % reichte.

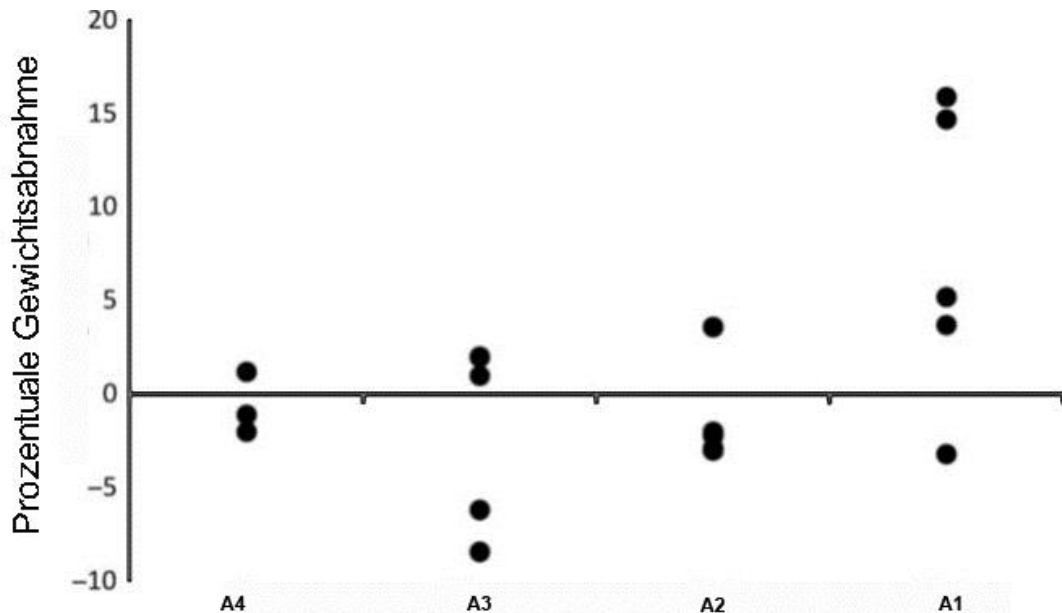


Abbildung 11: Gewichtsabnahme der immaturren Falken in Prozent, als Vergleich des Körpergewichtes zu Beginn und zum Ende des Tierversuches. Positive Werte entsprechen einer Gewichtsabnahme, negative Werte einer Gewichtszunahme. Gruppe A1 (inokuliert mit 10^7 *A. fumigatus*-Konidien), Gruppe A2 (inokuliert mit 10^5 *A. fumigatus*-Konidien), Gruppe A3 (inokuliert mit 10^3 *A. fumigatus*-Konidien), Gruppe A4 (Kontrollgruppe)

4.4.1.2 Versuchsteil B – Juvenile Falken

Im Versuchsteil B wurden zur exakteren Dokumentation und Beschreibung sowie zur Ermöglichung einer statistischen Auswertung über den gesamten Versuchsvverlauf ein Dyspnoe-Score (DS) sowie ein Klinischer Score (KS) ermittelt. So zeigten 20/21 Falken zeitweise zumindest geringgradige Dyspnoeanzeichen ($DS \geq 0,4$). Eine mittelgradige Dyspnoe ($DS \geq 0,6$) wurde bei 14/21 Falken festgestellt. Bei 11 dieser 14 Falken lag der DS sogar über $\geq 0,7$, wobei dies alle Falken der Gruppen B1 (10^7 *A. fumigatus*-Konidien, 3/3 Falken) und B2 (10^6 *A. fumigatus*-Konidien, 3/3 Falken), 1/3 Falken der Gruppe B3 (10^5 *A. fumigatus*-Konidien), 2/3 Falken der Gruppe B4 (10^4 *A. fumigatus*-Konidien) und lediglich je ein Einzeltier (B6.3) der niedrigsten Inokulations- (10^2 *A. fumigatus*-Konidien) bzw. der Kontrollgruppen B7 (B7.5) mit einschloss. Drei juvenile Falken (B1.1, B1.2, B2.2) zeigten sogar zeitweise eine hochgradige Dyspnoe ($DS \geq 0,8$). Diese äußerte sich in einer Atmung mit geöffnetem Schnabel (B1.2, B2.2), atemsynchroner Bewegung der Flügel (B1.1, B1.2), Tachypnoe (B1.1, B2.2) sowie

Stridores (B2.2). Die zugehörigen DS werden in Tabelle 10 aufgeführt. Statistisch korrelierte die Fläche unter der Kurve (Area under the curve - AUC) des DS über die gesamte Zeit signifikant mit der Infektionsdosis ($r = 0,514$; $p = 0,017$). Der zugehörige Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman lag bei $r_s = 0,52$ ($p = 0,017$).

Im Einzelnen gehörten gesträubtes Gefieder, Dyspnoeanzeichen, grünlich verfärbte Urinanteile der Exkreme und Diarrhoe zu den klinischen Symptomen, die in allen Gruppen beobachtet werden konnten. Inappetenz und Gewichtsverlust traten in den drei Infektionsgruppen B1 - B3 mit der höheren Infektionsdosen (10^5 - 10^7 *A. fumigatus*-Konidien) auf, während Erbrechen und Schläfrigkeit nur in der Gruppe B1 nach Inokulation von 10^7 *A. fumigatus*-Konidien beobachtet wurde (siehe Abbildung 12).

Die Atmung und weitere klinische Parameter der juvenilen Falken wurden in Klinischen Scores (KS) zusammengefasst, welche in Tabelle 11 dargestellt sind. Alle inokulierten Falken erreichten während des Versuches wenigstens KS 1 und zumindest zeitweilig, teils nur eintägig (B5.1, B5.3, B6.1), auch einen KS 2. Dabei erreichten auch alle Kontrolltiere einen KS 2 an 3 (B7.2), 9 (B7.4) bzw. 10 Tagen (B7.5), aber keines davon einen KS 3. Lediglich Falken (B3.1, B2.1, B1.1, B1.2, B1.3) der mittleren und hohen Infektionsgruppen B1 - B3 (10^5 - 10^7 *A. fumigatus*-Konidien) wiesen einen KS 3, teils über 5 - 10 Tage auf. Zwei Tiere (B1.1, B1.2) aus der Gruppe B1 und ein Tier (B2.2) aus der Gruppe B2 mussten vorzeitig aus dem Versuch entnommen und euthanasiert werden (KS 4). Statistisch korrelierte die AUC des KS über die gesamte Zeit signifikant mit der Infektionsdosis ($r = 0,662$; $p = 0,01$). Der zugehörige Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman lag bei $r_s = 0,67$ ($p < 0,001$).



Abbildung 12: Klinische Symptome von juvenilen Falken nach experimenteller Inokulation mit *A. fumigatus*-Konidien: A) Schläfriger Falke; B) Falke mit hängenden Flügelspitzen; C) Falke mit Dyspnoe in Form einer Atmung mit geöffnetem Schnabel; D) Falke nach Vomitus - Schnabel und Gefieder sind noch mit Erbrochenem verschmiert; E) Mintgrün gefärbter Urinanteil der Exkremente; F) Falke mit gestäubtem Gefieder.

Das Körpergewicht schwankte individuell während des Versuches, wobei 19/21 Tiere über den Zeitraum von 28 Tagen an Gewicht zunahmen. Lediglich zwei Tiere (B1.1, B3.1) nahmen zwischen drei und neun Prozent an Gewicht ab. Die Körpergewichte zum Versuchsende lagen zwischen 871 g und 1.048 g. Die Gewichtsentwicklung der Falken wird in Abbildung 13 dargestellt.

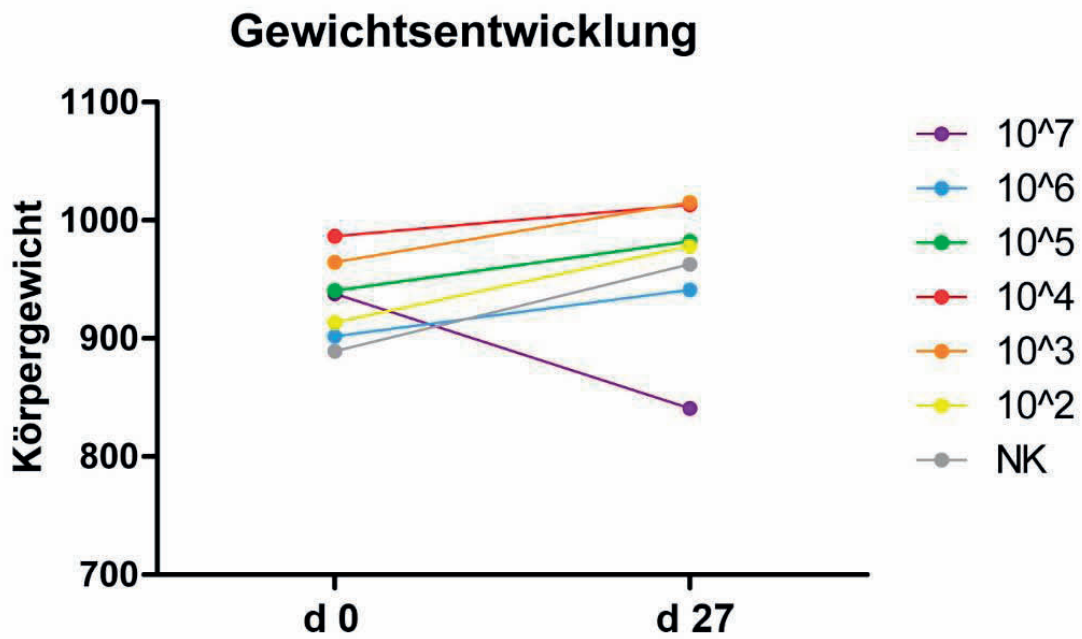


Abbildung 13: Gegenüberstellung der durchschnittlichen Körpergewichte (in g) je Inokulations- bzw. Kontrollgruppe von juvenilen Falken vor (d 0) und 28 Tage (d 27) nach experimenteller Inokulation

Tabelle 10: Übersicht über die Dyspnoe-Scores (0 - 1) juveniler Falken während der 28-tägigen Versuchsphase

Nr	ID	d0	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11	d12	d13	d14	d15	d16	d17	d18	d19	d20	d21	d22	d23	d24	d25	d26	d27	
B7.2		0	0	0	0,20	0,20	0,20	0,20	0,30	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,30	0,30	0,20	0,30	0,30	0,30	0,50	0,30	0,30	0,40	0,50	0,45	0,40	0,35	0,35	
B7.4	NK	0	0,30	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,20	0,30	0,30	0,10	0,35	0,50	0,50	0,70	0,60	0,70	0,60	0,60	0,60	0,65	0,65	0,65	0,60	
B7.5		0	0	0	0,10	0,10	0,20	0,30	0,30	0,20	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,40	0,45	0,45	0,55	0,50	0,70	0,60	0,60	0,60	0,60	0,50	0,55	0,70	
B1.1		0	0,10	0,20	0,20	0,50	0,40	0,40	0,40	0,40	0,60	0,60	0,50	0,50	0,60	0,40	0,40	0,60	0,75	0,60	0,70	0,60	0,70	0,70	1,00					
B1.2	10 ⁷	0	0,20	0,10	0,10	0,10	0,10	0,50	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,10	0,50	0,10	0,50	0,50	0,60	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70	0,80	0,80	0,90	
B1.3		0	0	0	0,20	0,20	0,20	0,20	0,30	0,20	0,10	0,10	0,20	0,30	0,30	0,30	0,30	0,60	0,60	0,60	0,50	0,50	0,60	0,50	0,70	0,60	0,70	0,60	0,65	
B2.1		0	0,10	0,30	0,40	0,30	0,40	0,20	0,50	0,50	0,50	0,30	0,40	0,50	0,40	0,50	0,50	0,50	0,50	0,60	0,50	0,70	0,50	0,70	0,65	0,70	0,60	0,65	0,60	
B2.2	10 ⁶	0	0	0	0,20	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50	0,40	0,70	0,70	0,70	1,00											
B2.3		0	0,10	0,10	0,15	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,30	0,30	0,40	0,30	0,25	0,40	0,50	0,30	0,50	0,50	0,50	0,35	0,40	0,30	0,70	0,60	0,55	0,45	0,55	
B3.1		0	0	0	0,20	0,20	0,20	0,20	0,30	0,20	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,20	0,60	0,30	0,60	0,40	0,60	0,50	0,60	0,60	0,55	0,55	0,55	0,50	0,60	
B3.2	10 ⁵	0	0	0	0,10	0,10	0,10	0,20	0,10	0,30	0,30	0,30	0,50	0,50	0,40	0,40	0,50	0,50	0,50	0,50	0,35	0,45	0,45	0,50	0,50	0,45	0,60	0,60	0,60	
B3.3		0	0,20	0	0	0,10	0,10	0,10	0,10	0,20	0,20	0,20	0,20	0,10	0,30	0,20	0,40	0,30	0,30	0,30	0,45	0,40	0,40	0,40	0,35	0,40	0,50	0,45	0,70	
B4.1		0	0	0	0,10	0,30	0,20	0,30	0,20	0,10	0,30	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,30	0,25	0,20	0,20	0,30	0,25	0,25	0,30	0,30	0,35	
B4.2	10 ⁴	0	0	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,20	0,10	0,40	0,40	0,40	0,40	0,45	0,40	0,50	0,50	0,55	0,60	0,65	0,65	0,65	0,70	0,70	0,70	
B4.3		0	0	0	0	0,10	0,10	0,40	0,50	0,20	0,50	0,40	0,40	0,40	0,50	0,70	0,50	0,40	0,45	0,40	0,30	0,40	0,45	0,60	0,45	0,45	0,35	0,30	0,30	
B5.1		0	0	0	0,10	0,10	0,20	0,10	0,20	0,10	0,10	0,10	0,10	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,30	0,40	0,50	0,50	0,40	0,40	0,40	0,40	0,45	0,50	
B5.2	10 ³	0	0	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,40	0,30	0,10	0,20	0,20	0,30	0,40	0,50	0,50	0,50	0,50	0,40	0,45	0,45	0,30	0,30	0,45	0,30	0,30	0,30	
B5.3		0	0	0	0	0	0	0,20	0,20	0,10	0,10	0,10	0,30	0,20	0,40	0,40	0,30	0,30	0,50	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,35	0,30	0,40	0,55	
B6.1		0	0	0	0	0	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,30	0,40	0,30	0,30	0,30	0,30	0,55	0,30	0,40	0,35	
B6.2	10 ²	0	0	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,20	0,10	0,30	0,30	0,30	0,20	0,30	0,20	0,40	0,40	0,45	0,30	0,30	0,40	0,30	0,35	0,35	0,45	0,30	0,50	0,45	
B6.3		0	0	0	0,10	0,10	0,10	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50	0,50	0,40	0,40	0,60	0,60	0,45	0,55	0,60	0,50	0,60	0,65	0,60	0,55	0,65	0,50	0,70	0,60	

Legende: Dyspnoe-Scores (= Mittelwerte der Scores für abdominale Atmung und für Schwanzwippen): 0 - 0,35 (Normopnoe), 0,4 - 0,55 (geringgradige/leichte Dyspnoe), 0,6 - 0,75 (mittelgradige/moderate Dyspnoe), 0,8 - 0,95 (hochgradige/verstärkte Dyspnoe) und 1 (höchstgradige Dyspnoe); Nr (Tiernummer); ID (Infektions-/Inokulationsdosis); NK (Negativkontrolle); d (Tag).

Tabelle 11: Übersicht über die Klinischen Scores (0 - 4) juveniler Falken während der 28-tägigen Versuchsphase

Nr	ID	d0	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10	d11	d12	d13	d14	d15	d16	d17	d18	d19	d20	d21	d22	d23	d24	d25	d26	d27		
B7.2		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	2	0	1	1	1	1	2	2	1		
B7.4	NK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
B7.5		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	
B1.1		0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	1	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	4						
B1.2	10 ⁷	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	2	2	3	2	3	2	3	3	3	3	3	4	
B1.3		0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	
B2.1		0	1	0	0	1	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	2	3	3	3	3	3	
B2.2	10 ⁶	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	2	2	4												
B2.3		0	0	1	0	0	0	0	2	0	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2	2	2	1	
B3.1		0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	2	1	0	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	
B3.2	10 ⁵	0	0	0	0	0	1	0	1	2	0	1	1	2	1	1	2	2	1	2	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	
B3.3		0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	2	1	2	1	1	2	1	2	2	1	2	2	2	2	
B4.1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	2	2	1	1	0	1	0	0	0	
B4.2	10 ⁴	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
B4.3		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	2	1	2	2	2	1	2	2
B5.1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B5.2	10 ³	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	2	2
B5.3		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1
B6.1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B6.2	10 ²	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	2	0	1	1	1	1	1	1	1	1
B6.3		0	0	0	0	0	0	1	0	2	1	1	2	1	1	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2

Legende: Klinische Scores: 0 (Dyspnoe-Score < 0,4, Haltung 1, Verhalten 1 - 2, Fressverhalten 1, Gefieder 1), 1 (Dyspnoe-Score 0,4 - 0,55 und/oder einer der folgenden Punkte: Haltung 2, Verhalten 2, Fressverhalten 2, Gefieder 2 - 3), 2 (Dyspnoe-Score 0,6 - 0,75 und/oder zwei der folgenden Punkte: Haltung 2, Verhalten 3 - 4, Fressverhalten 2, Gefieder 2 - 3), 3 (Dyspnoe-Score 0,8 - 0,95 und/oder einer der folgenden Punkte: Haltung 3, Verhalten 5, Fressverhalten 3 - 5, Gefieder 4), 4 (Dyspnoe-Score 1 und/oder Haltung 4 und/oder Verhalten 4 und/oder mehrtägliches Verhalten 5 und/oder Futteraufnahme mehrtäglich 4 - 5 → Euthanasieindikation); Nr (Tiernummer); ID (Infektions-/Inokulationsdosis); NK (Negativkontrolle); d (Tag).

4.4.2 Hämatologische Befunde

Eine hämatologische Untersuchung erfolgte lediglich im Versuchsteil B, da auf Grund der Durchführung eines humanmedizinischen Hämagglutinationstests (siehe 3.2.2) im Versuchsteil A nicht mehr genügend Blutvolumen hierfür zur Verfügung stand. Dieser Test wurde jedoch nachfolgend als nicht aussagekräftig eingestuft, weshalb im Versuchsteil B auf diesen verzichtet und stattdessen eine hämatologische Untersuchung der Falkenblutproben durchgeführt wurde.

Am Versuchsende überschritten 11/21 Falken (B7.4, B 7.5, B6.3, B5.2, B3.1, B3.2, B3.3, B2.1, B2.2, B1.1, B1.3), inklusive zweier Kontrolltiere (B7.4, B7.5), die Referenzwerte der Leukozytenanzahl (Leukozytose) für Gerfalkenhybriden (WERNERY et al., 2004a). Diese Leukozytose trat bei 5 dieser 11 Tiere parallel zu einem erhöhten Anteil heterophiler Granulozyten (Heterophilie) auf, während bei 4 dieser 11 Tiere ein erhöhter Lymphozytenanteil (Lymphozytose) feststellbar war. Ein gewisser Anteil der Lymphozyten (2 - 17 %) wies bei 19/21 Falken Anzeichen einer toxischen Aktivierung auf, welche durch eine Dunkelfärbung des Zytoplasmas sowie eine Größenzunahme der Zelle gekennzeichnet waren (PENDL, 2008a, b). Bei den Tieren mit Lymphozytose lag parallel ein erniedrigter Anteil an heterophilen Granulozyten (Heteropenie) und bei den Tieren mit Heterophilie lag parallel ein erniedrigter Lymphozytenanteil (Lymphopenie) vor. Der Anteil an Monozyten lag bei keinem der Falken oberhalb des Referenzbereiches für Monozyten (WERNERY et al., 2004a). Ein statistischer Zusammenhang zwischen hämatologischen Befunden (Leukozytose, Heterophilie oder Lymphozytose) und der Infektionsdosis wurde nicht festgestellt.

Unter den 11 Tieren mit Leukozytose waren acht Tiere, bei denen Granulome in der pathologisch-anatomischen Untersuchung festgestellt wurden. Lediglich ein Tier mit Granulomen (B1.2) zeigte keine Leukozytose.

Bezogen auf den *Intra-vitam*-Nachweis einer nachträglich histologisch bestätigten Aspergillose betrug die rechnerische Sensitivität einer Leukozytose 88,9 % (51,8 - 99,7), die einer Leukopenie 55,6 % (21,2 - 86,3), die einer Heterophilie 44,4 % (13,7 - 78,8) und die einer Lymphozytose 0 % (0 - 28,3). Die Spezifitäten bezüglich der *Intra-vitam*-Diagnose einer Aspergillose betrugen 75 % (42,8 - 94,5) für eine Leukozytose, 91,7 % (61,5 - 99,8) für eine Heterophilie und eine Leukopenie

und 66,7 % (34,9 - 90,1) für eine Lymphozytose. Die hämatologischen Parameter der juvenilen Falken zu Beginn und zum Ende des Versuchsteils B sowie die berechneten Spezifitäten und Sensitivitäten für die hämatologischen Befunde werden in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Hämatologische Untersuchung von Blutproben juveniler Falken vor und 28 Tage nach Inokulation mit *A. fumigatus*-Konidien

Nr	ID	Hist	d 0				d 28			
			EWBC	Het	Lymp	Mono	EWBC	Het	Lymp	Mono
Referenz ¹			4.280-14.580	45,7-75,1	20,1-48,6	1,0-8,4	4.280-14.580	45,7-75,1	20,1-48,6	1,0-8,4
B7.2	NK	-	10.500	63	37 (*10)	0	13.125	48	48 (*12)	4
B7.4		-	7.000	52	47 (*9)	3	24.500	79	20 (*5)	1
B7.5		-	5.250	63	35 (*2)	2	17.500	45	54 (*3)	1
B1.1 (§)	10 ⁷	+	12.250	57	42 (*3)	1	47.250	84	13 (*8)	3
B1.2		+	4.375	67	32 (*6)	1	8.750	66	31 (*17)	3
B1.3		+	18.375	77	23 (*2)	0	85.750	66	27 (*12)	7
B2.1	10 ⁶	+	8.750	53	43 (*6)	4	14.875	69	29 (*5)	2
B2.2 (#)		+	7.000	44	56 (*4)	0	52.500	86	13 (*4)	1
B2.3		-	15.750	64	35 (*8)	0	8.700	59	39 (*3)	2
B3.1	10 ⁵	+	6.125	43	53 (*4)	4	39.375	92	7 (*3)	1
B3.2		-	13.125	57	41 (*25)	2	14.875	68	26 (*8)	6
B3.3		+	7.000	78	22 (*7)	0	15.750	49	47 (*0)	4
B4.1	10 ⁴	-	14.875	63	34 (*6)	3	8.750	53	45 (*2)	2
B4.2		+	5.250	53	44 (*9)	3	42.875	76	17 (*3)	7
B4.3		-	7.000	46	51 (*13)	3	10.500	36	58 (*10)	6
B5.1	10 ³	-	14.875	62	35 (*8)	3	11.375	53	43 (*12)	4
B5.2		-	16.625	31	66 (*3)	3	14.000	73	26 (*7)	1
B5.3		-	7.000	46	52 (*11)	2	8.750	54	45 (*0)	1
B6.1	10 ²	-	16.625	64	33 (*6)	3	10.500	40	57 (*6)	3
B6.2		-	7.000	66	33 (*7)	1	10.500	36	58 (*10)	6
B6.3		+	14.000	40	56 (*18)	4	91.000	74	18 (*13)	8
			Sensitivität				Spezifität			
Leukozytose			88,89 % (51,75 - 99,72)				75,00 % (42,81 - 94,51)			
Heterophilie			44,44 % (13,70 - 78,80)				91,67 % (61,52 - 99,79)			
Lymphopenie			55,56 % (21,20 - 86,30)				91,67 % (61,52 - 99,79)			
Lymphozytose			0 % (0,0 - 28,31)				66,67 % (34,89 - 90,08)			

Legende: Nr (Tiernummer); ID (Infektions-/Inokulationsdosis von *A. fumigatus*-Konidien); NK (Negativkontrolle); d (Tag); Hist (Histologische Bestätigung der Aspergillose, z. B. Granulomnachweis); EWBC (Estimated White Blood cell Count / geschätzte Leukozytenzahl pro µl Blut); Het (Anteil der Heterophilen in %); Lymp (Anteil der Lymphozyten in %); Mono (Anteil der Monozyten in %); * (Anteil der toxisch veränderten Zellen); # (der Postinokulationswert wurde an d 16 bestimmt); § (der Postinokulationswert wurde an d 22 bestimmt); fett-gedruckte Werte überschreiten, kursiv gedruckte Werte unterschreiten die Referenzwerte.

¹ Quelle der Referenzwerte: WERNERY et al. 2004a

4.4.3 Pathologisch-anatomische Befunde

4.4.3.1 Versuchsteil A – Immature Falken

Bei 4/5 Falken (A1.1, A1.3, A1.4, A1.5) der Gruppe A1 (10^7 *A. fumigatus*-Konidien) wurden Granulome in den Luftsäcken und bei zwei von diesen (A1.3, A1.5) zusätzlich in den Lungen festgestellt, wobei die Läsionen nur bei 3/5 Tieren (A1.1, A1.3, A1.5) im Respirationstrakt beider Körperseiten zu finden waren (siehe Abbildung 14).

Die Luftsackläsionen variierten hierbei von fibrinösen PS 2-Läsionen (A1.3), über einzelne, granulomatöse Herde (A1.4), zu multifokalen, 2 - 6 mm großen, granulomatösen PS 3-Läsionen (A1.1, A1.5). Die Lungen waren dabei teils granulomatös durchsetzt (A1.3), teils verhärtet, atelektatisch und wiesen Verklebungen zum angrenzenden Luftsack auf (A1.5). Zudem fiel eine aufgehellte und mittel- bis hochgradig vergrößerte Milz bei zwei Tieren (A 1.4, A1.3) auf.

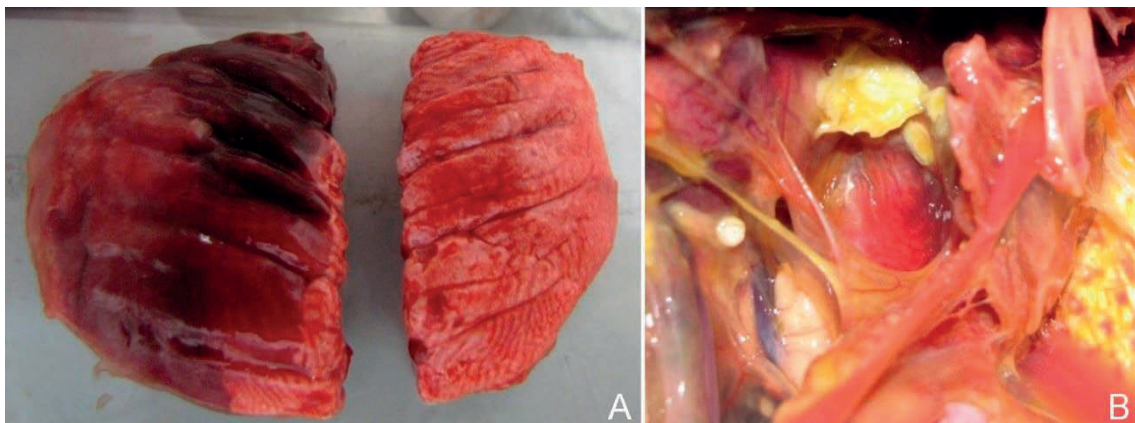


Abbildung 14: Pathologisch-anatomische Befunde eines immaturren Falken (A1.3) nach experimenteller Inokulation mit *A. fumigatus*-Konidien. A) Hochgradig entzündete und gestaute Lunge; B) Verkäsende Nekrose im kaudalen Thorakalluftsack mit multifokalen, knotigen Auflagerungen auf den Luftsackwänden und den angrenzenden Organen.

Ein Falke in Gruppe A2 (10^5 *A. fumigatus*-Konidien) (A2.3) hatte ein einzelnes Granulom im linken Abdominalluftsack. In anderen Organen und Organsystemen fanden sich keine pathologischen Läsionen.

Bei allen anderen Falken der Gruppen A1 und A2 sowie allen Falken der Gruppe A3 (10^3 *A. fumigatus*-Konidien) und der Kontrollgruppe A4 wurden keinerlei pathologische Veränderungen festgestellt, sodass sich auch keine Hinweise auf eine Aspergillose fanden.

Die pathologisch-anatomischen Befunde der immaturren Falken wurden in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Übersicht über die pathologischen Befunde der 18 immaturren Falken in Versuchsteil A nach der 28-tägigen Versuchsperiode

Nr	ID	Tr	Sy	Llu	Rlu	KrLTI	KrRTI	KaLTI	KaRTI	LAI	RAI	Per	Le	Mi	GIT	Ni	Na
A4.1	NK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A4.2		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A4.3		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A1.1	10 ⁶	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0	1	0	0	0
A1.2		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A1.3		0	0	3	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0
A1.4		0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	2	0	0	0
A1.5		0	0	2	3	3	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0	0
A2.1	10 ⁴	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A2.2		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A2.3		0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
A2.4		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A2.5		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A3.1	10 ³	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A3.2		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A3.3		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A3.4		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A3.5		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Legende: Pathologische Scores: 0 (ohne besonderen Befund), 1 (milde Läsionen, nicht aspergillosetypisch), 2 (gering- bis mittelgradige Läsionen, aspergillosetypisch, aber nicht granulomatös), 3 (granulomatöse Läsionen oder andere hochgradige Läsionen, z. B. Pilzmyzel); Nr (Tiernummer); ID (Infektions-/Inokulationsdosis); NK (Negativkontrolle); Tr (Trachea); Sy (Syrinx); Llu (linke Lunge); Rlu (rechte Lunge); KrLTI (kranialer, linker, Thorakalluftsack); KrRTI (kranialer, rechter, Thorakalluftsack); KaLTI (kaudaler, linker, Thorakalluftsack); KaRTI (kaudaler, rechter Thorakalluftsack); LAI (linker Abdominalluftsack); RAI (rechter Abdominalluftsack); Per (Perikard); Le (Leber); Mi (Milz); GIT (Gastrointestinaltrakt und Speiseröhre); Ni (Niere); Na (Nase).

4.4.3.2 Versuchsteil B – Juvenile Falken

Bei 3/3 Falken der Gruppe B1 (10⁷ *A. fumigatus*-Konidien) wurden Granulome in den Luftsäcken (PS 3) und bei 2/3 Falken (B1.1, B1.3) zusätzlich in der Lunge nachgewiesen. Die Lunge des Falken B1.2 wies lediglich dunkle und verfestigte Areale (Atelektasen) auf, die der Kategorie PS 1 zugeordnet wurden. Nur bei einem Tier (B1.1) waren Granulome in beiden Lungenflügeln sowie in allen untersuchten Luftsäcken und zusätzlich auf dem Magen, in der Niere und in der Milz vorhanden. Beim Falken B1.3 fanden sich neben den Läsionen im Respirationstrakt auch

Granulome an der Aorta, an der rechten Brustwand, auf der Niere sowie zwischen Magen und Herz. Bei diesem Tier war die Leber zudem stumpfrandig und von brüchiger Konsistenz. Parallel war die Milz dieses Falken vergrößert (Spleno-megalie) und aufgehellte, was der Kategorie PS 1 entsprach. Bei allen Tieren dieser Gruppe war eine Perikardtrübung feststellbar, die jeweils Adhäsionen zum angrenzenden Thorakalluftsack (Kategorie PS 2) aufwies.

Bei 2/3 Tieren der Gruppe B2 (10^6 *A. fumigatus*-Konidien) (B2.1, B2.2) waren Läsionen der Kategorie PS 2 und PS 3 im Respirationstrakt zu finden. Diese stellten sich als verfestigte, dunkel gefärbte Lungenbereiche (Atelektasen) sowie granulomatöse Veränderungen in Trachea, Syrinx, den kaudalen Thorakal- sowie den Abdominalluftsäcken dar. Eines der Tiere (B2.2) wies zudem schleimig verlegte Nasenmuscheln sowie eine deutliche Milzvergrößerung mit Hyperplasie der weißen Milzpulpa (follikuläre Hyperplasie) auf (siehe Abbildung 15). Beim Falken B2.3 zeigte sich lediglich ein geringgradig getrübtes Perikard mit geringgradigen, fettigen Verklebungen am Brustbein, aber sonst keinerlei pathologische Befunde.

In der Gruppe B3 (10^5 *A. fumigatus*-Konidien) wiesen 2/3 Tieren (B3.2, B3.3) Läsionen der Kategorie PS 1 und PS 2 in den Luftsäcken und/oder der Lunge und dem Perikard auf. Diese wurden vor allem durch gelbliche Verfärbungen, emphysematöse Bereiche sowie geringgradige Petechien im Lungengewebe charakterisiert. Das dritte Tier aus dieser Gruppe (B3.1) wies PS 3-Läsionen in Form von Granulomen in der Lunge, auf der Ventralseite des Sternums und in mehreren Luftsäcken, eine vergrößerte Milz (PS 1) sowie eine geringgradige, hämorrhagische Enteritis (PS 1) im Dünndarm auf.

Bei 1/3 Tieren der Gruppen B4 (10^4 *A. fumigatus*-Konidien) (B4.2) fanden sich Läsionen der Kategorie PS 2 in der Lunge und den Luftsäcken, welche durch verdichtete und teils gelblich-gräulich verfärbte Areale charakterisiert wurden. Alle anderen Falken der Inokulationsgruppen B4 zeigten keinerlei pathologische Veränderungen.

In der Gruppe B5 (10^3 *A. fumigatus*-Konidien) fehlten Läsionen der Kategorien PS 2 und PS 3. In der Gruppe B6 (10^2 *A. fumigatus*-Konidien) fanden sich nur bei 1/3

Falken (B6.3) Läsionen der Kategorie PS 2 im linken, kaudalen Thorakalluftsack und Granulome der Kategorie PS 3 in der Lunge. Daneben wurden Veränderungen der Kategorie PS 1 bei zwei Falken (B5.3, B6.2) aus diesen beiden Gruppen nachgewiesen. Diese bestanden aus unspezifischen Läsionen im kranialen Thorakalluftsack in Form von einzelnen, punktuellen Auflagerungen auf einer Luftsackwand. Beim Falken B6.2 waren zudem eine Perikardtrübung sowie eine fettige, gelbliche Gewebsverklebung des Perikards mit dem Sternum sichtbar. Alle anderen Falken der Inokulationsgruppen B5 und B6 zeigten keinerlei pathologische Veränderungen.

Bei 2/3 Falken (B7.4, B7.2) der Kontrollgruppe B7 wurden lediglich pathologische Veränderungen der Kategorie PS 1 festgestellt. Diese bestanden in vereinzelt, gelblichen Auflagerungen und teilweise einer schaumigen Flüssigkeit auf den Luftsackwänden.

Das Vorhandensein pathologischer Läsionen der Kategorien PS 2 und PS 3 korrelierte signifikant mit der Infektionsdosis ($r_s = 0,684$; $p < 0,001$).

Die pathologisch-anatomischen Befunde der juvenilen Falken werden in Tabelle 14 zusammengefasst und eine Auswahl der Läsionen wird in Abbildung 15 dargestellt.

Tabelle 14: Übersicht über die pathologischen Läsionen der 21 juvenilen Falken 28 Tage nach experimenteller Inokulation

Nr	ID	Tr	Sy	Llu	Rlu	KrLTI	KrRTI	KaLTI	KaRTI	LAI	RAI	Per	Le	Mi	GIT	Ni	Na
B7.2	NK	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
B7.4		0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B7.5		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B1.1	10 ⁷	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3	2	0	3	3	3	0
B1.2		0	2	1	1	2	2	2	2	3	3	2	0	1	0	0	0
B1.3		0	0	3	3	3	2	0	3	3	3	2	1	1	2	3	1
B2.1	10 ⁶	3	3	0	1	2	2	3	3	3	3	0	0	0	0	0	1
B2.2		0	2	1	0	1	1	2	2	0	0	0	0	2	0	0	0
B2.3		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
B3.1	10 ⁵	0	0	1	3	0	0	0	3	3	3	0	0	1	1	0	0
B3.2		0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B3.3		0	0	2	2	0	0	1	2	2	2	1	0	0	0	0	0
B4.1	10 ⁴	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B4.2		0	0	0	2	2	2	0	2	1	1	0	1	0	0	0	0
B4.3		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B5.1	10 ³	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B5.2		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B5.3		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B6.1	10 ²	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B6.2		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
B6.3		0	0	3	3	1	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Legende: Pathologische Scores: 0 (ohne besonderen Befund), 1 (milde Läsionen, nicht aspergillosetypisch), 2 (gering- bis mittelgradige Läsionen, aspergillosetypisch, aber nicht granulomatös), 3 (granulomatöse Läsionen oder andere hochgradige Läsionen, z. B. Pilzmyzel); Nr (Tiernummer); ID (Infektions-/Inokulationsdosis); NK (Negativkontrolle); Tr (Trachea); Sy (Syrinx); Llu (linke Lunge); Rlu (rechte Lunge); KrLTI (kranialer, linker, Thorakalluftsack); KrRTI (kranialer, rechter, Thorakalluftsack); KaLTI (kaudaler, linker, Thorakalluftsack); KaRTI (kaudaler, rechter Thorakalluftsack); LAI (linker Abdominalluftsack); RAI (rechter Abdominalluftsack); Per (Perikard); Le (Leber); Mi (Milz); GIT (Gastrointestinaltrakt inkl. Speiseröhre); Ni (Niere); Na (Nase).

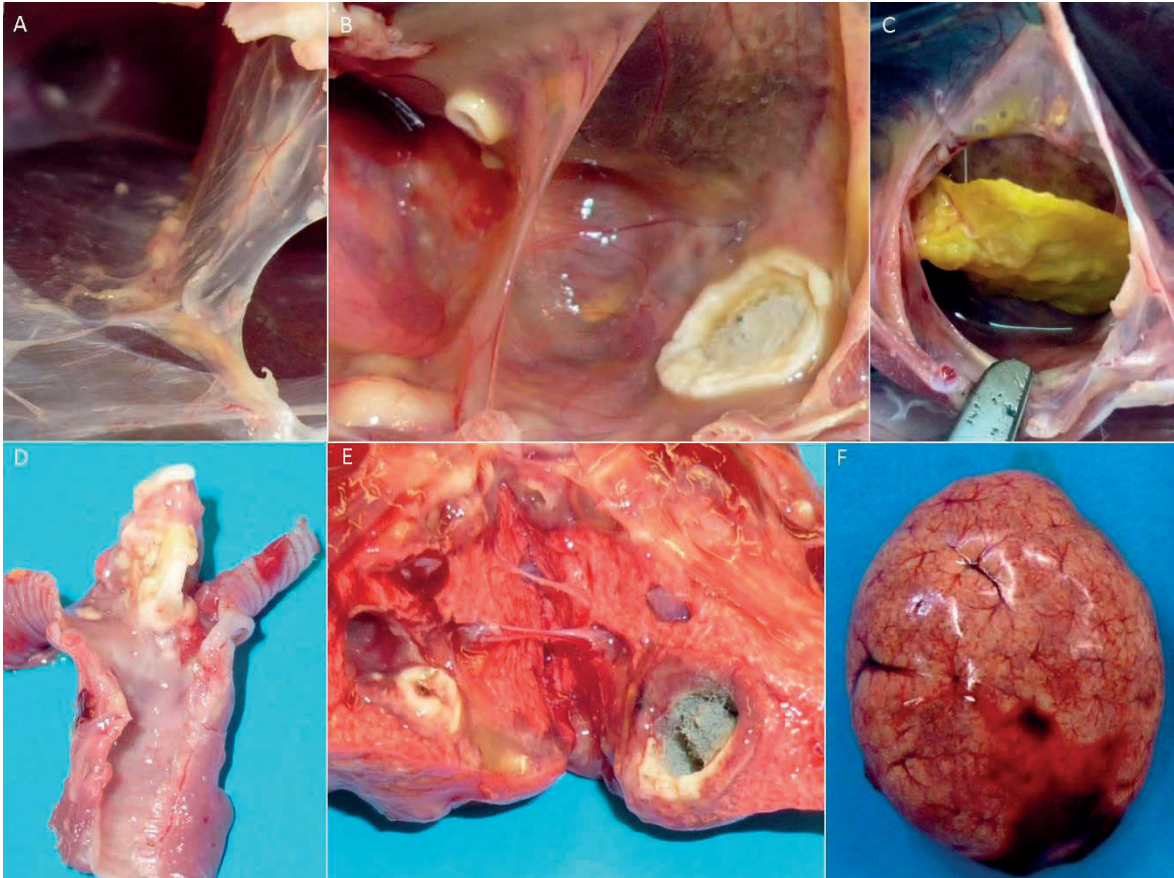


Abbildung 15: Pathologisch-anatomische Befunde von juvenilen Falken nach experimenteller Inokulation mit *A. fumigatus*-Konidien: A) multifokale, knotige Auflagerungen, Trübungen und Gefäßinsprossungen in den Luftsackwänden des kranialen Thorakalluftsackes, B) Granulomatöse Herde, teils schießscheibenartig geschichtet und mit aktivem Pilzmyzel, C) Verkäsende Nekrose im kaudalen Thorakalluftsack, D) Pilzgranulom an der *Bifurcatio tracheae*, E) Pilzgranulome und aktives Pilzmyzel in der Lunge, F) hochgradig vergrößerte und aufgehellte Milz mit follikulärer Hyperplasie.

4.4.4 Histologische und immunhistochemische Befunde

4.4.4.1 Versuchsteil A – Immature Falken

Die histopathologische Untersuchung der Organe identifizierte heterophile und granulomatöse Entzündungsherde im Respirationstrakt von 4/5 Falken (A1.1, A1.3, A1.4, A1.5) der Gruppe A1 (10^7 *A. fumigatus*-Konidien) und 1/5 Falken (A2.3) der Gruppe A2 (10^5 *A. fumigatus*-Konidien). Diese Entzündungsherde bestanden hauptsächlich aus einer Ansammlung heterophiler Granulozyten um ein nekrotisches Zentrum, welche von ringförmigen Reihen von Epitheloidzellen, mehrkernigen Riesenzellen und Makrophagen umgeben waren. Mittels PAS-Reaktion wurden in 3/5 Falken aus Gruppe A1 (A1.1, A1.3, A1.4) und dem einen

Falken aus der Gruppe A2 (A2.3) Pilzhyphen innerhalb dieser Granulome dargestellt. Zudem wurden dort mittels Concanavalin A-Färbung die Ansammlungen von Makrophagen und Riesenzellen um das nekrotische Zentrum bestätigt (siehe Abbildung 16). Somit stellten sich die meisten makroskopisch sichtbaren Läsionen in den Lungen (A1.3, A1.5) und Luftsäcken (A1.1, A1.4, A1.5, A2.3) histologisch als aspergilloseassoziierte Granulome (Aspergillome) mit typischem Granulomaufbau dar. Andererseits wurde in den PS 2-Läsionen der Falken A1.3 (rechter Bauchluftsack) und A1.5 (linke Lunge) eine Aspergillose nicht eindeutig nachgewiesen.

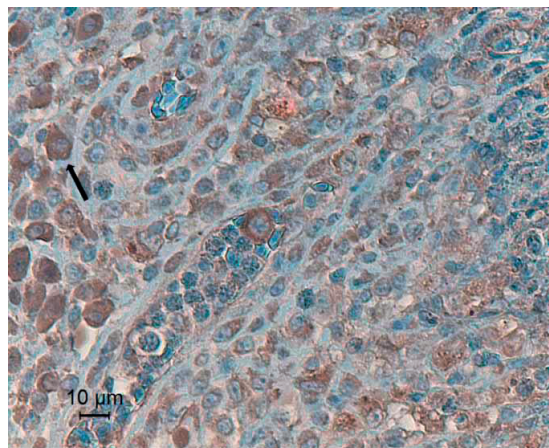


Abbildung 16: Bild eines histologischen Schnittes eines Pilzgranuloms aus dem Luftsack eines immaturren Falken (A1.3), 28 Tage nach Inokulation von 10^7 *A. fumigatus*-Konidien. Nach Anfärbung mit Peroxidase-markiertem Concanavalin A (20 µg/ml) sind dunkel gefärbte Makrophagen (gekennzeichnet mit einem Pfeil) am Rand des Granuloms sichtbar. Diese Abbildung wurde zur Verfügung gestellt vom Institut für Pathologie, Bakteriologie und Vogelkrankheiten der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Gent, Belgien.

4.4.4.2 Versuchsteil B – Juvenile Falken

Im Respirationstrakt von 9/18 inokulierten Falken (B1.1, B1.2, B1.3, B2.1, B2.2, B3.1, B3.3, B4.2, B6.3) wurden in der histopathologischen Untersuchung heterophile und granulomatöse Entzündungsherde identifiziert. Diese Entzündungsherde entsprachen vom histologischen Aufbau den Läsionen der immaturren Falken aus Versuchsteil A. Insgesamt wiesen alle neun Falken Läsionen in den Luftsäcken auf. Fünf von ihnen (B1.1, B1.2, B1.3, B2.1, B2.2) hatten zusätzlich weitere Veränderungen im oberen Atemtrakt (Trachea und Syrinx) und fünf von ihnen (B1.1, B1.3, B2.2, B3.1, B6.3) zusätzlich in der Lunge. Bei zwei dieser neun

Falken (B1.1, B1.3) fanden sich zudem Granulome in anderen Organen, nämlich in Perikard, Leber, Niere, Milz und/oder *Bursa cloacalis*.

Mittels PAS-Reaktion wurden bei allen neun Falken zumindest in einer Läsion Pilzhyphen im Zentrum der granulomatösen Herde dargestellt. Mittels Concanavalin A-Färbung wurde dort die Ansammlung von Makrophagen und Riesenzellen um diese nekrotischen Zentren bestätigt. Allerdings konnten sieben makroskopisch als granulomatös oder stark aspergilloseverdächtig eingeschätzte Läsionen (PS 3) histologisch nicht als solche bestätigt werden (in Milz, Verdauungstrakt und Niere von B1.1, im rechten Bauchluftsack von B1.2, in der Niere von B1.3, in der Trachea von B2.1 und in der rechten Lunge von B6.3). Andererseits konnten drei mit Aspergillose assoziierte Läsionen detektiert werden, wo diese zuvor makroskopisch nicht als solche vermutet worden waren (in der Syrinx von B1.1 und B1.3, in der rechten Lunge von B2.2 und im kaudalen linken Thorakalluftsack von B4.2).

Beim Vergleich makroskopisch-pathologischer Befunde mit histopathologischen Befunden fällt auf, dass die meisten PS 1- und PS 2-Läsionen histologisch keinen Beleg für eine Aspergillose lieferten (z. B. einzelnen Läsionen bei B1.1, B1.2, B1.3, B2.1, B2.2, B2.3, B3.1, B3.2, B3.3, B4.2, B5.3, B6.2, B6.3). Andererseits gab es auch eine PS 1-Läsion (Rechter Abdominalluftsack von B4.2) und 11 PS 2-Läsionen bei insgesamt sechs Falken (B1.2, B1.3, B2.1, B2.2, B4.2, B6.3), die zwar makroskopisch nicht sicher, aber histopathologisch eindeutig mit einer Aspergillose in Verbindung gebracht werden konnten. Bei den drei Kontrolltieren und bei drei inokulierten Falken (B3.2, B5.3 und B6.2) konnte keine der makroskopisch vermerkten Läsionen als positiv für eine Aspergillose bestätigt werden.

Insgesamt korrelierte das Vorhandensein histopathologisch bestätigter Aspergilloseläsionen signifikant mit der Infektionsdosis von *A. fumigatus*-Konidien ($r_s = 0,626$; $p = 0,003$).

Eine Übersicht über den histopathologischen Nachweis von Pilzhyphen in PAS-gefärbten Organschnitten von Jungfalken befindet sich in Tabelle 15.

Tabelle 15: Histologischer Nachweis von Pilzhyphen in Organschnitten von juvenilen Falken, 28 Tage nach Inokulation

Nr	ID	Tr	Sy	Llu	Rlu	KrLTI	KrRTI	KaLTI	KaRTI	LAI	RAI	Per	Le	Mi	GIT	Ni
B7.2	NK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B7.4		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B7.5		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B1.1	10 ⁷	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
B1.2		0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
B1.3		0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0
B2.1	10 ⁶	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
B2.2		0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
B2.3		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B3.1	10 ⁵	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
B3.2		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B3.3		0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
B4.1	10 ⁴	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B4.2		0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0
B4.3		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B5.1	10 ³	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B5.2		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B5.3		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B6.1	10 ²	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B6.2		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B6.3		0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Legende: Histologische Scores: 0 (ohne Nachweis von Pilzhyphen), 1 (mit Nachweis von Pilzhyphen); Nr (Tiernummer); ID (Infektions-/Inokulationsdosis); NK (Negativkontrolle); Tr (Trachea); Sy (Syrinx); Llu (linke Lunge); Rlu (rechte Lunge); KrLTI (kranialer, linker, Thorakalluftsack); KrRTI (kranialer, rechter, Thorakalluftsack); KaLTI (kaudaler, linker, Thorakalluftsack); KaRTI (kaudaler, rechter Thorakalluftsack); LAI (linker Abdominalluftsack); RAI (rechter Abdominalluftsack); Per (Perikard); Le (Leber); Mi (Milz); GIT (Gastrointestinaltrakt inkl. Speiseröhre); Ni (Niere).

4.4.5 Bakteriologische und mykologische Befunde

4.4.5.1 Versuchsteil A – Immature Falken

Bei keinem der Falken wurde aus Herzblut, Leber und Lunge ein bakterielles Wachstum unter aeroben Bedingungen festgestellt.

Bei 3/5 Falken (A1.1, A1.4, A1.5) der Gruppe A1 (10⁷ *A. fumigatus*-Konidien) wurde *A. fumigatus* aus den Luftsäcken reisoliert und auf SAB kultiviert. Dabei gelang beim

Falken A1.5 die Anzucht aus allen untersuchten Luftsäcken, obwohl histopathologisch kein Nachweis von Pilzhyphen mittels PAS-Reaktion möglich war. Eine Reisolierung aus der Lungenläsion dieses Tieres scheiterte jedoch. Gleichsam scheiterte die Reisolierung von *A. fumigatus* bei jeweils einem Falken aus den Gruppen A1 (A1.3) und A2 (10^5 *A. fumigatus*-Konidien) (A2.3), bei denen in der histopathologischen Untersuchung Granulome sowie Pilzhyphen in der Lunge bzw. im linken Abdominalluftsack nachgewiesen worden waren.

4.4.5.2 Versuchsteil B – Juvenile Falken

Mittels einer bakteriologischen Untersuchung wurde bei keinem der Falken aus Herzblut, Leber und Lunge ein bakterielles Wachstum unter aeroben Bedingungen festgestellt.

Bei 9/18 inokulierten Falken (B1.1, B1.2, B1.3, B2.1, B2.2, B3.1, B3.3, B4.2, B6.3) wurde *A. fumigatus* reisoliert. Dabei war eine Anzucht auf SAB bei allen neun Falken aus den Luftsäcken und zudem bei fünf dieser Falken aus der Lunge (B1.1, B1.3, B2.2, B3.1, B6.3) bzw. aus der Trachea und der Syrinx (B1.1, B1.2, B1.3, B2.1, B2.2) möglich. Zudem wurde aus der Nase bei zwei Tieren (B1.3, B3.1), aus der Niere bei zwei Tieren (B1.1, B1.3) und aus der *Bursa cloacalis* und der Milz bei einem Tier (B1.1) *A. fumigatus* isoliert. Damit entsprachen die Ergebnisse der mykologischen Untersuchung bei juvenilen Falken weitestgehend den Ergebnissen der Histopathologie, da aus allen histologisch positiven Läsionen auch eine Pilzanzucht gelang. Allerdings waren bei zwei Falken (B1.1, B1.3) zusätzlich zu diesen Läsionen auch mykologische Nachweise aus der Trachea, dem Perikard, der Leber, dem Gastrointestinaltrakt, der Niere und/oder der Milz möglich. Die PS 2-Läsionen im Perikard von B1.1 und B1.3 sowie drei granulomatöse PS 3-Läsionen in Milz, Verdauungstrakt und Niere von B1.1 waren zwar histologisch negativ, aber in der mykologischen Anzucht positiv für *A. fumigatus*. Zudem war ein mykologischer Nachweis aus zwei PS 1-Läsionen in der Leber und der Nase von B1.3 erfolgreich, die histologisch als negativ für eine Aspergillose gewertet wurden.

Die PS 3-Läsion in der Trachea von B2.1, ebenso wie mehrere PS 1- und PS 2-Läsionen in verschiedenen Falken (B1.2, B1.3, B2.1, B2.2, B2.3, B3.1, B3.2, B3.3, B4.2, B5.3, B6.2, B6.3) wurden mykologisch wie zuvor histologisch nicht als aspergillosetypisch bestätigt. Somit wurde aus einem Tier der Gruppe 3 (B3.2)

A. fumigatus nicht reisoliert, obwohl die Läsion im kaudalen, linken Thorakalluftsack makroskopisch als aspergilloseverdächtige PS 2-Läsion eingestuft worden war. Gleichsam wurde aus keiner der PS 1-Läsionen der Falken B2.3, B5.3, B6.2 sowie der drei Kontrolltiere *A. fumigatus* kultiviert.

Insgesamt korrelierte der erfolgreiche Nachweis von Pilzisolaten aus pathologischen Läsionen signifikant mit der Infektionsdosis ($r_s = 0,626$; $p = 0,003$).

Eine Übersicht über die Ergebnisse der mykologischen Anzucht aus den Organen juveniler Falken befindet sich in Tabelle 16.

Tabelle 16: Übersicht über die Ergebnisse der mykologischen Reisolierung aus den Organen von 21 juvenilen Falken, 28 Tage nach experimenteller Inokulation

Nr	ID	Tr	Sy	Llu	Rlu	KrLTI	KrRTI	KaLTI	KaRTI	LAI	RAI	Per	Le	Mi	Bu	Ni	Na	
B7.2	NK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
B7.4		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
B7.5		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
B1.1	10 ⁷	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
B1.2		0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B1.3		1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
B2.1	10 ⁶	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
B2.2		0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B2.3		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B3.1	10 ⁵	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1
B3.2		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B3.3		0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B4.1	10 ⁴	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B4.2		0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B4.3		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B5.1	10 ³	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B5.2		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B5.3		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B6.1	10 ²	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B6.2		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B6.3		0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Legende: Mykologische Scores: 0 (ohne Pilzwachstum), 1 (mit Pilzwachstum); Nr (Tiernummer); ID (Infektions-/Inokulationsdosis); NK (Negativkontrolle); Tr (Trachea); Sy (Syrinx); Llu (linke Lunge); Rlu (rechte Lunge); KrLTI (kranialer, linker, Thorakalluftsack); KrRTI (kranialer, rechter, Thorakalluftsack); KaLTI (kaudaler, linker, Thorakalluftsack); KaRTI (kaudaler, rechter Thorakalluftsack); LAI (linker Abdominalluftsack); RAI (rechter Abdominalluftsack); Per (Perikard); Le (Leber); Mi (Milz); Bu (*Bursa cloacalis*); Ni (Niere); Na (Nase).

4.4.6 Molekularbiologische Befunde

Bei allen immaturren und juvenilen Falken, aus denen *A. fumigatus* reisoliert werden konnten, war mittels Mikrosatelliten-Längenpolymorphismus ein Genotyp nachweisbar, der mit dem Genotyp des verwendeten Isolates identisch war. Eine Übersicht über die Ergebnisse des molekularbiologischen Vergleichs der Reisolat mit dem Inokulum befindet sich in Tabelle 17.

Tabelle 17: Übersicht über die molekularbiologische Bestätigung der Reisolat aus den Organen von 21 juvenilen Falken, 28 Tage nach experimenteller Inokulation

Nr	ID	Tr	Sy	Llu	Rlu	KrLTI	KrRTI	KaLTI	KaRTI	LAI	RAI	Per	Le	Mi	Bu	Ni	Na
B7.2	NK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B7.4		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B7.5		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B1.1	10 ⁷	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
B1.2		0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
B1.3		1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1
B2.1	10 ⁶	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
B2.2		0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B2.3		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B3.1	10 ⁵	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	2
B3.2		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B3.3		0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B4.1	10 ⁴	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B4.2		0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
B4.3		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B5.1	10 ³	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B5.2		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B5.3		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B6.1	10 ²	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B6.2		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B6.3		0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Legende: Molekularbiologische Scores: 0 (ohne Pilzwachstum), 1 (Reisolat identisch zum Inokulum), 2 (Reisolat abweichend vom Inokulum); Nr (Tiernummer); ID (Infektions-/Inokulationsdosis); NK (Negativkontrolle); Tr (Trachea); Sy (Syrinx); Llu (linke Lunge); Rlu (rechte Lunge); KrLTI (kranialer, linker, Thorakalluftsack); KrRTI (kranialer, rechter, Thorakalluftsack); KaLTI (kaudaler, linker, Thorakalluftsack); KaRTI (kaudaler, rechter Thorakalluftsack); LAI (linker Abdominalluftsack); RAI (rechter Abdominalluftsack); Per (Perikard); Le (Leber); Mi (Milz); Bu (*Bursa cloacalis*); Ni (Niere); Na (Nase).

Lediglich bei einem immaturren Falken (A1.5) unterschieden sich die *A. fumigatus*-Isolate aus 3/4 Läsionen und bei einem juvenilen Falken (B3.1) aus 1/5 Läsionen vom Genotyp des Inokulums. Dabei stimmte bei A1.5 das Isolat aus dem linken Thorakalluftsack mit dem Inokulum überein, während die Isolate aus dem rechten Thorakalluftsack sowie dem rechten und linken Abdominalluftsack vom Inokulum differierten. Beim Falken B3.1 wich das Isolat aus der Nase vom Inokulum und von den übrigen Isolaten aus der rechten Lunge, dem rechten, kaudalen Thorakalluftsack sowie dem rechten und linken Abdominalluftsack ab.

4.4.7 Befunde der Serumdiagnostik

4.4.7.1 Versuchsteil A – Immature Falken

Vier Serumproben von immaturren Falken, davon eine (A1.3) vor Inokulation (b. i.) und drei (A1.3, A2.1, A3.1) 28 Tage nach Inokulation (p. i.) mussten auf Grund von starker Hämolyse von der Serumdiagnostik ausgeschlossen werden. Demnach standen 17/18 Serumproben vor experimenteller Inokulation und 15/18 Serumproben am Versuchsende zur Verfügung. Da in den letztgenannten 15 Proben auch Proben von drei Kontrolltieren enthalten waren, standen insgesamt 12 Proben von mit *A. fumigatus* inokulierten Falken zur Verfügung. Bei drei dieser 12 p. i. - Proben (A3.2, A3.3, A3.5) konnten jedoch lediglich die Untersuchungen auf *A. fumigatus*-Antigene und Anti-*A. fumigatus*-Antikörper durchgeführt werden, da das Serumvolumen für weitere Untersuchungen nicht ausreichte. Somit standen für die Untersuchung auf *A. fumigatus*-Antigene und Anti-*A. fumigatus*-Antikörper zwar 12, aber für die Proteinelektrophorese und die Akute-Phase-Proteinbestimmung lediglich neun p. i.-Proben von mit *A. fumigatus* inokulierten Falken zur Verfügung. Bei den einzelnen Untersuchungen wurde stets ein Vergleich der Werte von inokulierten Falken ohne Granulombildung (8/12) und nachweislich an Aspergillose erkrankten Falken mit Granulombildung (4/12) gezogen.

Im Folgenden werden teils individuelle Werte von Falken sowie stets die Durchschnittswerte (Mean) mit Standardabweichungen (SD) für die Parameter vor und nach der Inokulation gegenübergestellt. Zudem werden die Sensitivität und die Spezifität des Tests mit dem 95 % Konfidenzintervall angegeben, die auf Basis der Probenzahlen für die jeweiligen Untersuchungsmethoden berechnet wurden. Dabei

beziehen sich die Sensitivitäten und Spezifitäten jeweils auf die *Intra-vitam*-Detektion einer nachfolgend pathologisch und histologisch bestätigten Aspergillose im Rahmen dieser Studie. Sie erlauben keine Aussage über die Qualität der Detektion der diagnostischen Zielp Parameter durch das angewendete Testverfahren (methodisch-diagnostische Qualität).

4.4.7.1.1 *Aspergillus*-Antikörper Diagnostik

4.4.7.1.1.1 Hämagglutinationstests

Ein kommerzieller Hämagglutinationstest zur Detektion von Anti-*Aspergillus*-Antikörpern wurde mit Seren der immaturren Falken (Versuchsteil A) durchgeführt. Das Testsystem wies am Versuchsende bei zwei Tieren (A1.5, A3.3) ein negatives Ergebnis (Titer $\leq 1:40$), bei allen anderen Tieren ein unsicheres/fragliches Ergebnis (Titer $> 1:40$ bis $< 1:320$) und bei keinem Tier ein positives Ergebnis (Titer $\geq 1:320$) auf (siehe Tabelle 18).

Tabelle 18: Übersicht über die Ergebnisse eines humanmedizinischen Hämagglutinationstests zur Detektion von *Aspergillus* spp.-spezifischen Antikörpern

Nr.	ID	d 0	d 28	Hist
A4.1	NK	1:80	1:160	-
A4.2		1:160	1:80	-
A4.3		1:80	1:80	-
A1.1	10 ⁷	1:80	1:160	+
A1.2		1:80	1:160	-
A1.3		1:80	1:80	+
A1.4		1:80	1:160	+
A1.5		1:80	1:40	-
A2.1	10 ⁵	1:160	1:160	+
A2.2		1:80	1:80	-
A2.3		1:40	1:80	-
A2.4		1:80	1:80	-
A2.5		1:80	1:80	-
A3.1	10 ³	1:80	1:160	-
A3.2		1:80	1:80	-
A3.3		1:80	1:40	-
A3.4		1:80	1:80	-
A3.5		1:80	1:160	-

Legende: Titer $\leq 1:40$ (negativ, grün hinterlegt); Titer $> 1:40$ bis $< 1:320$ (fraglich, gelb hinterlegt); Titer $\geq 1:320$ (positiv, rot hinterlegt); Nr (Tiernummer); ID (Infektions-/Inokulationsdosis); NK (Negativkontrolle); d (Tag); Hist (histologische Bestätigung der Aspergillose); - (negativ); + (positiv).

Es gab keinen signifikanten Antikörper-Anstieg bei Tieren, die im Verlauf des Versuchs Granulome entwickelten, und im Vergleich mit Kontrolltieren auch keinen signifikanten Unterschied zu inokulierten Vögeln.

Bezogen auf die *Intra-vitam*-Feststellung einer nachträglich histologisch bestimmten Aspergillose lag die Sensitivität bei 0 % (0 - 52,71) und die Spezifität bei 100 % (80,74 - 100) auf Basis der vom Hersteller gegebenen Cut-off-Werte. Inwiefern und mit welcher Sicherheit das Testsystem aber überhaupt Anti-*Aspergillus*-Antikörper von Falken detektierte bleibt unbekannt, weshalb diese Werte keine qualitative Aussage über die Spezifität und Sensitivität des Antikörpernachweises durch den Test zulassen.

4.4.7.1.1.2 *Aspergillus*-Antikörper ELISA

Die durchschnittlichen Antikörperindizes (Mean \pm SD) stiegen während des Infektionsversuches bei den inokulierten Falken von $1,2 \pm 0,3$ auf $1,6 \pm 0,2$. Die Werte von zwei Tieren (A1.2, A2.4) überstiegen den Cut-off-Index von 1,4 allerdings bereits vor Beginn des Versuches, während an dessen Ende 86,7 % (13/15) der Falken Indexwerte $\geq 1,4$ aufwiesen. Unter diesen befanden sich alle vier Vögel mit Granulombildung, aber auch 7/8 der inokulierten Tiere ohne Granulombildung und 2/3 der Kontrolltiere.

Die Sensitivität bezüglich des *Intra-vitam*-Nachweises einer histologisch bestätigten Aspergillose betrug folglich 100 % (47,3 - 100) und die Spezifität 18,2 % (2,3 - 51,8). Ein signifikanter Einfluss der Infektionsdosis (ID) auf die p. i.-Werte fehlte ($r_s = 0,466$; $p = 0,08$) ebenso wie eine signifikante Erhöhung der Antikörperindizes bei Tieren mit Granulomen im Vergleich zu Falken ohne Granulome ($p = 0,597$).

4.4.7.1.2 *Aspergillus*-Antigen ELISA

Die Galactomannan (GM)-Indizes lagen zu Versuchsanfang durchschnittlich bei $0,4 \pm 0,1$ und stiegen im Versuchsverlauf auf $0,6 \pm 0,9$. Dabei erreichten oder überstiegen die GM-Indizes am Versuchsende lediglich bei 3/12 inokulierten Falken (A1.5, A2.3, A2.5) den Cut-off-Index von 0,7, wobei zwei dieser drei Falken Granulome während des Versuches entwickelten. Es konnte trotzdem kein signifikanter Zusammenhang zwischen der ID und den GM-Werten ($r_s = 0,133$; $p = 0,636$) gezeigt werden. Ebenso war die GM-Erhöhung bei Tieren mit Granulomen im Vergleich zu Falken ohne Granulome nicht statistisch signifikant

($p = 0,130$). Die Sensitivität bezogen auf einen *Intra-vitam*-Nachweis einer histologisch bestätigten Aspergillose betrug 50 % (6,8 - 93,2) und dessen Spezifität 90,9 % (58,7 - 99,8).

4.4.7.1.3 *Aspergillus*-Toxin Fumigaclavin A (FuA) Nachweis mittels EIA

In keiner der Serumproben wurde Fumigaclavin A (FuA) oder dessen Glycosid- oder Sulfatkonjugate mit einer Nachweisgrenze von 0,7 ng/ml Serum nachgewiesen.

4.4.7.1.4 Akute-Phase-Proteinmessung

4.4.7.1.4.1 Serumamyloid A

Die durchschnittlichen Serumamyloid A (SAA)-Werte lagen zu Beginn des Versuchs bei $35,1 \pm 11,3$ mg/ml und stiegen im weiteren Verlauf auf $104,5 \pm 112,0$ mg/ml an. Generell schwankten die SAA-Werte am Versuchsende stark zwischen 17,8 und 291,8 mg/ml und überstiegen bei 3/9 immaturren Falken den Vergleichsbereich von nicht-exponierten Falken. Bei diesen drei Falken wurden nachträglich Granulomen nachgewiesen. Mit Bezug auf eine *Intra-vitam*-Detektion einer histologisch bestätigten Aspergillose betrug die Sensitivität des SAA-Anstieges 75 % (19,4 - 99,4) und dessen Spezifität 100 % (68,8 - 100). Die p. i.-Werte von SAA wurden nicht signifikant von der ID beeinflusst ($r_s = 0,311$; $p = 0,326$). Aber sie stiegen bei Vögeln mit Granulomen im Vergleich zu Vögeln ohne Granulome signifikant an ($p = 0,042$).

4.4.7.1.4.2 Haptoglobin

Die Haptoglobin (HP)-Werte lagen vor der Inokulation durchschnittlich bei $0,17 \pm 0,09$ mg/ml und stiegen am Ende der Versuchsphase auf $0,50 \pm 0,52$ mg/ml an. Individuelle HP-Werte stiegen bei 4/9 Falken an, wobei zu diesen 3/4 der Falken mit nachgewiesenen Granulomen, aber keine Kontrolltiere zählten. Insgesamt wurden die p. i.-Werte signifikant von der ID beeinflusst ($r_s = 0,665$; $p = 0,02$) und der HP-Anstieg bei Vögeln mit Granulomen war statistisch signifikant ($p = 0,011$). Somit betrug die Sensitivität des HP-Anstieges 75 % (19,4 - 99,4) und dessen Spezifität 87,5 % (47,4 - 99,7) bezogen auf einen *Intra-vitam*-Nachweis einer histologisch bestätigten Aspergillose.

4.4.7.1.5 Serum-Protein-Elektrophorese

4.4.7.1.5.1 Totalprotein

Die Mittelwerte (\pm SD) der Totalprotein (TP)-Konzentration lagen zum Anfang der Versuchsphase bei $3,01 \pm 0,51$ g/dl und stiegen p. i. auf $4,11 \pm 0,98$ g/dl an. Dabei konnte kein signifikanter Einfluss der ID auf die TP-Konzentration nachgewiesen werden ($r_s = 0,484$; $p = 0,111$). Vier Falken aus den Infektionsgruppen mit hohen und mittleren Infektionsdosen (A1.1, A1.2, A1.4, A2.3) wiesen am Ende des Versuches erhöhte TP-Werte auf, wobei 3/4 der Falken mit bestätigten Granulomen dazugehörten (Sensitivität des TP-Anstieges: 75 % (19,4 - 99,4)). Dennoch gab es keinen signifikanten Unterschied der TP-Werte zwischen Falken mit und ohne Granulome(n) ($p = 0,103$). Die Spezifität des TP-Anstieges in Verbindung mit einer *Intra-vitam*-Diagnose einer histologisch bestätigten Aspergillose betrug 87,5 % (47,4 - 99,7).

4.4.7.1.5.2 Albumin

Die durchschnittliche Albuminkonzentration lag zu Versuchsbeginn bei $1,00 \pm 0,18$ g/dl und der durchschnittliche Anteil von Albumin am TP bei $33,19 \pm 3,03$ %. Im Versuchsverlauf stieg die Durchschnittsalbuminkonzentration geringfügig auf $1,14 \pm 0,30$ g/dl an und war nicht signifikant von der ID beeinflusst ($r_s = -0,205$; $p = 0,524$). Der prozentuale Anteil von Albumin an den Serumproteinen sank im Gegensatz hierzu p. i. auf $28,71 \pm 8,44$ %, was hingegen signifikant durch die ID beeinflusst wurde ($r_s = -0,621$, $p = 0,031$). Demnach war mit steigender Infektionsdosis ein sinkender Albuminanteil zu erwarten.

Individuell sank der prozentuale Albuminanteil zum Ende der Versuchsphase bei vier Tieren (A1.1, A1.5, A2.3, A2.4), darunter 3/4 der Falken mit nachgewiesenen Granulomen, unter den Minimalwert aller Falken vor Inokulation. Bezüglich eines *Intra-vitam*-Nachweises einer histologisch bestätigten Aspergillose betrug die Sensitivität der Senkung des prozentualen Albuminanteils 75 % (19,4 - 99,4) und der Albuminkonzentration 25 % (0,6 - 80,6). Hingegen betrug die Spezifität der Senkung des prozentualen Anteils am TP 87,5 % (47,4 - 99,7) und die der Albuminkonzentration 100 % (68,8 - 100). Mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test wurde ein signifikanter Unterschied der prozentualen Albuminanteile am TP

($p = 0,027$), aber nicht der Albuminkonzentration ($p = 0,497$) zwischen Vögeln mit und ohne Granulome(n) nachgewiesen.

4.4.7.1.5.3 Präalbumin

Die durchschnittliche Präalbumin (PA)-Konzentration betrug vor der experimentellen Inokulation $0,71 \pm 0,11$ g/dl, welches einen Anteil von $23,59 \pm 2,30$ % an den Serumproteinen darstellte. Die Durchschnitts-PA-Konzentration sank bei inokulierten Tieren während des Versuchs auf $0,56 \pm 0,25$ g/dl und der durchschnittliche, prozentuale PA-Anteil auf $14,60 \pm 7,53$ %. Gemäß Berechnung des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman wurde nicht die PA-Konzentration ($r_s = -0,554$; $p = 0,062$), aber der prozentuale PA-Anteil am TP ($r_s = -0,785$; $p = 0,003$) signifikant durch die ID beeinflusst. Dabei weist die multiple ($p = 0,05$) und die einfache ($p = 0,044$) Regressionsanalyse auch für die PA-Konzentration eine signifikante Beeinflussung durch die ID aus. Die individuelle PA-Konzentration sank p. i. bei zwei Falken (A1.1, A1.5) unter das Minimum der Ausgangswerte aller Falken, wobei beide Tiere Granulome entwickelten. Mit Bezug auf einen *Intra-vitam*-Nachweis einer histologisch bestätigten Aspergillose lag die Sensitivität der Senkung der prozentualen PA-Anteile am TP bei 100 % (47,3 - 100) und der PA-Konzentration bei 50 % (6,8 - 93,2). Deren Spezifitäten lagen bei 62,5 % (24,5 - 91,5) bzw. 100 % (68,8 - 100). Der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test detektierte signifikante Unterschiede für die Konzentration ($p = 0,05$) und den prozentualen Anteil ($p = 0,011$) von PA zwischen Falken mit Granulomen und ohne Granulome.

4.4.7.1.5.4 Albumin-Globulin-Verhältnis

Das Albumin-Globulin (A/G)-Verhältnis lag zum Anfang des Versuchs im Durchschnitt bei $1,33 \pm 0,22$ und sank im weiteren Verlauf auf $0,88 \pm 0,46$. Individuelle A/G-Verhältnisse verringerten sich bei 5/9 inokulierten Tieren, jedoch nicht bei den Kontrolltieren. Allerdings sank es bei allen vier Falken mit nachgewiesenen Granulomen unter die minimalen Ausgangswerte aller Falken. In Verbindung mit einer *Intra-vitam*-Detektion einer histologisch bestätigten Aspergillose lag die Sensitivität des A/G-Abfalls bei 100 % (47,3 - 100) und die Spezifität bei 75 % (34,9 - 96,8). Statistisch wurden die p. i. AG-Werte signifikant durch die ID

beeinflusst ($r_s = -0,745$; $p = 0,005$) und variierten signifikant zwischen Tieren mit und ohne Granulome(n) ($p = 0,017$).

4.4.7.1.5.5 Alpha-1-Globulin

Die durchschnittliche Alpha 1-Globulin (α_1)-Konzentration betrug zu Beginn des Versuchs $0,10 \pm 0,03$ g/dl und repräsentierte hiermit durchschnittlich $3,28 \pm 0,73$ % des TP. Sowohl die Konzentration als auch der prozentuale Anteil von α_1 stiegen im Versuchsverlauf auf $0,14 \pm 0,07$ g/dl bzw. $3,58 \pm 2,02$ %, wobei statistisch keine signifikante Beeinflussung der ID auf die p. i.-Werte festgestellt werden konnte (α_1 -Konzentration: $r_s = 0,5188$; $p = 0,084$; prozentualer Anteil von α_1 : $r_s = -0,269$; $p = 0,398$).

Individuelle α_1 -Werte variierten meist im Rahmen der Ausgangswerte. Allerdings konnte ein signifikanter Anstieg der α_1 -Konzentration bei Vögeln mit nachgewiesenen Granulomen festgestellt werden ($p = 0,024$), was nicht für den prozentualen α_1 -Anteil am TP galt ($p = 0,734$).

Die Sensitivität der Senkung des α_1 -Anteils lag bezüglich eines *Intra-vitam*-Nachweises einer histologisch bestätigten Aspergillose bei 25 % (0,6 - 80,6) und die der α_1 -Konzentration bei 50 % (6,8 - 93,2). Die Spezifität der Senkungen beider Parameter lag diesbezüglich bei 100 % (68,8 - 100).

4.4.7.1.5.6 Alpha-2-Globulin

Das arithmetische Mittel (\pm SD) der Alpha-2-Globulin (α_2)-Konzentration betrug vor der Inokulation $0,41 \pm 0,14$ g/dl und stellte damit $13,41 \pm 2,70$ % des TP dar. Die durchschnittliche Konzentration und der prozentuale Anteil von α_2 stiegen während des Versuchs auf $0,87 \pm 0,49$ g/dl bzw. $20,38 \pm 8,32$ % und waren beide signifikant durch die ID beeinflusst (α_2 -Konzentration: $r_s = 0,686$; $p = 0,014$; prozentualer Anteil von α_2 : $r_s = -0,65$; $p = 0,022$). Individuelle α_2 -Konzentrationen stiegen bei keinem Kontrolltier, aber bei sechs inokulierten Falken, wobei vier von ihnen Granulome entwickelten. Folglich betrug die Sensitivität des α_2 -Konzentrationsanstiegs sowie des Anstiegs des α_2 -Anteils am TP bezogen auf eine *Intra-vitam*-Diagnose einer histologisch bestätigten Aspergillose jeweils 100 % (47,3 - 100). Die Spezifität dieser beiden Parameter 75 % (34,9 - 96,8) bzw. 100 % (87,5 - 99,7). Zudem bestanden signifikante Erhöhungen der α_2 -Konzentration ($p = 0,007$) und des α_2 -

Anteils ($p = 0,007$) bei Tieren mit bestätigten Granulomen im Vergleich zu Tieren ohne Granulome.

4.4.7.1.5.7 Beta-Globulin

Die durchschnittliche Beta-Globulin (β)-Konzentration betrug zu Beginn der Versuchsphase $0,47 \pm 0,07$ g/dl und der prozentuale Anteil von β am TP $15,74 \pm 2,36$ %. An deren Ende stiegen die durchschnittliche Konzentration von β auf $0,70 \pm 0,27$ g/dl und der prozentuale Anteil auf $16,78 \pm 3,29$ % an.

Für beide konnte ein signifikanter Einfluss durch die ID nachgewiesen werden (β -Konzentration: $r_s = 0,782$; $p = 0,003$; prozentualer Anteil von β : $r_s = 0,65$; $p = 0,022$). Bei 5/9 inokulierten Einzeltieren (A1.1, A1.2, A1.5, A2.3, A2.4) stieg die β -Konzentration p. i. über die maximalen Ausgangswerte aller Falken. Unter diesen fünf waren 3/4 der Falken, die Granulome im Versuchsverlauf entwickelten. Dadurch betrug die Sensitivität des β -Konzentrationsanstieges bezüglich einer *Intra-vitam*-Detektion einer histologisch bestätigten Aspergillose 75 % (19,4 - 99,4) und dessen Spezifität 75 % (34,9 - 96,8). Die Sensitivität und Spezifität des Anstiegs des Anteils von β am TP lagen diesbezüglich bei 25 % (0,63 - 80,6) bzw. 100 % (68,8 - 100). Die β -Konzentration zum Versuchsende unterschied sich signifikant zwischen Falken mit Granulomen und ohne Granulome ($p = 0,042$). Im Gegensatz dazu konnte ein signifikanter Unterschied beim prozentualen Anteil von β am TP nicht gezeigt werden ($p = 0,09$).

4.4.7.1.5.8 Gamma-Globulin

Die Durchschnittskonzentration der Gamma (γ)-Globuline lag zu Versuchsanfang bei $0,33 \pm 0,09$ g/dl und dies repräsentierte $10,67 \pm 2,17$ % des TP. Die γ -Konzentration stieg im Versuchsverlauf durchschnittlich auf $0,69 \pm 0,41$ g/dl und der prozentuale Anteil von γ auf $15,94 \pm 5,10$ %. Deren Beeinflussungen durch die ID war gemäß Berechnung des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman statistisch signifikant (γ -Konzentration: $r_s = 0,681$; $p = 0,015$; prozentualer Anteil von γ : $r_s = 0,701$; $p = 0,01$). Die multiple ($p = 0,18$ bzw. $0,19$) und die einfache ($p = 0,136$ bzw. $0,137$) Regressionsanalyse weisen allerdings für die Konzentration bzw. den Anteil von γ keine signifikante Beeinflussung durch die ID aus.

Individuelle γ -Konzentrationen von 7/9 Falken stiegen p. i. über das Ausgangsmaximum, wobei alle vier Falken mit nachgewiesenen Granulomen

darunter waren. Dies traf aber zusätzlich auch auf 2/3 Kontrolltiere zu. Folglich betrug die Sensitivität des γ -Konzentrationsanstiegs in Bezug auf einen *Intravital*-Nachweis einer histologisch bestätigten Aspergillose 100 % (47,3 - 100) und dessen Spezifität 37,5 % (8,5 - 75,5). Die Sensitivität und die Spezifität des Anstiegs des prozentualen Anteils von γ an den Serumproteinen betrug diesbezüglich 75 % (19,4 - 99,4) bzw. 87,5 % (47,4 - 99,7).

Es bestand eine signifikante Erhöhung der γ -Konzentration ($p = 0,033$) und des prozentualen Anteils von γ ($p = 0,017$) bei Vögeln mit bestätigten Granulomen im Vergleich zu Vögeln ohne Granulome.

Die Ergebnisse der Serumuntersuchung (*Aspergillus*-Antikörperbestimmung, *Aspergillus*-Antigenbestimmung mittels ELISA, Serum-Protein-Elektrophorese sowie Akute-Phase-Proteinbestimmung) wurden für die immaturren Falken in Tabelle 19 als Prä- und Post-Inokulationswerte dargestellt.

Die Durchschnittswerte (Mean) mit Standardabweichungen (SD), die Medianwerte sowie die Spanne (Range) mit Minimum- (Min) und Maximumwerten (Max) für diese Parameter vor und nach der Inokulation sind in Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 19: Werte für Akute-Phase-Proteine, Anti-*Aspergillus*-Antikörper-Indizes sowie Serumproteinfraktionen, bestimmt in den Serumproben von 18 immaturren Ger-Saker-Hybridfalken vor und 28 Tage nach experimenteller Inokulation mit *A. fumigatus*-Konidien

	ELISA			APP			EPH												
	L	GM	AK	SAA [mg/ml]	HP [mg/ml]	TP [g/dl]	A/G	PA [%]	PA [g/dl]	A [%]	A [g/dl]	α1 [%]	α1 [g/dl]	α2 [%]	α2 [g/dl]	β [%]	β [g/dl]	γ [%]	γ [g/dl]
Mittelw.	0.4	1.2	1.2	35.1	0.17	3.01	1.33	23.59	0.71	33.19	1.00	3.28	0.10	13.41	0.41	15.86	0.47	10.67	0.33
SD	0.1	0.3	0.3	11.3	0.09	0.51	0.22	2.30	0.11	3.03	0.18	0.73	0.03	2.70	0.14	2.36	0.07	2.17	0.09
Median	0.4	1.2	1.2	35.7	0.17	3.00	1.35	23.94	0.70	32.96	1.01	3.19	0.10	13.34	0.42	15.46	0.49	10.69	0.32
Min	0.2	0.7	0.7	17.8	0.01	2.00	1.01	20.07	0.52	28.58	0.66	2.26	0.06	9.71	0.19	12.65	0.37	6.98	0.14
Max	0.6	2.0	2.0	57.0	0.34	4.00	1.81	26.85	0.92	39.26	1.30	5.03	0.16	18.72	0.67	20.30	0.60	15.03	0.44
A 4.1	-	0.3	1.5	36.8	0.24	3.2	1.31	26.87	0.86	29.78	0.95	2.91	0.09	13.07	0.42	13.86	0.44	13.52	0.43
A 4.2	-	0.2	1.4	22.5	0.05	3.6	1.68	21.37	0.77	41.26	1.49	2.86	0.10	10.73	0.39	10.61	0.38	13.16	0.47
A 4.3	-	0.3	1.2	48.4	0.22	3.4	1.3	20.05	0.68	36.55	1.24	3.08	0.10	13.74	0.47	13.43	0.46	13.15	0.45
A 1.1	+	0.3	1.9	291.8	1.67	6	0.2	2.48	0.15	14.34	0.86	1.92	0.12	32.19	1.93	20.64	1.24	28.44	1.71
A 1.2	-	0.2	1.9	32.7	0.29	4.2	0.89	13.56	0.57	33.40	1.4	2.47	0.1	15.07	0.63	20.15	0.85	15.34	0.64
A 1.4	+	0.3	1.8	34.5	0.31	4.2	0.94	17.56	0.74	30.99	1.3	2.74	0.11	21.08	0.89	13.07	0.55	14.57	0.61
A 1.5	+	3.4	1.4	282.0	0.96	3.2	0.25	3.87	0.12	16.2	0.52	8.47	0.27	34.55	1.11	20.25	0.65	16.65	0.53
A 2.2	-	0.1	1.8	33.5	0.08	3	1.39	23.45	0.7	34.64	1.04	2.53	0.08	12.84	0.39	16.55	0.5	9.97	0.3
A 2.3	+	0.8	1.4	164.3	0.53	5.2	0.63	10.77	0.56	27.73	1.44	4.99	0.26	21.55	1.12	18.34	0.95	16.61	0.86
A 2.4	-	0.3	1.2	40.0	0.21	4	0.86	18.57	0.74	27.69	1.11	3.08	0.12	19.4	0.78	16.41	0.66	14.86	0.59
A 2.5	-	0.7	1.5	34.9	0.4	4	1.17	19.75	0.79	34.11	1.36	2.94	0.12	17.01	0.68	12.86	0.51	13.34	0.53
A 3.2	-	0.3	1.7	qns	qns	qns	qns	qns	qns	qns	qns	qns	qns	qns	qns	qns	qns	qns	qns
A 3.3	-	0.4	1.6	qns	qns	qns	qns	qns	qns	qns	qns	qns	qns	qns	qns	qns	qns	qns	qns
A 3.4	-	0.3	1.6	26.8	0.04	3.2	1.55	21.4	0.68	39.33	1.26	3.1	0.1	9.71	0.31	12.74	0.41	13.72	0.44
A 3.5	-	0.5	1.4	qns	qns	qns	qns	qns	qns	qns	qns	qns	qns	qns	qns	qns	qns	qns	qns

Legende: ELISA (Indirekter, enzymgekoppelter Immunsorptionsstest); APP (Akute-Phase-Proteine); EPH (Proteinelektrophorese). Kursive Zahlen zeigen eine Unterschreitung, fettgedruckte Zahlen eine Überschreitung des Referenzbereiches (Ref) an. 10^7 , 10^5 und 10^3 geben die jeweilige Inokulationsdosis an. L (Läsionen); + (Granulomnachweis positiv); - (Granulomnachweis negativ); GM (Galactomannan); AK (Antikörper); SAA (Serumamyloid A); HP (Haptoglobin); TP (Totalprotein); A/G (Albumin-Globulin-Verhältnis); PA (Präalbumin); A (Albumin); α1 (Alpha-1-Globulin); α2 (Alpha-2-Globulin); β (Beta-Globulin); γ (Gamma-Globulin); NK (Negativkontrolle); A. fum. (*Aspergillus fumigatus*); Mittelw. (Arithmetischer Mittelwert); SD (Standardabweichung); Min (Minimum); Max (Maximum); qns (Quantität nicht suffizient, um den Test durchzuführen).

Tabelle 20: Arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung, Minimum- und Maximum-Werte von 18 immaturren Ger-Saker-Hybridfalken vor und 28 Tage nach experimenteller Inokulation mit *A. fumigatus*-Konidien, bestimmt aus Serumproben

	GM	AK	SAA [mg/ml]	HP [mg/ml]	TP [g/dl]	A/G	PA [%]	PA [g/dl]	A [%]	A [g/dl]	$\alpha 1$ [%]	$\alpha 1$ [g/dl]	$\alpha 2$ [%]	$\alpha 2$ [g/dl]	β [%]	β [g/dl]	γ [%]	γ [g/dl]	
Serumproben immaturren Falken vor Inokulation																			
<i>Mittelw.</i>	0.37	1.17	35.1	0.17	3.01	1.33	23.59	0.71	33.19	1.00	3.28	0.10	13.41	0.41	15.86	0.47	10.67	0.33	
<i>SD</i>	0.14	0.32	11.3	0.09	0.51	0.22	2.30	0.11	3.03	0.18	0.73	0.03	2.70	0.14	2.36	0.07	2.17	0.09	
<i>Median</i>	0.40	1.20	35.7	0.17	3.00	1.35	23.94	0.70	32.96	1.01	3.19	0.10	13.34	0.42	15.46	0.49	10.69	0.32	
<i>Min</i>	0.20	0.70	17.8	0.01	2.00	1.01	20.07	0.52	28.58	0.66	2.26	0.06	9.71	0.19	12.65	0.37	6.98	0.14	
<i>Max</i>	0.60	2.00	57.0	0.34	4.00	1.81	26.85	0.92	39.26	1.30	5.03	0.16	18.72	0.67	20.30	0.60	15.03	0.44	
Serumproben immaturren Falken nach Inokulation - Kontrolltiere ausgeschlossen																			
<i>Mittelw.</i>	0.63	1.60	104.5	0.50	4.11	0.88	14.60	0.56	28.71	1.14	3.58	0.14	20.38	0.87	16.78	0.70	15.94	0.69	
<i>SD</i>	0.89	0.23	112.0	0.52	0.98	0.46	7.53	0.25	8.44	0.30	2.02	0.07	8.32	0.49	3.29	0.27	5.10	0.41	
<i>Median</i>	0.30	1.60	34.9	0.31	4.00	0.89	17.56	0.68	30.99	1.26	2.94	0.12	19.40	0.78	16.55	0.65	14.86	0.59	
<i>Min</i>	0.10	1.20	26.8	0.04	3.00	0.20	2.48	0.12	14.34	0.52	1.92	0.08	9.71	0.31	12.74	0.41	9.97	0.30	
<i>Max</i>	3.40	1.90	291.8	1.67	6.00	1.55	23.45	0.79	39.33	1.44	8.47	0.27	34.55	1.93	20.64	1.24	28.44	1.71	

Legende:

Kursive Zahlen zeigen eine Unterschreitung, fett-gedruckte Zahlen eine Überschreitung des Bereiches vor Inokulation mit *A. fumigatus*-Konidien an, GM (Galactomannan); AK (Antikörper); SAA (Serumamyloid A); HP (Haptoglobin); TP (Totalprotein); A/G (Albumin-Globulin-Verhältnis); PA (Präalbumin); A (Albumin); $\alpha 1$ (Alpha-1-Globulin); $\alpha 2$ (Alpha-2-Globulin); β (Beta-Globulin); γ (Gamma-Globulin); Mittelw. (arithmetischer Mittelwert); SD (Standardabweichung); Min (Minimum); Max (Maximum).

4.4.7.2 Versuchsteil B – Juvenile Falken

Zwei Plasmaproben von juvenilen Falken (B1.1, B1.2), welche vor der experimentellen Inokulation (b. i.) entnommen wurden, mussten wegen starker Hämolyse von den Untersuchungen ausgeschlossen werden. Demnach standen 19 Proben zu Versuchsbeginn und 21 Proben am Versuchsende (p. i.) zur Verfügung. Diese 21 Proben verteilten sich auf 3 Kontrolltiere und auf 18 Proben von Falken, die mit *A. fumigatus*-Konidien inokuliert wurden. Neun dieser 18 inokulierten Falken entwickelten im Versuchsverlauf histologisch bestätigte Pilzgranulome.

4.4.7.2.1 *Aspergillus*-Antikörper ELISA

Mittelwerte (\pm SD) der Antikörper (AK)-Indizes stiegen von $1,18 \pm 0,37$ vor Inokulation auf $1,91 \pm 0,21$ nach Inokulation. Bei 95,2 % (20/21) aller Versuchsfalken, inklusive zwei von drei Kontrolltieren, wurde der Cut-off-Index $\geq 1,4$ zum Ende des Versuches überschritten. Dies war allerdings bei sechs dieser Falken bereits zu Versuchsbeginn feststellbar. Damit wurde bei allen neun Falken mit Granulomen, aber auch bei den neun inokulierten Falken ohne Granulome, sowie bei 2/3 Kontrolltieren p. i. der Cut-off-Index überschritten. Folglich lag die Sensitivität des AK-Nachweises bezüglich einer *Intra-vitam*-Detektion einer histologisch bestätigten Aspergillose zwar bei 100 % (77,9 - 100), die Spezifität jedoch lediglich bei 8,3 % (0,2 - 38,5). Es zeigten sich jedoch statistisch signifikante Einflüsse und schwache Korrelationen der Infektionsdosis (ID) auf die p. i.-Werte ($r_s = 0,532$; $p = 0,013$). Ebenso waren signifikant erhöhte AK-Werte p. i. bei Tieren mit nachgewiesenen Granulomen im Vergleich zu Falken ohne Granulome feststellbar ($p = 0,018$).

4.4.7.2.2 *Aspergillus*-Antigen ELISA

Die durchschnittlichen Galactomannan (GM)-Indizes lagen zu Anfang des Versuchs bei $0,24 \pm 0,09$ und veränderten sich im Verlauf nicht merklich ($0,24 \pm 0,07$). Demnach gab es keine signifikante Korrelation der GM-Indizes und der ID ($r_s = 0,179$; $p = 0,436$). Keines der inokulierten Tiere und keines der Kontrolltiere zeigte am Ende des Versuchs GM-Indizes, die über die Ausgangswerte erhöht waren.

Folglich betrug die Sensitivität des GM-Nachweises in Bezug auf eine *Intra-vitam*-Diagnose einer histologisch bestätigten Aspergillose 0 % (0 - 28,3) und die Spezifität 100 % (77,9 - 100 %).

4.4.7.2.3 *Aspergillus*-Toxin Fumigaclavin A (FuA) Nachweis mittels EIA

In keiner der Plasmaproben wurde Fumigaclavin A (FuA) oder dessen Glycosid- bzw. Sulfatkonjugate mit einer Nachweisgrenze von 0,7 ng/ml Plasma detektiert. Die im Anschluss an die pathologische Untersuchung durchgeführte FuA-Untersuchung von Gewebeproben von drei juvenilen Falken (B1.1, B1.2, B1.3), die mit 10^7 *A. fumigatus*-Konidien inokuliert worden waren, lieferte positive EIA-Ergebnisse mit FuA Werten oberhalb des Cut-off Wertes für Gewebe von 1,5 ng/g Gewebe bei allen drei untersuchten Falken (MADELEINE GROß, persönliche Mitteilung).

4.4.7.2.4 Akute-Phase-Proteine

4.4.7.2.4.1 Serumamyloid A

Der arithmetische Mittelwert (\pm SD) von Serumamyloid A (SAA) lag zu Beginn der Versuchsphase bei $28,3 \pm 18,9$ mg/ml und stieg im Versuchsverlauf auf $200,3 \pm 119,7$ mg/ml an. Dabei waren die p. i.-Werte signifikant durch die ID beeinflusst ($r_s = 0,484$; $p = 0,026$). Zum Ende des Infektionsversuchs variierten individuelle SAA-Werte der inokulierten Falken stark zwischen 36 mg/ml und 516,3 mg/ml. Bei 15/18 Tieren wurde 28 Tage nach Inokulation das Maximum der Ausgangswerte überschritten, darunter bei allen neun Falken mit Granulomen. Bei den Kontrolltieren lagen zeitgleich niedrige SAA-Werte zwischen 5 mg/ml und 35,1 mg/ml vor. Somit lag die Sensitivität eines SAA-Anstiegs in Bezug auf einen *Intra-vitam*-Nachweis einer histologisch bestätigten Aspergillose bei 100 % (71,7 - 100) und die Spezifität bei 50 % (21,1 - 78,9). Es gab zudem einen signifikanten Unterschied zwischen Falken mit Granulomen und ohne Granulome ($p = 0,043$).

4.4.7.2.4.2 Haptoglobin

Die durchschnittlichen (\pm SD) Haptoglobin (HP)-Werte lagen zu Versuchsanfang bei $0,27 \pm 0,15$ mg/ml und am Versuchsende bei $1,23 \pm 0,61$ mg/ml, wobei die p. i.-Werte nicht signifikant durch die ID beeinflusst wurden ($r_s = 0,350$; $p = 0,120$). Zum

Ende der Versuchsphase wiesen 15/18 Tiere über die Ausgangswerte erhöhte HP-Werte auf, wobei alle neun Falken mit Granulomen und keine Kontrollvögel darunter waren. Dennoch gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen Falken mit Granulomen und ohne Granulome ($p = 0,385$). Die Sensitivität eines HP-Anstiegs lag bezüglich eines *Intra-vitam*-Nachweises einer histologisch bestätigten Aspergillose bei 100 % (71,7 - 100) und die Spezifität bei 50 % (21,1 - 78,9).

4.4.7.2.5 Plasma-Proteinelektrophorese

4.4.7.2.5.1 Totalprotein

Die Totalprotein (TP)-Konzentration betrug vor der experimentellen Inokulation durchschnittlich $4,11 \pm 1,58$ g/dl und stieg während des Versuchs auf $4,91 \pm 1,59$ g/dl an, wobei keine signifikante Korrelation mit der ID feststellbar war ($r_s = 0,345$; $p = 0,126$). Kein Kontrolltier, aber zwei inokulierte Falken (B1.2, B2.2), welche beide Granulome entwickelten, hatten p. i. deutlich über den maximalen Ausgangswert erhöhte TP-Konzentrationen. Folglich lag die Sensitivität eines TP-Anstieges in Bezug auf eine *Intra-vitam*-Detektion einer histologisch bestätigten Aspergillose bei 11,1 % (0,3 - 48,3) und die Spezifität bei 100 % (77,9 - 100). Ein signifikanter Unterschied zwischen Individuen mit und ohne Granulome zeigte sich aber nicht ($p = 0,346$).

4.4.7.2.5.2 Albumin

Der Gruppenmittelwert der Albuminkonzentration betrug zu Versuchsbeginn $1,45 \pm 0,62$ g/dl, was damit $35,01 \pm 3,85$ % aller Plasmaproteine entsprach. Sowohl die durchschnittliche Albuminkonzentration, als auch der prozentuale Albuminanteil am TP sanken im Versuchsverlauf auf $0,96 \pm 0,32$ g/dl bzw. $22,46 \pm 7,27$ % ab, wobei lediglich die Veränderung des Prozentanteils von Albumin signifikant von der ID beeinflusst wurde ($r_s = -0,657$, $p = 0,001$). Individuell sanken die prozentualen Albuminanteile zum Versuchsende bei 14/18 Tieren, darunter allen neun Falken mit Granulomen unter den Ausgangswert von Albumin vor Inokulation. In Verbindung mit einer *Intra-vitam*-Diagnose einer histologisch bestätigten Aspergillose lagen die Sensitivität der Erniedrigung des Anteils von Albumin am TP und der Albuminkonzentration bei 100 % (71,7 - 100) bzw. 22 % (2,8 - 60,0). Die Spezifitäten beider Parameter lagen diesbezüglich bei 50 % (21,1 - 78,9) bzw. 100 % (77,9 - 100).

Mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Falken mit Granulomen und ohne Granulome für den prozentualen Anteil ($p = 0,006$), aber nicht für die Konzentration von Albumin ($p = 0,218$) festgestellt werden.

4.4.7.2.5.3 Präalbumin

Vor der Inokulation betragen die Präalbumin (PA)-Konzentrationen im Durchschnitt $0,79 \pm 0,39$ g/dl und der prozentuale Anteil von PA an den Plasmaproteinen $18,64 \pm 4,01$ %. Beide Werte sanken während der Versuchsphase auf $0,49 \pm 0,30$ g/dl bzw. $10,18 \pm 5,77$ % ab. Eine signifikante Beeinflussung durch die ID konnte nur für den prozentualen Anteil von PA ($r_s = -0,531$, $p = 0,013$), nicht aber für die PA-Konzentration ($r_s = -0,266$, $p = 0,244$) gezeigt werden. Bei 4/9 inokulierten Falken mit nachgewiesenen Granulomen, aber bei keinem Kontrolltier, unterschritten die individuellen PA-Konzentrationen am Ende des Versuches das Minimum der Ausgangswerte.

Folglich betragen die Sensitivität der Erniedrigung des PA-Anteils am TP und der PA-Konzentration bezüglich eines *Intra-vitam*-Nachweises einer histologisch bestätigten Aspergillose $88,9$ % ($51,8 - 99,7$) bzw. $44,4$ % ($13,7 - 78,8$). Die Spezifitäten beider Parameter lagen diesbezüglich bei $83,33$ % ($51,6 - 99,7$) bzw. $91,7$ % ($61,6 - 99,8$). Mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test konnten signifikante Unterschiede der Konzentration ($p = 0,05$) und des prozentualen Anteils von PA ($p = 0,011$) zwischen Vögeln mit Granulomen und ohne Granulome nachgewiesen werden.

4.4.7.2.5.4 Albumin-Globulin-Verhältnis

Das Verhältnis von Albumin und Globulin (A/G-Verhältnis) lag zum Anfang des Infektionsversuchs durchschnittlich bei $1,20 \pm 0,35$ und sank an dessen Ende auf $0,49 \pm 0,30$ ab. Insgesamt unterschritten individuelle A/G-Verhältnisse p. i. bei 16/18 inokulierten Falken, aber nicht bei den Kontrolltieren, den minimalen Ausgangswert. Dies war auch bei allen neun Falken mit Granulomen der Fall. Somit lag die Sensitivität des A/G-Abfalls in Bezug auf eine *Intra-vitam*-Diagnose einer histologisch bestätigten Aspergillose bei 100 % ($71,7 - 100$) und die Spezifität bei $41,7$ % ($15,2 - 72,3$). Statistisch konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen den p. i.-A/G-Verhältnissen und der ID gezeigt werden ($r_s = -0,639$, $p = 0,002$).

Ebenso waren die A/G-Verhältnisse bei aspergillosepositiven Falken mit bestätigten Granulomen signifikant niedriger als bei Tieren ohne Granulome ($p = 0,005$).

4.4.7.2.5.5 Alpha-1-Globulin

Der Mittelwert der Alpha 1 ($\alpha 1$)-Globulin-Konzentration zu Versuchsbeginn betrug $0,12 \pm 0,09$ g/dl und stellte damit $2,94 \pm 1,61$ % des TP dar. Die durchschnittliche $\alpha 1$ -Konzentration sank im Versuchsverlauf geringgradig auf $0,11 \pm 0,07$ g/dl ab und der prozentuale Anteil von $\alpha 1$ verringerte sich auf $2,12 \pm 0,87$ %. Beide Werte waren nicht signifikant durch die ID beeinflusst ($\alpha 1$ -Konzentration: $r_s = -0,146$, $p = 0,527$; Anteil von $\alpha 1$: $r_s = -0,165$, $p = 0,474$). Bei den meisten Falken blieben die p. i. Werte im Rahmen der Ausgangswerte. Nur bei einem Falken (1/9) mit Granulomen wurde der minimale Ausgangswert für den $\alpha 1$ -Prozentanteil unterschritten. Somit bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Vögeln mit Granulomen und ohne Granulome ($p = 0,363$ bzw. $0,942$). Die Sensitivitäten der Erniedrigung des prozentualen $\alpha 1$ -Anteils am TP und der $\alpha 1$ -Konzentration lagen bezüglich eines *Intra-vitam*-Nachweises einer histologisch bestätigten Aspergillose bei 11,1 % (0,3 - 48,3) bzw. 0 % (0 - 28,3) und die Spezifität beider Parameter bei 100 % (77,9 - 100).

4.4.7.2.5.6 Alpha-2-Globulin

Die Alpha 2 ($\alpha 2$)-Globulin-Konzentration betrug vor der experimentellen Inokulation durchschnittlich $0,47 \pm 0,22$ g/dl und ihr Anteil an den Plasmaproteinen $11,49 \pm 2,47$ %. Beide Durchschnittswerte stiegen zum Ende des Versuchs auf $0,94 \pm 0,69$ g/dl bzw. $18,26 \pm 9,11$ %. Dabei wurde lediglich die $\alpha 2$ -Konzentration ($r_s = 0,45$, $p = 0,041$), nicht aber der prozentuale Anteil von $\alpha 2$ ($r_s = 0,275$, $p = 0,227$), signifikant durch die ID beeinflusst. Individuelle $\alpha 2$ -Konzentrationen überschritten zum Ende der Versuchsphase bei keinem Kontrolltier, aber bei sechs inokulierten Falken die Ausgangswerte, wobei alle sechs Tiere auch Granulome entwickelten. Folglich betrug die Sensitivität des Anstiegs des prozentualen $\alpha 2$ -Anteils am TP bezogen auf eine *Intra-vitam*-Detektion einer histologisch bestätigten Aspergillose 88,9 % (51,8 - 99,7) und der $\alpha 2$ -Konzentration 91,7 % (61,5 - 99,8). Die Spezifität des Anstiegs beider Parameter lag diesbezüglich bei 66,7 % (29,9 - 92,5) bzw. 100 % (77,9 - 100). Signifikante Unterschiede in der Konzentration ($p = 0,007$) und

im prozentualen Anteil von α_2 ($p = 0,009$) zwischen Falken mit und ohne Granulome(n) waren zudem feststellbar.

4.4.7.2.5.7 Beta-Globulin

Der arithmetische Mittelwert der Beta (β)-Globulin-Konzentration lag zu Versuchsanfang bei $0,94 \pm 0,33$ g/dl, was einem prozentualen Anteil von durchschnittlich $23,38 \pm 3,95$ % am TP entsprach. Sowohl die durchschnittliche Konzentration, als auch der prozentuale Anteil von β stiegen im Verlauf der Versuchsphase auf $1,31 \pm 0,63$ g/dl bzw. $26,22 \pm 6,67$ % an, wobei für beide ein signifikanter Zusammenhang mit der ID gezeigt werden konnte (β -Konzentration: $r_s = 0,543$, $p = 0,011$; Anteil von β : $r_s = 0,594$, $p = 0,005$). Einzeltierwerte überstiegen bei keinem Kontrolltier, aber bei 4/9 inokulierten Falken, die Granulome entwickelten, die Spannweite der Ausgangswerte. Folglich betrug die Sensitivität des Anstiegs des prozentualen β -Anteils am TP in Bezug auf einen *Intra-vitam*-Nachweis einer histologisch bestätigten Aspergillose $66,7$ % ($29,9 - 92,5$) und die des Anstiegs der β -Globulin-Konzentration $44,4$ % ($13,7 - 78,8$). Die Spezifitäten beider Parameter betrug diesbezüglich jeweils 100 % ($77,9 - 100$). Statistisch konnten signifikante Unterschiede für die β -Konzentration ($p = 0,031$) und für den prozentualen β -Anteil am TP ($p = 0,002$) zwischen Tieren mit Granulomen und ohne Granulome demonstriert werden.

4.4.7.2.5.8 Gamma-Globulin

Die durchschnittliche Gamma (γ)-Globulin-Konzentration lag zu Beginn der Versuchsphase bei $0,34 \pm 0,20$ g/dl und machte damit $8,54 \pm 3,92$ % des TP aus. Nach der Inokulation stiegen die γ -Konzentration auf $1,13 \pm 0,56$ g/dl und der γ -Prozentanteil am TP auf $22,75 \pm 8,37$ % an. Dennoch konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen den *p. i.*-Werten von γ und der ID gezeigt werden (γ -Konzentration: $r_s = 0,315$, $p = 0,165$; Anteil von γ : $r_s = 0,236$, $p = 0,303$). Individuelle *p. i.*-Werte überschritten bei 11/18 inokulierten Falken die Ausgangswerte. Darunter befanden sich 7/9 Falken mit Granulomen, aber auch 6/9 Falken ohne Granulome. Somit betrug die Sensitivitäten des Anstiegs des prozentualen Anteils von γ am TP sowie der γ -Globulin-Konzentration bezogen auf eine *Intra-vitam*-Diagnose einer histologisch bestätigten Aspergillose jeweils

77,8 % (40,0 - 97,2). Die Spezifität der Anstiege beider Parameter betrug diesbezüglich 33,3 % (9,9 - 65,1) bzw. 50 % (21,1 - 78,9).

Ein signifikanter Unterschied wurde für die γ -Konzentration ($p = 0,503$) und den prozentualen γ -Anteil am TP ($p = 0,376$) zwischen Falken mit Granulomen und ohne Granulome nicht nachgewiesen.

Die Ergebnisse der Serumuntersuchung für die juvenilen Falken werden in Tabelle 21 und als Prä- und Post-Inokulations-Werte dargestellt.

Die Durchschnittswerte (Mean) mit Standardabweichungen (SD), die Medianwerte sowie die Spanne (Range) mit Minimum- (Min) und Maximumwerten (Max) für diese Parameter vor und nach der Inokulation werden in Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 21: Werte für Akute-Phase-Proteine, Anti-Aspergillus Antikörper-Indizes sowie Plasmaproteinfraktionen, bestimmt in den Plasmaproben von 21 juvenilen Ger-Saker-Hybridfalken vor und 28 Tage nach experimenteller Inokulation mit *A. fumigatus*-Konidien

	L	ELISA		APP				EPH											
		GM	AK	SAA [mg/ml]	HP [mg/ml]	TP [g/dl]	A/G	PA [%]	PA [g/dl]	A [%]	A [g/dl]	α1 [%]	α1 [g/dl]	α2 [%]	α2 [g/dl]	β [%]	β [g/dl]	γ [%]	γ [g/dl]
Mean		0.24	1.18	28.3	0.27	4.11	1.22	18.64	0.79	35.01	1.45	2.94	11.49	0.47	23.38	0.94	8.54	0.34	0.34
SD		0.09	0.37	18.9	0.15	1.58	0.35	4.01	0.39	3.85	0.62	1.61	0.09	0.22	3.95	0.33	3.92	0.20	0.20
Median		0.20	1.20	18.1	0.22	4.00	1.07	18.70	0.64	34.36	1.26	2.39	0.09	0.44	23.86	0.89	7.77	0.29	0.29
Min		0.20	0.70	10.2	0.12	1.80	0.82	11.76	0.27	28.09	0.54	1.08	0.03	0.21	14.41	0.37	1.38	0.07	0.07
Max		0.50	1.70	64.9	0.62	7.20	2.12	27.11	1.64	43.36	2.57	7.78	0.39	1.06	29.42	1.66	15.09	0.78	0.78
B 7.2	-	0.2	1.3	27.7	0.3	3	1.31	21.58	0.65	35.21	1.06	2.32	0.07	0.43	18.64	0.56	7.85	0.24	0.24
B 7.4	-	0.2	1.5	5	0.41	4.4	1.19	19.76	0.87	34.56	1.52	2.38	0.1	0.41	20.04	0.88	14.06	0.62	0.62
B 7.5	-	0.2	1.6	35.1	0.39	2	0.96	12.99	0.26	36.07	0.72	2.59	0.05	0.34	19.88	0.4	11.36	0.23	0.23
B 1.1	+	0.2	2.2	221.8	0.73	3.6	0.13	2.65	0.1	9.07	0.33	2	0.07	22.58	0.81	40.45	1.46	23.26	0.84
B 1.2	+	0.4	1.9	132.4	1.1	6	0.38	6.62	0.4	21	1.26	1.42	0.09	24.6	1.48	31.13	1.87	15.23	0.91
B 1.3	+	0.4	2.2	206.4	0.82	2.8	0.21	3.33	0.09	13.99	0.39	2.04	0.06	23.16	0.65	28.99	0.81	28.5	0.8
B 2.1	+	0.2	2	193.1	1.55	5.2	0.41	11.37	0.59	17.64	0.92	1.85	0.1	25.37	1.32	29.64	1.54	14.12	0.73
B 2.2	+	0.2	1.9	516.3	2.75	8	0.2	3.31	0.26	13.04	1.04	1.01	0.08	34.06	2.72	37.5	3	11.08	0.89
B 2.3	-	0.2	2	181.1	1.46	6.8	0.49	14.17	0.96	18.88	1.28	4.59	0.31	8.74	0.59	20.27	1.38	33.36	2.27
B 3.1	+	0.2	2.1	268.9	1.54	7.6	0.25	4.35	0.33	15.56	1.18	2.93	0.22	28.83	2.19	30.26	2.3	18.07	1.37
B 3.2	-	0.2	1.6	298.9	2	5.4	0.39	8.21	0.44	19.7	1.06	2.22	0.12	14.18	0.77	18.69	1.01	37.01	2
B 3.3	+	0.2	1.8	148.9	1.1	4.6	0.66	14.85	0.68	25	1.15	2.96	0.14	8.75	0.4	21.94	1.01	26.5	1.22
B 4.1	-	0.2	1.7	229.8	1.6	5.2	0.55	15.69	0.82	19.71	1.02	1.6	0.08	6.13	0.32	22.81	1.19	34.05	1.77
B 4.2	+	0.2	2	312.9	1	4	0.27	6.7	0.27	14.85	0.59	3	0.12	30.21	1.21	29.4	1.18	15.85	0.63
B 4.3	-	0.2	1.5	36	0.34	3	1.23	19.32	0.58	35.93	1.08	1.14	0.03	14.27	0.43	19.92	0.6	9.43	0.28
B 5.1	-	0.3	2.2	41.1	0.41	3.4	0.81	14.71	0.5	30.15	1.02	1.16	0.04	9.64	0.33	24.85	0.84	19.5	0.66
B 5.2	-	0.3	1.7	156.6	1.17	5	0.64	12.74	0.64	26.29	1.31	1.77	0.09	7.69	0.38	22.83	1.14	28.67	1.43
B 5.3	-	0.2	1.8	61	0.5	2.2	0.91	19.06	0.42	28.57	0.63	2.59	0.06	12.45	0.27	20.78	0.46	16.55	0.36
B 6.1	-	0.2	1.8	186	1.58	5.6	0.47	9.8	0.55	22.25	1.25	2.07	0.12	13.99	0.78	19.04	1.07	32.84	1.84
B 6.2	-	0.3	1.9	77.5	0.83	4.6	0.71	14.72	0.68	26.67	1.23	2.19	0.1	13.53	0.62	19.72	0.91	23.17	1.07
B 6.3	+	0.2	2.1	337.3	1.65	5.4	0.13	1.66	0.09	9.99	0.54	1.63	0.09	30.58	1.65	33.78	1.82	22.37	1.21

Legende: Kursive Zahlen zeigen eine Unterschreitung, fett-gedruckte Zahlen eine Überschreitung des Referenzbereiches (Ref) an, 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³ und 10² geben die jeweilige Inokulationsdosis von *A. fumigatus*-Konidien an. ELISA (Indirekter, enzymgekoppelter Immunsorptions-test); APP (Akute-Phase-Proteine); EPH (Proteinelektrophorese); L (Läsionen); + (Granulomnachweis positiv); - (Granulomnachweis negativ); GM (Galactomannan); AK (Antikörper); SAA (Serumamyloid A); HP (Haptoglobin); TP (Totalprotein); A/G (Albumin-Globulin-Verhältnis); PA (Präalbumin); A (Albumin); α1 (Alpha-1-Globulin); α2 (Alpha-2-Globulin); β (Beta-Globulin); γ (Gamma-Globulin); NK (Negativkontrolle); A. fum. (*Aspergillus fumigatus*); Mittelw. (Arithmetischer Mittelwert); SD (Standardabweichung); Min (Minimum); Max (Maximum); qns (Quantität nicht suffizient, um den Test durchzuführen).

Tabelle 22: Arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung, Minimum- und Maximum-Werte von 21 juvenilen Ger-Saker-Hybridfalken vor und 28 Tage nach experimenteller Inokulation mit *A. fumigatus*-Konidien, bestimmt aus Plasmaproben

GM	AK	SAA [mg/ml]	HP [mg/ml]	TP [g/dl]	A/G	PA [%]	PA [g/dl]	A [%]	A [g/dl]	$\alpha 1$ [%]	$\alpha 1$ [g/dl]	$\alpha 2$ [%]	$\alpha 2$ [g/dl]	β [%]	β [g/dl]	γ [%]	γ [g/dl]	
Plasmaproben juveniler Falken vor Inokulation																		
<i>Mean</i>	0.24	1.18	28.3	0.27	4.11	1.20	18.64	0.79	35.01	1.45	2.94	0.12	11.49	0.47	23.38	0.94	8.54	0.34
<i>SD</i>	0.09	0.37	18.9	0.15	1.58	0.35	4.01	0.39	3.85	0.62	1.61	0.09	2.47	0.22	3.95	0.33	3.92	0.20
<i>Median</i>	0.20	1.20	18.1	0.22	4.00	1.07	18.70	0.64	34.36	1.26	2.39	0.09	11.86	0.44	23.86	0.89	7.77	0.29
<i>Min</i>	0.20	0.70	10.2	0.12	1.80	0.82	11.76	0.27	28.09	0.54	1.08	0.03	7.29	0.21	14.41	0.37	1.38	0.07
<i>Max</i>	0.50	1.70	64.9	0.62	7.20	2.12	27.11	1.64	43.36	2.57	7.78	0.39	16.11	1.06	29.42	1.66	15.09	0.78
Plasmaproben juveniler Falken nach Inokulation – Kontrolltiere ausgeschlossen																		
<i>Mean</i>	0.24	1.91	200.3	1.23	4.91	0.49	10.18	0.47	20.46	0.96	2.12	0.11	18.26	0.94	26.22	1.31	22.75	1.13
<i>SD</i>	0.07	0.21	119.7	0.61	1.59	0.30	5.77	0.25	7.27	0.32	0.87	0.07	9.11	0.69	6.67	0.63	8.37	0.56
<i>Median</i>	0.20	1.90	189.6	1.14	5.10	0.44	10.59	0.47	19.71	1.05	2.02	0.09	14.23	0.71	23.84	1.16	22.77	0.99
<i>Min</i>	0.20	1.50	36.0	0.34	2.20	0.13	1.66	0.09	9.07	0.33	1.01	0.03	6.13	0.27	18.69	0.46	9.43	0.28
<i>Max</i>	0.40	2.20	516.3	2.75	8.00	1.23	19.32	0.96	35.93	1.31	4.59	0.31	34.06	2.72	40.45	3.00	37.01	2.27

Legende: Kursive Zahlen zeigen eine Unterschreitung, fett-gedruckte Zahlen eine Überschreitung des Bereiches vor Inokulation mit *A. fumigatus*-Konidien an. GM (Galactomannan); AK (Antikörper); SAA (Serumamyloid A); HP (Haptoglobin); TP (Totalprotein); A/G (Albumin-Globulin-Verhältnis); PA (Präalbumin); A (Albumin); $\alpha 1$ (Alpha-1-Globulin); $\alpha 2$ (Alpha-2-Globulin); β (Beta-Globulin); γ (Gamma-Globulin); Mean (Arithmetischer Mittelwert); SD (Standardabweichung); Min (Minimum); Max (Maximum).

4.4.7.3 Zusammenfassung der Ergebnisse beider Versuchsteile

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Serumdiagnostik zunächst für die Gruppe der immaturen und die der juvenilen Falken separat zusammengefasst und danach im Gruppenvergleich zusammenfassend gegenübergestellt.

Bei den immaturen Falken im Versuchsteil A waren die Werte für Haptoglobin (HP) signifikant durch die Infektionsdosis beeinflusst. Ein solcher Zusammenhang konnte nicht für den *Aspergillus*-Antikörper-ELISA, den *Aspergillus*-Antigen-ELISA mit Galactomannan (GM) oder die Messung von Serumamyloid A (SAA) gezeigt werden. Bezüglich der Proteinelektrophorese waren das Albumin-Globulin-Verhältnis (A/G-Verhältnis), die Konzentrationen von Alpha-2 (α 2)-, Beta (β)- und Gamma (γ)-Globulinen sowie die prozentualen Anteile von Albumin, Präalbumin (PA), α 2-, β - und γ -Globulin am Totalprotein (TP) signifikant durch die Infektionsdosis beeinflusst. Ein signifikanter Einfluß konnte ebenfalls bezüglich der Konzentration von PA mittels der einfachen und der multiplen Regressionsanalyse gezeigt werden, der jedoch durch die Berechnung des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman nicht bestätigt wurde. Die Konzentrationen von TP, Albumin und Alpha-1 (α 1)-Globulin sowie der prozentuale Anteil von α 1-Globulin am TP waren hingegen nicht signifikant durch die Infektionsdosis beeinflusst.

Beim Vergleich von immaturen Falken mit und ohne Granulome gab es signifikante Unterschiede in den SAA- und den HP-gehalten. Diese Unterschiede fehlten bei den Ergebnissen des *Aspergillus*-Antikörper-ELISAs und des *Aspergillus*-Antigen-ELISA. Bezüglich der Proteinelektrophorese waren das A/G-Verhältnis, die Konzentrationen von PA, α 1-, α 2-, β - und γ -Globulin sowie die prozentualen Anteile von Albumin, PA, α 2- und γ -Globulin am TP signifikant unterschiedlich zwischen Tieren mit Granulomen und ohne Granulome. Allerdings waren die Konzentrationen des TPs und des Albumins sowie die prozentualen Anteile von α 1-, und β -Globulin am TP nicht signifikant unterschiedlich.

Bei den juvenilen Falken im Versuchsteil B wurden die Werte des *Aspergillus*-Antikörper-ELISA und von SAA signifikant durch die Infektionsdosis beeinflusst, während HP und die Werte des *Aspergillus*-Antigen-ELISA dies nicht wurden. Bezüglich der Proteinelektrophorese waren das A/G-Verhältnis, die Konzentrationen von α 2- und

β -Globulinen sowie der prozentuale Anteil von Albumin, PA und β -Globulin am TP signifikant durch die Infektionsdosis beeinflusst. Die Konzentrationen von TP, Albumin, PA, α 1- und γ -Globulin sowie der prozentuale Anteil von α 1-, α 2- und γ -Globulinen am TP waren hingegen nicht signifikant durch die Infektionsdosis beeinflusst.

Beim Vergleich von juvenilen Falken mit Granulomen und ohne Granulome gab es signifikante Unterschiede in den SAA- und den *Aspergillus*-Antikörper-ELISA-Ergebnissen. Diese Unterschiede fehlten bei den Ergebnissen von HP und dem *Aspergillus*-Antigen-ELISA. Bezüglich der Proteinelektrophorese waren das A/G-Verhältnis, die Konzentrationen von PA, α 2- und β -Globulinen sowie die prozentualen Anteile von Albumin, PA, α 2- und β -Globulinen am TP signifikant unterschiedlich zwischen Tieren mit Granulomen und ohne Granulome. Allerdings waren die Konzentrationen von TP, Albumin, α 1- und γ -Globulinen sowie die prozentualen Anteile von α 1- und γ -Globulinen am TP nicht signifikant unterschiedlich.

Bei Betrachtung der oben als signifikant berechneten Serumdiagnostika stiegen die Anti-*Aspergillus*-Antikörper-Indizes, die Konzentrationen von SAA, α 2- und β -Globulinen und die prozentualen Anteile von α 2- und β -Globulinen am TP im Zuge einer Aspergillose an. Das A/G-Verhältnis sowie die prozentualen Anteile von Albumin und PA am TP sanken im Gegensatz dazu im Zuge einer Aspergillose ab.

Bezogen auf beide Altersgruppen, war der Anstieg bzw. Abfall sowohl bei immaturren als auch bei juvenilen Tieren bezüglich der Anti-*Aspergillus*-Antikörper-Indizes, der Konzentrationen von SAA, HP, α 2- und γ -Globulinen, des A/G-Verhältnisses sowie der prozentualen Anteile von PA, Albumin, α 2- und γ -Globulinen am TP sensitiv für eine Aspergillose (Sensitivität ≥ 75 %). Dies traf zudem für die Konzentrationen des TP und der β -Globuline zu, allerdings in beiden Fällen nur für die Gruppe der immaturren Falken. Bei immaturren und juvenilen Falken lag eine Spezifität ≥ 75 % für Aspergillose bezogen auf den Anstieg bzw. den Abfall von GM und TP, die prozentualen Anteile von PA, α 1-, α 2-, β -Globulinen am TP sowie die Konzentrationen von Albumin, α 1-, α 2-, β -Globulinen vor. Dies traf nur für die immaturren Falken zudem für SAA und HP sowie für das A/G-Verhältnis und den prozentualen Anteil von Albumin und γ -Globulin am TP zu, während es nur bei den juvenilen Falken auch auf die Konzentrationen von PA zutraf.

Zusammenfassend über beide Altersgruppen wurden also sowohl bei immaturen als auch bei juvenilen Falken lediglich das A/G-Verhältnis, die Konzentrationen von α 2- und β -Globulinen sowie der prozentuale Anteil von Albumin, PA und β -Globulin am TP signifikant durch die Infektionsdosis beeinflusst. Dabei unterschieden sich alle genannten Parameter mit Ausnahme des prozentualen Anteils von β -Globulin signifikant zwischen Tieren mit Granulomen und ohne Granulome in beiden Altersgruppen. Dies traf zudem für den SAA-Gehalt sowie den prozentualen Anteil von α 2-Globulin am TP zu, während sich die Konzentration von PA nur knapp nicht signifikant unterschied ($p = 0,055$).

Die Ergebnisse der statistischen Untersuchungen zur Detektion potenzieller Einflüsse der Infektionsdosis und der Ausgangswerte auf die Blutparameter nach Inokulation bei immaturen und juvenilen Falken befinden sich in Tabelle 23.

Statistische Untersuchung potenzieller Unterschiede zwischen inokulierten Falken mit und ohne Granulome mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test werden in Tabelle 24 dargestellt.

Einen Überblick über die veränderten Blutwerte aus Serum-/Plasmaproben von immaturen und juvenilen Falken nach Inokulation sowie über die Sensitivität und Spezifität der einzelnen Tests und Parameter befindet sich in Tabelle 25.

Tabelle 23: Ergebnisse der multiplen und der einfachen Regressionsanalyse und des Rangkoeffizienten nach Spearman (r_s), um die Einflüsse der Infektionsdosis (ID) und der Ausgangswerte (prä) auf die Blutparameter 28 Tage nach Inokulation von *Aspergillus fumigatus*-Konidien bei Falken zu untersuchen

	GM	AK	SAA [mg/ml]	HP [mg/ml]	TP [g/dl]	A/G	PA [%]	PA' [g/dl]	A [%]	A [g/dl]	α_1 [%]	α_1 [g/dl]	α_2 [%]	α_2 [g/dl]	β [%]	β [g/dl]	Y [%]	Y [g/dl]
Multiple Regressionsanalyse zur Untersuchung des Einflusses der Ausgangswerte (prä-inokulation) und der Infektionsdosis auf die Werte am Versuchsende (p-Werte)																		
ID (imm)	0,210	0,12	0,15	0,09	0,13	0,01	0,02	0,05	0,4	0,54	0,24	0,02	0,03	0,01	0,02	0,19	0,18	
prä (imm)	0,210	0,37	0,81	0,74	0,77	0,1	0,56	0,63	0,69	0,6	0,18	0,32	0,94	0,28	0,11	0,56	0,7	
ID (juv)	0,120	0,03	0,08	0,07	0,06	0,01	0,06	0,44	0,58	0,34	0,15	0,28	0	0,05	0,03	0,18	0,27	
prä (juv)	0,400	0,49	0,54	0,48	0,28	0,79	0,52	0,13	0,76	0,23	0,77	0,57	0	0,16	0,3	0,49	0,99	
Einfache Regressionsanalyse zur Untersuchung des Einflusses der Infektionsdosis auf die Werte am Versuchsende (p-Werte)																		
ID (imm)	0,198	0,055	0,105	0,066	0,112	0,005	0,12	0,044	0,033	0,384	0,497	0,242	0,013	0,024	0,01	0,025	0,137	0,136
ID (juv)	0,192	0,01	0,035	0,069	0,101	0,002	0,01	0,255	0,001	0,312	0,977	0,268	0,1	0,077	0,005	0,02	0,346	0,274
Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman zur Untersuchung des Einflusses der Infektionsdosis auf die Werte am Versuchsende (oben: r_s, unten: p-Wert)																		
ID (imm)	0,133	0,466	0,311	0,665	0,484	-0,745	-0,785	-0,554	-0,621	-0,205	-0,269	0,5188	0,731	0,686	0,65	0,782	0,701	0,681
ID (juv)	0,636	0,08	0,326	0,02	0,111	0,005	0,003	0,062	0,031	0,524	0,398	0,084	0,007	0,014	0,022	0,003	0,01	0,015
	0,179	0,532	0,484	0,35	0,345	-0,639	-0,531	-0,266	-0,657	-0,179	-0,165	0,146	0,275	0,45	0,594	0,543	0,236	0,315
	0,436	0,013	0,026	0,12	0,126	0,002	0,013	0,244	0,001	0,438	0,474	0,527	0,227	0,041	0,005	0,011	0,303	0,165

Legende: GM (Galactomannan); AK (Antikörper); SAA (Serumamyloid A); HP (Haptoglobin); TP (Totalprotein); A/G (Albumin-Globulin-Verhältnis); PA (Präalbumin); A (Albumin); α_1 (Alpha-1-Globulin); α_2 (Alpha-2-Globulin); β (Beta-Globulin); γ (Gamma-Globulin); juv (juvener); imm (immatur); juv (juvener); ID (Infektionsdosis); prä (Ausgangswert, vor Inokulation); die fett-gedruckten p-Werte zeigen statistisch signifikante Einflüsse auf die Blutwerte am Versuchsende an.

Tabelle 24: Untersuchung potenzieller Unterschiede zwischen inokulierten Falken mit Granulomen und inokulierten Falken ohne Granulome 28 Tage nach Inokulation von *Aspergillus fumigatus*-Konidien mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test

	GM	AK	SAA [mg/ml]	HP [mg/ml]	TP [g/dl]	A/G	PA [%]	PA [g/dl]	A [%]	A [g/dl]	α 1 [%]	α 1 [g/dl]	α 2 [%]	α 2 [g/dl]	β [%]	β [g/dl]	γ [%]	γ [g/dl]
Immature Falken	0,130	0,597	0,042	0,011	0,103	0,017	0,011	0,05	0,027	0,497	0,734	0,024	0,007	0,007	0,089	0,042	0,017	0,033
Juvenile Falken	0,697	0,018	0,043	0,385	0,346	0,005	0,011	0,055	0,006	0,218	0,942	0,363	0,009	0,007	0,002	0,031	0,376	0,503

Legende: GM (Galactomannan); AK (Antikörper); SAA (Serumamyloid A); HP (Haptoglobin); TP (Totalprotein); A/G (Albumin-Globulin-Verhältnis); PA (Präalbumin); A (Albumin); α 1 (Alpha-1-Globulin); α 2 (Alpha-2-Globulin); β (Beta-Globulin); γ (Gamma-Globulin); die fett-gedruckten p-Werte zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen für die einzelnen Untersuchungen an.

Tabelle 25: Überblick über die veränderten Blutwerte aus Serum-/Plasmaprobe von immaturren und juvenilen Falken nach Inokulation mit *A. fumigatus*-Konidien

GM	AK	SAA [mg/ml]	HP [mg/ml]	TP [g/dl]	A/G	PA [%]	PA [g/dl]	A [g/dl]	A [%]	α1 [%]	α1 [g/dl]	α2 [%]	α2 [g/dl]	β [%]	β [g/dl]	γ [%]	γ [g/dl]
Serumproben immaturren Falken nach Inokulation (Pfeile: Anzahl der Proben mit Erhöhung/Erniedrigung; Prozentzahlen: Sensitivität/Spezifität bezogen auf die Histologie)																	
Inokulierte Histo pos (n=4); Sensitivität	2 ↑	4 ↑	3 ↑	3 ↑	4 ↓	4 ↓	2 ↓	3 ↓	1 ↓	1 ↓	2 ↓	4 ↑	4 ↑	1 ↑	3 ↑	3 ↑	4 ↑
Inokulierte Histo neg (n= 8 bzw. 5)	1 ↑	1 ↓	0	1 ↑	2 ↓	3 ↓	0	1 ↓	0 ↓	2 ↑	0	1 ↑	2 ↑	0	2 ↑	1 ↑	3 ↑
Kontrolltiere (n=3)	0	2 ↑	0	0	0	1 ↑	0	1 ↑	0 ↓	1 ↑	0	0	0	0	0	0	2 ↑
Spezifität	90,9%	18,2%	100%	87,5%	75%	62,5%	100%	87,5%	100%	100%	100%	100%	75%	100%	75%	87,5%	37,50%
Plasmaproben juveniler Falken nach Inokulation (Pfeile: Anzahl der Proben mit Erhöhung/Erniedrigung; Prozentzahlen: Sensitivität/Spezifität bezogen auf die Histologie)																	
Inokulierte Histo pos (n=9); Sensitivität	0	9 ↑	9 ↑	1 ↑	9 ↓	8 ↓	4 ↓	9 ↓	2 ↓	1 ↓	0 ↓	8 ↑	6 ↑	6 ↑	4 ↑	7 ↑	7 ↑
Inokulierte Histo neg (n=9)	0	9 ↑	6 ↑	0	7 ↓	2 ↓	0	6 ↓	0	0	0	0	0	0	0	8 ↑	6 ↑
Kontrolltiere (n=3)	0	2 ↑	1 ↓	0	0	0	1 ↓	0	0	0	0	1 ↑	0	0	0	0	0
Spezifität	100%	8,3%	50,0%	100%	58,3%	83,3%	91,7%	50%	100%	100%	100%	91,7%	100%	100%	100%	33,3%	50%
Serum- bzw. Plasmaproben aller Falken nach Inokulation (Pfeile: Anzahl der Proben mit Erhöhung/Erniedrigung; Prozentzahlen: Sensitivität/Spezifität bezogen auf die Histologie)																	
Inokulierte Histo pos (n=13); Sensitivität	2 ↑	13 ↑	12 ↑	4 ↑	13 ↓	12 ↓	6 ↓	12 ↓	3 ↓	2 ↓	2 ↓	12 ↑	10 ↑	7 ↑	7 ↑	10 ↑	11 ↑
Inokulierte Histo neg (n= 17 od. 14)	1 ↑	1 ↓	6 ↑	7 ↑	9 ↓	5 ↓	0	7 ↓	0	0	0	1 ↑	2 ↑	0	2 ↑	9 ↑	9 ↑
Kontrolltiere (n=6)	0	4 ↑	1 ↓	0	0	0	1 ↓	0	0	0	0	1 ↑	0	0	0	0	2 ↑
Spezifität	95,7%	13,04%	70,0%	65,0%	95,0%	55,0%	95,0%	65,0%	100% (↓)	100%	100%	95,0%	95,0%	100%	95,0%	55,0%	45,0%

Legende: Die Pfeile zeigen ein Überschreiten (↑) oder ein Unterschreiten (↓) der Werte nach Inokulation im Vergleich zu Cut-off-Werten oder Vergleichsbereichen vor Inokulation an. Die fettgedruckten Werte liegen über 75 %. Histo pos (histologisch bestätigte Aspergillose); Histo neg (ohne histologische Bestätigung der Aspergillose); od. (oder); GM (Galactomannan); AK (Antikörper); SAA (Serumamyloid A); HP (Haptoglobin); TP (Totalprotein); A/G (Albumin-Globulin-Verhältnis); PA (Präalbumin); A (Albumin); α1 (Alpha-1-Globulin); α2 (Alpha-2-Globulin); β (Beta-Globulin); γ (Gamma-Globulin); n (Probenanzahl; bei zwei durch ein od. getrennten Zahlen bezieht sich die vordere, höhere Zahl auf die Messungen von GM und Ak und die hintere, niedrigere Zahl auf SAA-, HP- und die Proteinmessungen, weil das Serumvolumen nicht ausreichte um alle Untersuchungen mit der gleichen Probenanzahl durchführen zu können).

4.4.8 Bestimmung der minimalen Infektionsdosis

4.4.8.1 Versuchsteil A – Immature Falken

Über die Anwendung der logistischen Regression im Programm BMDP5E wurden für die immaturren Falken die $MID_{10} (\pm S.E.) = 10^{4,52 \pm 1,09}$, die $MID_{50} (\pm S.E.) = 10^{6,02 \pm 0,54}$ und die $MID_{90} (\pm S.E.) = 10^{7,50 \pm 0,92}$ berechnet, wobei die Ergebnisse der pathologischen, histologischen und mykologischen Untersuchungen in die Berechnungen einfließen. Dieses Ergebnis blieb unverändert, wenn als aspergillosepositiv nur die Fälle in die Berechnung integriert wurden, in denen eine Aspergillose definitiv per Histologie bestätigt wurde.

Da bei einem Tier, bei dem eine Aspergillose histologisch bestätigt wurde, die mykologische Anzucht aber scheiterte, änderte sich die Berechnung geringfügig, wenn nur mykologisch bestätigte Fälle als aspergillosepositiv gewertet wurden. So ergaben sich minimale Änderungen zu einer $MID_{10} (\pm S.E.) = 10^{4,55 \pm 0,84}$, einer $MID_{50} (\pm S.E.) = 10^{6,54 \pm 0,70}$ und einer $MID_{90} (\pm S.E.) = 10^{8,56 \pm 1,50}$.

Da jedoch im Vorfeld die Histologie als ausschlaggebendes Bestätigungsverfahren definiert wurde, wurden erstgenannte Werte im Folgenden für Berechnungen verwendet und weiter verglichen.

4.4.8.2 Versuchsteil B – Juvenile Falken

Die Berechnung der MID erfolgte auf gleiche Weise wie im Versuchsteil A, wobei durch eine optimierte Gruppenszusammenstellung und die gleichmäßigere Verteilung der Inokulationsdosen zwischen 10^2 und 10^7 die MID mittels logistischer Regression (Maximale Wahrscheinlichkeitsanalyse) genauer bestimmt werden konnte.

Für die Gruppe der juvenilen Falken wurden somit eine $MID_{10} (\pm S.E.) = 10^{1,85 \pm 1,16}$, eine $MID_{50} (\pm S.E.) = 10^{4,14 \pm 0,62}$ sowie eine $MID_{90} (\pm S.E.) = 10^{6,45 \pm 1,13}$ ermittelt. Wenn als aspergillosepositiv nur die Fälle in die Berechnung integriert wurden, in denen eine Aspergillose definitiv per histologischer und mykologischer Untersuchung bestätigt wurde, so ergaben sich geringfügige Änderungen zu einer $MID_{10} (\pm S.E.) = 10^{1,95 \pm 1,26}$, einer $MID_{50} (\pm S.E.) = 10^{4,52 \pm 0,67}$ und einer $MID_{90} (\pm S.E.) = 10^{7,09 \pm 1,33}$.

4.4.8.3 Statistischer Vergleich der immaturen und der juvenilen Falken

Zum Vergleich der MIDs der immaturen und der juvenilen Falken wurde der asymptotische t-Test auf Basis der im logistischen Modell geschätzten MIDs in Verbindung mit deren Standardfehler genutzt. Hierdurch war ein statistisch signifikanter Unterschied nur für die MID₅₀ nachweisbar ($p = 0,0309$). Dies wies die juvenilen Falken als signifikant empfindlicher aus als die immaturen Falken. Die MID₁₀ ($p = 0,0748$) und MID₉₀ ($p = 0,4859$) unterschieden sich hingegen nicht signifikant, allerdings verlief die Kurve im Randbereich (von 10 % bzw. 90 %) der logarithmischen Funktion auch sehr flach, da dort der Standardfehler auf Grund der limitierten Anzahl an Beobachtungen groß wurde.

4.4.8.4 Umrechnung der minimalen Infektionsdosis auf eine Umgebungskonzentration

Setzt man nun die niedrigste MID der empfindlichsten Altersgruppe (MID₁₀ juveniler Falken) mit dem maximalen Atemzeitvolumen von Präriefalken in Relation kann eine Umgebungskonzentration mit der zugehörigen Expositionszeit berechnet werden, ab der die empfindlichste Gruppe der Falken potenziell erkranken (Maximaler Sicherheitsbereich). Demnach wurde das maximale Atemzeitvolumen in Kubikmetern pro Stunde (h) ($= 0,0431 \text{ m}^3/\text{h}$) bzw. in Kubikmetern pro Tag (d) ($= 1,0332 \text{ m}^3/\text{d}$) und die MID₁₀ = $10^{1,95}$ Koloniebildende Einheiten (KbE) bzw. $\sim 89,1251$ KbE) in eine Formel eingesetzt.

$$\text{Umgebungskonzentration/Stunde} = \frac{89,1251 \text{ KBE}}{0,0431 \text{ m}^3/\text{h}} = 2.067,87 \frac{\text{KBE}}{\text{m}^3} * 1 \text{ h}$$

$$\text{Umgebungskonzentration/Tag} = \frac{89,1251 \text{ KbE}}{1,0332 \text{ m}^3/\text{d}} = 86,26 \frac{\text{KBE}}{\text{m}^3} * 1 \text{ d}$$

Um bei maximaler Atemrate $\sim 89,1251$ KbE mit der Umgebungsluft aufzunehmen, müsste ein Falke über eine Stunde eine Umgebungskonzentration von $2.067,87 \text{ KbE}/\text{m}^3$ bzw. über einen Tag eine Umgebungskonzentration von $86,26 \text{ KbE}/\text{m}^3$ einatmen.

Zur Berücksichtigung eines im Tagesverlauf zeitweise auf Grund von Flugaktivität 12-fach erhöhten Atemzeitvolumens, werden zwei Stunden Flugzeit pro Tag in eine Formel eingesetzt.

$$\frac{\text{Umgebungskonzentration (Flug)}}{\text{Tag}} = \frac{89,1251 \text{ KBE}}{\left(\left(22 * 0,0431 \frac{\text{m}^3}{\text{h}} \right) + \left(12 * 2 * 0,0431 \frac{\text{m}^3}{\text{h}} \right) \right)} = 44,95 \text{ KBE/m}^3$$

$$\frac{\text{Umgebungskonzentration (Flug)}}{\text{Stunde}} = \frac{44,95 \text{ KBE/m}^3}{\frac{1}{24}} = 44,95 \frac{\text{KBE}}{\text{m}^3} * 24 \text{ h} = 1.078,89 \frac{\text{KbE}}{\text{m}^3} * 1 \text{ h}$$

Bei Berücksichtigung einer anteiligen Flugaktivität reduzierten sich dieser Wert auf eine Konzentration von 1.078,89 KbE/m³ über eine Stunde bzw. 44,95 KbE/m³ über einen Tag.

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die experimentelle Ermittlung einer minimalen Infektionsdosis von *Aspergillus fumigatus*-Sporen bei Großfalken, mit welcher nach einmaliger, intratrachealer Inokulation eine Aspergillose induziert werden kann. Auf diesem Wert basierend sollten Haltungsempfehlungen für Großfalken formuliert und Grenzwerte für Schimmelpilzsporenexpositionen in Greifvogel-haltungen festgelegt werden. Diese sollen die Unterbringung und das Management der Haltung dieser Tiere optimieren. Durch weitere Untersuchungen sollte eine potenzielle Altersabhängigkeit der Aspergillose bei Falken überprüft werden, wobei insbesondere Empfindlichkeitsunterschiede zwischen juvenilen und immaturren Großfalken im Fokus standen.

Im Anschluss an eine experimentelle Infektion mit *A. fumigatus*-Konidien sollte die Entwicklung möglicher klinischer Symptome über 28 Tage nach Inokulation verfolgt sowie die hämatologischen, serumdiagnostischen, pathologischen, histopathologischen und immunhistochemischen Befunde einer Aspergillose erhoben werden. Hierdurch sollte eine Aspergillose besser charakterisiert und daraus ableitend deren *Intra-vitam*-Diagnostik verbessert werden. Diesbezüglich wurde ein besonderer Fokus auf die Hämatologie, die Serum-/Plasma-Proteinelektrophorese sowie die Bestimmung von Akute-Phase-Proteinen, Anti-*Aspergillus*-Antikörpern, *Aspergillus*-Antigenen und *Aspergillus*-Toxinen gelegt. Dadurch sollte der Einsatz dieser diagnostischen Methoden bei Falken erprobt bzw. optimiert, die Früherkennung der Aspergillose verbessert und somit die Initiation einer frühzeitigen Therapie sowie eine Verbesserung der therapeutischen Prognose ermöglicht werden.

5.1 Ermittlung einer minimalen Infektionsdosis von *A. fumigatus*-Konidien und Untersuchung von altersspezifischen Empfänglichkeitsunterschieden

Als Versuchstiere wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Ger-Hybridfalken gewählt, da diese in der kommerziellen Falkenzucht regelmäßig gezüchtet und international vielfach verkauft werden (HEIDENREICH et al., 1993). Die exemplarische Untersuchung dieser Tiere spiegelt somit die aktuelle wirtschaftliche und veterinärmedizinische Situation gut wider. Zudem erschienen sie als Versuchstiere für die

durchgeführten Experimente sehr geeignet, da sie als Falken aus nordischen Regionen neben Merlinen und deren Hybriden als besonders anfällig für eine Aspergillose gelten (BAILEY, 2008, DEEM, 2003, FORBES, 1991, HEIDENREICH, 2013a, JOSEPH, 2000, MÜLLER, 2009, NALDO UND SAMOUR, 2004, REDIG, 1993, REDIG, 2007). Somit können Ger-Hybridfalken sozusagen als eine Sentinelart unter den Greifvögel angesehen werden. Das Alter der untersuchten Tiere entsprach dem gängigen Verkaufsalter (immature Falken) bzw. dem Alter, in dem häufig Infektionen (juvenile Falken) in den Zuchtbetrieben auftreten (HEIDENREICH, 2013a, REDIG, 1980b). Als Alternative zu den hier eingesetzten Hybriden hätten artreine Ger- oder Sakerfalken ebenfalls für diese Versuche verwendet werden können. Der Einsatz von Hybriden war aber möglich, da keine potenzielle Beeinflussung der Ergebnisse durch eine Hybridisierung zu befürchten war. Hybridisierungen zwischen Ger- und Sakerfalken treten tatsächlich regelmäßig in der Natur auf, ohne dass es dabei zu einer erhöhten Morbidität oder Mortalität kommt (ELLIS, 1995, NITTINGER et al., 2007, PFANDER, 1998, SEIBOLD et al., 1993, WINK et al., 2004). Auch in klinischen Fallberichten finden sich keine Hinweise auf eine vergleichsweise höhere oder niedrigere Anfälligkeit von Hybridfalken für eine Aspergillose im Vergleich zu artreinen Individuen (BAILEY, 2008). Hybriden sind jedoch für Artenschutzprojekte oder Erhaltungszuchtprogramme als Zuchttiere ungeeignet und darüber hinaus sind gezüchtete Hybridfalken auf Grund ihrer Häufigkeit für solche Versuche verfügbar. Die Ergebnisse und Erkenntnisse dieser Arbeit können damit zwar nicht ohne hinterfragt zu werden auf reine Gerfalken, Sakerfalken oder andere Falkenarten übertragen werden, jedoch bieten sie geeignete Orientierungswerte für Großfalken.

Bisherige experimentelle Studien zur aviären Aspergillose verfolgten unterschiedliche Zielsetzungen. Im Vordergrund stand dabei meistens die sichere Induktion der Aspergillose bei den gewählten Versuchstieren, um nachfolgend entweder die pathologischen und histologischen Veränderungen (ATASEVER UND GÜMÜŞSOY, 2004, BEERNAERT et al., 2008, ELMUBARAK UND FADLELMULA, 1991, FEMENIA et al., 2007, GÜMÜŞSOY et al., 2004, HERMAN UND SLADEN, 1958, JULIAN UND GORYO, 1990, KUNKLE UND RIMLER, 1996, REDIG, 1980b, RICHARD et al., 1973, RICHARD UND THURSTON, 1983, TAYLOR UND BURROUGHS, 1973) oder die Ansatzpunkte einer medikamentösen Behandlung einer Aspergillose zu erforschen (BEERNAERT et al., 2009a, BEERNAERT et al., 2009c, FORBES et al., 1992, GÜMÜŞSOY

et al., 2004, TELL et al., 2010, VAN CUTSEM et al., 1989, WLAZ et al., 2015). Nur wenige Arbeitsgruppen richteten den Fokus auf altersspezifische Empfänglichkeitsunterschiede (AUSTWICK, 1969, BEERNAERT et al., 2008, KUNKLE UND RIMLER, 1996) und lediglich in einer Studie wurde bisher eine Infektionsdosis bei Vögeln, in diesem Fall bei Wachteln, in Form der letalen Dosis 50 % (LD₅₀) berechnet. Hier wurden die dosisabhängigen Veränderungen durch eine Infektion mit *Aspergillus fumigatus* und die krankheitsauslösende Mindestmenge an aufzunehmenden Schimmelpilzkonidien untersucht (CHAUDHARY UND SADANA, 1988).

In der vorliegenden Arbeit wird der erste Infektionsversuch bei Großfalken mit *Aspergillus fumigatus*-Konidien dargestellt. Es ist zudem die erste Studie, welche die Ermittlung einer minimalen Infektionsdosis von *Aspergillus*-Konidien bei Greifvögeln zum Ziel hat. Da auf Grund dieser Zielsetzung eine exakte Quantifizierung der applizierten Konidienmenge erforderlich war, schloss sich eine experimentelle Inokulation über die Inhalation eines pilzsporenhaltigen Aerosols in Inhalationskammern von vornherein aus. Diese Inokulationsmethode hätte zwar die natürliche, aerogene Infektion am besten nachgestellt und wäre vergleichsweise wenig invasiv gewesen, hätte aber keine Möglichkeit der genauen Quantifizierung der individuell aufgenommenen Sporendosis und somit keine Möglichkeit der Ermittlung einer minimalen Infektionsdosis von Pilzsporen ermöglicht (FEMENIA et al., 2007). In bisherigen Studien, bei deren Durchführung Inhalationskammern zur Infektion von Vögeln genutzt wurden, fehlen genaue Angaben zur applizierten Pilzsporenmenge (JULIAN UND GORYO, 1990, O'MEARA UND CHUTE, 1959, RICHARD et al., 1981, RICHARD UND THURSTON, 1983, TAYLOR UND BURROUGHS, 1973). Bei vergleichenden Studien an Eintagsküken von Hühnern, Wachteln und Puten finden sich zwar gemittelte Angaben zur Expositionsdosis, diese wurden jedoch lediglich einmalig am Ende der Expositionsphase durch Messung eines kommerziellen Luftprobensammlers bestimmt (GHORI UND EDGAR, 1973). In einzelnen Telexperimenten dieser Studie war mit dieser Technik allerdings teilweise keine Ermittlung der Expositionsdosis möglich (GHORI UND EDGAR, 1973). In anderen Untersuchungen finden sich Angaben über die Sporenmenge, die über zehn Minuten in eine Inhalationskammer hineingegeben wurde, jedoch ohne Kontrollmessungen aus verschiedenen Bereichen der Kammer (RICHARD et al., 1981, RICHARD et al., 1984). Daraus folgt, dass keine Aussage über die Kontinuität

und die gleichmäßige Verteilung der Sporenexposition während des Versuches gemacht werden konnte. Belegmessungen aus verschiedenen Bereichen der Inhalationskammer und zu verschiedenen Expositionszeitpunkten wären jedoch für eine Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Daten erforderlich gewesen. Inwiefern eine gleichmäßige Sporenkonzentration während der gesamten Expositionsphase und in allen Bereichen der Inhalationskammer gegeben war, bleibt somit unbekannt. Dabei erscheint die technische Umsetzung einer gleichmäßigen Sporenkonzentration bei verschiedenen Expositionsdurchläufen, nach wiederholtem Öffnen der Inhalationskammertüren und bei unterschiedlichen Lüftungsraten generell schwierig, sodass eine Standardisierung der Infektionsdosis in der Inhalationskammer kaum möglich zu sein scheint (FEMENIA et al., 2007). Unabhängig davon kann selbst bei genau festgelegter und konstanter Expositions-dosis innerhalb der Inhalationskammer nicht angegeben werden, welches Tier welche Sporenmenge tatsächlich inhaliert hat. Dies müsste über die individuelle Atemfrequenz und das individuelle Atemzugvolumen (= Tidalvolumen) während der jeweiligen Expositionszeit je Tier einzeln berechnet werden, was wiederum fehleranfällig und schwer umsetzbar erscheint. Ein weiterer Punkt, der gegen die Verwendung von Inhalationskammern spricht, ist ein potenzielles Expositions- und Infektionsrisiko für das wissenschaftliche Personal (REDIG, 1980b). Somit ist die Verwendung von Inhalationskammern arbeitsschutzrechtlich abzulehnen. Aus den oben genannten Gründen wurden Inhalationskammern in der vorliegenden Studie nicht zur Inokulation der Pilzkonidien gewählt.

Die Nutzung der intratrachealen Inokulation ermöglichte hingegen eine genaue Quantifizierung der applizierten Konidienmenge. Diese Methode wurde in vorangegangenen Studien bei Enten (GRACZYK et al., 1998), Wachteln (CHAUDHARY UND SADANA, 1988, GÜMÜŞSOY et al., 2004, TELL et al., 2010, WLAZ et al., 2015), Staren (ATASEVER UND GÜMÜŞSOY, 2004), Tauben (BEERNAERT et al., 2008), Puten, Breitflügel- und Rotschwanzbussarden (REDIG, 1980a, REDIG, 1980b) bereits erfolgreich angewendet. Somit lagen nur für diese Inokulationsroute Erfahrungen an Greifvögeln (REDIG, 1980a, REDIG, 1980b) und mit exakten Inokulationsdosisberechnungen vor (CHAUDHARY UND SADANA, 1988). Zwar zeigten vergleichende Studien (BEERNAERT et al., 2008, FEMENIA et al., 2007, KANE UND ZAMANI, 2014), dass zur sicheren experimentellen Induktion der Aspergillose die Inokulation

in den kranialen Thorakalluftsack noch besser geeignet gewesen wäre. Der Fokus in diesen Studien mit Luftsackinokulation lag dabei jedoch explizit auf einer sicheren Induktion der Aspergillose als Ausgangspunkt für therapeutische Folgestudien und nicht auf einer Bestimmung der hierzu erforderlichen Konidiendosis. So wurde in keiner dieser Studien eine minimale Infektionsdosis ermittelt. Die Luftsackinokulation bot außerdem im Gegensatz zur intratrachealen Inokulation keine Möglichkeit der experimentellen Verfolgung der natürlichen Infektionsroute über die oberen Atemwege (Trachea und Bronchien). Desweiteren ist die Luftsackapplikation (BEERNAERT et al., 2008, FEMENIA et al., 2007, KUNKLE UND RIMLER, 1996, KUNKLE et al., 1999, PEDEN UND RHOADES, 1992) im Vergleich zur intratrachealen Applikation als invasiver anzusehen, da hierzu Haut, Muskulatur und Luftsack eröffnet werden müssen. Ähnliches gilt für die intrapulmonale (BEERNAERT et al., 2008, PERELMAN, 1993), die intravenöse (ELMUBARAK UND FADLELMULA, 1991, VAN CUTSEM et al., 1989) und die intraperitoneale (OKOYE UND OKEKE, 1986) Inokulation, welche alle invasiv sind und vom natürlichen Infektionsweg abweichen. Für die Durchführung einer intratrachealen Applikation waren hingegen keine Punktionen oder Inzisionen notwendig. Zudem wurde im Gegensatz zu etablierten intratrachealen Infektionsmodellen bei Hühnern (ANTÃO et al., 2008) die tiefe intratracheale Inokulation bei den Falken unter Allgemeinanästhesie durchgeführt, um zusätzlich Stress für die Tiere zu vermeiden sowie Abwehr- und Hustenreflexe der Tiere zu unterbinden. Zusammenfassend erschien demnach die intratracheale Inokulation im Hinblick auf die Zielsetzung der Studie und unter Abwägung infektionsmedizinischer, experimenteller, arbeitsschutz- und tierschutzrechtlicher Gegebenheiten am besten geeignet und wurde deshalb als Inokulationsroute für die vorliegende Studie gewählt. Die Auswertbarkeit des Versuches und die statistisch als signifikant ermittelten, infektionsdosisabhängigen Ergebnisse belegen die Anwendbarkeit des vorliegenden Infektionsmodells.

Bei der Festlegung einer einmaligen intratrachealen Inokulationsdosis von *A. fumigatus*-Konidien für Falken konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf keine Erfahrungen aus Infektionsversuchen bei dieser Tierart zurückgegriffen werden. Es finden sich zwar einzelne Fallbeschreibungen bei Falken, die im Anschluss an eine erhöhte Sporenexposition durch Einstreuwechsel, Erntearbeiten oder Volierenreinigung akut an Aspergillose verstarben (REDIG, 1980b, 2007), aber

in diesen Berichten fehlen Angaben zur Höhe der Sporenkonzentration in der Umgebungsluft. Studien bei anderen Vogelfamilien weisen darauf hin, dass es deutliche familiäre und teils tierartliche Unterschiede in der Empfänglichkeit gegenüber einer Infektion mit Schimmelpilzsporen zu geben scheint (COLWELL et al., 1973, GHORI UND EDGAR, 1973). Daher ist familien- bzw. speziesspezifische Forschung als notwendig anzusehen. In Ermangelung von speziesspezifischen Vergleichsstudien musste für die Auswahl der Inokulationsdosen bei Falken auf Erfahrungen aus Studien bei anderen Vogelspezies zurückgegriffen werden. Aus Versuchen mit Rotschwanz- und Breitflügelbussarden gab es einzelne quantitative Orientierungswerte für Greifvögel. Allerdings waren diese Versuche deutlich anders aufgebaut, da sie nicht die Ermittlung einer minimalen Infektionsdosis sondern die Verbesserung der Aspergillosediagnostik mittels Untersuchung der Immunantwort auf einen Kontakt mit *A. fumigatus* zum Ziel hatten (REDIG, 1980a, REDIG, 1980b). Somit waren die Werte aus diesen Versuchen nur eingeschränkt übertragbar. Präzise Angaben zu experimentell bestimmten Infektionsdosen finden sich lediglich bei Wachteln (CHAUDHARY UND SADANA, 1988).

Zur Dosisermittlung wurden im Versuchsteil A Konidienkonzentrationen von $2,25 \times 10^3$, $1,89 \times 10^5$ und $2,5 \times 10^7$ KbE/0,5 ml Inokulat pro Falke gewählt. Damit wurden die Werte der normalen Umgebungskonzentration in Innenräumen von 10^2 Konidien/m³ Umgebungsluft überschritten (AULT UND SCHOTT, 1994), die in Vorversuchen bei Puten keinerlei klinische, pathologische oder histologische Aspergillosebefunde zur Folge hatten (REDIG, 1980b). Andererseits sollte bei den circa 1 kg schweren Falken eine intratracheale Inokulationsmenge von 10^8 *A. fumigatus*-Konidien/kg Körpergewicht unterschritten werden, da diese mit einer Mortalität von 100 % bei Puten assoziiert war (REDIG, 1980b). Auch Erfahrungen aus anderen Studien bestätigen, dass einmalige intratracheale Inokulationsmengen von mehr als 10^7 *A. fumigatus*-Konidien mit einer 100 %-igen Mortalität bei unterschiedlichen Vogelarten verbunden waren und deshalb im Rahmen der vorliegenden Fragestellung als Obergrenze nicht überschritten werden sollten (GÜMÜŞSOY et al., 2004, REDIG, 1980b). Basierend auf den Erfahrungen aus dem Versuchsteil A, wurde unter Berücksichtigung einer möglichen, höheren Empfindlichkeit von juvenilen Tieren und vor allem, um den mittleren Dosisbereich zwischen 10^3 und 10^6 *A. fumigatus*-Konidien besser untersuchen zu können, die Graduierung im Versuchsteil B feiner gewählt. Dementsprechend wurden alle

Dosisstufen von 10^2 bis 10^7 *A. fumigatus*-Konidien abgedeckt, nämlich $1,50 \times 10^2$, $0,80 \times 10^3$, $0,66 \times 10^4$, $0,88 \times 10^5$, $0,78 \times 10^6$ und $1,20 \times 10^7$ KbE/0,5 ml Inokulat.

Um sicherzustellen, dass eine einmalige experimentelle Inokulation einer definierten Konidiendosis bei den immaturren und den juvenilen Hybridfalken eine Aspergillose induziert, und diese nicht durch andere Faktoren hervorgerufen wird, wurden etwaige Kontaminationen und begünstigende Faktoren bestmöglich ausgeschlossen. Hierzu wurde beginnend mit der Aufzucht im Herkunftsbetrieb bis zur Unterbringung in den Versuchsräumen auf eine Minimierung von krankheitsbegünstigenden Faktoren geachtet. So wurden die Falken unter Standardbedingungen aufgezogen und gehalten (KÜSPERT et al., 1993) und schonend an den Menschen gewöhnt, wobei etablierte, falknerische Methoden zum Einsatz kamen (SCHÖNEBERG, 2009). Hierdurch wurden ein möglichst stressarmes Handling sowie ein stressarmer Transport der Tiere für den Versuch umgesetzt. Dies geschah vor dem Hintergrund, dass Stress bei nicht an den Menschen gewöhnten Wildvögeln eine prädisponierende Rolle für eine Aspergillose zugeschrieben wurde (KAPLAN et al., 1975, REDIG, 1980b). Inwiefern Stress aber in der vorliegenden Arbeit trotzdem einen Einfluss hatte, kann abschließend nicht genau beurteilt werden, da dieser durch diese Vorbereitungsmaßnahmen zwar minimiert aber sicher nie völlig ausgeschlossen werden kann. Die geringgradige Leukozytose, die in der hämatologischen Untersuchung bei sechs Falken vor Versuchsbeginn festgestellt wurde, könnte eventuell als Folge von geringgradigem Stress während des Transports und der Untersuchungen der Tiere interpretiert werden. Andererseits kann es sich hier auch um Zufallsbefunde handeln, da im Vergleich zu speziesspezifischen Referenzwerten für Großfalken (WERNERY et al., 2004a) auch erhöhte Leukozytengehalte bei gesunden, nicht gestressten Falkennestlingen (DEL PILAR LANZAROT et al., 2001) nachgewiesen wurden. Zum Ausschluss aspergillosebegünstigender Co-Infektionen wurden ein Befall der Versuchstiere mit Parasiten bereits im Zuchtbetrieb überwacht und regelmäßige parasitologische Kotuntersuchungen sowie Entwurmungen durchgeführt. Klinisch waren die Tiere bei Versuchsbeginn unauffällig und in den Voruntersuchungen fanden sich keine Hinweise auf Vorerkrankungen oder organische Anomalien.

Um eine Infektion durch ubiquitär vorkommende Aspergillussporen in der Umgebungsluft der Versuchsräume auszuschließen, wurden diese gründlich gereinigt, mehrfach mit Sprüh- und Rauchgas-Desinfektionsmitteln desinfiziert und ein Luftfiltersystem zur Reduktion der Sporenbelastung in der Raumluft eingesetzt. Die Sporenkonzentration in der Raumluft während der Versuche lag durchschnittlich zwischen $91,43 \pm 32,70$ KbE/m³ und $117,14 \pm 65,84$ KbE/m³. Unter Verwendung der für weibliche Präriefalken angegebenen Atemvolumina bei Raumtemperatur (19 - 21 °C) und dieser in der Raumluft gemessenen *A. fumigatus*-Konidienkonzentrationen kann eine tägliche Sporenaufnahme von 13 - 41 Konidien/Tag/Falke aus der Umgebungsluft der Versuchsräume geschätzt werden. Zur Berechnung der täglichen Sporenaufnahme der Ger-Saker-Hybridfalken muss dabei auf Daten von verwandten und ähnlich großen, weiblichen Präriefalken (KAISER UND BUCHER, 1985) zurückgegriffen werden, da bei Gerfalken spezifische Studien fehlen und Atemvolumina starke familienspezifische Schwankungen aufweisen können (SCHEID UND PIIPER, 1987, SCHMIDT-NIELSEN, 1997). Diese Konidienmenge löste bei keinem der Kontrolltiere eine klinische Erkrankung oder pathologisch-anatomische sowie histologische Läsionen aus. Insgesamt lag die Konidienkonzentration in der Raumluft der Versuchsräume damit im Rahmen der üblichen Sporenkonzentration in Innenräumen von 135 KbE/m³ (JOVANOVIC et al., 2001) bzw. < 175 KbE/m³ Luft (AULT UND SCHOTT, 1994). Zum Vergleich lagen diese Werte weit unter Messungen in Geflügelställen im Frühling, bei denen Sporenkonzentrationen von bis zu 2060 KbE/m³ Luft gemessen wurden (AULT UND SCHOTT, 1994). Allerdings überschritten sie auch Ergebnisse aus Berichten über deutlich geringere Sporenkonzentrationen, die in Tauben und Geflügelställen zwischen 3 ± 1 KbE/m³ und 43 ± 24 KbE/m³ Luft betragen (VANHEE et al., 2009, VANHEE et al., 2010). Gleichzeitig lag die Sporenkonzentration in den Versuchsräumen aber auch im Bereich der üblichen Außenluftkonzentration für *Aspergillus* spp. in verschiedenen Regionen Deutschlands, Dänemarks und den USA: Diese variierten von 10 (0 - 52) KbE/m³ über 55 (10 - 109) KbE/m³ (TRAUTMANN et al., 2005), 145 KbE/m³ (JOVANOVIC et al., 2001) und 150 KbE/m³ bis hin zu 204 KbE/m³ Luft (AULT UND SCHOTT, 1994). Somit kann zusammenfassend festgestellt werden, dass die Konidienlast in der Raumluft der besetzten

Versuchsräume durch die durchgeführten Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen im Bereich der üblichen Umgebungskonzentration gehalten werden konnte, die bei keinem Kontrollfalken zur Ausbildung einer Aspergillose führte.

Im Anschluss an den Versuch wurde das experimentell, intratracheal inokulierte *A. fumigatus*-Isolat K125 mit allen aus den Versuchstieren rückgewonnenen Isolaten mittels etablierter Mikrosatelliten-Längenpolymorphismus-Methoden verglichen (VAN WAEYENBERGHE et al., 2011). Es war bei allen Falken ein mit dem experimentellen Inokulum K125 identisches Reisolat nachweisbar. Damit kann das hier genutzte Infektionsmodell für eine gezielte Induktion einer Aspergillose als geeignet angesehen werden.

Zusätzlich wurde bei einem immaturren Tier (A1.5) in den Luftsäcken auch ein anderer *A. fumigatus*-Genotyp detektiert. Da dieser aus makroskopisch sichtbaren und histopathologisch bestätigten Aspergilloseläsionen isoliert wurde, kann von einer Sekundär- oder Superinfektion ausgegangen werden. Eine ähnliche Co-Infektion mit mehreren Schimmelpilzisolaten wurde bereits bei Weißstörchen beschrieben, wobei keine Aussage über eine synergistische Wirkung der verschiedenen Isolate getroffen wurde (OLIAS et al., 2011a, OLIAS et al., 2011b). Im vorliegenden Fall erscheint eine gegenseitige Begünstigung der beiden *A. fumigatus*-Stämme jedoch wahrscheinlich, da die Sporenbelastung der Umgebungsluft alleine nicht ausreichte, um eine Aspergillose bei den Kontrolltieren zu induzieren. Es kann hier aber keine abschließende Aussage über den Grad einer potenziellen Beteiligung von Sekundärisolaten am Krankheitsgeschehen getroffen werden.

Bei einem juvenilen Falken (B3.1) fand sich ebenfalls ein vom Inokulum abweichender, zusätzlicher *A. fumigatus*-Genotyp in der Nase. Hier waren weder klinische Symptome noch makroskopisch-pathologisch oder histologisch nachweisbare Läsionen feststellbar. Aus allen Läsionen innerhalb der Körperhöhle dieses Tieres war ausschließlich das Inokulum K125 nachweisbar. Deswegen kann in diesem Fall von einer Kontamination mit Sporen aus der Umgebungsluft bzw. bei der Probenentnahme ausgegangen werden, die kurz vor dem Tod des Tieres oder eventuell erst während der pathologischen Untersuchung stattgefunden hat. Eine genaue Quelle des abweichenden Isolates konnte nicht identifiziert werden.

Mit der intratrachealen Inokulation von *A. fumigatus*-Konidien wurden klinische Symptome bei 80 % der immaturen Falken erzeugt, bei denen eine Aspergillose mykologisch und/oder histologisch diagnostiziert wurde nachdem sie mit hohen (10^7 *A. fumigatus*-Konidien) bzw. mittleren (10^5 *A. fumigatus*-Konidien) Konidien-dosen inokuliert worden waren. Diese Symptome entsprachen mit Vomitus, Inappetenz und Grünverfärbungen des Urins den zuvor bei Falken beschriebenen Krankheitsanzeichen einer Aspergillose (BAILEY, 2008). Jedoch zeigte auch ein Falke aus der Gruppe mit der höchsten Inokulationsdosis Erbrechen, ohne dass anschließend eine Aspergillose bestätigt werden konnte. Da Erbrechen, Inappetenz und Grünverfärbung der Exkreme im Rahmen vieler anderer Erkrankungen und durch mehrere Ursachen hervorgerufen werden, können diese Symptome außerhalb des kontrollierten Tierversuches nicht als aspergillosespezifisch angesehen werden (BAILEY, 2008, DAHLHAUSEN, 2006). Sie können allerdings im Rahmen der Routinediagnostik Hinweise auf eine aviäre Aspergillose geben. Ihre Beurteilung muss jedoch mit Vorsicht erfolgen und andere Differentialdiagnosen müssen stets ausgeschlossen werden.

Eine deutliche Dyspnoe fehlte bei den immaturen Falken und nur zeitweise waren ein geringgradiges, atemsynchrones Schwanz- bzw. Flügelwippen, eine geringgradige Bauchatmung sowie ein geringgradig aufgeplustertes Gefieder festzustellen. Da in diesem Versuchsteil jedoch lediglich die Abwesenheit bzw. das Vorhandensein deutlicher klinischer Symptome im Fokus standen, wurde diese minimale Symptomatik nicht weiter ausgewertet. Im Versuchsteil B wurden zur Ermöglichung einer weiterführenden statistischen Auswertung der klinischen Symptome über den 28-tägigen Versuchsverlauf kombinierte Scores in Form eines Dyspnoe-Scores (DS) und eines Klinischen Scores (KS) etabliert. Mittels des DS sollte dabei der Fokus auf zwei häufige Dyspnoeanzeichen (abdominale Atmung und Schwanzwippen) gelegt werden. Mittels des KS sollten neben der Atmung auch die Körperhaltung, das Verhalten, der Aufplusterungsgrad des Gefieders, die Futteraufnahme und das Auftreten von anderen Symptomen (z. B. Erbrechen) bewertet werden. Es zeigte sich, dass ein hoher $DS \geq 0,8$ und ein hoher $KS \geq 3$ ausschließlich bei Falken auftraten, die mit der höchsten Inokulationsdosis infiziert worden waren und bei denen auch nachfolgend eine Aspergillose mykologisch und/oder histologisch bestätigt wurde. Damit erscheint eine deutliche klinische Symptomatik im hohen Scorebereich des DS und des KS als geeigneter Hinweis

auf eine bestehende Aspergillose im Rahmen des kontrollierten Tierversuches. Die Ausprägung der beiden Scores war signifikant abhängig von der eingesetzten Konidiendosis. Dennoch wiesen 6/9 Falken mit bestätigter Aspergillose lediglich einen mittelgradig abweichenden DS (DS 0,6 - 0,7) und drei dieser Tiere zudem einen mittelgradig abweichenden KS (KS 2) auf. Identische Scorewerte traten aber auch bei vielen aspergillosenegativen Falken und den Kontrolltieren auf, sodass keine Abgrenzung zwischen negativen Tieren und erkrankten Falken im unteren und mittleren Scorebereich möglich war. Deshalb erscheint nur eine schwere klinische Symptomatik diagnostisch nutzbar, wobei dann immer eine Abklärung der möglichen Differentialdiagnosen vorgenommen werden muss (BAILEY, 2008, GIRLING, 2005, JONES UND OROSZ, 2000). Außerhalb des Tierversuchs können eine Vielzahl verschiedener Erkrankungen zu Dyspnoe und Abweichungen in Haltung, Verhalten, Aufplusterungsgrad des Gefieders und Fressverhalten führen, die auf Grundlage der klinischen Symptomatik nicht ausgeschlossen werden können. Demnach bestätigen diese Ergebnisse die Aussagen anderer Autoren, dass die Feststellung einer Aspergillose allein basierend auf klinischen Symptomen unsicher ist (FORBES et al., 1992, JONES UND OROSZ, 2000, JOSEPH, 2000).

Mortalität und Euthanasieindikationen lagen bei den immaturren Falken im Versuchsteil A nicht vor. Dies war in Studien bei adulten Tauben (BEERNAERT et al., 2008) und bei Rotschwanzbussarden (REDIG, 1980b) ebenfalls der Fall, bei denen nach intratrachealer Applikation von $0,2 \times 10^8$ bzw. $0,96 - 1,22 \times 10^5$ *A. fumigatus*-Konidien/Tier eine experimentelle Aspergillose ohne Mortalität induziert wurde. Im Gegensatz dazu erkrankten und starben in einer Studie mit Staren 100 % der inokulierten Tiere nach intratrachealer Applikation von $1,35 \times 10^6$ *A. fumigatus*-Konidien/Tier (ATASEVER UND GÜMÜŞSOY, 2004). Auch in Versuchen an Puten wird nach intratrachealer Gabe von 10^5 bzw. 10^8 Konidien/Tier eine höhere Mortalität von 50 % bzw. 88 % beschrieben (REDIG, 1980b). Demnach erscheint die Mortalität bei immaturren Falken nach Applikation einer vergleichbar hohen Konidiendosis ähnlich der bei Tauben und Bussarden, aber auffällig geringer als bei Puten und Staren. Dabei muss jedoch bedacht werden, dass die individuell applizierte Dosis bei Staren und den 300 g schweren Puten bezogen auf das Körpergewicht der Tiere, um ein vielfaches höher gewertet werden müsste, als die gleiche individuell applizierte Dosis bei den circa ein Kilogramm schweren Falken. Demnach könnten diese

Unterschiede rein dosisbedingt sein. Zudem muss bedacht werden, dass eventuell der Beobachtungszeitraum zu gering angesetzt wurde und eine Mortalität eventuell zu einem späteren Zeitpunkt aufgetreten wäre.

Im Versuchsteil B gab es eine euthanasiebedingte Mortalität von 66,7 % bzw. 33,3 % bei den juvenilen Falken aus den beiden Gruppen mit den höchsten Inokulationsdosen (10^7 bzw. 10^6 *A. fumigatus*-Konidien), aber in keiner der anderen Gruppen. Die Mortalität lag damit über der bei zwei Wochen alten Wachteln, bei denen die Mortalität nach Inokulation von $6,25 - 50 \times 10^6$ *A. fumigatus*-Konidien/Tier lediglich 20 % betrug (CHAUDHARY UND SADANA, 1988). Demnach könnte eine höhere Empfindlichkeit von juvenilen Falken im Vergleich zu juvenilen Wachteln vermutet werden. Allerdings wurde in einer anderen Studie mit drei Wochen alten Wachteln nach Inokulation von $0,5 - 5 \times 10^6$ *A. fumigatus*-Konidien/Tier eine Mortalität von 100 % beschrieben (GÜMÜŞSOY et al., 2004), was diese Vermutung wieder relativiert.

Zusammenfassend erscheint demnach die Mortalität bei juvenilen höher als bei immaturren Falken. Die Mortalitäten in beiden Versuchsteilen waren aber mit denen aus Studien bei anderen Vogelarten in jeweils ähnlichen Altersstufen weitestgehend vergleichbar.

Die pathologischen Läsionen bei 4/15 immaturren und 9/18 juvenilen, inokulierten Falken variierten von weiß-gelblichen und käsigen über gelatinöse und knotige bis hin zu konfluierend-diphtheroiden Auflagerungen, teilweise mit flauschigem, pigmentierten Pilzmyzel. Solche Läsionen traten dabei generell im gesamten Respirationstrakt, inklusive Luftröhre, Lunge und Thorakal- sowie Abdominal-luftsäcken auf. Dieses Verteilungsmuster der Läsionen wurde bisher häufig mit einem chronischen Krankheitsverlauf assoziiert, während bei akuten Krankheitsverläufen die Läsionen auf die Lunge und die oberen Atemwege beschränkt bleiben sollten (REDIG, 1993, REDIG, 2007). Luftsackläsionen konnten aber bei Puten auch nach perakuten bzw. akuten Krankheitsverläufen nachgewiesen werden (FEMENIA et al., 2007, KUNKLE UND RIMLER, 1996) und auch bei Wachteln fanden sich Luftsackläsionen bereits 14 Tage nach intratrachealer Inokulation (GÜMÜŞSOY et al., 2004). Deshalb erscheint das Auftreten von Läsionen im gesamten Respirationstrakt bei den Falken im Zuge von akuten und subakuten Krankheitsverläufen nicht ungewöhnlich und ist demnach nicht nur auf chronische Verläufe limitiert.

Bei juvenilen Falken wurden neben dem Respirationstrakt auch andere Organe und Organsysteme, wie Milz, *Bursa cloacalis* und Niere, befallen. Dies deutet auf eine invasive Form der Aspergillose mit kanalikulärer oder hämatogener Ausbreitung oder auf eine Streuung per Abklatschinfektion hin (BARATHIDASAN et al., 2013, CACCIUTTOLO et al., 2009, RICHARD UND THURSTON, 1983). Diese Form wurde beim Menschen vielfach beschrieben (ABAD et al., 2010, BARTON, 2013), während sie bei Vögeln bisher nur beim Himalayageier (*Gyps himalayensis*) explizit nachgewiesen (BARATHIDASAN et al., 2013) und bei Puten pathogenetisch vermutet wurde (OLIAS et al., 2010b).

Es konnte eine direkte Abhängigkeit zwischen der eingesetzten Konidiendosis und der Ausprägung von Schimmelpilzläsionen und mykologischen Reisolaten festgestellt werden. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von Studien bei jungen Puten und Tauben überein (BEERNAERT et al., 2008, RICHARD et al., 1973). So wurden nach intratrachealer Inokulation der höchsten Dosis von 10^7 *A. fumigatus*-Konidien sowohl bei 80 % der immaturen, als auch bei 100 % der juvenilen Falken histologisch bestätigte Aspergilloseläsionen erzeugt. Letztere stimmen mit Nachweisraten bei einwöchigen Puten und 4 - 5 Wochen alten Tauben überein, die nach Inhalation von $\sim 2.6 \times 10^7$ (RICHARD et al., 1973) bzw. nach intratrachealer, intraaerosacculärer und intrapulmonaler Inokulation von 10^8 *A. fumigatus*-Konidien (BEERNAERT et al., 2008) ebenfalls erreicht wurden. Andererseits liegt die Nachweisrate über der bei Eintagsputenküken, bei denen lediglich 60 % der Tiere nach intraaerosacculärer Injektion von 10^7 *A. fumigatus*-Konidien mykologisch bestätigte Läsionen einer Aspergillose entwickelten (FEMENIA et al., 2007).

Nach Inokulation der etwas geringeren Dosis von 10^6 *A. fumigatus*-Konidien entwickelten 66,7 % der juvenilen Falken Granulome. Damit lag die Nachweisrate auf dieser Dosisstufe geringfügig über den Ergebnissen aus Studien bei Puten, in denen 50 % der Tiere nach intratrachealer bzw. intraaerosacculärer Inokulation von 10^6 *A. fumigatus*-Konidien bestätigte Aspergilloseläsionen ausbildeten (HERMAN UND SLADEN, 1958, REDIG, 1980b). Andererseits lag sie unter der bei 21 Tage alten Wachteln, die nach intratrachealer Inokulation von durchschnittlich $2,7 \times 10^6$ *A. fumigatus*-Konidien 100 % betrug (GÜMÜŞSOY et al., 2004). Insgesamt

ist aber der Zusammenhang der Läsionen und der Reisolationsrate mit der Inokulationsdosis tendenziell mit der bei anderen Vogelarten vergleichbar.

Bei zwei immaturen und einem juvenilen Falken, die mit 10^7 bzw. 10^5 *A. fumigatus*-Konidien inokuliert worden waren, wurden noduläre Läsionen festgestellt, aus denen mykologisch keine Erreger reisoliert werden konnten. Eine wahrscheinliche Erklärung hierfür ist eine sterile Infektion nach Bekämpfung und Beseitigung der Pilzerreger im Wirtstier, wie sie auch in Studien mit Puten und Hühnern schon berichtet wurde (FEMENIA et al., 2007, TAYLOR UND BURROUGHS, 1973). Darin konnte kein Pilznachweis aus zuvor klinisch erkrankten Tieren erbracht werden, weshalb diskutiert wurde, ob eine Aspergillose in Einzelfällen auch als selbstlimitierende Erkrankung auftreten kann (FEMENIA et al., 2007, TAYLOR UND BURROUGHS, 1973).

Aspergilloseläsionen bei Falken wichen in den vorliegenden Versuchen histologisch nicht von Aspergilloseläsionen bei anderen Vogelarten wie Tauben, Hühnern, Möwen und Rothühnern ab (BEERNAERT et al., 2010, CACCIUTTOLO et al., 2009, CHUTE UND O'MEARA, 1958, FEMENIA et al., 2007, RICHARD et al., 1973, RICHARD et al., 1981). Histologisch ähnelten sie auch den Läsionen bei Puten nach experimenteller Infektion, die aus einer ringförmigen Ansammlung von heterophilen Granulozyten, Epitheloidzellen, mehrkernigen Riesenzellen und Makrophagen um ein nekrotisches Zentrum mit Konidien und Pilzhyphen bestanden (PEDEN UND RHOADES, 1992). Histologisch können also bei Großfalken die für andere Vogelarten etablierten Nachweismethoden problemlos angewendet werden.

Die exakten, mittels logistischer Regression ermittelten, minimalen Infektionsdosen von *A. fumigatus*-Konidien bei immaturen Falken lagen bei $MID_{10} = 10^{4,52 \pm 1,09}$, $MID_{50} = 10^{6,02 \pm 0,54}$ und $MID_{90} = 10^{7,50 \pm 0,92}$. Unterstützt werden diese Werte dadurch, dass nach Inokulation von 10^7 Konidien 80 % und nach Inokulation von 10^5 Konidien 20 % der immaturen Falken erkrankten. Nach Inokulation von 10^6 Konidien wären demnach 50 % Erkrankte zu erwarten gewesen, was der errechneten MID_{50} entspricht, aber im Versuchsteil A nicht als Inokulationsdosis explizit getestet wurde. Für juvenile Falken konnte im Vergleich zu den immaturen Falken eine signifikant niedrigere minimale Infektionsdosis 50 % ($MID_{50} = 10^{4,52 \pm 0,67}$ *A. fumigatus*-Konidien) ermittelt werden ($p = 0,0309$). Demnach erkrankten vergleichsweise mehr juvenile Falken als immature Falken bei gleicher Konidiendosis, wodurch eine

höhere Empfindlichkeit juveniler Falken ableitbar ist. Für die MID_{10} ($p = 0,0748$) war der Unterschied zu den immaturen Falken knapp und für die MID_{90} deutlich ($p = 0,4859$) nicht signifikant. Dies ist jedoch durch den flachen Verlauf der logarithmischen Funktion im Randbereich von 10 % bzw. 90 % zu erklären, da dort der Standardfehler auf Grund der limitierten Anzahl an Beobachtungen, also der histologisch bestätigten Aspergillosefälle, entsprechend groß war. Um im Randbereich der Kurve einen deutlicheren Unterschied darstellen zu können, hätten mehr Beobachtungen im Bereich der MID_{10} und der MID_{90} liegen müssen. Trotzdem wird beim direkten Vergleich der MID_{10} der immaturen und der MID_{50} der juvenilen Falken deutlich, dass ein Empfindlichkeitsunterschied bestehen musste. Beide waren mit $10^{4,52}$ *A. fumigatus*-Konidien sehr ähnlich, allerdings würden bei dieser Dosis lediglich 10 % der immaturen Falken im Gegensatz zu 50 % der juvenilen Falken erkranken. Dies steht im Einklang mit Studien bei anderen Vogelarten, in denen festgestellt wurde, dass Jungvögel empfindlicher auf Schimmelpilzsporen reagierten als immature Individuen (AUSTWICK, 1969, BEERNAERT et al., 2008). Bei Hühnern etwa lag die Konidiendosis bei Küken circa eine Zehnerpotenz niedriger als bei immaturen Hühnern, um eine Aspergillose experimentell zu induzieren (AUSTWICK, 1969). Bei 4 - 5 Wochen alten Tauben konnte mit einer Infektionsdosis, die bei immaturen Tieren nicht zu einer Erkrankung führte, eine akute Aspergillose experimentell induziert werden. Somit kann auch für Falken eine altersspezifisch höhere Empfindlichkeit bei Jungtieren, im Vergleich zu älteren Tieren angesetzt werden, wie diese auch bei anderen Vogelarten bereits beschrieben wurde (FEMENIA et al., 2007, O'MEARA UND CHUTE, 1959).

Der Vergleich der bei Falken ermittelten MID zu Infektionsdosen in Studien bei anderen Vogelarten ist schwierig, da diese meistens nicht explizit berechnet wurden. So liegen die MID_{50} -Werte juveniler Falken zwar ungefähr im Bereich von Infektionsdosen bei Pekingenten, bei denen $3,5 \times 10^4$ *Aspergillus* spp.-Sporen zu einer histologisch bestätigten Infektion bei 60 % der Tiere führten (GRACZYK et al., 1998), aber in dieser Arbeit wurde keine MID berechnet. In einer Studie bei Wachteln wurden hingegen mit $12,03 \times 10^6$ *A. fumigatus*-Sporen eine letale Dosis 50 % (LD_{50}) als Infektionsdosis ermittelt (CHAUDHARY UND SADANA, 1988). Jedoch kann eine minimale Infektionsdosis 50 % natürlich nicht mit einer letalen Dosis 50 % in direkten Bezug gesetzt werden, zumal da im Versuchsteil A keine Todesfälle

auftraten. Auf Grund solcher methodischer Unterschiede sowie Unterschieden in der Infektionsroute, der Inokulationsdosis oder dem Alter der Versuchstiere, ist ein Vergleich der Ergebnisse mit den Ergebnissen anderer Studien nahezu unmöglich. Ein weiterer Faktor, der die Vergleichbarkeit der Studien untereinander limitiert, ist die Nutzung verschiedener *Aspergillus*-Isolate, welche eine unterschiedliche Virulenz aufweisen können (PEDEN UND RHOADES, 1992). Darum können in der vorliegenden Arbeit lediglich Aussagen bezüglich des verwendeten Isolates K125 getroffen werden. Virulenzunterschiede der Erregerstämme können im Vogelorganismus zu einer unterschiedlichen Morbidität und Mortalität führen. Dies könnte erklären, warum in einigen Studien mit Tauben keine Erkrankung nach Inokulation mit einer im Vergleich hohen Dosis von 10^8 *A. fumigatus*-Konidien erzeugt werden konnte (BEERNAERT et al., 2008), während in einer anderen Studie der gleichen Arbeitsgruppe nach Inokulation mit der gleichen Methode von 10^7 *A. fumigatus*-Konidien klinische Symptome und pathologische Läsionen bei Tauben erzeugt werden konnten (VAN WAEYENBERGHE et al., 2012a). Ähnliche Virulenzunterschiede von *A. fumigatus*-Stämmen wurden zuvor bei Puten (PEDEN UND RHOADES, 1992), Hühnern und Mausmodellen für eine invasive Aspergillose beschrieben (AUFAUVRE-BROWN et al., 1998, MONDON et al., 1996). Andererseits wurde die Bedeutung unterschiedlicher Virulenzen von Pilzisolaten bei Feldinfektionen von Störchen als untergeordnet dargestellt (OLIAS et al., 2011a), sodass ohne weiterführende Untersuchungen und der vergleichenden Verwendung verschiedener Pilzisolate hierüber keine Aussage getroffen werden kann. In diesem Zusammenhang sollte aber bedacht werden, dass unter natürlichen Bedingungen und bei hohen Sporenbelastungen in der Umwelt auch viele verschiedene *Aspergillus*-Genotypen parallel vorliegen können, worunter potenziell virulente Stämme oder ein Zusammenwirken ähnlich virulenter Stämme das Krankheitsgeschehen dominieren (OLIAS et al., 2011b). Da das verwendete Isolat K125 aus einem an Aspergillose erkrankten und nachfolgend verstorbenen Gerfalken isoliert wurde, ist hier von einem Isolat mit einer gewissen Virulenz auszugehen. Demnach sind die in dieser Arbeit ermittelten Werte als Orientierungshilfe wertvoll, auch wenn unter Praxisbedingungen beim Vorliegen virulenterer Isolate oder bei der Kombination mehrerer Isolate die Empfindlichkeit noch durchaus höher liegen könnte.

Die experimentell ermittelten minimalen Infektionsdosen können zur Formulierung von Haltungsempfehlungen sowie zur Festlegung von Grenzwerten für die Belastung mit *A. fumigatus*-Konidien in der Umgebungsluft von Greifvogelhaltungen und somit zum Schutz der Tiere genutzt werden. Hierzu sollten die errechneten MID-Werte auf die jeweiligen Umweltbedingungen übertragen werden. Dabei war es sinnvoll, die ermittelten Werte von juvenilen Falken für diese Berechnung zu verwenden, da sie die empfindlichste Altersklasse repräsentieren. Zudem wurde die Gruppengröße, die Gruppenanzahl sowie die Abstufung der verwendeten Inokulationsdosen im Versuchsteil B zur Berechnung der MID optimiert, wodurch die bei juvenilen Falken gewonnenen Werte als exakter anzusehen sind.

Bei der einmaligen, experimentellen, intratrachealen Inokulation in dieser Arbeit handelte es sich um eine akute Exposition, die von einer wiederholten, chronischen, experimentellen Exposition zu unterscheiden ist, da diese in Ausprägung und Verlauf der Aspergillose deutlich abweichen kann (REDIG, 1980a). Daher erschien es sinnvoll, die ermittelten Werte auf einen begrenzten Expositionszeitraum von einer bzw. 24 Stunden zu übertragen. Die Expositionszeit von einer Stunde entsprach dabei modellhaft einer akuten, einmaligen und kurzen Belastung, wie diese z. B. während Stroh- bzw. Einstreuwechsel vorkommen kann. Diese kurzzeitige Belastung erschien laut Fallbeschreibungen bei Greifvögeln besonders wichtig, da sie einem Großteil der in der Praxis vermuteten Expositionszeiträume vor Ausbrüchen von akuter Aspergillose entspricht (REDIG, 1980b, 2007). Der Expositionszeitraum von 24 Stunden/einem Tag entsprach modellhaft einer kurzzeitigen, temporär-konstanten, aber immer noch auf eine akute Exposition begrenzten Exposition unter Feldbedingungen (z. B. einem Tag mit Erntearbeiten in der Umgebung von Falkenhaltungen).

Um eine Risikoabschätzung für Falken mit größtmöglicher Sicherheit durchzuführen, wurden juvenile Falken als empfindlichste Altersgruppe, die MID₁₀ als niedrigste Infektionsdosis und das höchste angegebene Atemzeitvolumen zur Berechnung der Umgebungskonzentration berücksichtigt, die zur Induktion der Aspergillose inhaliert werden müssten. Diesbezüglich wurde das maximale Atemzeitvolumen von 717,5 ml/min für nah verwandte, weibliche Präriefalken verwendet (KAISER UND BUCHER, 1985), da die Körpermaße und Gewichte dieser Weibchen denen der männlichen Ger-Hybridfalken aus der vorliegenden Studien ähnelten. Jedoch muss in Falkenbeständen bedacht werden, dass weibliche

Gerfalken durchaus doppelt so schwer und so groß wie weibliche Präriefalken werden können, weshalb die hier ermittelten Konzentrationswerte für diese Tiere eventuell auf Grund höherer Atemparameter deutlich tiefer angesetzt werden müssen (FRAPPELL et al., 2001). Bezogen auf die maximale Atemrate von Präriefalken würde die Aufnahme der MID_{10} ($MID_{10} = 10^{1,95}$) eine Inhalation von 2.067 KbE/m^3 Umgebungsluft über eine Stunde bzw. 86 KbE/m^3 Umgebungsluft über 24 Stunden erfordern. Damit wurden durch Nutzung der maximalen Atemrate die starken temperaturbedingten Schwankungen der Atemfrequenz und des Atemzeitvolumens bedacht, die vor allem im Bereich sehr hoher ($> 31 \text{ }^\circ\text{C}$) und niedriger ($< 9 \text{ }^\circ\text{C}$) Außentemperaturen ansteigen (KAISER UND BUCHER, 1985). Dies könnte die deutlich erhöhte Erkrankungsrate während der Sommermonate erklären, da auf Grund der gesteigerten Atemparameter in diesen extremen Temperaturbereichen verhältnismäßig weniger Konidien zur Induktion einer Aspergillose nötig wären als im thermoneutralen Bereich (REDIG, 1993, REDIG, 2007). Hinzukommend begünstigen eine jahreszeitlich vergleichsweise höhere Konidienbelastung während der Sommermonate sowie Aktivitäten mit hoher Sporenexposition (z. B. Mäh- und Erntearbeiten) in dieser Zeit eine Aspergillose zusätzlich (TRAUTMANN et al., 2005). Zusätzlich zur Außentemperatur musste bei der Kalkulation der Konidienkonzentration in der Umwelt eine flugbedingte Erhöhung des Atemminutenvolumens (HART UND ROY, 1966, TORRE-BUENO, 1978) während einer geschätzten Flugzeit von 2 Stunden pro Tag (CRAIG, 1997, HAAK, 1982) berücksichtigt werden. In diesem Fall wären bei Außentemperaturen von $0 - 42 \text{ }^\circ\text{C}$ lediglich 1.079 KbE/m^3 Umgebungsluft über eine Stunde bzw. 45 KbE/m^3 Umgebungsluft über 24 Stunden zur Erreichung der MID_{10} der juvenilen Falken erforderlich. Letztgenannte Sporenkonzentrationen lägen bereits im und teils sogar unter dem Bereich üblicher Sporenkonzentrationen in der äußeren Umgebungsluft, die mit $145 - 204 \text{ KbE/m}^3$ angegeben werden (AULT UND SCHOTT, 1994, JOVANOVIC et al., 2001). Allerdings wurden in neueren Studien deutlich geringere Medianwerte der normalen Umgebungsluftkonzentrationen für *A. fumigatus* ermittelt, die zwischen $5 - 10 \text{ KbE/m}^3$ in den Wintermonaten und $10 - 55 \text{ KbE/m}^3$ in den Sommermonaten betragen und die damit größtenteils überschritten wären (TRAUTMANN et al., 2005). Eine erhöhte Aspergilloserate oberhalb dieser Werte stimmt mit Berichten bei Falken und Steppenmöwen überein, bei denen eine Konzentration von 400 KbE/m^3

Luft (SCHULZ et al., 2007) bzw. 450 - 525 KbE/m³ Luft (NARDONI et al., 2006) mit einer erhöhten Inzidenz von Aspergillose und erhöhter Mortalität assoziiert wurden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bieten zusammenfassend erste Orientierungswerte zur Beurteilung der Relevanz von *A. fumigatus*-Umgebungskonzentrationen für die Entstehung einer Aspergillose bei Falken. Unterhalb der ermittelten Empfehlungswerte sollte es bei gesunden nicht vorbelasteten Falken kaum zu Erkrankungen in einem Bestand kommen. Wenn höhere *A. fumigatus*-Emissionen vorliegen, diese längere Zeit bestehen bleiben oder es zu kurzzeitigen Emissionspeaks kommt, können die Erkrankungszahlen, auch bei völlig gesunden Falken, hingegen deutlich steigen. Gemessene Umweltkonzentrationen können nun mit den in der Literatur angegebenen Atemparametern in Bezug zu den ermittelten MIDs gesetzt werden. Dabei können diese Parameter auch modellhaft zur Risikoberechnung einer maximalen Expositionszeit in einer bestimmten Umwelt genutzt werden. Die ermittelten Werte müssen stets auf Grund von individuellen Variationen des Atemzeitvolumens und diversen Einflussfaktoren auf die Atmung (z. B. Umgebungstemperatur oder Bewegung) interpretiert werden. Diese Einflussfaktoren erklären, dass die Tiere in einem Bestand meist variabel erkranken und die Erkrankungsrate sowohl im Jahresverlauf als auch bezogen auf die jeweiligen Individuen stark schwanken kann.

5.2 *In-vivo*-Diagnostik zur Detektion der Aspergillose

Die *In-vivo*-Diagnose einer aviären Aspergillose gilt gegenwärtig als schwierig, da klinische Symptome oft unspezifisch sind, lange unerkannt bleiben und viele Diagnostika nicht hinreichend in der Vogelmedizin etabliert sind (ARCA-RUIBAL et al., 2006, BURCO et al., 2011, CRAY et al., 2009a, JONES UND OROSZ, 2000). Deshalb ist die Neu- und Weiterentwicklung diagnostischer Methoden und Testsysteme in diesem Bereich notwendig. Durch eine frühere Erkennung der Erkrankung kann potenziell eine frühere Initiation der antimykotischen Therapie und dadurch eine Verkürzung von erkrankungsassoziierten Leiden und Schmerzen sowie eine Reduktion der Mortalität ermöglicht werden (FLACH et al., 1990). Bisher richtete man jedoch nur in wenigen Untersuchungen den Fokus auf eine *Intra-vitam*-Diagnostik einer Aspergillose bei Vögeln (BURCO et al., 2011, CHAUDHARY UND SADANA, 1988,

GRACZYK et al., 1998, GÜMÜŞSOY et al., 2004, PEDEN UND RHOADES, 1992, REDIG, 1980b, RICHARD et al., 1973).

Im Rahmen der klinischen Voruntersuchung wurden konventionelle und etablierte diagnostische Methoden wie die röntgenologische Untersuchung und die endoskopische Laparoskopie (BEERNAERT et al., 2010, DEEM, 2003, JONES UND OROSZ, 2000, JOSEPH, 2000) genutzt, um Vorerkrankungen der Versuchsfalke bestmöglich auszuschließen. Die Endoskopie gilt in Verbindung mit Probenentnahmen für mykologische oder histologische Untersuchungen als die sicherste *Intra-vitam*-Methode, um eine aviäre Aspergillose zu diagnostizieren (BAILEY, 2008, JONES UND OROSZ, 2000, TAYLOR, 1997). Sie stellt allerdings einen invasiven Eingriff dar, der die Durchtrennung von Haut, Muskulatur und Luftsackwand sowie eine Allgemeinanästhesie erfordert. Daher sollten weniger invasive *Intra-vitam*-Methoden zur Untersuchung des Blutes von infizierten Falken, wie die Hämatologie, ein Galactomannan-ELISA, ein Antikörper-ELISA, ein FuA-EIA, elektrophoretische Veränderungen und die Bestimmung von Akute-Phase-Proteinen (APP) im Hinblick auf ihren Nutzen für die Diagnosestellung einer Aspergillose untersucht werden. Diese Methoden wurden hier erstmals anhand von Blutproben evaluiert. Die Daten wurden anschließend mit der Inokulationsdosis, dem Krankheitsbild sowie den Ergebnissen aus pathologischen und histologischen Untersuchungen korreliert. Weiterhin waren ein Vergleich der Parameter vor und nach Inokulation von *A. fumigatus*-Konidien in denselben Tieren und der Vergleich von inokulierten Tieren mit Kontrolltieren möglich.

5.2.1 Hämatologie

Bei 11/18 Falken im Versuchsteil B wurde nach experimenteller Inokulation von *A. fumigatus*-Konidien eine Leukozytose festgestellt, die in 5/18 Fällen mit einer Heterophilie und einer Lymphopenie verbunden war. Dies entspricht den Ergebnissen von Infektionsstudien bei Wachteln (PANDITA et al., 1991) und den bisher in der Literatur mit einer Aspergillose assoziierten, hämatologischen Veränderungen (CAMPBELL UND ELLIS, 2007, JONES UND OROSZ, 2000, PANDITA et al., 1991, PENDL, 2008b). Unter den elf Falken mit Leukozytose waren acht, die granulomatöse Läsionen entwickelten. Damit erscheint eine Leukozytose mit 88,9 % sehr sensitiv für den *Intra-vitam*-Nachweis einer später histologisch bestätigten Aspergillose. Zudem war deren rechnerische Spezifität mit 75 %

ebenfalls hoch. Daher könnte sich die Ausprägung einer Leukozytose als ein Symptom für die Diagnosestellung einer Aspergillose bzw. einer granulomatösen Entzündung eignen. Jedoch wiesen auch drei inokulierte, aber nicht erkrankte Falken und zwei nicht inokulierte Kontrollfalken ebenfalls eine Leukozytose auf, weshalb die Aussage dieses Parameters eher vorsichtig interpretiert werden sollte. Limitierend muss auch bedacht werden, dass eine Leukozytose teils nur auf einen kurzen Zeitraum nach der Infektion beschränkt ist und das Hämatogramm außerhalb dieses Zeitraums unverändert erscheinen kann (PANDITA et al., 1991). Demnach besteht die Gefahr von falsch negativen Testergebnissen. Zudem ist die Entwicklung einer Leukozytose außerhalb dieses kontrollierten Tierversuchs als nicht spezifisch für eine Aspergillose anzusehen, da viele Erkrankungen, u. a. eine Mykobakteriose oder eine Chlamydiose, ebenfalls häufig mit einer Leukozytose einhergehen, die nicht von einer Leukozytose durch Aspergillose unterscheidbar ist (CAMPBELL UND ELLIS, 2007, PENDL, 2008a, b).

Es wurde bei 2 - 17 % der Lymphozyten aus dem Blut der Falken eine Aktivierung festgestellt, die definitionsgemäß durch eine Größenzunahme, eine Verdichtung des nukleären Chromatins und eine Basophilie des Zytoplasmas bestimmt wird und mit einer Stimulation durch erfolgten Antigenkontakt assoziiert zu sein scheint (CAMPBELL UND ELLIS, 2007, PENDL, 2008a, b). Diese Aktivierung steht mit den bisherigen Erkenntnissen zum hämatologischen Bild einer Aspergillose und den Reaktionen auf einen mykotischen Erreger im Einklang, wobei sie auch als Reaktion auf viele andere Infektionserreger beschrieben wurde und somit nicht als aspergillosespezifisch zu sehen ist (CAMPBELL UND ELLIS, 2007, PENDL, 2008a, b).

Zu den häufig mit einer Aspergillose assoziierten, hämatologischen Veränderungen zählt auch eine Monozytose, welche jedoch hier nicht festgestellt wurde. Grund hierfür könnte sein, dass diese bisher meist mit einer chronischen Aspergillose einhergeht, also einer Erkrankungsdauer über 30 Tagen (CAMPBELL UND ELLIS, 2007). Die Versuchsdauer von 28 Tagen war möglicherweise für die Entwicklung einer Monozytose zu gering, obwohl sich auch akute Monozytosen als direkte Reaktion auf Infektionserreger manifestieren können (BRANTON et al., 1997). Monozyten werden als ein Teil des angeborenen Immunsystems bereits im Embryo angelegt und produziert, hämatogen transportiert und als Makrophagen ins Gewebe

eingelagert (CAMPBELL UND ELLIS, 2007). Deshalb sollten sie generell auch bei subakuten Prozessen in Erscheinung treten. Dies wird in der vorliegenden Studie bestätigt, da Makrophagen histologisch in vielen der granulomatösen Läsionen der Falken nachgewiesen wurden. Deshalb ist es wahrscheinlicher, dass die Monozyten im Organismus vorhanden waren, aber in die sich formierenden Granulome einwanderten, ohne dabei erhöhte Zahlen von Monozyten im Blut zu formieren. Abschließend und retrospektiv kann die Ursache und der Hergang der ausbleibenden Monozytose nicht vollständig geklärt werden.

Zusammenfassend erscheinen hämatologische Veränderungen im Hinblick auf die *Intra-vitam*-Diagnose einer Aspergillose insgesamt diagnostisch wenig hilfreich, da kaum eine Differenzierung zwischen einer Aspergillose und einer anderen granulomatösen Erkrankung möglich ist (CAMPBELL UND ELLIS, 2007), sodass die Hämatologie stets im Zusammenhang mit anderen klinischen und diagnostischen Befunden bewertet werden sollte (JONES UND OROSZ, 2000).

5.2.2 Aspergillus-Antikörperbestimmung

Zur Feststellung einer spezifischen Reaktion des erworbenen Immunsystems auf den inokulierten Erreger wurden in Blutproben von Falken zwei Testsysteme zur Detektion von Anti-*A. fumigatus*-Antikörper genutzt. Ein im Versuchsteil A verwendeter, kommerzieller, humanmedizinischer Hämagglutinationstest ergab bei keinem der inokulierten Tiere, weder vor noch nach Inokulation von *A. fumigatus*-Konidien, und bei keinem Kontrolltier ein positives Ergebnis. Der Test wies allerdings gemäß Herstellerangaben nur bei einem Falken vor Versuchsbeginn und bei zwei anderen Tieren am Versuchsende das Ergebnis als sicher negativ aus (Titer $\leq 1:40$). Stattdessen waren bei allen anderen Falken zu beiden Messzeitpunkten die Resultate als unsicher/fraglich zu bewerten (Titer 1:80 bis $< 1:320$). Demnach konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen aspergillosepositiven Falken, die im Versuchsverlauf Granulome entwickelten, und aspergillosenegativen Falken festgestellt werden. Ebenso fehlten signifikante Unterschiede zwischen inokulierten Tieren und Kontrolltieren. Unklar ist, inwiefern hier Inkompatibilitäten des aviären Serums mit dem humanmedizinischen Testsystem eine Rolle spielten. Dieser Hämagglutinationstest wurde außerdem auch in einer anderen Untersuchung anhand von 154 Blutproben von Falken mit

bekanntem Aspergillosestatus (endoskopisch bzw. pathologisch bestätigt) als nicht aussagekräftig eingestuft (FISCHER et al. unveröffentlichte Daten). Daher erschien er für die Aspergillose diagnostik bei Falken ungeeignet und wurde im Versuchsteil B nicht mehr verwendet.

Mittels einer spezifisch an Vögel adaptierten ELISA-Methode wurden in beiden Versuchsteilen am Versuchsende positive Antikörperindizes (Antikörperindex $\geq 1,4$) bei 93,3 % aller inokulierten Falken und 92,3 % aller Falken mit Granulomen nachgewiesen. Dies zeigte somit die sehr hohe Sensitivität dieser Methode von 100 % bezüglich eines *Intra-vitam*-Nachweises für eine nachfolgend histologisch bestätigte Aspergillose und zugleich die Reaktion des Immunsystems auf den inokulierten Erreger. Allerdings entwickelten 4/6 Kontrolltiere aus beiden Altersgruppen ebenfalls eine Serokonversion, und zwei immature und sechs juvenile Falken wiesen bereits vor der experimentellen Inokulation einen positiven Antikörperindex auf. Demnach war die Spezifität des Antikörpernachweises mit 18,2 % bei den immaturren bzw. 8,3 % bei den juvenilen Falken bezüglich eines *Intra-vitam*-Nachweises für eine nachfolgend histologisch bestätigte Aspergillose sehr gering. Dabei sagen die hier berechneten Sensitivitäten und Spezifitäten nichts über die Qualität bzw. Güte dieses Testverfahrens zum Nachweis von Anti-*A. fumigatus*-Antikörpern aus, die im Vergleich zu einem Goldstandard oder einer anderen etablierten, einschlägigen Nachweismethode hätte evaluiert werden müssen. Demnach kann beispielsweise nicht gesagt werden, ob hiermit mehr oder weniger bzw. besser oder schlechter Antikörper detektiert wurden, als mit einer anderen Testmethode zum Antikörpernachweis. Sie belegen aber, dass die Eignung eines Antikörpernachweises mit dieser Testmethode für den Nachweis einer klinischen Aspergillose insgesamt als fraglich bewertet werden kann. In diesem Zusammenhang muss allerdings bedacht werden, dass der verwendete Antikörper-cut-off-Index hauptsächlich anhand von bestätigten Aspergillosefällen bei Papageien eingestellt und evaluiert wurde (CRAY et al., 2009b, IVEY, 2000). Eine Anwendbarkeit dieses Indexes wurde bisher bei anderen Vogelfamilien nicht hinreichend untersucht (CRAY et al., 2009b). In einer vergleichenden Studie mit verschiedenen Vogelfamilien war zwar der durchschnittliche Antikörper-Index bei der aspergillosepositiven Gruppe im Vergleich zur aspergillose negativen Gruppe erhöht, aber dies war nicht statistisch signifikant (CRAY et al., 2009b). Zudem lagen

in der aspergillosepositiven Gruppe 42 % aller Proben unterhalb des Antikörperindex von 1,4, wobei die Gründe hierfür nicht genau geklärt werden konnten. Demnach erscheint eine Anpassung dieses Cut-off-Wertes für Falken sinnvoll (CRAY et al., 2009b), wobei hierzu mehr Kontrollfalken und Vergleichsproben erforderlich wären.

Die Häufigkeit der Detektion von anti-*Aspergillus*-spezifischen Antikörpern unabhängig von einer klinischen Erkrankung entspricht vorherigen Studien. Bei 93 % der Pinguine in zoologischen Einrichtungen wurden Anti-*Aspergillus*-Antikörper nachgewiesen, ohne dass es einen direkten Bezug zu klinischen Aspergillose zu geben schien (GERMAN et al., 2002). Auch bei Greifvögeln wurde bereits über hohe Antikörpertiter gegen *Aspergillus*-Antigen berichtet, wobei diese sowohl bei klinisch gesunden als auch bei mit *A. fumigatus* infizierten Individuen detektiert wurden (CRAY et al., 2009b). Bei Pekingenten fehlte ebenfalls eine Korrelation zwischen Antikörpertitern, histopathologischen Befunden und anderen, mit einer Aspergillose assoziierten Veränderungen der Blutwerte (GRACZYK et al., 1998). Variable Antikörperspiegel scheinen daher lediglich einen Beleg für eine Immunreaktion des Individuums auf Schimmelpilze, aber nicht für eine klinische Aspergillose darzustellen. Dabei muss bei Pilzinfektionen bedacht werden, dass der zellvermittelten Immunität neben der humoralen Immunantwort eine besondere Bedeutung zukommen kann, die nicht durch Antikörpertiter darstellbar ist (BLANCO UND GARCIA, 2008, SHOHAM UND LEVITZ, 2005). Die erhöhten Antikörperindizes bei sechs juvenilen und zwei immaturren Falken vor Versuchsbeginn könnten also durch einen vorherigen Kontakt der Falken zu aerosolisierten *A. fumigatus*-Konidien begründet sein. Dabei erscheint es zunächst widersprüchlich, dass mehr Jungvögel als immaturre Falken erhöhte Antikörperindizes aufwiesen, obwohl letztere auf Grund ihres höheren Alters mit höherer Wahrscheinlichkeit bereits Kontakt zu *A. fumigatus*-Konidien gehabt haben könnten. Obwohl alle Vögel aus dem gleichen Zuchtbetrieb stammten und dort unter identischen Bedingungen aufgezogen und gehalten wurden, sind Unterschiede in der Exposition zu Schimmelpilzen vor Versuchsbeginn möglich. Insbesondere saisonal schwankende Expositionen mit Umwelterregern oder unterschiedliche Witterungseinflüsse könnten hier in den jeweiligen Aufzuchtphasen eine Rolle gespielt haben. Bei den juvenilen Falken könnte zudem die Präsenz maternaler Antikörper eine Rolle spielen. Diese erscheint bei den 7 - 8 Wochen alten Tieren allerdings äußerst unwahrscheinlich,

da maternale Antikörper bei anderen Vogelarten bereits nach 2 - 4 Wochen nicht mehr nachweisbar sind (HASSELQUIST UND NILSSON, 2009). Andererseits könnten die Antikörperspiegel bei den immaturen im Gegensatz zu den juvenilen Falken nach länger zurückliegender Exposition wieder abgefallen sein, da unerforscht ist, wie lange Antikörperspiegel nach Kontakt mit *Aspergillus* spp. bestehen bzw. wie lange diese im Vogelorganismus nachweisbar sind.

Ein signifikanter Unterschied der Antikörperindizes am Versuchsende zwischen Falken mit Granulomen und ohne Granulome wurde nur bei den juvenilen Falken, aber nicht bei den immaturen Falken nachgewiesen. Der Grund hierfür könnte eine methodische Abweichung sein, da Antikörpertiter in Serumproben (Versuchsteil A, immature Falken) eventuell weniger gut detektiert werden konnten als in Plasmaproben (Versuchsteil B, juvenile Falken). Zwar besteht laut Herstellerangaben keine Einschränkung für die Verwendung von Serumproben, jedoch wurden in bisherigen Studien mit dieser Methode ausschließlich mit Lithium-Heparin versetzte Plasmaproben untersucht (CRAY et al., 2009b). Somit kann die gleichartige Eignung von Serum- und Plasmaproben von Falken für die Anti-*Aspergillus*-Antikörperdiagnostik sowie das potenzielle Auftreten von unbekanntem Kreuzreaktionen, z. B. durch das im Plasma vorhandene und im Serum entfernte Fibrinogen (KUMMROW et al., 2012) nicht sicher überprüft werden.

Zusammenfassend erscheint die *Aspergillus*-Antikörper-Methode allein nicht ausreichend, um klinische Fälle von Aspergillose bei Falken festzustellen. Allerdings mag sie einen gewissen Nutzen im Rahmen von Verlaufskontrollen und zur Überwachung von Greifvogelbeständen bezüglich einer erhöhten Schimmelpilzexposition haben, was aber durch weiterführende Studien anhand von größeren Tierzahlen genauer untersucht werden müsste.

5.2.3 *Aspergillus*-Antigenbestimmung

Die Identifizierung von Antigenen von *A. fumigatus*, wie dem zellwandassoziierten Polysaccharid Galactomannan (GM), werden vielfach in der Humanmedizin und anfänglich in der Tier- und Vogelmedizin als schnelle und wenig invasive Diagnostik einer Aspergillose genutzt (DENIKUS, 2004, MARTY UND KOO, 2009, ARCA-RUIBAL et al., 2006, BURCO et al., 2011, CRAY et al., 2009a, CRAY et al., 2009c). In der vorliegenden Arbeit konnte GM mittels eines Antigen-ELISAs bei drei immaturen Falken und damit bei 50 % der immaturen Falken mit Granulomen, aber nur bei

22,2 % der juvenilen Falken mit Granulomen nachgewiesen werden. Daneben wurde keiner der inokulierten, juvenilen und nur einer der inokulierten, immaturren Falken ohne Granulome positiv auf GM getestet. Dennoch konnte weder ein signifikanter Zusammenhang der Inokulationsdosen auf die GM-Spiegel noch ein signifikanter Unterschied zwischen den Werten von Falken mit Granulomen und ohne Granulome nachgewiesen werden. Die rechnerische Sensitivität des GM-Nachweises für die *Intra-vitam*-Diagnose einer nachfolgend histologisch bestätigten Aspergillose war vergleichsweise gering (beide Altersgruppen gemittelt: 15,38 %; nur Immature: 50 %; nur Juvenile: 0 %) aber die Spezifität hoch (beide Altersgruppen gemittelt: 95,65 %, nur Immature: 90,9 %; nur Juvenile: 100 %). Dies entspricht den Ergebnissen einer vorherigen Studie bei Falken, in der eine geringe Sensitivität des GM-Sandwich ELISAs mit 12 % und eine hohe Spezifität dieses Testsystems von 95 % festgestellt wurden (ARCA-RUIBAL et al., 2006). Die Spezifität lag damit auch im Bereich von 90 - 100 %, die in der Humanmedizin für diese Methode angegeben werden (MAERTENS et al., 1999, PINEL et al., 2003). Die Sensitivität lag allerdings weit hinter den humanmedizinischen Werten von 31 - 100 % (MAERTENS et al., 1999) bzw. 50 % (PINEL et al., 2003) zurück. Auch in zwei Studien an Psittaziden wurden höhere Sensitivitäten festgestellt, da erhöhte GM-Werte bei 67 % (CRAY et al., 2009c) bzw. 83 % (CRAY et al., 2009a) der bestätigten Aspergillosefälle nachgewiesen wurden. Andererseits ähnelt die niedrige Nachweisrate des zirkulierenden GM den Ergebnissen einer Studie bei Großtrappen (*Chlamydotis undulate*), in der bei keinem von fünf pathologisch bestätigten aspergillosepositiven Tieren GM nachzuweisen war (ARCA-RUIBAL et al., 2006). Zudem wurde bei Falken in einer anderen Studie lediglich in 14 von 272 Serumproben, darunter 90 Serumproben von aspergillosepositiven Falken, GM nachgewiesen (ARCA-RUIBAL et al., 2006). Demnach könnte eine unterschiedliche Reaktion und damit eine unterschiedliche Eignung von Seren verschiedener Vogelspezies für den verwendeten GM-ELISA vermutet werden. Darüber hinaus wurden in anderen Studien weitere Ursachen für eine fehlerhafte bzw. ausbleibende Detektion von zirkulierendem GM diskutiert (FRANCIS et al., 1994, MAERTENS et al., 1999, PINEL et al., 2003, VERWEIJ et al., 1995, VERWEIJ et al., 2000). So könnten die Abkapselung der Schimmelpilze mit nachfolgend ausbleibender Freisetzung von *Aspergillus*-Antigenen in den Blutkreislauf, eine nur begrenzte Pilzinvasion in die Lungengefäße, ein hoher Titer antigenbindender Antikörper und geringe

GM-Freisetzungsraten durch den Pilz als mögliche Gründe eine Rolle spielen (FRANCIS et al., 1994, MAERTENS et al., 1999, PINEL et al., 2003, VERWEIJ et al., 1995, VERWEIJ et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden neben der geringen Nachweisrate von GM ebenfalls hohe Antikörpertiter in 93,3 % der inokulierten Falken beobachtet. Daher könnten Antikörper das zirkulierende Antigen gebunden haben, wodurch es entfernt und dem Nachweissystem entzogen worden sein könnte. Die Läsionen durch die Aspergilloseinfektion waren auf den Respirationstrakt beschränkt, wodurch eine geringe oder gänzlich ausbleibende Invasion in die Blutgefäße (z. B. in den Luftsäcken) und die geringe Konzentration von zirkulierendem GM erklärt werden könnte. Weiterhin ist bekannt, dass verschiedene *A. fumigatus*-Stämme eine unterschiedlich hohe Produktion von GM aufweisen (PINEL et al., 2003, VERWEIJ et al., 2000), sodass die GM-Nachweisrate möglicherweise auf Grund der Verwendung des *Aspergillus*-Stammes K125 so gering war. Ob die Nachweisrate bei Verwendung eines invasiveren Stammes höher gewesen wäre, bleibt jedoch ebenfalls unklar. Darüber hinaus waren die Messungen in den hier durchgeführten Versuchen nur auf einen terminalen Zeitpunkt beschränkt. Eventuell hätten frühere oder mehrfach wiederholte Messungen andere Resultate ergeben. In Einklang mit den Ergebnissen vorheriger Studien (ARCA-RUIBAL et al., 2006), deuten die Daten dieser Arbeit aber derzeitig darauf hin, dass ein GM-ELISA zum *Intra-vitam*-Nachweis einer Aspergillose bei Falken ungeeignet zu sein scheint.

5.2.4 Fumigaclavin A-Nachweis aus Blutproben

Schimmelpilze der Gattung *Aspergillus* spp. sind in der Lage, Mykotoxine wie das Clavin-Alkaloid Fumigaclavin A (FuA) zu bilden (ABAD et al., 2010, ABRAMS et al., 2001, MÜCKE UND LEMMEN, 2004, RICHARD, 1997). Die Detektion von FuA sollte hier als *Intra-vitam*-Diagnostikmethode zum Nachweis einer Aspergillose untersucht werden. Dabei bestanden für die dazu genutzte EIA Technik bereits vielversprechende Erfahrungen aus der Untersuchung von Organproben von an Aspergillose erkrankten Vögeln, in denen bei 67 % der aspergillosepositiven und keinem der aspergillose negativen Vögel FuA nachweisbar war (GROSS et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde FuA jedoch in keiner der Blutproben detektiert. Möglicherweise lag die FuA-Konzentration im Blut der Falken unterhalb der Nachweisgrenze des Testsystems von 0,7 ng/g. Eine andere Erklärung könnte sein,

dass der hier verwendete *A. fumigatus*-Stamm K125 kein FuA produzierte, sodass es folglich auch nicht nachgewiesen werden konnte. Dagegen spricht jedoch, dass eine nachträglich durchgeführte Untersuchung von Gewebeproben dreier Falken aus Versuchsteil B, welche Aspergillome aufwiesen, deutlich positive EIA-Testergebnisse lieferte. Es könnte aber auch sein, dass FuA zwar im Gewebe gebildet wurde, jedoch nicht vom Gewebe ins Blut der Falken gelangte. Sollte Fumigaclavin C (FuC) statt FuA in den Gewebeproben vorgeherrscht haben, könnte es durch eine bekannte Kreuzreaktivität mit FuA zu falsch positiven EIA-Testergebnissen in den Gewebeproben geführt haben. Dafür würde sprechen, dass FuC in *A. fumigatus*-Kulturen ein häufiges Endprodukt der Biosynthese innerhalb der Fumigaclavine darstellt (FRISVAD et al., 2009, ROBINSON UND PANACCIONE, 2012). Da diese Kreuzreaktivität aber meist gering ist (circa 10 %), hätte in diesem Fall eine sehr hohe FuC-Konzentration vorgelegen haben müssen, damit sie im EIA des Serums/Plasmas noch als positiv bewertet worden wäre (LATIF et al., 2015). Eventuell wurde FuA aber auch in eine Form metabolisiert, welche im EIA nicht detektierbar war. FuA, Vorläufertoxine und Festuclavine lassen sich dabei meist nur für eine kurze Zeit nachweisen (LATIF et al., 2015). Ähnliche Transformationen wurden auch bei anderen Mykotoxinen und Testsystemen beschrieben, z. B. beim Aflatoxin B1-Metaboliten Aflatoxin-M1 in der Milch von Kühen (VELDMAN et al., 1992). Zur Metabolisierung solcher Alkaloide bei Vögeln gibt es gegenwärtig keine spezifischen Daten, sodass diese Hypothese weder bestätigt noch entkräftet werden kann. Um dies aber bestmöglich auszuschließen, wurde hier eine Vorbehandlung der Falkenserumproben mit Glucuronidase und Sulfatase durchgeführt, um einige potenziell störende Konjugate gegebenenfalls zu entfernen. Unklar bleibt aber, ob dies zum Erfolg führte oder ob andere Metaboliten während der Pathogenese oder der Probenaufbereitung auftraten, welche mit dem EIA interferiert haben könnten. Aus welchen Gründen auch immer, aktuell scheint der Test nicht geeignet zu sein, um FuA im Blut von Falken nachzuweisen und weitere Studien sind zur Klärung einer zukünftigen diagnostischen Anwendbarkeit erforderlich.

5.2.5 Akute-Phase-Proteine

Das Vorkommen von Akute-Phase-Proteinen (APP), wie dem Serumamyloid A (SAA) und dem Haptoglobin (HP), wurde bei Säugetieren und Hühnern im

Zusammenhang mit diversen Entzündungen, Infektionen, Neoplasien, Traumata und Stress nachgewiesen (CHAMANZA et al., 1999b, CONNER et al., 1988, CONNER et al., 1989, CRAY, 2012, MURATA et al., 2004, NAZIFI et al., 2010). In dieser Arbeit sollte ihre Aussagekraft in Bezug auf die Diagnose einer aviären Aspergillose überprüft werden. Diesbezüglich wurde SAA bereits in einer Studie mit 259 Falken als Gesundheitsindikator untersucht, wobei es im Blut von Tieren mit entzündlichen Erkrankungen signifikant anstieg und im Falle von mykotischen Atemwegsinfektionen auch dauerhaft erhöht blieb (CALIENDO et al., 2013). Letzteres stimmt mit einem signifikanten Anstieg von SAA im Blut von Falken der vorliegenden Arbeit überein. Dieser wurde ebenso wie ein Anstieg von HP bei 75 % der immaturen und 100 % der juvenilen Falken mit Granulomen, aber nicht bei Kontrolltieren beobachtet. Somit können SAA und HP als vergleichsweise sensitive Messparameter für eine klinische Aspergillosediagnostik angesehen werden. Gemäß dieser Ergebnisse scheint SAA bei Falken ein „positives APP“ zu sein, welches definitionsgemäß als Reaktion auf eine Noxe ansteigt (MURATA et al., 2004). Da sich bei immaturen Falken mit Granulomen aber neben einem SAA-Anstieg auch signifikant erhöhte HP-Werte zeigten scheint auch HP ein positives APP zu sein. Dies widerspricht jedoch den Ergebnissen einer Studie bei experimentell infizierten jungen Wachteln, bei denen die HP-Werte nach einer Infektion mit *A. fumigatus* sanken (GOETTING et al., 2013). Somit wurde HP bisher bei Vögeln als „negatives APP“ angesehen (MURATA et al., 2004), was aber nun auf Grund der Reaktionen bei Falken überdacht werden sollte.

Die Spezifitäten der SAA- und HP-Anstiege bezüglich des *Intra-vitam*-Nachweises einer nachfolgend bestätigten Aspergillose schwankte mit 100 % bzw. 87,5 % bei immaturen Falken und 50 % bei juvenilen Falken stark. SAA und HP stiegen somit nicht nur bei Falken an, die auch Granulome entwickelten, sondern auch bei 66,7 % bzw. 20 % der Falken ohne eindeutige histopathologische Nachweise einer Aspergillose. Die Inokulation von *A. fumigatus*-Konidien und die Reaktion des Immunsystems darauf könnten somit bereits den Anstieg der APPs verursacht haben. Das hieße, dass diese APPs im Zuge einer Infektion mit *A. fumigatus* vielleicht bereits ansteigen, bevor makroskopische Läsionen entstehen (subklinische Aspergillose). In diesem Zusammenhang wäre es für zukünftige Untersuchungen interessant, ob SAA und HP bei Falken mit Granulomen dauerhaft erhöht bleiben und bei Tieren ohne Läsionen wieder absinken. Ob subklinische

Sekundärinfektionen oder nicht-infektiöse Ursachen wie Stress den Anstieg der APPs bei den Falken mit verursachten, kann retrospektiv nicht geklärt werden. Abschließend kann die Aussagekraft dieser beiden APPs und vor allem die Bedeutung dieses Tests für die Aspergillosediagnostik mit den vorliegenden Daten nicht sicher beurteilt werden. Dennoch scheint die Ermittlung von APPs eine vielversprechende Methode zu sein, die in zukünftigen Studien mit an Aspergillose und an anderen Krankheiten erkrankten Vögeln weiter untersucht werden sollte.

5.2.6 Proteinelektrophorese

Die Menge und das Verteilungsmuster der Serum-/Plasmaproteine können beim Säugetier auf spezifische Erkrankungen, Stoffwechselsituationen oder Belastungen hinweisen (CRAY UND TATUM, 1998, TOTHOVA et al., 2016). Auch beim Vogel wurde die Proteinelektrophorese bereits als nützlich für die Diagnose verschiedener Erkrankungen, inklusive der Aspergillose beschrieben, wobei eine Differenzierung zwischen verschiedenen Erkrankungen nur eingeschränkt möglich war (CRAY UND TATUM, 1998, KUMMROW et al., 2012). Bei Falken dieser Studie stiegen im Anschluss an eine Inokulation von *A. fumigatus*-Konidien die durchschnittlichen Konzentrationen Alpha-2-Globulin (α_2 -), Beta-Globulin (β -) und Gamma-Globulin (γ -) sowie der prozentuale Anteil dieser drei Globulinfraktionen am Totalprotein an. Dabei wurde der Anstieg der Konzentration der α_2 - und β -Globuline sowie der prozentualen Anteile der β -Globuline in beiden Altersgruppen und der Anstieg der prozentualen γ - und α_1 -Globulinanteile sowie der γ -Globulinfraktion nur bei den immaturren Falken signifikant durch die Inokulationsdosis beeinflusst. Im Gegensatz dazu sanken die prozentualen Anteile von Albumin und Präalbumin (PA) sowie die Konzentrationen von PA und das Albumin-Globulin-Verhältnis (A/G-Verhältnis) bei inokulierten Falken, wobei das A/G-Verhältnis sowie die prozentualen Anteile von Albumin und PA in beiden Altersgruppen signifikant durch die Inokulationsdosis beeinflusst waren. Diese Beobachtungen entsprechen Ergebnissen von Studien bei Vögeln, in denen ebenfalls ansteigende Konzentrationen von β - und γ -Globulinen und absinkende Konzentrationen von Albumin sowie ein erniedrigtes A/G-Verhältnis als markante elektrophoretische Veränderungen durch eine Aspergillose beschrieben wurden (CRAY UND TATUM, 1998, CRAY et al., 2009c, IVEY, 2000, REIDARSON UND MCBAIN, 1995). Für die Konzentration von PA konnte ein signifikanter Zusammenhang nur bei den immaturren Falken gezeigt werden. Damit

stimmt dies mit Ergebnissen einer kürzlich bei Falken durchgeführten Studie überein, in der signifikant erniedrigte PA-Konzentrationen bei aspergillosepositiven Falken nachgewiesen wurden (KUMMROW et al., 2012). Warum dieser Unterschied, ebenso wie die unterschiedlichen Reaktionen bei den α 1- und γ -Globulinen, im Rahmen der vorliegenden Studie jedoch nur bei immaturren Falken signifikant durch die Infektionsdosis beeinflusst wurde bleibt unklar. Allerdings muss bedacht werden, dass bei den immaturren Falken Serumproben und bei den juvenilen Falken Plasmaproben für die Untersuchungen verwendet wurden. Von Serumproben ist bekannt, dass sie abweichende Elektrophoreseresultate liefern, v. a. im Bereich der β -Globulin-Fraktion (CRAY et al., 2007, KUMMROW et al., 2012). Die erhöhten β -Fraktionen der Plasmaproben stammen in diesen Fällen von den erhöhten Fibrinogenanteilen, welche in Serumproben nicht mehr vorhanden sind (KUMMROW et al., 2012). Vorangegangene Studien zogen die Nutzung von Plasmaproben der Nutzung von Serumproben vor, da diese besser für weiterführende klinische oder blutchemische Analysen verwendet werden können (CRAY et al., 2007). Generell sollte bedacht werden, dass für eine korrekte Interpretation der Ergebnisse die Proben immer im gleichen Labor untersucht werden sollten, da deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Analysesystemen gezeigt wurden (CRAY et al., 2011).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit waren folgende elektrophoretische Abweichungen bei über 75 % der Falken mit Granulomen sichtbar: erniedrigte A/G-Verhältnisse, erniedrigte Prozentanteile von PA und Albumin, erhöhte Prozentanteile und Konzentrationen von α 2- und γ -Globulinen. Alle aufgeführten Parameter stellen somit rechnerisch hoch sensitive (> 75 % Sensitivität) Messparameter dar, die sich außer im Falle der γ -Globuline in beiden Altersgruppen signifikant zwischen inokulierten Falken mit Granulomen und ohne Granulome unterschieden. Zusätzlich bestanden zwischen Falken mit und ohne Granulome signifikante Unterschiede in der Konzentration von β -Globulinen in beiden Altersgruppen, der Konzentration von PA, α 1-, γ -Globulinen sowie der Prozentanteile von γ -Globulinen nur bei immaturren Falken und der Prozentanteile von β -Globulinen nur bei juvenilen Falken. Ein Grund für diese Unterschiede zwischen den Altersgruppen könnten die oben genannten unterschiedlichen Reaktionen und Zusammensetzung von Serum und Plasma sein, wobei auch echte altersbedingte Unterschiede nicht ausgeschlossen werden können.

Darüber hinaus blieben einige dieser oben als sensitiv herausgestellten Parameter bei der Mehrheit der Kontrolltiere und der aspergillosenegativen Tiere unverändert, sodass die rechnerische Spezifität einer Erniedrigung der Prozentanteile von PA sowie einer Erhöhung der Prozentanteile und Konzentrationen von α_2 -Globulinen mit über 75 % ebenfalls hoch war. Allerdings waren bei einigen inokulierten Falken ohne makroskopische Aspergilloseläsionen das A/G-Verhältnis, die Konzentration der γ -Globuline und der Prozentanteil von Albumin und γ -Globulinen auf ähnliche Weise verändert wie bei Falken mit Granulomen, sodass für diese Parameter lediglich eine geringe Spezifität festgestellt werden kann. Eventuell könnten diese Parameter als Reaktion auf den Erreger angestiegen sein, bevor makroskopische Läsionen entstehen konnten. Allerdings stiegen sie teilweise in einzelnen Kontrollfalken ebenfalls an, weshalb falsch-positive Testresultate bei der Interpretation solcher Testergebnisse bedacht werden müssen.

Zusammenfassend kann die Proteinelektrophorese demnach zur Diagnose der Aspergillose beitragen, mit ihr kann diese aber nicht alleine gestellt werden. Gegenwärtig kann die Kombination etablierter, diagnostischer Methoden wie der Endoskopie, der röntgenologischen Untersuchung, der kulturellen Anzucht und der Histologie durch diese Blutuntersuchungen nicht ersetzt werden, da es andere Erkrankungen gibt, die ebenfalls zu einer Veränderung dieser Werte führen könnten (CRAY UND TATUM, 1998, CRAY, 2012). Unklar bleibt, ob diese Parameter bei Falken mit Granulomen dauerhaft erhöht bleiben und ob und wann sie wieder absinken. Zudem muss weiter geklärt werden, ob und wie die Veränderung der Parameter bei Großfalken durch differentialdiagnostische Ursachen auftreten würden. Diese Fragen sollten in zukünftigen Studien untersucht werden, um eine bessere Identifikation und Abgrenzung der Aspergillose zu erreichen.

5.3 Schlussbetrachtung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass klinisch gesunde Falken nach einer einmaligen, intratrachealen Inokulation einer definierten Menge von *A. fumigatus*-Konidien eine akute bis subakute Aspergillose mit eindeutigen pathologischen, histologischen und mykologischen Befunden entwickeln können. Auf diese Weise konnte experimentell eine minimale Infektionsdosis für *A. fumigatus*-Konidien bei Falken ermittelt werden. Die signifikant höhere minimale Infektionsdosis bei immaturren Falken im Vergleich zu juvenilen Tieren bestätigt die Annahme, dass junge Falken empfindlicher gegenüber *A. fumigatus* zu sein scheinen als ältere Falken. Eine Umgebungskonzentration von 45 *A. fumigatus*-Konidien/m³ Luft über 24 Stunden bzw. 1.079 KbE/m³ Luft über eine Stunde sollte in der Umgebung von Falkenhaltungen nicht überschritten werden, um kein erhöhtes Aspergilloserisiko einzugehen.

Die Hämatologie, die Anti-*Aspergillus fumigatus*-Antikörperbestimmung, sowie die Fumigaclavin-A- und die Galactomannan-Bestimmung bieten keinen feststellbaren Nutzen für die *Intra-vitam*-Diagnostik der Aspergillose bei Falken. Allerdings schienen das Akute-Phase-Protein Serum Amyloid A gemeinsam mit einzelnen Proteinfractionen der Proteinelektrophorese (A/G-Verhältnis, die Konzentrationen von Alpha-2- und Beta-Globulinen sowie die prozentualen Anteile am Totalprotein von Albumin, Präalbumin, Alpha-2- und Beta-Globulin) signifikante Hinweise auf eine Aspergillose zu liefern.

Die etablierten, diagnostischen Methoden wie die Endoskopie und die kulturelle Anzucht bzw. die histologische Untersuchung nach Probenentnahme können hierdurch jedoch nicht ersetzt werden.

6 Zusammenfassung

Die Aspergillose wird meist durch *Aspergillus fumigatus* ausgelöst und stellt eine häufige und lebensbedrohliche Atemwegserkrankung bei Greifvögeln dar. Unter den Greifvögeln gelten Gerfalken (*Falco rusticolus*) und ihre Hybriden als besonders empfindlich, wobei juvenile Falken als am empfindlichsten angesehen werden. Allerdings mangelte es bisher an experimentellen Studien, die dies belegen, und es gibt keine Angaben zu einer minimalen Infektionsdosis von Schimmelpilzkonidien. Darüber hinaus ist die *Intra-vitam*-Diagnose der aviären Aspergillose äußerst schwierig. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit die minimale Infektionsdosis von *A. fumigatus* bei Gerfalkenhybriden, eine mögliche Altersabhängigkeit und verschiedene diagnostische *Intra-vitam*-Methoden für eine Aspergillose untersucht werden.

Hierzu wurde die Entwicklung einer Aspergillose bei immaturren (8 Monate alten, n = 18, Versuchsteil A) und bei juvenilen (7 - 8 Wochen alten, n = 21, Versuchsteil B), gesunden Ger-Saker-Hybridfalken (*F. rusticolus* X *F. cherrug*) nach einmaliger, intratrachealer Inokulation verschiedener *A. fumigatus*-Konidien-Dosen (Versuchsteil A: 10^7 , 10^5 , 10^3 und Kontrolltiere; Versuchsteil B: 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 und Kontrolltiere) untersucht. Über 28 Tage wurde die Entwicklung von klinischen Symptomen überwacht. Eine hämatologische und serundiagnostische Untersuchung wurde zu Beginn und Ende des Versuchs vergleichend durchgeführt. Es erfolgten pathologisch-anatomische, histologische, bakteriologische und mykologische Untersuchungen sowie ein Vergleich der aus den Falken reisolierten Schimmelpilzisolat mit dem experimentellen Inokulum per Mikrosatelliten-Längen-Polymorphismus.

Klinische Symptome waren bei 80 % der aspergillosepositiven immaturren Falken sichtbar und bei juvenilen Falken korrelierten sie signifikant mit der Infektionsdosis. Granulome wurden in Luftsäcken und Lungen von 4/15 inokulierten, immaturren Falken und von 10/18 inokulierten, juvenilen Falken, aber nicht von Kontrolltieren festgestellt. Sie wurden histopathologisch als Pilzgranulome bestätigt, aus denen mykologisch die Reisolation von *A. fumigatus* bei 3/15 immaturren und 9/18 inokulierten, juvenilen Falken gelang. Die Reisolat waren molekularbiologisch mit dem Inokulum identisch.

Basierend auf der Histologie als Bestätigung einer Aspergillose wurde die „Minimale Infektionsdosis“ für die einmalige intratracheale Inokulation von *A. fumigatus*-Konidien bei den immaturren Falken mit $MID_{10} = 10^{4,52 \pm 1,09}$, die $MID_{50} = 10^{6,02 \pm 0,54}$ und die $MID_{90} = 10^{7,50 \pm 0,92}$ ermittelt. Bei den juvenilen Falken wurden diese mit $MID_{10} = 10^{1,95 \pm 1,26}$, $MID_{50} = 10^{4,52 \pm 0,67}$ und $MID_{90} = 10^{7,09 \pm 1,33}$ berechnet. Von der MID_{10} der juvenilen Falken ableitend sollte eine Umgebungskonzentration von 45 *A. fumigatus*-Konidien/m³ Luft über 24 Stunden bzw. 1.079 KbE/m³ Luft über eine Stunde in Falkenhaltungen nicht überschritten werden.

In der Serumdiagnostik korrelierten die Antikörpertiter mit der Inokulationsdosis, nicht aber mit der klinischen Erkrankung. Das Akute-Phase-Protein Serum Amyloid A war gemeinsam mit einzelnen Proteinfractionen der Proteinelektrophorese (A/G-Verhältnis, Konzentrationen von Alpha-2- und Beta-Globulinen sowie prozentuale Anteile am Totalprotein von Albumin, Präalbumin, Alpha-2- und Beta-Globulin) diagnostisch für eine *Intra-vitam*-Diagnose einer Aspergillose hilfreich.

Zusammenfassend belegt die vorliegende Arbeit erstmalig, dass eine einmalige intratracheale Applikation von *A. fumigatus*-Konidien und somit vermutlich eine einmalige erhöhte Exposition mit der Umgebungsluft zur Induktion einer klinischen Aspergillose bei immaturren und juvenilen Falken ausreicht. Juvenile Falken sind dabei signifikant empfindlicher als immaturre Falken. Zudem konnten erstmalig minimale Infektionsdosen für *A. fumigatus*-Konidien bei Falken und Empfehlungen für deren Maximalkonzentrationen in der Umgebungsluft von Falkenhaltungen etabliert werden.

7 Summary

Aspergillosis caused by *Aspergillus fumigatus* is a common and life-threatening respiratory disease in raptors. Among raptors, gyr falcons (*Falco rusticolus*) and their hybrids are often declared to be highly susceptible with juvenile individuals being regarded as most susceptible. However, proofing species specific experimental studies and data about a minimal infectious dose of *A. fumigatus* conidia are lacking. Moreover, the antemortem diagnosis of avian aspergillosis is very challenging. Therefore, the main study aimed to detect a minimal infectious dose of *A. fumigatus* and potential age-dependent susceptibility differences in gyr-hybrid falcons. Moreover, the diagnostic *intra vitam* assays for aspergillosis should be improved.

To this end, the development of aspergillosis was investigated in 8-months-old (N = 18, Trial A) and in 7 - 8-weeks-old (N = 21, Trial B), healthy gyr-saker hybrid falcons (*F. rusticolus* X *F. cherrug*) after a single intratracheal inoculation of different dosages of *A. fumigatus* conidia (trial A: 10^7 , 10^5 , 10^3 and negative control; trial B: 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 and negative control). Over 28 days, clinical signs were monitored. Hematological and serodiagnostic examinations were compared before and after the trials. Afterwards, necropsy, histopathology, bacteriology, and mycology were performed. Moreover, the re-isolated fungal isolates were compared to the inoculum using microsatellite length polymorphisms.

Clinical signs were observed in 80 % of the aspergillosis-positive, immature falcons and in the juvenile falcons the clinical signs correlated significantly with the infectious dose. Necropsy revealed the presence of granulomas in the air sacs and lungs of 4/15 inoculated, immature falcons and in 10/18 inoculated, juvenile falcons, but not in the control animals. From these lesions, fungal granulomas were confirmed by histopathology and *A. fumigatus* was re-isolated in 3/15 immature falcons and 9/18 juvenile falcons. All fungal strains re-isolated from lesions were identical to the inoculum based on microsatellite length polymorphism. Based on histopathology results minimal infectious doses were $MID_{10} = 10^{4.52 \pm 1.09}$, $MID_{50} = 10^{6.02 \pm 0.54}$ and $MID_{90} = 10^{7.50 \pm 0.92}$ in immature and $MID_{10} = 10^{1.95 \pm 1.26}$, $MID_{50} = 10^{4.52 \pm 0.67}$ and $MID_{90} = 10^{7.09 \pm 1.33}$ in juvenile individuals. Derived from MID_{10} in juvenile falcons, it can be recommended to not exceed levels of 45

A. fumigatus conidia/m³ ambient air for 24 hrs or 1,079 *A. fumigatus* conidia/m³ ambient air for one hour at falcon husbandry sites, respectively.

In the serumdiagnostic antibody titers correlated significantly with the infectious dose, but not with the clinical disease. The acute phase protein Serumamyloid A was in addition to single parameters of protein electrophoresis (A/G-ratio, concentrations of alpha-2- and beta-globulins and percental share of total proteins of albumin, prealbumin, alpha-2- und beta-globulin) helpful for an *intra vitam* diagnostics to detect aspergillosis.

In conclusion, the study shows for the first time that falcons are susceptible to aspergillosis after inoculation of a single dose of conidia intratracheally and thus most likely after increased conidia exposition with the ambient air too. Juvenile falcons are significantly more susceptible than immature falcons. Moreover, a minimal infectious dose for *A. fumigatus* conidia in falcons was calculated for the first time enabling the formulation of husbandry recommendations for maximum conidia concentrations in the ambient air.

8 Literaturverzeichnis

ABAD, A., VICTORIA FERNÁNDEZ-MOLINA, J., BIKANDI, J., RAMÍREZ, A., MARGARETO, J., SENDINO, J., LUIS HERNANDO, F., PONTÓN, J., GARAIZAR, J. UND REMENTERIA, A. (2010): What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev Iberoamericana Micología* **27(4)**, 155-182.

ABRAMS, G. A., PAUL-MURPHY, J., RAMER, J. C. UND MURPHY, C. J. (2001): *Aspergillus* blepharitis and dermatitis in a peregrine falcon-gyrfalcon hybrid (*Falco peregrinus* × *Falco rusticolus*). *J Avian Med Surg* **15(2)**, 114-120.

ACKERMANN, H. (2010): BiAS für Windows, Biometrische Analyse von Stichproben, Version 9. Epsilon-Verlag, Hochheim, Darmstadt.

ADRIAN, W. J., SPRAKER, T. R. UND DAVIES, R. B. (1978): Epornitics of aspergillosis in mallards (*Anas platyrhynchos*) in North Central Colorado. *J Wildlife Dis* **14**, 212-217.

AINSWORTH, G. C. UND REWELL, R. E. (1949): The incidence of aspergillosis in captive wild birds. *J Comp Pathol Ther* **59**, 213-217.

AL-TIMIMI, F. A. (1897): *Falcons and falconry in Qatar*. Ali Bin Ali Printing Press, Doha, Qatar.

ALCAZAR-FUOLI, L., MELLADO, E., ALASTRUEY-IZQUIERDO, A., CUENCA-ESTRELLA, M. UND RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. (2008): *Aspergillus* section fumigati: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob Agents Ch* **52(4)**, 1244-1251.

ALVAREZ-PEREZ, S., MATEOS, A., DOMINGUEZ, L., MARTINEZ-NEVADO, E., BLANCO, J. L. UND GARCIA, M. E. (2010): Polyclonal *Aspergillus fumigatus* infection in captive penguins. *Vet Microbiol* **144(3-4)**, 444-449.

ANDREWS, C. P. UND WEINER, M. H. (1981): Immunodiagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in rabbits. *Am Rev Respir Dis* **124(1)**, 60-64.

ANTÃO, E.-M., GLODDE, S., LI, G., SHARIFI, R., HOMEIER, T., LATURNUS, C., DIEHL, I., BETHE, A., PHILIPP, H.-C., PREISINGER, R., WIELER, L. H. UND EWERS, C. (2008): The chicken as a natural model for extraintestinal infections caused by avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Microb Pathogenesis* **45(5-6)**, 361-369.

ARCA-RUIBAL, B., WERNERY, U., ZACHARIAH, R., BAILEY, T. A., DI SOMMA, A., SILVANOSE, C. UND MCKINNEY, P. (2006): Assessment of a commercial sandwich ELISA in the diagnosis of aspergillosis in falcons. *Vet Rec* **158(13)**, 442-444.

ARISTOTELES (1783): *Histoire des animaux*, Greque publication avec la traduction francais et des notes par Campus, 2 Bände, Paris.

ARNÉ, P., THIERRY, S., WANG, D., DEVILLE, M., LE LOC'H, G., DESOUTTER, A., FEMENIA, F., NIEGUISILA, A., HUANG, W., CHERMETTE, R. UND GUILLOT, J. (2011): *Aspergillus fumigatus* in poultry. Int J Microbiol **2011**, Article ID 746356.

ATASEVER, A. UND GÜMÜŞSOY, K. S. (2004): Pathological, clinical and mycological findings in experimental aspergillosis infections of starlings. J Vet Med A **51(1)**, 19-22.

AUFAUVRE-BROWN, A., BROWN, J. S. UND HOLDEN, D. W. (1998): Comparison of virulence between clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **17(11)**, 778-780.

AUGST, U. (2001): Die ersten erfolgreichen Bruten des Würgfalken *Falco cherrug* in Deutschland. Limicola **15**, 137-146.

AULT, S. K. UND SCHOTT, M. (1994): *Aspergillus*, aspergillosis, and composting operations in California. Research Services Section, Grants and Research Branch, Markets, Research and Technology Division, California Integrated Waste Management Board, California Environmental Protection Agency.

AUSTWICK, P. C. K. (1969): Mycotic infections. In: MCDIARMID, A. (Hrsg). Diseases in free-living wild animals. Symposia of the Zoological Society of London, Academic Press, London, UK, 249-271.

AYDOGAN, S., KUSTIMUR, S. UND KALKANCI, A. (2010): Comparison of glucan and galactomannan tests with real-time PCR for diagnosis of invasive aspergillosis in a neutropenic rat model. Mikrobiyol Bul **44(3)**, 441-452.

BAILEY, T. A., SILVANOSE, C., PESCI, E. UND DI SOMMA, A. (2005): *Histoplasma* sp. - incidental finding, underdiagnosed, or occasional opportunistic pathogen in falcons in the Middle East? In: BAILEY, T., CHITTY, J., HARCOURT-BROWN, N. UND SAMOUR, J. H. (Hrsg). European Association of Avian Veterinarians Conference, Arles, Frankreich, 479-481.

BAILEY, T. A. (2008): Raptors: respiratory problems. In: CHITTY, J. UND LIERZ, M. (Hrsg.). BSAVA Manual of raptors, pigeons and passerine birds. British Small Animal Veterinary Association, Quedgeley, Gloucester, UK, 223-234.

BAIR, W. C., SIMPSON, S. G. UND WINDINGSTAD, R. M. (1988): Acute aspergillosis in mallards at Oahe Seep near Pierre, South Dakota. Prairie Naturalist **20**, 153-156.

BÄR, N. (1997): Falkenfang und Falkenhandel in der Arabischen Republik Syrien. Mitt. Fränk. Georg. Ges. **44**, 191-223.

BARATHIDASAN, R., SINGH, S. D., SAINI, M., SHARMA, A. K. UND DHAMA, K. (2013): The first case of angioinvasive pulmonary aspergillosis in a Himalayan griffon vulture (*Gyps himalayensis*). Avian Biol Res **6(4)**, 302-306.

BARNETT, J., BOOTH, P., ARROW, M., GARCIA-RUEDA, C. UND IRVINE, R. M. (2011): Spinal aspergillosis in pheasants. Vet Rec **169(17)**, 449-450.

- BARR, W. (2012): Gyrfalcons to Germany: Herdemerten's expedition to west Greenland, 1938. *Polar Record* **48(245)**, 113-122.
- BARTHEL, P. H. (2011): Zwischen Freiland und Gesetz - der Würgfalke *Falco cherrug* als heimische Vogelart. *Limicola* **25**, 284-316.
- BARTON, J. T., DAFT, B. M., READ, D. H., KINDE, H. UND BICKFORD, A. A. (1992): Tracheal aspergillosis in 6 1/2-week-old chickens caused by *Aspergillus flavus*. *Avian Dis* **36(4)**, 1081-1085.
- BARTON, R. C. (2013): Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis: from diagnosis to prediction of outcome. *Scientifica (Cairo)* **2013**, Article ID 459405.
- BAUER, J. UND SCHWAIGER, K. (2011): Allgemeine Mykologie & Spezielle Mykologie. In: SELBITZ, H.-J., TRUYEN, U. UND VALENTIN-WEIGAND, P. (Hrsg.). *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, 9. Auflage. Enke Verlag, Stuttgart, 345-385.
- BAUMGART, W. (1991): Der Sakerfalke, Die Neue Brehm-Bücherei, Band 514, 3. Auflage. Ziemsen Verlag, Wittenberg Lutherstadt.
- BAUMGART, W. (2013): Einige nomenklatorische Konsequenzen der molekularen Neuordnung in der Greifvogelssystematik. In: DEUTSCHER FALKENORDEN (Hrsg.). *Greifvögel und Falknerie*. J. Neumann-Neudamm AG, Melsungen, 145-186.
- BECKMAN, B. J., HOWE, C. W., TRAMPEL, D. W., DEBEY, M. C., RICHARD, J. L. UND NIYO, Y. (1994): *Aspergillus fumigatus* keratitis with intraocular invasion in 15-day-old chicks. *Avian Dis* **38(3)**, 660-665.
- BEERNAERT, L. A., PASMANS, F., HAESBROUCK, F. UND MARTEL, A. (2008): Modelling *Aspergillus fumigatus* infections in racing pigeons (*Columba livia domestica*). *Avian Pathol* **37**, 545-549.
- BEERNAERT, L. A., PASMANS, F., BAERT, K., VAN WAEYENBERGHE, L., CHIERS, K., HAESBROUCK, F. UND MARTEL, A. (2009a): Designing a treatment protocol with voriconazole to eliminate *Aspergillus fumigatus* from experimentally inoculated pigeons. *Vet Microbiol* **139(3-4)**, 393-397.
- BEERNAERT, L. A., PASMANS, F., VAN WAEYENBERGHE, L., DORRESTEIN, G. M., VERSTAPPEN, F., VERCAMMEN, F., HAESBROUCK, F. UND MARTEL, A. (2009b): Avian *Aspergillus fumigatus* strains resistant to both itraconazole and voriconazole. *Antimicrob Agents Ch* **53(5)**, 2199-2201.
- BEERNAERT, L. A., BAERT, K., MARIN, P., CHIERS, K., DE BACKER, P., PASMANS, F. UND MARTEL, A. (2009c): Designing voriconazole treatment for racing pigeons: balancing between hepatic enzyme auto induction and toxicity. *Med Mycol* **47(3)**, 276-285.
- BEERNAERT, L. A., PASMANS, F., VAN WAEYENBERGHE, L., HAESBROUCK, F. UND MARTEL, A. (2010): *Aspergillus* infections in birds: a review. *Avian Pathol* **39(5)**, 325-31.

BEHNSEN, J., NARANG, P., HASENBERG, M., GUNZER, F., BILITEWSKI, U., KLIPPEL, N., ROHDE, M., BROCK, M., BRAKHAGE, A. A. UND GUNZER, M. (2007): Environmental dimensionality controls the interaction of phagocytes with the pathogenic fungi *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. PLoS Pathog **3(2)**, e13.

BEN-AMI, R., LEWIS, R. E. UND KONTOYIANNIS, D. P. (2010): Enemy of the (immunosuppressed) state: an update on the pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* infection. Brit J Haematol **150(4)**, 406-417.

BEYAZ, L., GUMUSSOY, K. S., CAM, Y., ABAY, S. UND ATASEVER, A. (2008): Systemic aspergillosis in some wild bird species at Kayseri Zoo. Ankara Univ Vet Fak **55**, 31-35.

BEYTUT, E., OZCAN, K. UND ERGINSOY, S. (2004): Immunohistochemical detection of fungal elements in the tissues of goslings with pulmonary and systemic aspergillosis. Acta Vet Hung **52(1)**, 71-84.

BEYTUT, E. (2007): Immunohistochemical diagnosis of aspergillosis in adult turkeys. Turk J Vet Anim Sci **31(2)**, 99.

BIRDLIFE INTERNATIONAL (2015a): *Falco cherrug*. The IUCN Red List of Threatened Species. (<http://www.iucnredlist.org/>), aufgerufen am: 27. November 2015, e.T22696495A40788105.

BIRDLIFE INTERNATIONAL (2015b): *Falco rusticolus*. The IUCN Red List of Threatened Species. (<http://www.iucnredlist.org/>), aufgerufen am: 27. November 2015, e.T22696500A80463760.

BLANCO, J. L. UND GARCIA, M. E. (2008): Immune response to fungal infections. Vet Immunol Immunopathol **125(1-2)**, 47-70.

BOND, F. M. (2006): Role of falconers in new world raptor conservation and the law. In: BILDSTEIN, K. L., BARBER, D. R. UND ZIMMERMAN, A. (Hrsg). Second Neotropical Raptor Conference, Iguazu, Argentina, 193-203.

BOOMS, T. L. UND FULLER, M. R. (2003): Gyrfalcon diet in Central West Greenland during the nesting period. The Condor **105(3)**, 528-537.

BOOMS, T. L., TALBOT, S. L., SAGE, G. K., MCCAFFERY, B. J., MCCracken, K. G. UND SCHEMPF, P. F. (2011): Nest-site fidelity and dispersal of Gyrfalcons estimated by noninvasive genetic sampling. Condor **113(4)**, 768-778.

BRANTON, S. L., MAY, J. D., LOTT, B. D. UND MASLIN, W. R. (1997): Various blood parameters in commercial hens acutely and chronically infected with *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. Avian Dis **41(3)**, 540-7.

BRENNAN, M., THOMAS, D. Y., WHITEWAY, M. UND KAVANAGH, K. (2002): Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. FEMS Immunol Med Microbiol **34(2)**, 153-157.

BROCKHAUS (1997a): Freyja. In: Die Enzyklopädie in 24 Bänden. Brockhaus GmbH, Leipzig, Mannheim, 696.

BROCKHAUS (1997b): Horus. In: Die Enzyklopädie in 24 Bänden. Brockhaus GmbH, Leipzig, Mannheim, 273-274.

BROWN, P. A. UND REDIG, P. T. (1994): *Aspergillus* ELISA: a tool for detection and management. In: Annu Conf Assoc Avian Vet, Reno, NV, USA, 295–300.

BROWN, T., JORDAN, F. T. W. UND WODD, A. M. (2008): Fungal diseases. In: PATTISON, M., McMULLIN, P. F., BRADBURY, J. M. UND ALEXANDER, D. J. (Hrsg.). Poultry diseases, 6. Auflage. Saunders Elsevier, Edinburg, London, New York, Oxford, Philadelphia, St. Louis, Sydney, Toronto, 428-443.

BRÜLL, H. UND TROMMER, G. (1997): Die Beizjagd - Ein Leitfaden für die Falknerprüfung und für die Praxis, neubearbeitete, 4. Auflage. Parey Buchverlag, Berlin.

BUNN, A. G., KLEIN, W. UND BILDSTEIN, K. L. (1995): Time-of-day effects on the numbers and behavior of non-breeding raptors seen on roadside surveys in Eastern Pennsylvania. J Field Ornithol **66(4)**, 544-552.

BURCO, J. D., ZICCARDI, M. H., CLEMONS, K. V. UND TELL, L. A. (2011): Evaluation of plasma (1→3) β -D-glucan concentrations in birds naturally and experimentally infected with *Aspergillus fumigatus*. Avian Dis **56(1)**, 183-191.

BURNHAM, K. K., BURNHAM, W. A. UND NEWTON, I. (2009): Gyrfalcon *Falco rusticolus* post-glacial colonization and extreme long-term use of nest-sites in Greenland. Ibis **151(3)**, 514-522.

BUXTON, I. UND SOMMER, C. V. (1980): Serodiagnosis of *Aspergillus fumigatus* antibody in migratory ducks. Avian Dis **24(2)**, 446-54.

BYGRAVE, A. (1981): Leg paralysis in pheasant poults (*Phasianus colchicus*) due to spinal aspergillosis. Vet Rec **109(23)**, 516.

CACCIUTTOLO, E., ROSSI, G., NARDONI, S., LEGROTTAGLIE, R. UND MANI, P. (2009): Anatomopathological aspects of avian aspergillosis. Vet Res Commun **33(6)**, 521-527.

CADE, T. UND WEAVER, J. D. (1976): Gyrfalcon x peregrine hybrids produced by artificial insemination. J North Americ Falc Assoc **15**, 42-47.

CALIENDO, V. UND MCKINNEY, P. (2013): Fungal airsacculitis associated with serratospiculiasis in captive falcons of the United Arab Emirates. Vet Rec **173(6)**, 143.

CALIENDO, V., MCKINNEY, P., BAILEY, T., KINNE, J. UND WERNERY, U. (2013): Serum amyloid A as an indicator of health status in falcons. J Avian Med Surg **27(2)**, 83-89.

CAMPBELL, T. W. UND ELLIS, C. K. (2007): Avian and exotic animal hematology and cytology, 3. Auflage. Blackwell Ames, IA, USA.

CARRASCO, L., BAUTISTA, M. J., DELASMULAS, J. M. UND JENSEN, H. E. (1993): Application of enzyme-immunohistochemistry for the diagnosis of aspergillosis, candidiasis, and zygomycosis in 3 lovebirds. *Avian Dis* **37(3)**, 923-927.

CARRASCO, L., LIMA, J. S., HALFEN, D. C., SALGUERO, F. J., SÁNCHEZ-CORDÓN, P. UND BECKER, G. (2001): Systemic aspergillosis in an oiled magallanic penguin (*Spheniscus magellanicus*). *J Vet Med B* **48(7)**, 551-554.

CHAMANZA, R., TOUSSAINT, M. J. M., VAN EDEREN, A. M., VAN VEEN, L., HULSKAMP-KOCH, C. UND FABRI, T. H. F. (1999a): Serum amyloid a and transferrin in chicken. A preliminary investigation of using acute-phase variables to assess diseases in chickens. *Vet Quart* **21(4)**, 158-162.

CHAMANZA, R., VAN VEEN, L., TIVAPASI, M. T. UND TOUSSAINT, M. J. M. (1999b): Acute phase proteins in the domestic fowl. *Worlds Poult Sci J* **55(1)**, 61-71.

CHAUDHARY, S. K. UND SADANA, J. R. (1988): Experimental aspergillosis in Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). *Mycopathologia* **102(3)**, 179-184.

CHAVKO, J., SLOBODNÍK, R., DEUSCHOVÁ, L., LIPTÁK, J., MIHÓK, J., OBUCH, J. UND NEMCEK, V. (2014): The saker falcon (*Falco cherrug*) population, diet and nest boxes in Slovakia: LIFE-project report 2011–2014. *Slovak Raptor J* **8(2)**, 73-86.

CHUTE, H. L. UND O'MEARA, D. C. (1958): Experimental fungous infections in chickens. *Avian Dis* **2(2)**, 154-166.

CHUTE, H. L., HOLLANDER, S. L., BARDER, E. S. UND O'MEARA, D. C. (1965): The pathology of mycotoxicosis of certain fungi in chickens. *Avian Dis* **9(1)**, 57-66.

CIESIELSKI, L. C. (2007): Der Gerfalke, Die Neue Brehm Bücherei, 1. Auflage. Westarp-Wissenschaften-Verlagsgesellschaft mbH, Hohenwarsleben, 200.

CLEMONS, K. V. UND STEVENS, D. A. (2005): The contribution of animal models of aspergillosis to understanding pathogenesis, therapy and virulence. *Medical Mycology* **43(Supl. 1)**, 101-110.

COLE, R. J., KIRKSEY, J. W., DORNER, J. W., WILSON, D. M., JOHNSON, J. C., JR., JOHNSON, A. N., BEDELL, D. M., SPRINGER, J. P., CHEXAL, K. K., CLARDY, J. C. UND COX, R. H. (1977): Mycotoxins produced by *Aspergillus fumigatus* species isolated from molded silage. *J Agric Food Chem* **25(4)**, 826-830.

COLWELL, W. M., ASHLEY, R. C., SIMMONS, D. G. UND HAMILTON, P. B. (1973): The relative in vitro sensitivity to Aflatoxin B1 of tracheal organ cultures prepared from day-old chickens, ducks, Japanese quail, and turkeys. *Avian Dis* **17(1)**, 166-172.

CONNER, J., ECKERSALL, P., WISEMAN, A., AITCHISON, T. UND DOUGLAS, T. (1988): Bovine acute phase response following turpentine injection. *Res Vet Sci* **44(1)**, 82-88.

- CONNER, J., ECKERSALL, P., WISEMAN, A., BAIN, R. UND DOUGLAS, T. (1989): Acute phase response in calves following infection with *Pasteurella haemolytica*, *Ostertagia ostertagi* and endotoxin administration. *Res Vet Sci* **47(2)**, 203-207.
- CONVERSE, K. A. (2008): Aspergillosis. In: THOMAS, N. J., HUNTER, D. B. UND ATKINSON, C. T. (Hrsg.). *Infectious diseases of wild birds*. Blackwell Publishing Professional, Ames, Oxford, Victoria, 360-374.
- COON, N. C. UND LOCKE, L. N. (1968): Aspergillosis in a bald eagle (*Haliaeetus leucocephalus*). *Bulletin of the Wildlife Disease Association* **4**, 51.
- COOPER, J. E. (1969): Some diseases of birds of prey. *Vet Rec* **84**, 454-457.
- COOPER, J. E. (1973): Post-mortem findings in East African birds of prey. *J Wildlife Dis* **9(4)**, 368-375.
- CORTES, P. L., SHIVAPRASAD, H. L., KIUPEL, M. UND SENTIES-CUE, G. (2005): Omphalitis associated with *Aspergillus fumigatus* in poult. *Avian Dis* **49(2)**, 304-308.
- COTTER, G., DOYLE, S. UND KAVANAGH, K. (2000): Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. *FEMS Immunol Med Microbiol* **27(2)**, 163-169.
- COULTON, D. W., VIRGL, J. A. UND ENGLISH, C. (2013): Falcon nest occupancy and hatch success near two diamond mines in the Southern Arctic, Northwest Territories. *Avian Conser Ecol* **8(2)**, 14.
- CRAIG, G. R. (1997): Wide ranging by nesting Peregrine Falcons (*Falco peregrinus*) determined by radiotelemetry. *J Raptor Res* **31(4)**, 333-338.
- CRAY, C. UND TATUM, L. M. (1998): Applications of protein electrophoresis in avian diagnostics. *J Avian Med Surg* **12(1)**, 4-10.
- CRAY, C., RODRIGUEZ, M. UND ZAIAS, J. (2007): Protein electrophoresis of psittacine plasma. *Vet Clin Path* **36(1)**, 64-72.
- CRAY, C. UND VILLAR, D. (2008): Cross-reactivity of anti-chicken IgY antibody with immunoglobulins of exotic avian species. *Vet Clin Patho* **37(3)**, 328-331.
- CRAY, C., REAVILL, D., ROMAGNANO, A., VAN SANT, F., CHAMPAGNE, D., STEVENSON, R., ROLFE, V., GRIFFIN, C. UND CLUBB, S. (2009a): Galactomannan assay and plasma protein electrophoresis findings in psittacine birds with aspergillosis. *J Avian Med Surg* **23(2)**, 125-135.
- CRAY, C., WATSON, T. UND ARHEART, K. L. (2009b): Serosurvey and diagnostic application of antibody titers to *Aspergillus* in avian species. *Avian Dis* **53(4)**, 491-494.

CRAY, C., WATSON, T., RODRIGUEZ, M. UND ARHEART, K. L. (2009c): Application of galactomannan analysis and protein electrophoresis in the diagnosis of aspergillosis in avian species. *J Zoo Wildl Med* **40(1)**, 64-70.

CRAY, C., KING, E., RODRIGUEZ, M., DECKER, L. S. UND ARHEART, K. L. (2011): Differences in protein fractions of avian plasma among three commercial electrophoresis systems. *J Avian Med Surg* **25(2)**, 102-110.

CRAY, C. (2012): Acute phase proteins in animals. In: CONN, P. M. (Hrsg.). *Progress in molecular biology and translational science*. Academic Press, 113-150.

CYTEL INC. (2010): Cytel Studio LogXact Vers. 9.0.0 Statistical software for regression procedures featuring exact methods, user manual. Cytel Inc, Cambridge, MA, USA.

DAHLHAUSEN, B., ABBOTT, R. UND VAN OVERLOOP, P. (2004): Rapid detection of pathogenic *Aspergillus* species in avian samples by Real-Time PCR assay: a preliminary report. In: *Annu Conf Assoc Avian Vet, Association of Avian Veterinarians*, New Orleans, LA, USA, 37-40.

DAHLHAUSEN, R. D. (2006): Implications of mykoses in clinical disorders. In: HARRISON, G. J. UND LIGHTFOOT, T. L. (Hrsg.). *Clinical avian medicine*. Spix Publishing Inc., Palm Beach, FL, USA, 691-704.

DAVIDSON, W. R., SHOTTS, E. B., TESKA, J. UND MORELAND, D. W. (1989): Feather damage due to mycotic infections in wild turkeys. *J Wildl Dis* **25(4)**, 534-539.

DE BOER, L. E. (1975): Karyological heterogeneity in the Falconiformes (Aves). *Experientia* **31(10)**, 1138-1139.

DE VALK, H. A., MEIS, J. F. G. M., CURFS, I. M., MUEHLETHALER, K., MOUTON, J. W. UND KLAASSEN, C. H. W. (2005): Use of a novel panel of nine short tandem repeats for exact and high-resolution fingerprinting of *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Clin Microbiol* **43(8)**, 4112-4120.

DE VALK, H. A., MEIS, J. F. G. M., BRETAGNE, S., COSTA, J. M., LASKER, B. A., BALAJEE, S. A., PASQUALOTTO, A. C., ANDERSON, M. J., ALCÁZAR-FUOLI, L., MELLADO, E. UND KLAASSEN, C. H. W. (2009): Interlaboratory reproducibility of a microsatellite-based typing assay for *Aspergillus fumigatus* through the use of allelic ladders: proof of concept. *Clin Microbiol Infec* **15(2)**, 180-187.

DE VLIJGER, G., LAGROU, K., MAERTENS, J., VERBEKEN, E., MEERSSEMAN, W. UND VAN WIJNGAERDEN, E. (2011): Beta-d-glucan detection as a diagnostic test for invasive aspergillosis in immunocompromised critically ill patients with symptoms of respiratory infection: an autopsy-based study. *J Clin Microbiol* **49(11)**, 3783-3787.

DEEM, S. L. (2003): Fungal diseases of birds of prey. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* **6(2)**, 363-376.

- DEL PILAR LANZAROT, M., MONTESINOS, A., SAN ANDRÉS, M. I., RODRÍGUEZ, C. UND BARAHONA, M. V. (2001): Hematological, protein electrophoresis and cholinesterase values of free-living nestling peregrine falcons in Spain. *J Wildlife Dis* **37(1)**, 172-178.
- DENIKUS, N. (2004): Identifikation infektionsrelevanter Antigene von *Aspergillus fumigatus*, Dr. med. vet. Dissertation, Institut für Mikrobiologie, Zentrum für Infektionsmedizin, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover.
- DIXON, W. J. (1993): BMDP statistical software manual, Vol. 1 & 2. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London.
- DURMAN-WALTERS, D. (1994): The modern falconer - training, hawking, & breeding. Swan Hill Press, London, UK.
- DYAR, P. M., FLETCHER, O. J. UND PAGE, R. K. (1984): Aspergillosis in turkeys associated with use of contaminated litter. *Avian Dis* **28(1)**, 250-255.
- DYKSTRA, M. J., LOOMIS, M., REININGER, K., ZOMBECK, D. UND FAUCETTE, T. (1997): A comparison of sampling methods for airborne fungal spores during an outbreak of aspergillosis in the forest aviary of the North Carolina Zoological Park. *J Zoo Wildl Med* **28(4)**, 454-463.
- EASTHAM, C., NICHOLLS, M. UND FOX, N. (2002): Morphological variation of the saker (*Falco cherrug*) and the implications for conservation. *Biodivers Conserv* **11(2)**, 305-325.
- ELLIS, D. H. (1995): What is *Falco altaicus* Menzbier? *J Raptor Res* **29(1)**, 15-25.
- ELMUBARAK, A. K. UND FADLELMULA, A. (1991): Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* infection in pigeons in the Sudan. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* **44(1)**, 26-28.
- FALANDYSZ, J. UND SZEFER, P. (1983): Metals and organochlorines in a specimen of white-tailed eagle. *Environ Conserv* **10(3)**, 256-258.
- FEDDE, M. R. (1998): Relationship of structure and function of the avian respiratory system to disease susceptibility. *Poultry Sci* **77(8)**, 1130-1138.
- FEMENIA, F., FONTAINE, J.-J., LAIR-FULLERINGER, S., BERKOVA, N., HUET, D., TOWANOU, N., RAKOTOVAO, F., GRANET, O.-I., LE LOC'H, G., ARNÉ, P. UND GUILLOT, J. (2007): Clinical, mycological and pathological findings in turkeys experimentally infected by *Aspergillus fumigatus*. *Avian Pathol* **36(3)**, 213-219.
- FERGUSON-LEES, J. UND CHRISTIE, D. A. (2001): Raptors of the world. Houghton Mifflin Company, Boston, New York, USA.
- FERGUSON-LEES, J. UND CHRISTIE, D. A. (2009): Die Greifvögel der Welt. Franckh-Kosmos Verlags-GmbH & Co. KG, Stuttgart.
- FITZGERALD, S. D. UND MOISAN, P. G. (1995): Mycotic rhinitis in an ostrich. *Avian Dis* **39(1)**, 194-196.

FLACH, E. J., STEVENSON, M. F. UND HENDERSON, G. M. (1990): Aspergillosis in gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) at Edinburgh Zoo, 1964 to 1988. *Vet Rec* **126(4)**, 81-85.

FORBES, N. A. (1991): Aspergillosis in raptors. *Vet Rec* **128(11)**, 263.

FORBES, N. A., SIMPSON, G. N. UND GOUDSWAARD, M. F. (1992): Diagnosis of avian aspergillosis and treatment with Itraconazole. *Vet Rec* **130(23)**, 519-520.

FRANÇA, M., CRAY, C. UND SHIVAPRASAD, H. L. (2012): Serologic testing for aspergillosis in commercial broiler chickens and turkeys. *Avian Dis* **7(1)**, 68-69.

FRANCIS, P., LEE, J. W., HOFFMAN, A., PETER, J., FRANCESCONI, A., BACHER, J., SHELHAMER, J., PIZZO, P. A. UND WALSH, T. J. (1994): Efficacy of unilamellar liposomal amphotericin B in treatment of pulmonary aspergillosis in persistently granulocytopenic rabbits: The potential role of bronchoalveolar d-mannitol and serum galactomannan as markers of Infection. *J Infect Dis* **169(2)**, 356-368.

FRANSON, J. C., THOMAS, N. J., SMITH, M. R. UND ROBBINS, A. H. (1996): A retrospective study of postmortem findings in red-tailed hawks. *J Raptor Res* **30(1)**, 7-14.

FRAPPELL, P. B., HINDS, D. UND BOGGS, D. (2001): Scaling of respiratory variables and the breathing pattern in birds: an allometric and phylogenetic approach. *Physiological and Biochemical Zoology* **74(1)**, 75-89.

FRESENIUS, G. (1863): Beiträge zur Mykologie. Brönner, Frankfurt a. M.

FRIEND, M. UND TRAINER, D. O. (1969): Aspergillosis in captive herring gulls. *J Wildlife Dis* **5(3)**, 271-275.

FRIEND, M. (1999): Aspergillosis. In: FRIEND, M. UND FRANSON, J. C. (Hrsg.). Field manual of wildlife diseases. General field procedures and diseases of birds. USGS Biological Resources Division, Madison, WI, USA, 129-134.

FRISVAD, J. C., RANK, C., NIELSEN, K. F. UND LARSEN, T. O. (2009): Metabolomics of *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* **47(S1)**, 53-71.

FUDGE, A. M. UND SPEER, B. (2001): Selected controversial topics in avian diagnostic testing. *Semin Avian Exot Pet* **10(2)**, 96-101.

GALLATI, H. UND PRACT, I. (1985): Peroxidase auf Meerrettich: Kinetische Studien und Optimierung der Peroxidase-Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H₂O₂ und 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin. *J Clin Chem Biochem* **23**, 453-460.

GEDEK, B. (2002): Pilzkrankheiten der Haustiere. In: ROLLE, M. UND MAYR, A. (Hrsg.). Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 7. Auflage. Enke, Stuttgart, 623-624.

GEISSLER, H. UND GERINGER, J. (1977): Diagnosis of avian aspergillosis using agar gel precipitation in zoo and pet birds. *Tierarztl Umsch* **32(7)**, 359-361.

- GERMAN, A. C., SHANKLAND, G. S., EDWARDS, J. UND FLACH, E. J. (2002): Development of an indirect ELISA for the detection of serum antibodies to *Aspergillus fumigatus* in captive penguins. *Vet Rec* **150(16)**, 513-518.
- GHORI, H. M. UND EDGAR, S. A. (1973): Comparative susceptibility of chickens, turkeys and coturnix quail to aspergillosis. *Poult Sci* **52(6)**, 2311-2315.
- GIRLING, S. J. (2005): Respiratory disease. In: HARCOURT-BROWN, N. UND CHITTY, J. (Hrsg.). *BSAVA Manual of psittacine birds*, 2. Auflage. British Small Animal Veterinary Association, Quedgeley, Gloucester, UK, 170-179.
- GLARE, T. R., GARTRELL, B. D., BROOKES, J. J. UND PERROTT, J. K. (2014): Isolation and identification of *Aspergillus* spp. from brown kiwi (*Apteryx mantelli*) nocturnal houses in New Zealand. *Avian Dis* **58(1)**, 16-24.
- GLASIER, P. (1998): *Falconry and Hawking*, 3. Auflage. B T Batsford, London, UK.
- GOETTING, V., LEE, K. A., WOODS, L., CLEMONS, K. V., STEVENS, D. A. UND TELL, L. A. (2013): Inflammatory marker profiles in an avian experimental model of aspergillosis. *Med Mycol* **51(7)**, 696-703.
- GRACZYK, T. K. UND COCKREM, J. F. (1995): *Aspergillus* spp. seropositivity in New Zealand penguins. *Mycopathologia* **131(3)**, 179-184.
- GRACZYK, T. K., CRANFIELD, M. R. UND KLEIN, P. N. (1998): Value of antigen and antibody detection, and blood evaluation parameters in diagnosis of avian invasive aspergillosis. *Mycopathologia* **140(3)**, 121-127.
- GREENACRE, C. B., LATIMER, K. S. UND RITCHIE, B. W. (1992): Leg paresis in a black palm cockatoo (*Probosciger aterrimus*) caused by aspergillosis. *J Zoo Wildl Med* **23(1)**, 122-126.
- GREENFIELD, C. L., SANDERS, F. S. UND DIETERT, R. R. (1988): Detection of avian macrophages with concanavalin A. *Avian Pathol* **17(4)**, 803-820.
- GREGORY, P. H. UND LACEY, M. E. (1963): Liberation of spores from mouldy hay. *T Brit Mycol Soc* **46(1)**, 73-80.
- GRIFFITHS, C. S. (1994): Monophyly of the Falconiformes based on syringeal morphology. *The Auk* **111(4)**, 787-805.
- GROSS, M., LATIF, H., FISCHER, D., LIERZ, M., VAN WAEYENBERGHE, L., MARTEL, A. UND USLEBER, E. (2013): Immunochemical analysis of fumigaclavine A in avian respiratory system tissue and in blood of falcons with clinical aspergillosis. In: 35th Mycotoxin Workshop, Gent, Belgien, 183.
- GÜMÜŞSOY, K. S., UYANIK, F., ATASEVER, A. UND ÇAM, Y. (2004): Experimental *Aspergillus fumigatus* infection in quails and results of treatment with itraconazole. *J Vet Med B* **51(1)**, 34-38.

HAAK, B. A. (1982): Foraging ecology of prairie falcons in northern California, M.Sc. Dissertation, Oregon State University.

HACKING, A. UND BLANDFORD, T. (1971): Aspergillosis in five-to-16-week-old turkeys. *Vet Rec* **88(20)**, 519-520.

HADRICH, I., DRIRA, I., NEJI, S., MAHFOUD, N., RANQUE, S., MAKNI, F. UND AYADI, A. (2013): Microsatellite typing of *Aspergillus flavus* from clinical and environmental avian isolates. *J Med Microbiol* **62**, 121-125.

HAFNER, J. C. UND HAFNER, M. S. (1977): The cryptic occipital spot in the Accipitridae (Falconiformes). *The Auk* **94(2)**, 293-303.

HARMON, B. (1998): Avian heterophils in inflammation and disease resistance. *Poult Sci* **77**, 972-977.

HART, J. S. UND ROY, O. Z. (1966): Respiratory and cardiac responses to flight in pigeons. *Physiol Zool* **39(4)**, 291-306.

HASEGAWA, I., SHOYA, S. UND HORIUCHI, T. (1971): Brain lesions in chicken aspergillosis. *Natl J Anim Health Q* **11**, 122-123.

HASSELQUIST, D. UND NILSSON, J.-Å. (2009): Maternal transfer of antibodies in vertebrates: trans-generational effects on offspring immunity. *Philos T R Soc B* **364(1513)**, 51-60.

HAWKINS, M. G., BARRON, H. W. UND SPEER, B. L. (2013): Hematologic and serum biochemical values of selected raptors. In: CARPENTER, J. W. (Hrsg.). *Exotic Animal Formulary*, 4. Auflage. Elsevier Saunders, St Louis, MO, USA, 354-361.

HEIDENREICH, M., KÜSPERT, H., KÜSPERT, H.-J. UND HUSSONG, R. (1993): Falkenhybriden. Deren Zucht, zum Verwandtschaftsgrad verschiedener Falkenarten, sowie zum Thema der Faunenverfälschung durch Hybridfalken. *Beitr. Vogelkunde* **39**, 205-226.

HEIDENREICH, M. (2013a): Pilzinfektionen. In: HEIDENREICH, M. (Hrsg.). *Greifvögel - Krankheiten, Haltung, Zucht, überarbeitete und stark erweiterte*, 2. Auflage. J. Neumann-Neudamm, Melsungen, 176-184.

HEIDENREICH, M. (2013b): Klinische Untersuchung. In: HEIDENREICH, M. (Hrsg.). *Greifvögel - Krankheiten, Haltung, Zucht, überarbeitete und stark erweiterte*, 2. Auflage. J. Neumann-Neudamm, Melsungen, 111-129.

HEIDENREICH, M. (2013c): Forensik. In: HEIDENREICH, M. (Hrsg.). *Greifvögel - Krankheiten, Haltung, Zucht, überarbeitete und stark erweiterte*, 2. Auflage. J. Neumann-Neudamm, Melsungen, 309-337.

HENNS, M. (1970): Kaiser Friedrich der Zweite: Über die Kunst mit Vögeln zu jagen. Zur Faksimileausgabe des Codex Palatinus Latinus 1071 der Biblioteca Apostolica Vaticana. *J. Orn.* **111**, 456.

- HERMAN, C. UND SLADEN, W. J. (1958): Aspergillosis in waterfowl. Trans Am Wildlife Conf. **23**, 187-191.
- HÖFLE, U., BLANCO, J. M., RODRIGUEZ, A. UND VICENTE, A. (2001): Atypic aspergillosis a new threat to the Iberian imperial eagle (*Aquila adalberti*)? In: KORBEL, R. (Hrsg). 6th European AAV-DVG Conference of the Association of Avian Veterinarians, 4th Scientific ECAMS Meeting of the European College of Avian Medicine and Surgery, München, 288.
- HOPPE, S., GURFIELD, N., FLAMMER, K., COLITZ, C. UND FISHER, P. (2000): Mycotic keratitis in a blue-fronted amazon parrot (*Amazona aestiva*). J Avian Med Surg **14(3)**, 185-189.
- HUBBEN, K. (1958): *Aspergillus* meningo-encephalitis in turkeys and ducks. Avian Dis **2**, 110-116.
- HUTON, L. R. (1966): Bagasse litter as a contributory factor in avian aspergillosis. Can Vet J **7(6)**, 117-120.
- IVEY, E. S. (2000): Serologic and plasma protein electrophoretic findings in 7 psittacine birds with aspergillosis. J Avian Med Surg **14(2)**, 103-106.
- JACOBSEN, I. D., GROßE, K., SLESIONA, S., HUBE, B., BERNDT, A. UND BROCK, M. (2010): Embryonated eggs as an alternative infection model to investigate *Aspergillus fumigatus* virulence. Infect Immun **78(7)**, 2995-3006.
- JENKINS, A. R. (1995): Morphometrics and flight performance of Southern African peregrine and lanner falcons. J Avian Biol **26(1)**, 49-58.
- JENKINS, M. A. (1978): Gyrfalcon nesting-behavior from hatching to fledging. Auk **95(1)**, 122-127.
- JENSEN, H. E., CHRISTENSEN, J. P., BISGAARD, M. UND NIELSEN, O. L. (1997): Immunohistochemistry for the diagnosis of aspergillosis in turkey poults. Avian Pathol **26(1)**, 5-18.
- JOHNSON, J. A. UND BURNHAM, K. K. (2013): Timing of breeding and offspring number covary with plumage colour among gyrfalcons *Falco rusticolus*. Ibis **155(1)**, 177-188.
- JONES, M. P. UND OROSZ, S. E. (2000): The diagnosis of aspergillosis in birds. Sem Avian Exot Pet **9(2)**, 52-58.
- JOSEPH, V. (1996): Aspergillosis, the silent killer. J Wildlife Rehabil **19**, 15-18.
- JOSEPH, V. (2000): Aspergillosis in raptors. Semin Avian Exot Pet **9(2)**, 66-74.
- JOVANOVIC, S., PIECHOTOWSKI, I., GABRIO, T., WEIDNER, U., ZÖLLNER, I. UND SCHWENK, M. (2001): Abschätzung der Schimmelpilzbelastung in Wohnungen in Südwestdeutschland. Gesundheitswesen **63(6)**, 404-411.

JULIAN, R. J. UND GORYO, M. (1990): Pulmonary aspergillosis causing right ventricular failure and ascites in meat type chickens. *Avian Pathol* **19(4)**, 643-654.

JUNG, K., KIM, Y., LEE, H. UND KIM, J. T. (2009): *Aspergillus fumigatus* infection in two wild Eurasian black vultures (*Aegypius monachus* Linnaeus) with carbofuran insecticide poisoning: a case report. *Vet J* **179(2)**, 307-312.

KAISER, T. J. UND BUCHER, T. L. (1985): The consequences of reverse sexual size dimorphism for oxygen consumption, ventilation, and water loss in relation to ambient temperature in the prairie falcon, *Falco mexicanus*. *Physiol Zool* **58(6)**, 748-758.

KALINER, G. UND COOPER, J. E. (1973): Dual infection of an African fish eagle with acid-fast bacilli and an *Aspergillus* sp. *J Wildl Dis* **9(1)**, 51-55.

KALISINSKA, E., LISOWSKI, P., CZERNOMYSY-FUROWICZ, D. UND KAVETSKA, K. M. (2008): Serratospiculiasis, mycosis, and haemosiderosis in wild peregrine falcon from Poland. A case report. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* **52**, 75-79.

KAMI, M., FUKUI, T., OGAWA, S., KAZUYAMA, Y., MACHIDA, U., TANAKA, Y., KANDA, Y., KASHIMA, T., YAMAZAKI, Y., HAMAKI, T., MORI, S.-I., AKIYAMA, H., MUTOU, Y., SAKAMAKI, H., OSUMI, K., KIMURA, S. UND HIRAI, H. (2001): Use of real-time PCR on blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* **33(9)**, 1504-1512.

KANE, S. A. UND ZAMANI, M. (2014): Falcons pursue prey using visual motion cues: new perspectives from animal-borne cameras. *J Exp Biol* **217(2)**, 225-234.

KAPLAN, W., ARNSTEIN, P., AJELLO, L., CHANDLER, F., WATTS, J. UND HICKLIN, M. (1975): Fatal aspergillosis in imported parrots. *Mycopathologia* **56(1)**, 25-29.

KAVANAGH, K. UND REEVES, E. P. (2004): Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* **28(1)**, 101-112.

KEYMER, F. (2007): Post-mortem examination, with anatomical notes. In: SAMOUR, J. H. (Hrsg.). *Avian medicine*, 2. Auflage. Mosby, Amsterdam, Barcelona, Peking, Boston, Philadelphia, London, Madrid, Mexiko, Mailand, München, Orlando, Paris, Rom, Sydney, Tokio, Toronto, 393-410.

KEYMER, I. F. (1972): Diseases of birds of prey. *Vet Rec* **90**, 579-594.

KHOSRAVI, A. R., SHOKRI, H., ZIGLARI, T., NAEINI, A. R., MOUSAVI, Z. UND HASHEMI, H. (2008): Outbreak of severe disseminated aspergillosis in a flock of ostrich (*Struthio camelus*). *Mycoses* **51(6)**, 557-559.

KLEINSCHMIDT, O. (1901): Der Formenkreis *Falco Hierofalco* und die Stellung der ungarischen Würgfalken in demselben. *Aquila* **8**, 1-49.

- KLIKA, E., SCHEUERMANN, D., DE GROODT-LASSEEL, M., BAZANTOVA, I. UND SWITKA, A. (1996): Pulmonary macrophages in birds (barn owl, *Tyto tyto alba*), domestic fowl (*Gallus gallus f. domestica*), quail (*Coturnix coturnix*) and pigeons (*Columbia livia*). *Anat Rec* **246**, 87-97.
- KOPLIN, J. R., COLLOPY, M. W., BAMMANN, A. R. UND LEVENSON, H. (1980): Energetics of Two Wintering Raptors. *The Auk* **97(4)**, 795-806.
- KRAUTWALD-JUNGHANNS, M.-E., SCHUMACHER, F. UND TELLHELM, B. (1993): Evaluation of the lower respiratory tract in psittacines using radiology and computer tomography. *Vet Radiol Ultrasoun* **34(6)**, 382-390.
- KRAUTWALD-JUNGHANNS, M.-E. (2011): Mykosen des Respirationstraktes. In: KALETA, E. F. UND KRAUTWALD-JUNGHANNS, M.-E. (Hrsg.). *Kompendium der Ziervogelkrankheiten*, 4. Auflage. Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH, Hannover, 231-240.
- KRAUTWALD-JUNGHANNS, M.-E. (2012): Pilze. In: SIGMANN, O. UND NEUMANN, U. (Hrsg.). *Kompendium der Geflügelkrankheiten*, 6. Auflage. Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH, Hannover, 299-310.
- KUMMROW, M., SILVANOSE, C., DI SOMMA, A., BAILEY, T. A. UND VORBRÜGGEN, S. (2012): Serum protein electrophoresis by using high-resolution agarose gel in clinically healthy and *Aspergillus* species-infected falcons. *J Avian Med Surg* **26(4)**, 213-220.
- KUNKLE, R. A. UND RIMLER, R. B. (1996): Pathology of acute aspergillosis in turkeys. *Avian Dis* **40(4)**, 875-886.
- KUNKLE, R. A., RIMLER, R. B. UND STEADHAM, E. M. (1999): Absence of protection against challenge with *Aspergillus fumigatus* by adoptive transfer of splenocytes from convalescent turkeys. *Avian Dis* **43(4)**, 678-684.
- KUNKLE, R. A. (2003): Fungal infections. In: SAIF, Y. M., BARNES, H. J., GLISSON, J. R., FADLY, A. M., MCDUGALD, L. R. UND SWAYNE, D. E. (Hrsg.). *Diseases of Poultry*. Blackwell Publishing Professional, Ames, IA, USA, 883-904.
- KURUP, V. P. (1984): Interaction of *Aspergillus fumigatus* spores and pulmonary alveolar macrophages of rabbits. *Immunobiology* **166(1)**, 53-61.
- KÜSPERT, H., HEIDENREICH, M. UND KÜSPERT, H.-J. (1993): Falkenzucht. *Die Voliere* **16(9, 10, 11)**.
- LACEY, J. UND LACEY, M. E. (1964): Spore concentrations in the air of farm buildings. *T Brit Mycol Soc* **47(4)**, 547-552.
- LAIR-FULLERINGER, S., GUILLOT, J., DESTERKE, C., SEGUIN, D., WARIN, S., BEZILLE, A., CHERMETTE, R. UND BRETAGNE, S. (2003): Differentiation between isolates of *Aspergillus fumigatus* from breeding turkeys and their environment by genotyping with microsatellite markers. *J Clin Microbiol* **41(4)**, 1798-1800.

LATGÉ, J. P. (1999): *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin Microbiol Rev **12(2)**, 310-350.

LATIF, H., CURTUI, V., ACKERMANN, Y., GROß, M. UND USLEBER, E. (2009): Production and characterization of antibodies against fumigaclavine A. Mycotox Res **25(3)**, 159-164.

LATIF, H. (2010): Development and application of an enzyme immunoassay for the detection of mycotoxin fumigaclavine A, Dr. med. vet. Dissertation, Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Justus Liebig Universität, Gießen.

LATIF, H., GROSS, M., FISCHER, D., LIERZ, M. UND USLEBER, E. (2015): Immunochemical analysis of fumigaclavine mycotoxins in respiratory tissues and in blood serum of birds with confirmed aspergillosis. Mycotoxin Res **31(4)**, 177-183.

LEHMANN, P. F. UND REISS, E. (1978): Invasive aspergillosis: antiserum for circulating antigen produced after immunization with serum from infected rabbits. Infect Immun **20(2)**, 570-572.

LI, S.-J., PASMANS, F., CROUBELS, S., VERBRUGGHE, E., VAN WAEYENBERGHE, L., YANG, Z., HAESBROUCK, F. UND MARTEL, A. (2013): T-2 toxin impairs antifungal activities of chicken macrophages against *Aspergillus fumigatus* conidia but promotes the pro-inflammatory responses. Avian Pathol **42(5)**, 457-463.

LI, S.-J., DHAENENS, M., GARMYN, A., VERBRUGGHE, E., ROOIJ, P. V., SAEGER, S. D., EECKHOUT, M., DUCATELLE, R., CROUBELS, S., HAESBROUCK, F., DEFORCE, D., PASMANS, F. UND MARTEL, A. (2015): Exposure of *Aspergillus fumigatus* to T-2 toxin results in a stress response associated with exacerbation of aspergillosis in poultry. World Mycotoxin J **8(3)**, 323-333.

LIERZ, M. (2007): Diagnostic value of endoscopy and biopsy. In: HARRISON, G. J. UND LIGHTFOOT, T. L. (Hrsg.). Clin Avian Med. Spix Publishing Inc, Palm Beach, FL, USA, 641-644.

LIERZ, M. (2008): Raptors: Endoscopy, biopsy and endosurgery. In: CHITTY, J. UND LIERZ, M. (Hrsg.). BSAVA Manual of raptors, pigeons and passerine birds. British Small Animal Veterinary Association Limited, Quedgeley, Gloucester, UK, 128-142.

LIERZ, M. UND KORBEL, R. (2012): Anesthesia and analgesia in birds. J Exot Pet Med **21(1)**, 44-58.

LIONAKIS, M. S. UND KONTOYIANNIS, D. P. (2005): Fruit flies as a minihost model for studying drug activity and virulence in *Aspergillus*. Med Mycol **43 Suppl. 1**, 111-114.

MAERKER, C., ROHDE, M., BRAKHAGE, A. A. UND BROCK, M. (2005): Methylcitrate synthase from *Aspergillus fumigatus*. FEBS J **272(14)**, 3615-3630.

- MAERTENS, J., VERHAEGEN, J., DEMUYNCK, H., BROCK, P., VERHOEF, G., VANDENBERGHE, P., VAN ELDERE, J., VERBIST, L. UND BOOGAERTS, M. (1999): Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hematological patients at risk for invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* **37(10)**, 3223-3228.
- MAINA, J. N. UND COWLEY, H. M. (1998): Ultrastructural characterization of the pulmonary cellular defences in the lung of a bird, the rock dove, *Columba livia*. *P R Soc London* **265(1405)**, 1567-1572.
- MAINA, J. N. (2002): Some recent advances on the study and understanding of the functional design of the avian lung: morphological and morphometric perspectives. *Biol Rev* **77(1)**, 97-152.
- MARTEL, A. (2016): Aspergillosis. In: SPEER, B. (Hrsg.). *Current therapy in avian medicine and surgery*, 1. Auflage. Elsevier, St. Louis, MO, USA, 63-73.
- MARTINEZ-QUESADA, J., NIETO-CADENAZZI, A. UND TORRES-RODRIGUEZ, J. M. (1993): Humoral immunoresponse of pigeons to *Aspergillus fumigatus* antigens. *Mycopathologia* **124(3)**, 131-137.
- MARTY, F. M. UND KOO, S. (2009): Role of (1→3)-β-D-glucan in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Med Mycol* **47 Suppl. 1**, 233-240.
- MCDIARMID, A. (1955): Aspergillosis in free-living wild birds. *J Comp Pathol* **65(3)**, 246-249.
- MCMILLAN, M. C. UND PETRAK, M. L. (1989): Retrospective study of aspergillosis in pet birds. *J Assoc Avian Vet*, 211-215.
- MEBS, T. UND SCHMIDT, D. (2014): *Die Greifvögel Europas, Nordafrikas, Vorderasiens*, 2. Auflage. Franckh-Kosmos Verlag GmbH & Co. KG, Stuttgart.
- MECHNIKOVA, S. A., ROMANOV, M. S., KALYAKIN, V. N. UND KUDRYAVTSEV, N. V. (2010): The Gyrfalcon, *Falco rusticolus*, in the Yamal Peninsula: Dynamics of Brood Size and Nest Size over the Years 1973-2008. *Russ J Ecol* **41(3)**, 256-263.
- MEHLHORN, H., DÜWEL, D. UND RAETHER, W. (1993): *Diagnose und Therapie der Parasitosen von Haus Nutz- und Heimtieren*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York.
- MELLOUL, E., THIERRY, S., DURAND, B., CORDONNIER, N., DESOUBEAUX, G., CHANDENIER, J., BOSTVIRONNOIS, C., BOTTEREL, F., CHERMETTE, R., GUILLOT, J. UND ARNE, P. (2014): Assessment of *Aspergillus fumigatus* burden in lungs of intratracheally-challenged turkeys (*Meleagris gallopavo*) by quantitative PCR, galactomannan enzyme immunoassay, and quantitative culture. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **37(5-6)**, 271-279.
- MIKAELIAN, I., GAUTHIER, F., FITZGERALD, G., HIGGINS, R., CLAVEAU, R. UND MARTINEAU, D. (1997): Causes primaires de deces des oiseaux de la faune au Quebec. *Le Medecin Veterinaire du Quebec* **27(3)**, 94-102.

MILLNER, P. D., MARSH, P. B., SNOWDEN, R. B. UND PARR, J. F. (1977): Occurrence of *Aspergillus fumigatus* during composting of sewage sludge. *Appl Environ Microb* **34(6)**, 765-772.

MOMANY, M. UND TAYLOR, I. (2000): Landmarks in the early duplication cycles of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*: polarity, germ tube emergence and septation. *Microbiology* **146(12)**, 3279-3284.

MONDON, P., DE CHAMPS, C., DONADILLE, A., AMBROISE-THOMAS, P. UND GRILLOT, R. (1996): Variation in virulence of *Aspergillus fumigatus* strains in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *J Med Microbiol* **45(3)**, 186-191.

MOORE D., ROBSON G.D. UND A.P.J., T. (2011): 21st Century guidebook to fungi, http://140.136.180.180/Repository/SCO_009/Ch09_03.htm.

MORI, T., MATSUMURA, M., YAMADA, K., IRIE, S., OSHIMI, K., SUDA, K., OGURI, T. UND ICHINOE, M. (1998): Systemic aspergillosis caused by an aflatoxin-producing strain of *Aspergillus flavus*. *Med Mycol* **36(2)**, 107-112.

MORISHITA, T. Y., MCFADZEN, M. E., MOHAN, R., AYE, P. P. UND BROOKS, D. L. (1998): Serologic survey of free-living nestling prairie falcons (*Falco mexicanus*) for selected pathogens. *J Zoo Wildl Med* **29(1)**, 18-20.

MORRIS, J. UND STEVENS, R. (1971): Successful cross-breeding of a peregrine tiercel and a saker falcon. *Captive Breeding of Diurnal Birds of Prey* **1(2)**, 5-7.

MORRISEY, J. K. (1998): Avian aspergillosis. *Exot Pet Pract* **3(10)**, 73-74.

MÜCKE, W. UND LEMMEN, C. (2004): Schimmelpilze - Vorkommen, Gesundheitsgefahren, Schutzmaßnahmen, 3. Auflage. Ecomed Medizin, Landsberg am Lech, 184.

MÜLLER, M. G. (2009): Fungal diseases. In: MÜLLER, M. G. (Hrsg.). *Practical handbook of falcon husbandry and medicine*. Nova Science Publishers, New York, 223-242.

MULLINS, J., HARVEY, R. UND SEATON, A. (1976): Sources and incidence of airborne *Aspergillus fumigatus* *Clin Exp Allergy* **6(3)**, 209-217.

MULLINS, J., HUTCHESON, P. S. UND SLAVIN, R. (1984): *Aspergillus fumigatus* spore concentration in outside air: Cardiff and St Louis compared. *Clin Exp Allergy* **14(4)**, 351-354.

MURATA, H., SHIMADA, N. UND YOSHIOKA, M. (2004): Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J* **168(1)**, 28-40.

NALDO, J. L. UND SAMOUR, J. H. (2004): Causes of morbidity and mortality in falcons in Saudi Arabia. *J Avian Med Surg* **18(4)**, 229-241.

NARDONI, S., CECCHERELLI, R., ROSSI, G. UND MANCIANTI, F. (2006): Aspergillosis in *Larus cachinnans micaellis*: survey of eight cases. *Mycopathologia* **161(5)**, 317-321.

- NAZIFI, S., DADRAS, H., HOSEINIAN, S. A., ANSARI-LARI, M. UND MASOUDIAN, M. (2010): Measuring acute phase proteins (haptoglobin, ceruloplasmin, serum amyloid A, and fibrinogen) in healthy and infectious bursal disease virus-infected chicks. *Comp Clin Pathol* **19(3)**, 283-286.
- NEDYALKOV, N., LEVIN, A., DIXON, A. UND BOEV, Z. (2014): Diet of saker falcon (*Falco cherrug*) and Eastern imperial eagle (*Aquila heliaca*) from Central Kazakhstan. *Ecologia Balkanica* **6(1)**, 25-30.
- NEWELL, S. M., ROBERTS, G. D. UND AVERY BENNETT, R. (1997): Imaging techniques for avian lower respiratory diseases. *Sem Avian Exot Pet* **6(4)**, 180-186.
- NGANPIEP, L. N. UND MAINA, J. N. (2002): Composite cellular defence stratagem in the avian respiratory system: functional morphology of the free (surface) macrophages and specialized pulmonary epithelia. *J Anat* **200(5)**, 499-516.
- NIELSEN, O. K. UND CADE, T. J. (1990): Seasonal changes in food habits of gyrfalcons in NE-Iceland. *Ornis Scandinavica* **21(3)**, 202-211.
- NIELSEN, O. K. (1999): Gyrfalcon predation on ptarmigan: numerical and functional responses. *J Anim Ecol* **68(5)**, 1034-1050.
- NISHIDA, C., ISHIJIMA, J., KOSAKA, A., TANABE, H., HABERMANN, F. A., GRIFFIN, D. K. UND MATSUDA, Y. (2008): Characterization of chromosome structures of Falconinae (Falconidae, Falconiformes, Aves) by chromosome painting and delineation of chromosome rearrangements during their differentiation. *Chromosome Res* **16(1)**, 171-81.
- NITTINGER, F., HARING, E., PINSKER, W., WINK, M. UND GAMAUF, A. (2005): Out of Africa? Phylogenetic relationships between *Falco biarmicus* and the other hierofalcons (aves: falconidae). *J Zool Syst Evol Res* **43(4)**, 321-331.
- NITTINGER, F., GAMAUF, A., PINSKER, W., WINK, M. UND HARING, E. (2007): Phylogeography and population structure of the saker falcon (*Falco cherrug*) and the influence of hybridization: mitochondrial and microsatellite data. *Mol Ecol* **16(7)**, 1497-1517.
- NORTON, A. J., JORDAN, S. UND YEOMANS, P. (1994): Brief, high-temperature heat denaturation (pressure cooking): A simple and effective method of antigen retrieval for routinely processed tissues. *J Pathol* **173(4)**, 371-379.
- NYSTRÖM, J., EKENSTEDT, J., ENGSTRÖM, J. UND ANGERBJÖRN, A. (2005): Gyr Falcons, ptarmigan and microtine rodents in northern Sweden. *Ibis* **147(3)**, 587-597.
- O'MEARA, D. C. UND CHUTE, H. L. (1959): Aspergillosis experimentally produced in hatching chicks. *Avian Dis* **3(4)**, 404-406.
- O'MEARA, D. C. UND WITTER, J. F. (1971): Aspergillosis. In: DAVIS, J. N., ANDERSON, R. C., KARSTAD, L. UND TRAINER, D. O. (Hrsg.). *Infectious and parasitic diseases of wild birds*. Iowa State University Press, Ames, IA, USA, 153-162.

OBST, J. (1994): Tree nesting by the gyrfalcon *Falco rusticolus* in the Western Canadian Arctic. *J Raptor Res* **28(1)**, 4-8.

OBUCH, J. UND CHAVKO, J. (1997): The diet of the saker falcon (*Falco cherrug*) in SW Slovakia. *Buteo* **9**, 77-84.

OGLESBEE, B. L. (1997): Mycotic diseases. In: ALTMAN, R. B. (Hrsg.). *Avian Medicine Surgery*, 1. Auflage. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 323-361.

OKOYE, J. O. A. UND OKEKE, C. N. (1986): Pathogenicity of an isolate of *Aspergillus flavus* in chickens. *Avian Pathol* **15(2)**, 259-270.

OLIAS, P., GRUBER, A. D., WINFRIED, B., HAFEZ, H. M. UND LIERZ, M. (2010a): Fungal pneumonia as a major cause of mortality in white stork (*Ciconia ciconia*) chicks. *Avian Dis* **54(1)**, 94-98.

OLIAS, P., HAUCK, R., WINDHAUS, H., VAN DER GRINTEN, E., GRUBER, A. D. UND HAFEZ, H. M. (2010b): Articular aspergillosis of hip joints in turkeys. *Avian Dis* **54(3)**, 1098-1100.

OLIAS, P., GRUBER, A. D., HAFEZ, H. M., LIERZ, M., SLESIONA, S., BROCK, M. UND JACOBSEN, I. D. (2011a): Molecular epidemiology and virulence assessment of *Aspergillus fumigatus* isolates from white stork chicks and their environment. *Vet Microbiol* **148(2-4)**, 348-355.

OLIAS, P., JACOBSEN, I. D. UND GRUBER, A. D. (2011b): Fungal species identification from avian lung specimens by single hypha laser microdissection and PCR product sequencing. *Med Mycol* **49(1)**, 56-61.

OZMEN, O. UND DORRESTEIN, M. G. (2004): Observations of aspergillosis in the brains of turkey poults using different histopathological staining techniques. *Biotech Histochem* **79(2)**, 95-99.

PANDITA, A., SADANA, J. R. UND ASRANI, R. K. (1991): Studies on clinical signs and haematological alterations in pneumonic aspergillosis due to *Aspergillus flavus* in Japanese quail. *Mycopathologia* **116(2)**, 119-123.

PARKER, C. D. (2011): Aspergillosis in gamebirds and ducks. *Vet Rec* **169(23)**, 613-614.

PEDEN, W. M. UND RHOADES, K. R. (1992): Pathogenicity differences of multiple isolates of *Aspergillus fumigatus* in turkeys. *Avian Dis* **36(3)**, 537-542.

PENDL, H. (2008a): Für Studium und Praxis: Möglichkeiten und Grenzen einer praxisnahen Hämatologie beim Vogel - Teil 1: Methodische Einführung und Befunde beim klinisch gesunden Vogel. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere* **36(4)**, 290-298.

- PENDL, H. (2008b): Für Studium und Praxis: Möglichkeiten und Grenzen einer praxisnahen Hämatologie beim Vogel - Teil 2: Ontogenetisch-physiologische und pathologische Befunde und deren Interpretation. Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere **36(5)**, 368-380.
- PERELMAN, B. UND KUTTIN, E. S. (1992): Aspergillosis in ostriches. Avian Pathol **21(1)**, 159-163.
- PERELMAN, B. (1993): Evaluation of azole anti-mycotic agents using an experimental model of aspergillosis in turkey poults. In: European Conference on Avian Medicine and Surgery, Utrecht, NL, 120.
- PERTZ, H. (1996): Naturally occurring clavines: antagonism/partial agonism at 5-HT_{2A} receptors and antagonism at α 1-adrenoceptors in blood vessels. Planta medica **62(5)**, 387-392.
- PFANDER, P. (1998): Neues über den Altai(ger)falken. In: DEUTSCHER FALKENORDEN (Hrsg.). Greifvögel und Falknerei. Neumann-Neudamm, Melsungen, 131-136.
- PHALEN, D. N. (2000): Respiratory medicine of cage and aviary birds. Vet Clin N Am Exot Anim Pract **3(2)**, 423-452.
- PINEL, C., FRICKER-HIDALGO, H., LEBEAU, B., GARBAN, F., HAMIDFAR, R., AMBROISE-THOMAS, P. UND GRILLOT, R. (2003): Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* galactomannan: Value and limits of the Platelia test for diagnosing invasive aspergillosis. J Clin Microbiol **41(5)**, 2184-2186.
- PUZOVIĆ, S. (2008): Nest occupation and prey grabbing by saker falcon (*Falco cherrug*) on power lines in the province of Vojvodina (Serbia). Arch Biol Sci **60(2)**, 271-277.
- PYE, G. W., BENNETT, R. A., NEWELL, S. M., KINDRED, J. UND JOHNS, R. (2000): Magnetic resonance imaging in psittacine birds with chronic sinusitis. J Avian Med Surg **14(4)**, 243-256.
- RAUTENSCHLEIN, S. UND LEGLER, M. (2006): Eulen herpes virus infection (*Hepatosplenitis infectiosa strigum*) with additionally present Trichomonadosis (*Trichomonas gallinae*) und Aspergillosis (*Aspergillus fumigatus*) in an eagle owl (*Bubo bubo*) from avian breeding. Praktischer Tierarzt **87(9)**, 688-694.
- REDIG, P. T. (1980a): Aspergillosis in raptors. In: COOPER, J. E. UND GREENWOOD, A. G. (Hrsg). Recent advances in the study of raptor diseases: Proceedings of the International Symposium on Diseases of Birds of Prey, London, UK, 117-122.
- REDIG, P. T. (1980b): The diagnosis and treatment of aspergillosis in birds, PhD Dissertation, College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, St. Paul, MN.
- REDIG, P. T., FULLER, M. R. UND EVANS, D. L. (1980): Prevalence of *Aspergillus fumigatus* in free-living goshawks (*Accipiter gentilis atricapillus*). J Wildlife Dis **16**, 169-174.

REDIG, P. T. (1993): Avian Aspergillosis. In: FOWLER, M. E. (Hrsg.). Zoo and wild animal medicine current therapy. WB Saunders, Philadelphia, PA, USA, 178-181.

REDIG, P. T., OROSZ, S. E. UND CRAY, C. (1997): The ELISA as a management guide for aspergillosis in raptors. In: Annu Conf Assoc Avian Vet, Association of Avian Veterinarians, Reno, NV, USA, 99-104.

REDIG, P. T. (2007): Fungal diseases - aspergillosis. In: SAMOUR, J. H. (Hrsg.). Avian medicine, 2. Auflage. Mosby, Amsterdam, Barcelona, Peking, Boston, Philadelphia, London, Madrid, Mexiko, Mailand, München, Orlando, Paris, Rom, Sydney, Tokio, Toronto, 373-387.

REEVES, E., MESSINA, C. G. M., DOYLE, S. UND KAVANAGH, K. (2004): Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. Mycopathologia **158(1)**, 73-79.

REIDARSON, T. H. UND MCBAIN, J. (1995): Serum protein electrophoresis and *Aspergillus* antibody titers as an aid to diagnosis of aspergillosis in penguins. In: KORNELSEN, M. J. (Hrsg.). Annual Conf Assoc Avian Vet, Association of Avian Veterinarians, Philadelphia, PA, USA, 61-64.

REISS, E. UND LEHMANN, P. F. (1979): Galactomannan antigenemia in invasive aspergillosis. Infection and Immunity **25(1)**, 357-365.

REMPLE, D. UND GROSS, C. (1993): Falconry and birds of prey in the Gulf. Motivate Publishing, Dubai, Abu Dhabi, London.

RICH, G. A. (1991): Basic history taking and the avian physical examination. Vet Clin N Am Exot Anim Pract **21(6)**, 1135-1145.

RICHARD, J. L., PIER, A. C., CYSEWSKI, S. J. UND GRAHAM, C. K. (1973): Effect of aflatoxin and aspergillosis on turkey poults. Avian Dis **17(1)**, 111-121.

RICHARD, J. L., CUTLIP, R. C., THURSTON, J. R. UND SONGER, J. (1981): Response of turkey poults to aerosolized spores of *Aspergillus fumigatus* and aflatoxigenic and nonaflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. Avian Dis **25(1)**, 53-67.

RICHARD, J. L., THURSTON, J. R., CUTLIP, R. C. UND PIER, A. C. (1982): Vaccination studies of aspergillosis in turkeys: subcutaneous inoculation with several vaccine preparations followed by aerosol challenge exposure. Am J Vet Res **43(3)**, 488-492.

RICHARD, J. L. UND THURSTON, J. R. (1983): Rapid hematogenous dissemination of *Aspergillus fumigatus* and *A. flavus* spores in turkey poults following aerosol exposure. Avian Dis **27**, 1025-1033.

RICHARD, J. L., THURSTON, J. R., PEDEN, W. M. UND PINELLO, C. (1984): Recent studies on aspergillosis in turkey poults. Mycopathologia **87(1)**, 3-11.

RICHARD, J. L., PEDEN, W. M. UND WILLIAMS, P. P. (1994): Gliotoxin inhibits transformation and its cytotoxic to turkey peripheral blood lymphocytes. Mycopathologia **126(2)**, 109-114.

- RICHARD, J. L., DVORAK, T. J. UND ROSS, P. F. (1996): Natural occurrence of gliotoxin in turkeys infected with *Aspergillus fumigatus*, Fresenius. *Mycopathologia* **134(3)**, 167-170.
- RICHARD, J. L. (1997): Gliotoxin, a mycotoxin associated with cases of avian aspergillosis. *J Nat Toxins* **6(1)**, 11-18.
- RICKERTS, V., MOUSSET, S., LAMBRECHT, E., TINTELNOT, K., SCHWERDTFEGER, R., PRESTERL, E., JACOBI, V., JUST-NUBLING, G. UND BIALEK, R. (2007): Comparison of histopathological analysis, culture, and polymerase chain reaction assays to detect invasive mold infections from biopsy specimens. *Clin Infect Dis* **44(8)**, 1078-1083.
- ROBINSON, S. L. UND PANACCIONE, D. G. (2012): Chemotypic and genotypic diversity in the ergot alkaloid pathway of *Aspergillus fumigatus*. *Mycologia* **104(4)**, 804-812.
- SAAR, C., GERRIET, S., PAASCH, B. UND SPAETER, C. (1983): Die künstliche Besamung beim Wanderfalken (*Falco peregrinus*). Ein Beitrag zur Rettung einer vom Aussterben bedrohten Art. *Kleintierpraxis* **28**, 163-176.
- SACHS, L. (2013): Angewandte Statistik: Statistische Methoden und ihre Anwendungen, 5. Auflage. Springer-Verlag, Berlin und Heidelberg, 552.
- SCHEID, P. UND PIIPER, J. (1987): Gas exchange and transport. In: SELLER, T. J. (Hrsg.). *Bird respiration*. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, USA, 97-129.
- SCHLEGEL, H. UND VAN WULVERHORST, A. H. V. (1999): *Traité de Fauconnerie - Greifvögel und Falknerei im 19. Jahrhundert*. Peter N KlühVerlag, Darmstadt
- SCHMIDT-NIELSEN, K. (1997): *Animal physiology: adaptation and environment*, 5. Auflage. Cambridge University Press, Cambridge, UK, New York, USA, Melbourne, Australia.
- SCHMIDT, A. UND WOLFF, M. (1997): Morphological characteristics of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from patient samples. *Mycoses* **40(9-10)**, 347-351.
- SCHÖNEBERG, H. (2009): *Falknerei - Der Leitfaden für Prüfung und Praxis, durchgesehene und aktualisierte, 3 Auflage*. Peter N. Klüh Verlag, Darmstadt, 343.
- SCHULZ, J., SANCHEZ, A., LIERZ, M. UND HARTUNG, J. (2007): Dead losses of falcons caused by aspergillosis. In: ALAND, A. (Hrsg). *XIII. International Congress on Animal Hygiene ISAH*, Estonian University of Life Sciences, Tartu, Estonia 707-711.
- SCHWARTZ, J. (2013): *Raptors in Education: How Educators Use Live Raptors for Environmental Education*, Master of Environmental Education Dissertation, University of Minnesota, St. Paul, MN USA.
- SCHWARZ, T., KELLEY, C., PINKERTON, M. E. UND HARTUP, B. K. (2015): Computed tomographic anatomy and characteristics of respiratory aspergillosis in juvenile whooping cranes. *Vet Radiol Ultrasound* **57(1)**, 16-23.

- SEIBOLD, I., HELBIG, A. UND WINK, M. (1993): Molecular systematics of falcons (family Falconidae). *Naturwissenschaften* **80(2)**, 87-90.
- SHEAHAN, D., BELL, R., MELLANBY, R. J., GOW, A. G., FRIEND, E., HELLER, J., BENCE, L. M. UND ECKERSALL, P. D. (2010): Acute phase protein concentrations in dogs with nasal disease. *Vet Rec* **167(23)**, 895-899.
- SHOHAM, S. UND LEVITZ, S. M. (2005): The immune response to fungal infections. *Brit J Haematol* **129(5)**, 569-582.
- SIBLEY, C. G. (1994): On the Phylogeny and Classification of Living Birds. *J Avian Biol* **25(2)**, 87-92.
- SILVANOSE, C. D., BAILEY, T. A. UND DI SOMMA, A. (2006): Susceptibility of fungi isolated from the respiratory tract of falcons to amphotericin B, itraconazole and voriconazole. *Vet Rec* **159(9)**, 282-284.
- SINGH, N., GREWAL, G. S., BRAR, R. S., SINGH, B., DHALIWAL, A. S. UND JAND, S. K. (1993): Outbreak of mycotic tracheitis in domestic fowl. *Mycoses* **36(1-2)**, 65-67.
- SOLTI, B. (1981): Vergleichend-osteologische Untersuchungen am Skelettsystem der Falkenarten *Falco cherrug* Gray und *Falco peregrinus* Tunstall. *Vertebrata Hungarica* **20**, 75-125.
- SOUZA, M. J. UND DEGERNES, L. A. (2005): Mortality due to aspergillosis in wild swans in Northwest Washington State, 2000–02. *J Avian Med Surg* **19(2)**, 98-106.
- SPILSBURY, J. UND WILKINSON, S. (1961): The isolation of festuclavine and two new clavine alkaloids from *Aspergillus fumigatus* Fres. *J Chem Soc* **5**, 2085-2091.
- STEDHAM, M. A., BUCCI, T. J. UND MARONPOT, R. R. (1968): Sexual and asexual phases of *Aspergillus nidulans* in an egret. *Mycopathologia et mycologia applicata* **36(3)**, 289-292.
- STOUTE, S. T., BICKFORD, A. A., WALKER, R. L. UND CHARLTON, B. R. (2009): Mycotic pododermatitis and mycotic pneumonia in commercial turkey poults in northern California. *J Vet Diagn Invest* **21(4)**, 554-547.
- STROUD, R. K. UND DUNCAN, R. M. (1982): Occlusion of the syrinx as a manifestation of aspergillosis in Canada geese. *J Am Vet Med Assoc* **181(11)**, 1389-1390.
- SUEDMEYER, W. K., BERMUDEZ, A. J. UND FALES, W. H. (2002): Treatment of epidermal cysts associated with *Aspergillus fumigatus* and alternaria species in a silky bantam chicken. *J Avian Med Surg* **16(2)**, 133-137.
- SUSEVER, S. UND YEGENOGLU, Y. (2011): Evaluation of the significance of molecular methods in the diagnosis of invasive fungal infections: comparison with conventional methods. *Mikrobiyol Bul* **45(2)**, 325-335.

- TATUM, L. M., ZAIAS, J., MEALEY, B. K., CRAY, C. UND BOSSART, G. D. (2000): Protein electrophoresis as a diagnostic and prognostic tool in raptor medicine. *J Zoo Wildlife Med* **31(4)**, 497-502.
- TAYLOR, J. UND BURROUGHS, E. (1973): Experimental avian aspergilosis. *Mycopathologia* **51(2)**, 131-141.
- TAYLOR, J. W. (2006): Evolution of human-pathogenic fungi: phylogenies and species. In: HEITMAN, J., FILLER, S. G., EDWARDS, J. E. J. UND MITCHELL, A. P. (Hrsg.). *Molecular principles of fungal pathogenesis*. ASM Press, Washington D.C., USA, 113-132.
- TAYLOR, M. (1997): Endoscopic diagnosis of avian respiratory tract diseases. *Sem Avian Exot Pet* **6(4)**, 187-194.
- TELL, L. A. (2005): Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine. *Med Mycol* **43 Suppl. 1**, 71-73.
- TELL, L. A., CLEMONS, K. V., KLINE, Y., WOODS, L., KASS, P. H., MARTINEZ, M. UND STEVENS, D. A. (2010): Efficacy of voriconazole in Japanese quail (*Coturnix japonica*) experimentally infected with *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* **48(2)**, 234-244.
- TEMPLE, S. A. (1972): Artificial insemination with imprinted birds of prey. *Nature* **237**, 287-288.
- THAL, J., STEFFEN, M., MEIER, B., SCHNEIDER, E., ADRIANY, A. UND USLEBER, E. (2011): Development of an enzyme immunoassay for the antibiotic cefquinome and its application for residue determination in cow's milk after therapeutical mastitis treatment. *Anal Bioanal Chem* **399**, 1051-1059.
- TORRE-BUENO, J. R. (1978): Respiration during flight in birds. In: PIPER, J. (Hrsg.). *Respiratory function in birds, adult and embryonic*. Springer, Berlin, 89-94.
- TOTH, T. E. (2000): Nonspecific cellular defense of the avian respiratory system: a review. *Developmental & Comparative Immunology* **24(2-3)**, 121-139.
- TOTHOVA, C., NAGY, O. UND KOVAC, G. (2016): Serum proteins and their diagnostic utility in veterinary medicine: a review. *Veterinari Medicina* **61(9)**, 475-496.
- TRAUTMANN, C., GABRIO, T., DILL, I., WEIDNER, U. UND BAUDISCH, C. (2005): Hintergrundkonzentrationen von Schimmelpilzen in Luft. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz* **48(1)**, 12-20.
- TSAI, S. S., PARK, J. H., HIRAI, K. UND ITAKURA, C. (1992): Aspergillosis and candidiasis in psittacine and passeriforme birds with particular reference to nasal lesions. *Avian Pathol* **21(4)**, 699-709.
- TUDOR, D. C. (1983): Mycotic infections of feathers as a cause of feather pulling in pigeons and psittacine birds. *Vet Med Small Anim Clin* **78**, 249-253.

TULLY, T. N. UND HARRISON, G. J. (1994): Pneumology. In: RITCHIE, B. W. (Hrsg.). Avian medicine: Principles and application. Wingers, Lake Worth, FL, USA, 556-581.

VAN CUTSEM, J. UND FRANSEN, J. (1987): Fungal infections in birds in captivity - six case reports. *Mykosen* **30**, 166-171.

VAN CUTSEM, J., VAN GERVEN, F. UND JANSSEN, P. A. (1989): Oral and parenteral therapy with saperconazole (R 66905) of invasive aspergillosis in normal and immunocompromised animals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33(12)**, 2063-2068.

VAN DER HEYDEN, N. (1993): Aspergillosis in psittacine chicks. In: Annual Conference Association Avian Veterinarians, Nahville, Tennessee, USA, 207-212.

VAN VEEN, L., DWARS, R. M. UND FABRI, T. H. F. (1999): Mycotic spondylitis in broilers caused by *Aspergillus fumigatus* resulting in partial anterior and posterior paralysis. *Avian Pathol* **28(5)**, 487-490.

VAN WAEYENBERGHE, L., PASMANS, F., BEERNAERT, L. A., HAESEBROUCK, F., VERCAMMEN, F., VERSTAPPEN, F., DORRESTEIN, G. M., KLAASSEN, C. H. W. UND MARTEL, A. (2011): Microsatellite typing of avian clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Avian Pathol* **40(1)**, 73-77.

VAN WAEYENBERGHE, L., FISCHER, D., COENYE, T., DUCATELLE, R., HAESEBROUCK, F., PASMANS, F., LIERZ, M. UND MARTEL, A. (2012a): Susceptibility of adult pigeons and hybrid falcons to experimental aspergillosis. *Avian Pathol* **41(6)**, 563-567.

VAN WAEYENBERGHE, L., PASMANS, F., D'HERDE, K., DUCATELLE, R., FAVOREEL, H., LI, S.-J., HAESEBROUCK, F. UND MARTEL, A. (2012b): Germination of *Aspergillus fumigatus* inside avian respiratory macrophages is associated with cytotoxicity. *Vet Res* **43**, 32.

VANHEE, L. M. E., NELIS, H. J. UND COENYE, T. (2009): Rapid detection and quantification of *Aspergillus fumigatus* in environmental air samples using solid-phase cytometry. *Environ Sci Technol* **43(9)**, 3233-3239.

VANHEE, L. M. E., PERMAN, D., NELIS, H. J. UND COENYE, T. (2010): Rapid quantification of itraconazole-resistant *Aspergillus fumigatus* in air. *J Microbiol Meth* **81(2)**, 197-199.

VELDMAN, A., MEIJS, J. A. C., BORGGREVE, G. J. UND HEERES-VAN DER TOL, J. J. (1992): Carry-over of aflatoxin from cows food to milk. *Anim Prod* **55(2)**, 163-168.

VERSTAPPEN, F. UND DORRESTEIN, G. M. (2005): Aspergillosis in Amazon parrots after corticosteroid therapy for smoke-inhalation injury. *J Avian Med Surg* **19(2)**, 138-141.

VERWEIJ, P. E., STYNEN, D., RIJS, A. J., DE PAUW, B. E., HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. UND MEIS, J. F. (1995): Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay compared with Pastorex latex agglutination test for diagnosing invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* **33(7)**, 1912-1914.

- VERWEIJ, P. E., WEEMAES, C. M., CURFS, J. H. A. J., BRETAGNE, S. UND MEIS, J. F. G. M. (2000): Failure to detect circulating *Aspergillus* markers in a patient with chronic granulomatous disease and invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* **38(10)**, 3900-3901.
- VESELSKY, M., OTCENASEK, M., DUBA, J. UND DITRICH, O. (1984): Mass occurrence of mycotic tracheitis in chickens. *Vet Med* **29(5)**, 301-306.
- VIEGAS, C., MALTA-VACAS, J., SABINO, R., VIEGAS, S. UND VERISSIMO, C. (2014): Accessing indoor fungal contamination using conventional and molecular methods in Portuguese poultries. *Environ Monit Assess* **186(3)**, 1951-1959.
- VORBRÜGGEN, S., BAILEY, T. UND KRAUTWALD-JUNGHANNS, M. E. (2013): Röntgenzeichen bei an Mykose des Respirationstrakts erkrankten Greifvögeln. *Tierärztliche Praxis Kleintiere* **41(5)**, 311-318.
- WALKER, A. K. (2012): Aspergillosis in gamebirds and ducks. *Vet Rec* **170(3)**, 84.
- WANG, D. Y., HADJ-HENNI, L., THIERRY, S., ARNE, P., CHERMETTE, R., BOTTEREL, F., HADRICH, I., MAKNI, F., AYADI, A., RANQUE, S., HUANG, W. Y. UND GUILLOT, J. (2012): Simple and highly discriminatory VNTR-based multiplex PCR for tracing sources of *Aspergillus flavus* isolates. *PLoS One* **7(9)**, e44204.
- WARD, F. P., FAIRCHILD, D. G. UND VUICICH, J. V. (1970): Pulmonary aspergillosis in prairie falcon nest mates. *J Wildl Dis* **6(1)**, 80-83.
- WEINER, H. L., DA CUNHA, A. P., QUINTANA, F. UND WU, H. (2011): Oral tolerance. *Immunol Rev* **241(1)**, 241-259.
- WERNER, L. L. UND REAVILL, D. R. (1999): The diagnostic utility of serum protein electrophoresis. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* **2(3)**, 651-662.
- WERNERY, R., WERNERY, U., KINNE, J. UND SAMOUR, J. H. (2004a): Haematology and blood biochemistry. In: WERNERY, R., WERNERY, U., KINNE, J. UND SAMOUR, J. H. (Hrsg.). *Colour atlas of falcon medicine*. Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH, Hannover, 12-42.
- WERNERY, R., WERNERY, U., KINNE, J. UND SAMOUR, J. H. (2004b): Fungal Diseases. In: WERNERY, R., WERNERY, U., KINNE, J. UND SAMOUR, J. H. (Hrsg.). *Colour Atlas of Falcon Medicine*. Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH, Hannover, 81-91.
- WINK, M., SEIBOLD, I., LOTFIKHAH, F. UND BEDNAREK, W. (1998): Molecular systematics of holarctic raptors (Order Falconiformes). *Holarctic birds of prey* **29**, 48.
- WINK, M., SAUER-GUERTH, H., ELLIS, D. UND KENWARD, R. (2004): Phylogenetic relationships in the Hierofalco complex (saker-, gyr-, lanner-, laggar falcon). In: CHANCELLOR, R. UND MEYBURG, B. (Hrsg.). *Raptors worldwide*. WWGBP/MME, Budapest, Berlin, 499-504.

WINK, M., SAUER-GÜRTH, H., ABDEL-AZIZ EL-SAYED UND GONZALES, J. (2007): Ein Blick durch die Lupe der Genetik: Greifvögel aus der DNA-Perspektive. In: DEUTSCHER FALKENORDEN (Hrsg.). Greifvögel und Falknerei. J. Neumann-Neudamm AG, Melsungen.

WLAZ, P., KNAGA, S., KASPEREK, K., WLAZ, A., POLESZAK, E., JEZEWSKA-WITKOWSKA, G., WINIARCZYK, S., WYSKA, E., HEINEKAMP, T. UND RUNDFELDT, C. (2015): Activity and safety of inhaled itraconazole nanosuspension in a model pulmonary *Aspergillus fumigatus* infection in inoculated young quails. *Mycopathologia* **180**(1-2), 35-42.

WOBESER, G. UND SAUNDERS, J. R. (1975): Pulmonary oxalosis in association with *Aspergillus niger* infection in a great horned owl (*Bubo virginianus*). *Avian Dis* **19**(2), 388-392.

YOUNG, E. A., CORNISH, T. E. UND LITTLE, S. E. (1998): Concomitant mycotic and verminous pneumonia in a blue jay from Georgia. *J Wildl Dis* **34**(3), 625-628.

ZAFRA, R., PÉREZ, J., PÉREZ-ÉCIJA, R. A., BORGE, C., BUSTAMANTE, R., CARBONERO, A. UND TARRADAS, C. (2008): Concurrent Aspergillosis and Ascites with High Mortality in a Farm of Growing Broiler Chickens. *Avian Dis* **52**(4), 711-713.

9 Anhang

Anhang I Übersicht zu experimentellen Studien über Aspergillose durch *Aspergillus fumigatus* bei Vögeln (exklusive Medikamenten-/Therapiestudien)

Vogelart	Alter	Route der Inokulation	<i>A. fumigatus</i> - Inokulationsdosis (ID); Expositionsdauer (Exp); Tierzahlen (n)	Dauer des Experiments; Hauptziel des Experiments; Ergebnisse der klinischen (Klinik), pathologischen (Patho), histologischen (Histo), mykologischen (Myko) und weiterer Untersuchungen	Referenz
Huhn	1 Tag	Inhalation	ID: $\geq 3,16 \times 10^7$ Konidien (Kon.) (= 100 Kon./g Lungengewebe); Exp: 30 min.; n = keine Angaben	30 Tage/7 Wochen: Erforschung von Pathogenese und Immunantwort auf inhalierte Konidien sowie von <i>A. fumigatus</i> -Antigenen; Klinik: geringere Gewichtszunahme, keine Mortalität; Patho: plaqueähnl. Läsionen in Luftsäcken (3 - 25 d. p. i.); Histo: 3 - 10 d. p. i. positiv; Myko: 3 - 12 d. p. i. positiv	(TAYLOR UND BURROUGHS, 1973)
			ID: keine Angaben zur Dosis; 1.) Exp: 3 Std. (n = 75); 2.) Exp: 6 Std. (n = 75); Kontrolltiere: n = 50	21 Tage: Erforschung der Pathologie und Histopathologie einer Aspergillose sowie eines Zusammenhangs mit Rechts-Herz-Versagen und Aszites; Klinik: Depression, Tachypnoe, Schnabel- & Schnappatmung nach 18 Std. (1.) bzw. 24 Std. (2.), 70 % respiratorischen Symptome, Zyanose, 21 % Aszites, fehlende Gewichtszunahme; teils Koma, Ophistotonus, Seitenlage; 60 % Mortalität 2 - 8 d. p. i., 16% Überlebende; Patho: Rechtsherzhypertrophie, Aszites, Lungenatelektasen, -granulome Histo: akute bis subakute, fibrinöse Pneumonie (2 - 10 d. p. i.), intraläsionale Pilze, viele Heterophile, Lymphozyten und Makrophagen, Bronchial-obstruktion durch Fibrin, nekrotischen Debris oder Granulome (≥ 6 d. p. i.)	(JULIAN UND GORYO, 1990)

Huhn	1 Tag	Inhalation	<p>ID: 1.) 3258 Kon./m³ Luft, n = 10; Kontrolltiere: n = 10 2.) unbestimmbar hohe Konzentration, n = 20; 3.) 9840 Kon./m³ Luft, n = 25, Kontrolltiere: n = 22; 4.-8.) 1.540 - 8.800 (durchschnittlich 4.604 Kon./m³ Luft, n = 98; Kontrolltiere: n = 103</p>	<p>7 - 35 Tage: Vergleichende Empfänglichkeit von Wachteln, Puten und Hühnern für Aspergillose und Konidien-Dosisabhängigkeit der Aspergillose; Klinik: 20 % (1.), 95 % (2.), 60 % (3.), durchschnittlich 4,7 % (4. - 8.) Mortalität (1. - 3. gänzlich, 4. - 8. überwiegend < 7 d. p. i.) Schnappatmung, 4,7 % Gewichts-, 7,2 % Wachstumsrückstand; Patho: gelb, knotige & plaqueähnliche Läsionen in Lunge & Luftsäcken; Lungenstauungen, -atelektasen & -verfestigungen, auch Läsionen (Lungenstauung und Granulome in Lunge und Luftsäcken) bei 25 % (1.), 5 % (2.), 50 % (3.) bzw. durchschnittlich 26,8 % (4. - 8.) der Überlebenden; Histo: Pilzmyzel mit Konidien in den Läsionen</p>	(GHORI UND EDGAR, 1973)
			<p>ID: $\geq 5 \times 10^6$ Konidien; Exp: nicht angegeben; n = nicht angegeben</p>	<p>Altersunterschiede in der Empfänglichkeit von Hühnern; keine genaueren Angaben zu Tierzahl, Symptomen, pathologischen, histologischen, mykologischen Befunden oder Dauer des Experiments</p>	(AUSTWICK, 1969)
	1 - 5 Wochen	Luftsack	<p>ID: 1.) $< 1 \times 10^6$ Kon., 2.) 1×10^7 Kon., 3.) 5×10^7 Kon.</p>	<p>Dauer unbekannt: Erforschung der experimentellen Induktion, der klinischen Erkrankung und der pathologischen Läsionen; Klinik: Mortalität: $< 50 \%$ (1.), $> 80 \%$ (2.), 100 % (3.) jeweils 2 - 11 d. p. i., Überlebende > 11 d. p. i. konnten innerhalb von 3 Wochen genesen; Patho: verfestigte Lungen und Luftsäcke, von stecknadelstichgroßen Knoten bis hin zu gelben Flecken und käsig-schwammartigen, festen, gelben Ausgüssen der Luftsäcke, verdickte Luftsackwände; kleine, gelbe Flecken in den Lungen, selten mit aktivem Pilzmyzel; selten Leberläsionen</p>	(HERMAN UND SLADEN, 1958)
	Adulte (ohne Angaben)	Inhalation	<p>ID: $\geq 1,7 \times 10^7$ Kon.; Exp: nicht angegeben; n = nicht angegeben</p>	<p>Altersunterschiede in der Empfänglichkeit von Hühnern; keine genaueren Angaben zu Tierzahl, Symptomen, pathologischen, histologischen oder mykologischen Befunden oder zur Experimentdauer</p>	(AUSTWICK, 1969)

Huhn	4 Wochen	Luftsack	ID: 0,5 - 1 ml einer nicht näher bestimmten Konidien suspension; n = 6; Kontrolltiere: n = 2	<p>1 - 6 Wochen: Erforschung der Virulenz verschiedener Schimmelpilzisolatate;</p> <p>Klinik: kaum Symptome, teils Atemnot;</p> <p>Patho: cremefarbene, plaqueähnliche Läsionen in Muskelwand (Injektionsstelle), Abdominal Luftsack und Lunge, teils Leberschwellung und plaqueähnliche Leberauflagerungen, Leberschwellung, Luftsacktrübung;</p> <p>Histo: Granulome (7 d. p. i.), mononukleäre Infiltration gefolgt von granulomatösen Entzündungen mit vielen Epitheloid-, Riesenzellen, Pilzmyzel und Konidien, Myokarditis;</p> <p>Myko: teils positiv (1 - 6 w. p. i.)</p>	(CHUTE UND O'MEARA, 1958)
	3 Monate	Luftsack	ID: 5 x 10 ⁸ Kon.; Exp: 1x wöchentlich	<p>Dauer unbekannt: Erforschung der experimentellen Induktion, der klinischen Erkrankung und der pathologischen Läsionen;</p> <p>Klinik: Mortalität nur wenn Sekundärfaktoren (z. B. Hungern) den Organismus schwächen; Überlebende > 11. d. p. i. konnten innerhalb von 3 Wochen genesen;</p> <p>Patho: Verfestigte Lungen und Luftsäcke, von stecknadelstichgroßen Knoten bis hin zu gelben Flecken und käsig-schwammartigen, festen, gelben Ausgüssen der Luftsäcke, verdickte Luftsackwände; kleine, gelbe Flecken in den Lungen, selten mit aktivem Pilzmyzel; selten Leberläsionen</p>	(HERMAN UND SLADEN, 1958)

Pute	1 Tag	Inhalation	<p>1.) ID: ~ 3.258 Kon./m³ Luft, n = 10, Kontrolltiere: n = 9;</p> <p>2.) ID: unbestimmbar hohe Konzentration; n = keine Angaben</p> <p>3.) ID: ~ 9.840 Kon./m³ Luft, n = 20, Kontrolltiere: n = 20</p> <p>4.-8.) ID: ~ 1.540 - 8.800 (durchschnittlich 4.604 Kon./m³ Luft, n = 77; Kontrolltiere: n = 69</p>	<p>7 - 35 Tage: Vergleichende Empfänglichkeit von Wachteln, Puten und Hühnern für Aspergillose und Konidien-Dosisabhängigkeit der Aspergillose;</p> <p>Klinik: 60 % (1.), 100 % (2.), 80 % (3.), durchschnittlich 22,8 % (4. - 8.) Mortalität (1. - 3. Gänzlich, 4. - 8. überwiegend < 7 d. p. i.), Schnappatmung, 6,6 % Gewichts-, 10 % Wachstumsrückstand;</p> <p>Patho: gelbe, knotige & plaqueähnliche Läsionen in Lunge & Luftsäcken, Lungenstauungen, -atelektasen & -verfestigungen (vergleichsweise stärker als bei Hühnern und Wachteln); auch Läsionen (Lungenstauung und Granulome in Lunge und Luftsäcken) bei 100 % (1. & 3.) bzw. durchschnittlich 44,0 % (4. - 8.) der Überlebenden;</p> <p>Histo: Pilzmyzel mit Konidien in den Läsionen</p>	(GHORI UND EDGAR, 1973)
		Luftsack	<p>ID: 100 µl einer Suspension mit 10⁷ Kon.; n = 15; Kontrolltiere: n = 10</p>	<p>7 Tage: Evaluation pathologischer, histologischer und mykologischer Befunde nach experimenteller Infektion;</p> <p>Klinik: klinische Symptome erst ab 6 d. p. i., 1/15 Küken zeigte Atemnot und Durchfall;</p> <p>Patho: 9/15 Tiere zeigten 1 - 3mm große, knotige, weiße Umfangsvermehrungen und teils plaqueähnliche Läsionen in den Luftsäcken;</p> <p>Histo: 1 - 7 d. p. i. positiv in Lunge und Luftsäcken; initial (1. d. p. i.) Lungenstauung, Luftsackverdickung und Ödem mit heterophilen Granulozyten, Ulzerationen und Konidien an der Oberfläche; später vermehrt Lymphozyten, Makrophagen und mehrkernige Riesenzellen, mit Nekrosen und Pilzhypen und Konidien im Zentrum der Läsionen;</p> <p>Myko: 1. - 5. d. p. i. positiv in Luftsack, Lunge und Leber, am 7. d. p. i. negativ</p>	(FEMENIA et al., 2007)

Pute	1 Woche	Inhalation	<p>ID: ~ 2.6 x 10⁷ Kon.; Exp: 5 min. (= 1.4 - 1.88 x 10⁴ Kon./g Lungengewebe); n=14; Kontrolltiere: n= 17</p>	<p>5 Wochen: Erforschung der Effekte von inhalierten Konidien und ingestierten <i>Aspergillus</i>-Toxinen sowie der jeweiligen Antikörperantwort; Klinik: 1/14 verstorben; Patho: keine Luftsackkläsionen, gestaute Lunge mit kleinen, gelben, nodulären Umfangsvermehrungen; Histo: multifokale, granulomatöse Pneumonie (2 w. p. i.) mit Makrophagen, Riesenzellen und Bindegewebskapsel um ein nekrotisches Zentrum mit Pilzmyzel in der Nähe von sekundären und tertiären Bronchien; Myko: 14/14 aus der Lunge, 1/14 aus der Leber positiv; Präzipitierende Antikörper gegen <i>A. fumigatus</i>: 0/13</p>	(RICHARD et al., 1973)
2 - 4 Wochen	Trachea	<p>1.) ID: 1,28 x 10⁷ Kon./kg; Exp: 1x; 24 Std.; n = 20; Proben: 0, 6, 10, 24 h. p. i. 2.) ID: 2,4 x 10⁷ Kon./kg; Exp: 1 x; 72 Std.; n = 15; Proben: 0, 48, 72 h. p. i. 3.) ID: 1,34 x 10⁷ Kon./kg; Exp: 1x; 120 Std.; n = 15; Proben: 0, 96, 120 h. p. i. 4.) ID: 1,76 x 10⁷ Kon./kg; Exp: 1x; 24 Std.; n = 8; Proben: 0, 14, 19, 24 h. p. i.</p>	<p>24 - 120 Stunden: Beseitigung der inkorporierten Pilzkonidien (Clearance-Rate); Patho/Myko: im Vergleich von 1. - 4. konnten drei Phasen der Sporeneimination entdeckt werden: <u>Erste Phase</u> (0 - 10 h. p. i.): kaum Konidienbeseitigung und -vermehrung; Konidienbeseitigung 5 - 12,7 % und geringe Lungengewichtszunahme - 30 % - 28 % (1., 4.); <u>Zweite Phase</u> (10 - 24 h. p. i.): schnelle und starke Konidienzunahme und Immunsystemschwächung, Konidienbeseitigung 60 - 68 % bzw. 81 % und starke Lungengewichtszunahme 4 - 59 % bzw. 69 % (2.); <u>Dritte Phase</u> (24 - 120 h. p. i.): konstant bleibende Konidienbeseitigung von 70 - 82 % und deutliche Lungengewichtszunahme von 101 - 176 % (3.); Histo: Lungengewichtszunahme auf Grund von Ödemen, Lungenschwellung, Entzündungszelleinwanderung (vor allem heterophile Granulozyten und mononukleäre Zellen)</p>	(REDIG, 1980b)	

Pute	3 Wochen	Inhalation	<p>1.) ID: 72 mg Konidien (Viabilität: $7,2 \times 10^9$/mg) Exp: 10 min. (= $4,4 \times 10^5$ KbE/g Lungengewebe); n = 12;</p> <p>2.) ID: 144 mg Konidien (Viabilität: $7,2 \times 10^9$/mg) Exp: 10 min. (= 5×10^5 KbE/g Lungengewebe); n = 12</p>	<p>8 Wochen: Untersuchung potenzieller Virulenzunterschiede zwischen <i>A. flavus</i>- und <i>A. fumigatus</i>-Stämmen; Klinik: 3/9 (1.) bzw. 5/9 (2.) Tiere starben innerhalb von 1 - 2 w. p. i. Patho: verdickte Luftsackmembranen mit gelben, käsigen, plaqueähnlichen, 1 - 10 mm großen Auflagerungen, gestaute Lunge mit kleinen, 1 mm große, gelben, nodulären Umfangsvermehrungen; Histo: granulomatöse Pneumonie mit heterophilen Granulozyten, Makrophagen, Riesenzellen, Lymphozyten und einer schmalen Bindegewebskapsel um ein nekrotisches Zentrum mit Pilzbestandteilen in 50 - 75 % des Lungenparenchyms bei Verstorbenen; granulomatöse Pneumonie mit dicker Bindegewebskapsel, vielen Riesenzellen, wenigen Makrophagen und ohne Lymphozyten bei Überlebenden; ein Tier mit Retinitis und Iridozyklitis; Myko: 5/6 (1.) bzw. 1/4 (2.) positiv (8 w. p. i.), davon 60 % positiv aus der Lunge; bei 86 % der Verstorbenen auch aus Hirn und Leber; Präzipitierende Antikörper gegen <i>A. fum.</i>: 6/6 (1.) bzw. 3/4 (2.) (2 - 8 w. p. i.) $LD_{50} = \sim 5 \times 10^5$ Konidien/g Lungengewebe</p>	(RICHARD et al., 1981, RICHARD et al., 1984)
			<p>1.) ID: 142 mg Konidien Exp: 15 min.; n = 2x 24; 2.) ID: 300 mg Konidien Exp: 15 min.; n = 12</p>	<p>3 - 24 Stunden (1.) bzw. 15 min. (2.): Erforschung einer hämatogenen Streuung von inhalierten Konidien und deren Pathomechanismen; Myko: 54 - 66 % positiv aus peripherem Blut, Lunge, Leber und Gehirn, nach 24 Std. p. i. weiterhin aus Blut und nur noch teils aus Hirn und Leber; Zytologie: Lavageflüssigkeit aus dem Respirationstrakt enthielt Makrophagen mit enthaltenen Konidien, Makrophagenaggregate und Konidien, die an Erythrozyten geheftet waren (~ 1 % der Erythrozyten)</p>	(RICHARD UND THURSTON, 1983)

Pute	3 Wochen	Luftsack	<p>ID: 5 x 10⁶ Kon. in 1 ml Suspension; n = 124 in 16 Gruppen zu 7 - 8 Tieren, die je Gruppe 21 - 84 Konidien/Tier bekamen; Kontrolltiere: n = 8; Exp: einmalige Applikation</p>	<p>6 Wochen: Unterschiedliche Virulenz von Pilzisolaten; Klinik: Mortalität zwischen 0 - 100 %, die zu 39 % am 4. - 7. d. p. i., zu 56 % am 7. d. p. i. und nur noch sporadisch bis 19. d. p. i. auftrat, mit signifikanten Unterschieden zwischen den Pilzisolaten; Niedrig-Mortalitätsgruppen (< 50 % Mort.), Hoch-Mortalitätsgruppen (≥ 50 % Mort.); insgesamt starben 71/116 (= 61 %) der Vögel vor Versuchsende; Niedrig-Mortalitätsgruppen mit höheren Gewichten als Hoch-Mortalitätsgruppen; Patho/Histo: Tiere, die 1. - 3. d. p. i. starben, zeigten eine mittel- bis hochgradige, fibrino-heterophile bzw. granulomatöse Aerosacculitis mit getrübbten, verdickten und gefüllten Luftsäcken (fibrinöses oder granulomatoses Material); 1 - 2 mm Nekrosing aus Makrophagen, heterophilen Granulozyten, Ödem und beginnender Bindegewebsformation auf dem Luftsackepithel; > 3. d. p. i. fibrinös-käsige Auflagerungen auf den Luftsäcken, Zölomitis mit Organverklebungen und typischen Plaques; Lungenverdichtungen und/oder käsig-granulomatöse Pneumonien (20 - 95 % des Parenchyms betroffen) mit teilweise vollständigem Gewebsuntergang; innerhalb der Nekrosen waren Pilzhypen nachweisbar; Überlebende zeigten eine mittelgradige, lymphoide Hyperplasie der Luftsäcke und Lungen; Agar Gel Diffusion (AGD): Prä- und Post-Inokulation; Verhältnis der Anzahl positiver zur Anzahl überlebender Tieren in allen Gruppen variierte p. i. zwischen 0/1 - 3/6; dabei waren die Raten der Niedrig-Mortalitätsgruppen mit 5/30 signifikant niedriger als in der Hoch-Mortalitätsgruppen mit 9/15 positiv (Positiv = deutlicher Anstieg der Bandenanzahl oder -intensität im Serum experimentell exponierter Tiere im Vergleich zu Messungen vor Exposition); ELISA: Durchschnittliche Absorptionswerte variierten in den Gruppen von -0,08 bis 0,7, dabei waren sie in den Niedrig-Mortalitätsgruppen 0,40 ± 0,12 signifikant niedriger als in den Hoch-Mortalitätsgruppen 0,09 ± 0,06</p>	(PEDEN UND RHOADES, 1992)
------	----------	----------	---	--	---------------------------

Pute	~ 3 Wochen (ohne genaue Altersangabe) 300g Körpergewicht	Trachea	<p>1.) ID: 1×10^2 Kon.; n = 8</p> <p>2.) ID: 1×10^4 Kon.; n = 8</p> <p>3.) ID: 1×10^6 Kon.; n = 8</p> <p>4.) ID: 1×10^8 Kon.; n = 8</p> <p>Kontrolltiere: n=8; Exp: jeweils einmalige Applikation</p>	<p>Etablierung eines Infektionsmodells (exakte Dauer nicht angegeben);</p> <p>Klinik: keine Veränderungen des Gewichts, der Mortalität, der Hämatologie oder der Blutchemie (1. & 2.); 2/8 Tiere starben am 3. d. p. i. und 2/8 am 6. d. p. i., Überlebende zeigten geringere Gewichtszunahme (3.); 2/8 Tiere starben am Infektionstag, 5/8 zwischen 2. - 8. d. p. i., während die eine (1/8) überlebende Pute stetig an Gewicht verlor (4.);</p> <p>Patho: keine Veränderungen (1. & 2.); Schwellungen und Entzündungsanzeichen der Lunge und Luftsäcke mit verdickten Luftsackwänden und käsigen Exsudaten (3.); keine Angaben (4.);</p> <p>Myko: negativ (1. & 2.); 20 - 35 bis 660 KbE/g Lungengewebe (3.); keine Angaben (4.)</p>	(REDIG, 1980b)
4 Wochen	Inhalation	<p>1.) ID: 2×10^4 - 3×10^8 Kon./kg, kontinuierlich gesteigert; Exp: 19x und Gabe von 14x 1 mg/kg und 2x 2 mg/kg Dexamethason; n = 5;</p> <p>2.) ID: 2×10^4 - 3×10^8 Kon./kg, kontinuierlich gesteigert, Exp: 19x; n = 5;</p> <p>3.) ID: 2×10^4 - 3×10^8 Kon./kg, kontinuierlich gesteigert, Exp: 19x; n = 7; Kontrolltiere: n = 5</p>	<p>57 Tage: Etablierung eines Infektionsmodells für chronische Aspergillose;</p> <p>Klinik: asymptomatisch bis 35 d. p. i. (1. - 3.), auch durch Dosissteigerung keine Mortalität (2. & 3.); in immunsupprimierten Tieren zeigte sich geringere Gewichtszunahmen (Durchschnittsgewicht von 806 ± 281 g im Vergleich zu 1.623 ± 393 g) bis 44 d. p. i. und 2/5 Tiere starben 44 bzw. 46 d. p. i. (1.);</p> <p>Patho: keine Läsionen bis 35 d. p. i. (3.); danach schwerste Läsionen in immunsupprimierten Tieren in der Lunge und Luftsäcken (1.) im Vergleich zu abgekapselte, plaqueähnliche Prozessen, leichter Verdickung und Vaskularisierung der Luftsackwände (2. & 3.)</p>	(REDIG, 1980b)	
			ID: 1.) $2,2 \times 10^6$ KbE/g Lungengewebe; n = 21;	14 Tage: Protektivität von <i>Aspergillus</i> -Vakzinen;	(RICHARD et al., 1982)

Pute			<p>2.) 5,2 x 10⁵ KbE/g Lungengewebe; n = 18; 3.) 1,1 x 10⁶ KbE/g Lungengewebe; n = 14</p>	<p>Klinik 1.) 38 % der Tiere nach s.c.-Applikation einer Keimlingsvakzine geschützt; geringere Mortalität (62 %) im Vergleich zu den ungeimpften Kontrolltieren (dort 100 % innerhalb von 4 d.p.i.); 2.) 48 % der Tiere nach s.c.-Applikation einer Keimlingsvakzine geschützt; geringere Mortalität (52 %) im Vergleich zu den ungeimpften Kontrolltieren (dort 78 % innerhalb 8 d.p.i.); 3.) 57 % der Tiere nach intraperitonealer Applikation einer Keimlingsvakzine geschützt; geringere Mortalität (43 %) im Vergleich zu den ungeimpften Kontrolltieren (dort 100 % innerhalb von 9 d.p.i.); Patho: Lungenläsionen; Histo/Myko: positiv in/aus Lungenschnitten</p>	(REDIG, 1980b)
4 Wochen Ø 590 ± 88g Körpergewicht	Trachea	<p>1.) ID: : 1 x 10⁸ Kon./kg; n = 7; Blutproben: 0, 2, 6, 10, 14 d. p. i.; 2.) ID: 1 x 10⁸ Kon./kg; n = 7; Blutproben: 0, 4, 8, 12, 16 d. p. i.; Exp: jeweils einmalige Applikation; Kontrolltiere: n = 7</p>	<p>22 Tage, Evaluation von Veränderungen biochemischer und hämatologischer Parameter im Zuge einer Aspergillose; Klinik: infizierte zeigten eine geringere Gewichtszunahme und hohe Mortalität; Atemnot und Tod zwischen 1. - 10. d. p. i., Mortalität 86 % (12/14), danach bei 2/14 Tieren spontane Erholung und Gewichtszunahme; Patho: vor allem das kaudale Drittel der Lunge war entzündlich verändert, Luftsäcke zeigten verdickte und entzündlich veränderte Wände und waren mit käsigem Exsudat gefüllt; Hämatologie: keine Unterschiede zwischen infizierten und nicht-infizierten Tieren; Blutchemie: Haptoglobin war bei infizierten Tieren höher (Anstieg von Haptoglobin 1. - 9. d. p. i., danach Abfall), Albumin niedriger; Antikörper: Bindungsfähigkeit des Plasmas blieb unverändert; 2/14 Tieren (Überlebende) zeigten Präzipitin im Serum-Präzipitin-Test</p>	(REDIG, 1980b)	

Pute	~ 5 Wochen (ohne genaue Angabe) 1.000 g Körpergewicht	Trachea	ID: 2x 10 ⁸ Kon./kg; n = 30; Kontrolltiere: n = 10; Exp: einmalige Applikation	Etablierung eines Infektionsmodells (exakte Dauer nicht angegeben); Klinik: 14/30 Tiere starben zwischen 1. - 7. d. p. i., davon 12 am 5. d. p. i.; während die Überlebenden einer geringere Gewichtszunahme zeigten (19,26 g/kg/Tag im Vergleich zu 41,75 g/kg/Tag zwischen 1. - 10. d. p. i.); Patho: kaudales Lungendrittel mit starken Entzündungsanzeichen, Luftsäcke zeigen verdickte Luftsackwände und sind mit käsigem Exsudat gefüllt	(REDIG, 1980b)
			1.) ID: 2x 10 ⁴ Kon./kg 0., 3. d. p. i.; 8x 10 ⁴ Kon./kg 6., 9., 12. d. p. i., 1x 10 ⁴ Kon./kg 18. d. p. i., 2,5x 10 ⁵ Kon./kg 21. d. p. i., 1x 10 ⁶ Kon./kg 25. d. p. i., 2x 10 ⁶ Kon./kg 27., 29. d. p. i., 3x 10 ⁷ Kon./kg 32., 34., 36. d. p. i., 3x 10 ⁸ Kon./kg 38., 40., 42., 48. d. p. i., 2x 10 ⁸ Kon./kg 52. d. p. i., 2,2x 10 ⁸ Kon./kg 56. d. p. i.; n = 12; 2.) ID wie bei 1., aber zusätzl. 14x 1 mg/kg Dexamethason 12. - 42. d. p. i. und 2x 2 mg/kg 48., 52. d. p. i.; n = 5; Kontrolltiere: n = 5; Exp: einmalige Applikation	57 Tage: Etablierung eines Infektionsmodells für chronische Aspergillose; Klinik keine Klinik bis 35. d. p. i. (1.), deutlich geringere Gewichtszunahme während der ersten 44 Tage und 3/5 Tote 44. - 46. d. p. i. (2.); durchschnittliche Gewichtszunahmen: 806 ± 281 g (2.) statt 1468 ± 171 g (1.) bzw. statt 1623 ± 393 g (Kontrolltiere); Patho: keine Läsionen bis 35. d. p. i. (1.); danach abgekapselte, plaqueähnliche Läsionen in Lunge und Luftsäcken und verdickte Luftsackwände (1.); schwerere, flächig-diffuse und zahlenmäßig mehr Läsionen in den Lungen und Luftsäcken (2.)	(REDIG, 1980b)

Pute	12 -14 Wochen	Luftsack (LS) - und intravenös (i. v.)	<p>1.) ID: 5,03 x 10⁷ Kon. via LS 5 W. vor Splenozytentransfer (SZT); n = 9;</p> <p>2.) ID: 5,03 x 10⁷ Kon. via LS und 5x10⁸ inaktivierte Kon. i. v. 1 W. vor SZT; n = 9;</p> <p>3.) 3 Gruppen von SZT-Empfängern 16 Std. nach SZT mit 5,2 x 10⁷ Kon. via LS; n = 30;</p> <p>4.) 3 Gruppen von SZT-Empfängern 16 Std. nach SZT mit 1,1 x 10⁶ Kon. i. v.;</p> <p>Kontrolltiere: n = 7 (in 1. & 2.) und n = 10 (je in 3. & 4.)</p>	<p>5 Wochen (1. & 2.) bzw. 6 - 7 Tage (3. & 4.): Überprüfung der protektiven Wirkung von Splenozytentransfer (SZT) von rekonvaleszenten auf naive Tiere;</p> <p>Klinik: Kümmern und geringgradige Leistungsdepression ab 3 d. p. i. (1. & 2.), rapide klinische Verschlechterung (Brust-Bauchlage, Festliegen) nach i. v.-Inokulation und Euthanasie nach 3 - 6 d. p. i. aus Tierschutzgründen (3. & 4.);</p> <p>Patho: ipsilaterale Läsionen in Luftsack (von Trübungen und Verdickungen der Luftsackwände bis hin zu exsudativen und granulomatösen Entzündung) in 3/9 Tieren (1. & 2.) bzw. 2 - 3/10 Tieren (3.) sowie in der Lunge nach Luftsackinokulation (1. & 2. & 3.); schwere, miliare Hepatitis nach i. v.-Inokulation sowie Splenitis;</p> <p>Ergebnis: Der SZT zeigte keine protektive Wirkung</p>	(KUNKLE et al., 1999)
9 und 19 Wochen	Luftsack	<p>1.) 9 Wochen: ID: 5,0 x 10⁷ Kon.; n = 8; Exp: einmalig; Kontrolltiere: n = 2;</p> <p>2.) 19 Wochen: ID: 5,0 x 10⁷ Kon.; n = 16; Exp: einmalig; Kontrolltiere: n = 4</p>	<p>24, 48, 72 bzw. 96 Stunden: Pathologische Veränderungen durch <i>A. fumigatus</i> in zwei Altersgruppen;</p> <p>Klinik: keine Mortalität; milde Atemnot und geringgradiges Kümmern 72 - 96 h. p. i.;</p> <p>Patho/Histo: zeitabhängig zunehmende Exsudatansammlung und Exsudatverfestigung am Luftsackepithel; geringgradige Trübung bis hin zu 1 - 5 mm-großen, weißen, granulomatösen Auflagerungen und Aufrauungen auf den Luftsackwänden; zunehmende Lungenläsionen,</p>	(KUNKLE UND RIMLER, 1996)	

Pute	9 und 19 Wochen	Luftsack	<p>1.) 9 Wochen: ID: 5,0 x 10⁷ Kon.; n = 8; Exp: einmalig; Kontrolltiere: n = 2;</p> <p>2.) 19 Wochen: ID: 5,0 x 10⁷ Kon.; n = 16; Exp: einmalig; Kontrolltiere: n = 4</p>	<p>Lungenläsionen (zeitabhängig zunehmend von milder, interstitieller Pneumonie mit Ödembildung bis hin zur schweren multifokalen bis konfluierenden, granulomatös-nekrotischen und hämorrhagischen Pneumonie mit Atelektasen und Weißverfärbung der Lungenoberfläche) und schwere Pleuritis; teils Splenomegalie und Milzstauung; teils granulomatöse Entzündung im Mesenterium sowie Kapsulitis der Leber, Milz und der <i>Bursa cloacalis</i>; zeitabhängig zunehmende Anzahl an histologisch nachweisbaren Pilzbestandteilen (z. B. Konidien in Makrophagen);</p> <p>Myko: positiv aus der Lunge von allen infizierten, außer 2/16 älteren Tieren 72 h. p. i. (2.); jüngere Tiere zeigten eine maximale Reisolierung von <i>A. fumigatus</i> 72 h. p. i. (8.070 - 8.770 KbE) (1.); ältere Tiere enthielten 24 h. p. i. die meisten KbE (600 - 5.770), die danach im Verlauf abnahm (2.)</p>	(KUNKLE UND RIMLER, 1996)
Wachtel	1 Tag	Inhalation	<p>1.) 3.258 Kon./m³ Luft, n = 12; Kontrolltiere: n = 13;</p> <p>2.) unbestimmbar hohe Konzentration; n = keine Angaben</p> <p>3.) 9.840 Kon./m³ Luft, n = 29; Kontrolltiere: n = 28;</p> <p>4.-8.) 1.540 - 8.800 Kon./m³ Luft (durchschnittlich 4.604 Kon./m³ Luft); n = 138; Kontrolltiere: n = 134</p>	<p>7 - 35 Tage: vergleichende Empfänglichkeit von Wachteln, Puten und Hühnern für Aspergillose und Konidien-Dosisabhängigkeit der Aspergillose; Klinik: 67 % (1.), 100 % (2.), 93 % (3.), durchschnittlich 51,0 % (4. - 8.) Mortalität (1. - 3. gänzlich, 4. - 8. überwiegend < 7 d. p. i.) Schnappatmung, 4,7 % Gewichts-, 10,2 % Wachstumsrückstand;</p> <p>Patho: gelb, knotige & plaqueähnliche Läsionen in Lunge & Luftsäcken, Lungenstauungen, -atelektasen & -verfestigungen, auch Läsionen (Lungenstauungen) bei 75 % (1.), 50 % (3.) bzw. durchschnittlich 31,5 % (4. - 8.) der Überlebenden;</p> <p>Histo: Pilzmyzel mit Konidien in den Läsionen</p>	(GHORI UND EDGAR, 1973)

Wachtel	10 Tage	Trachea	ID: 5 x 10 ⁶ Kon.; n = 17; Kontrolltiere: n = 23 adulte Individuen	Einsatzmöglichkeiten eines Testsystems zur serologischen Bestimmung von 1-3-Beta-D-Glucan (BG) im Rahmen der Aspergillose Diagnostik (Dauer nicht angegeben); BG-Konzentration: war bei infizierten Tieren signifikant höher als bei Kontrolltieren; Histo/Myko: Bestätigung der Infektion durch Hyphenzählung bzw. KbE-Bestimmung (in Anlehnung an TELL et al., 2010)	(BURCO et al., 2011)
	14 Tage		1.) ID: 50 x 10 ⁶ Kon.; 2.) ID: 25 x 10 ⁶ Kon.; 3.) ID: 12,5 x 10 ⁶ Kon.; 4.) ID: 6,25 x 10 ⁶ Kon.; 5.) ID: 3,125 x 10 ⁶ Kon.; n = 7 (je 1. - 5.); Kontrolltiere: n = 7; 6.) 12,03 x 10 ⁶ Kon (= LD ₅₀); n = 50; Kontrolltiere: n = 50	6 Wochen: Klinische und Hämatologische Befunde im Zuge einer Aspergillose; Klinik: ab 24 h. p. i. bis 10 d. p. i. gesträubtes Gefieder, reduziertes Allgemeinbefinden, hängende Flügel, Apathie, Inappetenz, Erschöpfung, geringgradig aufgelockerter Kot, erschwerte Atmung bis Atemnot, Festliegen und Tod (2 - 10 d.p.i, Mortalität 20%), ab 10 d. p. i. Erholung, aber Körpergewichte bleiben etwas geringer (nicht signifikant); Hämatologie: durchschnittliche Erythrozytengesamtzahl, Hämoglobingehalt und Hämokrit waren etwas niedriger als in infizierten (nicht signifikant); die Leukozytengesamtzahl stieg 2 - 7 d. p. i. (Heterophilie und Lymphopenie)	(CHAUDHARY UND SADANA, 1988)
	21 Tage		ID: 0,2 ml mit 0,5 - 5 x 10 ⁶ Kon./ml (durchschnittlich 2,7 x 10 ⁶ Kon./ml); n = 60; Kontrolltiere: n = 60	14 Tage: Klinische, histopathologische und biochemische Befunde im Zuge einer Aspergillose und Behandlungseffekt von Itraconazol; Klinik: ab 48 h. p. i. gesträubtes Gefieder, reduziertes Allgemeinbefinden, Apathie, Inappetenz, grünlich-wässriger Durchfall, erschwerte Atmung bis Atemnot, Tod (3 - 10 d. p. i.), Mortalität 100 %; Blutchemie: Werte für Alanin-Aminotransferase (ALT/GPT), Albumin, Kalzium und den Albumin-Globulin-Quotienten sanken signifikant; Werte für Phosphor und Globulin stiegen signifikant; Gesamteiweißwerte stiegen (nicht signifikant);	(GÜMÜSSOY et al., 2004)

Wachtel	21 Tage	Trachea	ID: 0,2 ml mit 0,5 - 5 x 10 ⁶ Kon./ml (durchschnittlich 2,7 x 10 ⁶ Kon./ml); n = 60; Kontrolltiere: n = 60	<p>Patho: weißlich-gelbe, käsige Läsionen in Trachea, Lunge und Luftsäcken; Histo: Läsionen in Sinus, Luftröhre, Bronchien, Lunge und Luftsäcken; Lymphozyten, Makrophagen, Riesenzellen und heterophile Granulozyten ohne zentrale Nekrose traten neben nekrotisch-granulomatösen Herden auf; teils fibrotische Abkapselung größerer Herde mit Entzündungszellinfiltration und septierten sowie unseptierten Hyphen und Konidien; Myko: aus Lunge und Trachealtupfern (100 %), Luftsäcken (94,9 %), Nieren (31,6 %), Leber (22,7 %), Milz (15,1 %) und Herz (6,3 %) positiv</p>	(GÜMÜŞSOY et al., 2004)
Taube	1. - 6.) 4 - 5 Wochen 7. & 8.) Adult (ohne genaue Angaben)	Trachea, Luftsack oder Lunge	1.) ID: 0,2 ml mit 10 ⁸ Kon./ml; Exp: 1x & 3x 2 mg/kg Dexamethason vorher; Trachea; n = 4; 2. - 3.) ID: 0,2 ml mit 10 ⁸ Kon./ml; Exp: 1x Luftsack und 3x 2mg/kg Dexamethason vorher in 3.; je n = 4; 4. - 5.) ID: 0,2 ml 10 ⁸ Kon./ml; Exp: 1x Lunge und 3x 2mg/kg Dexamethason vorher in 5.; je n = 4; 6.) nur 3x 2mg/kg Dexamethason; 7.) ID: 0,2 ml 10 ⁶ Kon./ml; Trachea; n = 6; Exp: 1x;	<p>Entwicklung von Infektionsmodellen für akute und chronische Aspergillose (Vergleich von Inokulationsrouten und Infektionsdosen sowie Bewertung des Einflusses einer Immunsuppression);</p> <p>Klinik: Keine (7. & 8.); geringeres Gewicht bei Dexamethason-Behandelten (1., 3., 5., 6.) am Infektionstag; p. i. Gewichtsverlust und Dyspnoe bei fast allen infizierten Jungtieren (außer 3. & 5. bzw. nur 3.); Niesen und Stridoros in Einzeltieren am 4.-5. d. p. i.; Mortalität 0 % (7. & 8.); 25 % (1. & 3.) bis 100 % (2., 3., 5.), letztere sehr akut;</p> <p>Patho: Keine Läsionen (7. & 8.); Läsionen in allen anderen Infektionsgruppen im Respirationstrakt und den parenchymatösen Organen, getrübe und granulomatös entzündete Luftsäcke, granulomatös und hämorrhagisch entzündete Lungen, granulomatös entzündete Perikardien mit gelblichem Erguss, Stauungen und granulomatöse Entzündungen der Leber, blasse Nieren, granulomatöse Enzephalitis, blasse und granulomatös entzündete Brustmuskeln;</p> <p>Myko: Negativ (7. & 8.); 100 % positiv aus verschiedenen Organen (1.-6.);</p>	(BEERNAERT et al., 2008)

Tauben	1. - 6.) 4 - 5 Wochen 7. & 8.) Adult (ohne genaue Angaben)	Trachea, Luftsack oder Lunge	8.) ID: 0,2 ml 10 ⁸ Kon./ml; Trachea; n = 6; Exp: 1x; Kontrolltiere: n = 7 (1. - 6.) und n = 6 (7. & 8.)	Mikrosatelliten-Längen-Polymorphismus (MLP): molekularbiologisch waren die reisolierten Stämme mit dem zur Infektion genutzten Stamm identisch, mit Ausnahme von ein Tier (aus 5.)	(BEERNAERT et al., 2008)
3 - 4 Wochen	i. v.	ID: 0,5 ml 2 x 10 ⁶ Kon./ml; n = 15; Kontrolltiere: n = 15	6 Tage: Erforschung der Pathogenese der akuten Aspergillose; Klinik: 7/15 Tiere starben bis 3. - 4. d. p. i. und 8/15 starben 5. - 6. d. p. i. ohne vorherige Krankheitszeichen oder mit hochgradig gestörtem Allgemeinbefinden wenige Stunden vor dem Tod; Patho: guter Ernährungszustand, dunkle Brustmuskulatur, Stauung in multiplen Organen, noduläre, gelblich-weiße Herde in Lunge, Nieren und Leber, Blutungen in Leber und Milz; Perikarderguss; Histo: Läsionen in Leber (akute, purulente, später granulomatös-nekrotisierende Hepatitis mit septierten Hyphen und lymphozytärer Invasion der Gallengänge), Milz (akute, degenerative bis nekrotisierende Splenitis), Lunge (akute exsudative bis nekrotische Pneumonie), Nieren (granulomatöse Nephritis mit degenerativer bis nekrotischer Tubulonephrose), Gehirn (akute, purulente Meningoenzephalitis) und Herz; initial akute Entzündungsherde, dann Abszesse mit Ansammlung von Monozyten, Granulozyten und Riesenzellen um Hyphen, Konidien und zentrale Nekrose; Myko: positiv aus Leber, Lunge und Nieren	(ELMUBARAK UND FADLELMULA, 1991)	

Star	nicht genau bekannt, adult	Trachea	ID: 0,2 ml mit $1,35 \times 10^6$ Kon.; n = 18; Exp: 1x; Kontrolltiere: n = 6	<p>6 Tage: Erforschung der Pathogenese der akuten Aspergillose sowie von klinischen, mykologischen, makro- und mikroskopischen Befunden;</p> <p>Klinik: 6/18 Tiere starben am 2. d. p. i., 4/18 am 3. d. p. i., 2/18 am 4. d. p. i., 4/18 am 5. d. p. i. und 2/18 am 6. d. p. i., Mortalität 100 %; gesträubtes Gefieder, grünlicher, wässriger Durchfall, Anorexie, Dyspnoe, keuchende Stridores;</p> <p>Patho: weißlich-gelbe, käsig-knotige Herde in Lunge, Luftsäcken, Myokard, Brustwand und Serosa;</p> <p>Histo: initial Lymphozyten und teils Makrophagen-, heterophile Granulozyten- und Riesenzellinvasion um Konidien, ohne Nekrose, später granulomatöse Herde aus Makrophagen, Riesenzellen, heterophilen Granulozyten um dünne, kurze Pilzhypen und Konidien, umgeben von einer bindegewebigen Kapsel in Lunge, Luftsäcken, Myokard, Brustwand und Serosa;</p> <p>Myko: positiv aus Lunge, Luftsäcken, Myokard, Brustwand und Serosa</p>	(ATASEVER UND GÜMÜŞSOY, 2004)
Ente	Juvenil (keine genaue Angabe)	Luftsack	ID: 5×10^7 Kon.	<p>Dauer unbekannt: Erforschung der Erkrankung und der experimentellen Induktion;</p> <p>Klinik: Mortalität: 100 % jeweils 2 - 11 d. p. i.; Überlebende > 11. d. p. i. konnten innerhalb von 3 Wochen genesen;</p> <p>Patho: verfestigte Lungen und Luftsäcke; von stecknadelstichgroßen Knoten bis hin zu gelben Flecken und käsig-schwammartigen, festen, gelben Ausgüssen der Luftsäcke, die verdickte Wände aufwiesen; kleine, gelbe Flecken in den Lungen, selten mit aktivem Pilzmyzel; selten Leberläsionen</p>	(HERMAN UND SLADEN, 1958)

Ente	4 Wochen	Trachea	<p>1.) ID: $3,5 \times 10^4$ Kon.; n = 5; Exp: 1x; 2.) ID: $3,5 \times 10^4$ Kon.; n = 5 nach vorheriger Immunisierung mit einer kombinierten <i>A. fumigatus</i>-, <i>A. niger</i>- und <i>A. flavus</i>-Vakzine i.m. 7, 14, 21, 28 und 35 d. p. i.; Exp: 1x; Kontrolltiere: n = 8</p>		(GRACZYK et al., 1998)
Adulte	Luftsack	ID: 5×10^8 Konidien; Exp: 1x wöchentlich	<p>35 Tage: Evaluation von systemischen <i>Aspergillus</i> spp.-spezifischen IgG, zirkulierendem <i>Aspergillus</i> spp.-Antigen und biochemischer Parameter für die Diagnose invasiver Aspergillose und Erforschung der Protektivität der <i>Aspergillus</i> spp.-spezifischen IgGs; Histo: 3/5 geringgradige, granulomatöse Aerosaccutitis mit Hyphen und Konidien (1.); 2/5 granulomatöse Pneumonie mit Pilzbestandteilen und lymphoider Hyperplasie (1.); nur wenige Luftsackgranulome und keine Pneumonie nach Vakzination (2.); Aspergillus spp.-spezifischen IgG: positiv ab 7. d. p. i. in 1/5 (2.) und in allen Tieren am 14. d. p. i. (1. & 2.), schneller in 2. als in 1., ohne signifikante Unterschiede in der IgG-Titer-Höhe zwischen beiden Gruppen; Aspergillus spp.-Antigene: positiv ab 21. d. p. i. (1.) (65-270 ng/ml); Blutchemischer Parameter: keine signifikanten Unterschiede zwischen 1. und 2. und zu Kontrolltieren</p>		(HERMAN UND SLADEN, 1958)

Bussarde	unterschiedlich ohne genaue Angaben (Ø 350 g Körper- gewicht)	Trachea	Breitflügelbussarde 1.) ID: 3 x 10 ⁴ Kon. (= 8,6 x 10 ⁴ Kon./kg) und 0,5 mg Dexamethason 10 Tage vor und nach Inokulation; n = 5; 2.) ID: 3 x 10 ⁴ Kon. (= 8,6 x 10 ⁴ Kon./kg); Exp: 3x alle 48 Std. (1. & 2.); Kontrolltiere: n = 2	31 Tage: Evaluierung der Präzipitierenden Antikörperantwort auf <i>A. fumigatus</i> ; Klinik: 3/5 Todesfälle am 10., 13. und 20. d. p. i. (1.) und 1/5 am 20. d. p. i. (2.); Patho: Überlebende zeigen milde Läsionen einer Aspergillose (1. & 2.); Antikörper: 1/5 Tieren (Überlebende) zeigten Präzipitin im Serum-Präzipitin-Test am 17. und 24. d. p. i. (2.)	(REDIG, 1980b)
Keine Angabe		Rotschwanzbussarde 10 ⁵ Kon./kg einmalig		Dauer und Ziel unbekannt: Aspergillose wurde experimentell induziert, bestätigt durch Patho und Myko (keine genaueren Angaben)	(REDIG, 1980a)

Anhang II Listen

II.I Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

II.I.I Reagenzien und Verbrauchsmaterial für die Aspergillose diagnostik und die Voruntersuchungen

Kryokonservierung des Schimmelpilzisolates:

Microbank™ Pro-Lab Diagnostics, Novolab
SPRL, Geraardsbergen, Belgien

***Galleria mellonella* Virulenztest:**

Myjector U-100 Insulin syringe Verdifarm, Beringen, Belgien
Wachsmottenlarven Fauna Tropics GmbH,
Marbach/Neckar-Rielingshausen

Desinfektionsmittel:

F 10 (1:250, 30 Minuten) Health & Hygiene, Florida Hills,
Südafrika
Mold Bomb Bio Cide Laboratories, Cumming,
GA, USA
Neopredisan 135-1 MENNO Chemie Vertrieb GmbH,
Norderstedt

Testsysteme für die Serodiagnostik:

Hämagglutinationstests:

Hemkit® Aspergillus IHA Ravo Diagnostika, Freiburg
Glucuronidase-Sulfatase-Lösung Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Taufkirchen

***Aspergillus*-Antigen ELISA:**

Platelia™ ELISA Kit Bio-Rad Laboratories, Hercules,
CA, USA

***Aspergillus*-Antikörper ELISA:**

unfraktioniertes <i>Aspergillus</i> -Antigen	Immuno-Mycologics, Norman, OK, USA
Nunc Maxisorp Immunomodule ELISA plates	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
10 %-ige Kasein-Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Anti-Huhn-Meerrettich Peroxidase Konjugat (Anti chicken IgG)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
2,29-Azino-bis-3-Ethylbenzthiazolin-6-Schwefelsäure	Kirkegaard and Perry, Gaithersburg, MD, USA
Tween® 20	Sigma, St. Louis, MO, USA

***Aspergillus*-Toxin (FuA) EIA**

FuA Standardlösung (ALX-630-110; 200 ng/ml) - 98 % Reinheit, Molekulargewicht 298,4 in Methanol, mit Adsorptionsmaxima bei 224 nm, 275 nm, 281 nm und 292 nm.	Alexis Biochemicals, Lausen, Schweiz
Polyklonales Schweine anti-Kaninchen IgG-Meerrettich Peroxidase Konjugat (anti-rabbit-IgG-HRP)	Dako A/S, Glostrup, Dänemark
Methanol	Merck KgaA, Darmstadt
Kasein-Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Serum-/Plasma-Proteinelektrophorese

Split Beta gels	Helena Laboratories, Beaumont, TX, USA
Rocket Stain - Coomassie Acid Blue,	Helena Laboratories, Beaumont, TX, USA

Akute-Phase-Proteinmessung:

Eiken SAA kit	Eiken Chemical Co Ltd., Tokio, Japan
Tridelta Phase HP Kit	Tridelta, Boston, NY, USA

Färbelösung für die Hämatologie:

Shandon Wright-Giemsa Stain Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
---------------------------------	---

Eindeckmedium:

Kaisers Glyceringelatine	Merck KgaA, Darmstadt
Entellan® Neu	Merck KgaA, Darmstadt

Molekularbiologie

Formamid	Amresco Inc., Ohio, USA
GS 500 LIZ size standard	Applied Biosystems, Halle, Belgien
ABI Prism 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Halle, Belgien

Fixierlösung für die Histologie:

gepuffertes Formalin 10% (pH 6,9)	Merck KgaA, Darmstadt
-----------------------------------	-----------------------

Hämalaun nach Mayer:

Hämatoxylin (Monohydrat) für die Mikroskopie	Merck KgaA, Darmstadt
Eosin G-Lösung wässrig	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumiodat zur Analyse NaIO ₃	Merck KgaA, Darmstadt
Aluminiumkaliumsulfat- Dodecahydrat (Kalialaun)	Merck KgaA, Darmstadt
Chloralhydrate pure	AppliChem GmbH, Darmstadt
Citronensäure-Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

Immunhistochemie

Concanavalin A (L6397)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
------------------------	-----------------------------------

PAS (Periodic-Acid-Schiff) Reaktion:

Periodsäure	Merck KgaA, Darmstadt
Schiffs Reagenz	Merck KgaA, Darmstadt
Hämatoxylin Lösung n. Gill III	Merck KgaA, Darmstadt
Xylol	Merck KgaA, Darmstadt

Waschlösungen:

PBS tablets (1 Tabl. Auf 1.000 ml Aqua dest., pH 7,4 einstellen)	Medicago AB, Uppsala, Schweden
Triton X 100	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

Pufferlösung:

Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Hank's balanced salt solution (HBSS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Verbrauchsmaterial:

SuperFrost*/Plus-Objektträger	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Coverplates	Thermo Fisher Scientific Inc., Astmoor, Runcorn, UK
Immersionsöl 104699	Merck KgaA, Darmstadt

Medien

Sabouraud Dextrose Agar (SAB) CM0041	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel
Columbia-Agar-Fertigplatte mit Schafblut (CSB)	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel
Gassner-Nährboden-Fertigplatten	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel
Brilliantgrünagar	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel
Gepuffertem Peptonwasser	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel

Endotrachealtubus

Paediatric endotracheal tube 2.5 Vygon, Ecouen, Frankreich
(2,5 mm Innen- und 3,5 mm Außendurchmesser, 165 mm Länge)

Blutentnahmematerial:

Octenisept Hautdesinfektionsspray	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Kanüle Finejekt 25G x 5/8, 0,5 x 16 mm	Henkel Sass Wolf, Tuttlingen
Einmalspritzen BD Discardit 5 ml	Rogg Verbandstoffe GmbH & Co. KG, Fahrenzhausen
Mikro-Probengefäß 1,3 ml LH	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Mullkompressen 8-fach, 5 x 5 cm	NOBAMED Paul Danz AG, Wetter/ Ruhr

Nahtmaterial:

Coated Vicryl Plus 4-0	Ethicon LLC, Guaynabo, Puerto Rico, USA
------------------------	---

II.I.II Reagenzien und Verbrauchsmaterial für die Durchführung des Tierversuchs

Narkose- und Euthanasie-medikamente:

Isoflo®	Medini NV, Oostkamp, Belgien
T61	Intervet Deutschland GmbH, MSD Tiergesundheit, Unterschleißheim

II.I.III Sonstiges Verbrauchsmaterial

Deckgläser	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim
Mikrotestplatte PS 96er System V-Form, 0,3 ml	Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe
Objektträger, gebrauchsfertig, gereinigt	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim
Neubauer® Zählkammer	LO - Laboroptik Ltd., Lancing, UK
Papiertischtuch mit Damast- prägung 100 m x 1,2 m weiß	PAPSTAR GmbH, Kall

II.II Liste der verwendeten Geräte

Geräte zur Untersuchung der Falken:

Phonendoskop:

Littmann Classic II Stethoskop 3M Deutschland GmbH, Neuss

Röntgengerät:

Gierth HF 400A GIERTH X-Ray international GmbH, Riesa

Waage:

MTB 20 Adam Equipment, Kingston, Milton Keynes, MK10 0BD, UK

Endoskop:

TelePack PAL 20043020 KARL STORZ GmbH & Co. KG, Tuttlingen

Hopkins® Großbild-Vorausblick-
Optik 30°; Ø 2,7 mm,
Länge 18 mm KARL STORZ GmbH & Co. KG,
Tuttlingen

Telecam Ein-Chip-Kamerakopf mit Parfocal Zoom Objektiv 25 - 50 mm	KARL STORZ GmbH & Co. KG, Tuttlingen
---	---

Geräte zur Durchführung von Inokulum- und Probenbearbeitung:

Mikroskope:

Axioskop	Carl Zeiss AG, Jena
Leica DM 2500	Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar

Digitale Mikroskopkameras:

Leica ICC 50 HD	Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar
Leica DFC 425 C	Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar

Zentrifugen:

Hettich Universal 32R, r = 97 mm	Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen
Mikro20	Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen
Rotanta/T	Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen

Werkbänke:

Safeflow 1.2	Nunc GmbH & Co KG, Wiesbaden
Sterile Werkbank Microflow	Nunc GmbH & Co KG, Wiesbaden
Sterile Werkbank S@feflow 1.2	Nunc GmbH & Co KG, Wiesbaden
Isoflurane Vapor 19.3	Drägerwerk AG, Lübeck

Automatische Pipetten:

Eppendorf Reference [®] , 0,5 - 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf XPlorer [®] , 15 - 300 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetman [®] , P10, 1 - 10 µl;	Gilson International France S.A.S.,
P20, 2 - 20 µl; P100, 20 - 100 µl;	Villiers-le-Bel, Frankreich
P200, 50 - 200 µl;	
P1000, 200 - 1.000 µl	

Brutschrank:

Sanyo CO ₂ Incubator	Sanyo, München
CO ₂ Auto Zero	Heraeus Instruments, Hanau
Keltvitron® t	Heraeus Instruments, Hanau

Luftprobensammler:

MAS-100 Eco	Merck-Whitehouse Station, New Jersey, USA
-------------	---

Geräte für die Durchführung des *Aspergillus*-Antikörper ELISAs:

Molecular Devices plate reader	Molecular Devices Ltc, Sunnyvale, CA, USA
--------------------------------	---

Geräte für die Durchführung des FuA EIA:

Model Sunrise Plate Reader	Tecan, Crailsheim, Germany
Peristaltischer Homogenisator	Seward Seward, West Sussex, UK
Stomacher® 400 Circulator	

Geräte für die Durchführung der APP-Messungen:

Randox Daytona Analyzer	Randox Laboratories, Kearneysville, VA, USA
-------------------------	---

Geräte für die Durchführung der Proteinelektrophorese:

Helena SPIFE 3000 system	Helena Laboratories, Beaumont, TX, USA
Ortho Vitros 250 Analyzer	Ortho Clinical Diagnostics, Rochester, NY, USA

Vortex-Schüttler:

REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach
-----------	--

Geräte für die Durchführung der PCR:

ABI Prism 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Halle, Belgien
QIAcube	Qiagen GmbH, Hilden

NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA
PTC-200 Peltier Thermal Cycler	MJ Research Inc, St. Bruno, Kanada
Rotor-Gene Q	Qiagen GmbH, Hilden
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg
TissueLyser LT	Qiagen GmbH, Hilden

II.III Liste der verwendeten Programme (Software)

Software zur Auswertung des EIA

Magellan EIA Software	Tecan Group Ltd., Männendorf, Schweiz
-----------------------	--

Software zur Auswertung der PCR

Genemapper v3.5	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
BioNumerics version 6	Applied Maths, St-Martens-Latem, Belgien

Software zur statistischen Auswertung

BMDP1, BMDP3D, BMDP6D	BMDP Statistical Solutions, Stonehill Corporate Center, Saugs, MA, USA
BiAS“ (Biometrische Analyse von Stichproben) für Windows, Version 9.08	Epsilon-Verlag, Hochheim, Darmstadt
Microsoft Excel 2013	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
BiAS für Windows, Version 9.14	Dr. rer. med. Hanns Ackermann, Goethe-Universität-Frankfurt

Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle allen Personen danken, die zum Entstehen der vorliegenden Dissertationsarbeit beigetragen haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Michael Lierz für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung von Arbeitsplatz, Material und Literatur und ganz besonders für die konstruktive Kritik sowie die flexible und immer gewährte Unterstützung bei Fragen und Problemen jeglicher Art.

Ebenfalls Danke ich Frau Prof. Dr. An Martel und Herrn Prof. Dr. Frank Pasma vom Institut für Pathologie, Bakteriologie und Vogelkrankheiten der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Gent in Merelbeke, Belgien (IPBAD) für die wissenschaftliche Co-Betreuung, die Bereitstellung der Tierversuchs- und Laborräume, des Arbeitsplatzes, des Materials und der Literatur sowie die Unterstützung bei der Versuchsdurchführung.

Der Studienstiftung des Deutschen Volkes möchte ich für die Gewährung eines Graduiertenstipendiums danken.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Lieven van Waeyenberghe vom IPBAD für vielseitige und große Unterstützung bei der Durchführung der Voruntersuchungen und der Tierversuche, der pathologischen und der mikrobiologischen Untersuchungen, der Datenanalyse und der Manuskripterstellung bei den aus dieser Arbeit entstandenen Publikationen. Zudem danke ich ihm für die eigenständige Durchführung eines Großteils der histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen, der histologischen Auswertung, der molekularbiologischen Untersuchungen und des *A. fumigatus*-Virulenztests in Wachsmottenlarven. In diesem Zusammenhang danke ich auch dem wissenschaftlichen und dem technischen Personal der Universität Gent für ihren Beitrag an den oben genannten Untersuchungen, namentlich Herrn Prof. Dr. Freddy Haesebrouck, Herrn Prof. Dr. Tom Coenye, Herrn Prof. Dr. Richard Ducatelle und Herrn Dr. Tom Hellebuyck.

Vielen Dank richte ich auch an Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Ewald Usleber, Frau Prof. Dr. Madeleine Groß und Herrn Dr. Hadri Latif von der Professur für Milchwissenschaften des Instituts für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen für die Durchführung der Fumigaclavin A Untersuchungen und die Hilfestellung bei der Datenanalyse und der Manuskripterstellung bei den aus dieser Arbeit entstandenen Publikationen.

Mein Dank gebührt auch Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Tietz für die Durchführung des Hämagglutinationstests am Institut für Pilzkrankheiten in Berlin.

Zudem Danke ich Frau Prof. Dr. Carolyn Cray von der Division of Comparative Pathology der University of Miami - Miller School of Medicine in Miami, Florida, USA für die Durchführung der Serumdiagnostik (Untersuchung auf Galactomannan, Anti-*A. fumigatus*-Antikörper, die Akute-Phase-Proteine Haptoglobin und Serumamyloid A und die Serum-/Plasma-Proteinelektrophorese) und die Hilfestellung bei der Datenanalyse und der Manuskripterstellung bei den aus dieser Arbeit entstandenen Publikationen.

Ein großes Dankeschön gebührt auch Herrn AkadD Dr. Dipl.-Math. Klaus Failing, Herrn Andreas Schaubmar und Frau Marion Sparenberg von der AG Biomathematik und Datenverarbeitung am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Versuche, für die geduldige Beantwortung von Nachfragen sowie die Hilfestellung bei der Manuskripterstellung bei den aus dieser Arbeit entstandenen Publikationen.

Den (ehemaligen) Mitarbeitern der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische der Justus-Liebig-Universität Gießen möchte ich für die vielseitig gewährte Unterstützung bei der Durchführung der Versuche sowie der anschließenden Untersuchungen danken. Allen voran möchte ich Frau Luisa Ziegler, Frau Helena Schneider, Frau Dr. Kristina Maier und Frau Sylvia L. Parmentier geb. Mayr, aber auch Frau Dr. Elisa Wüst, Frau Susanne Paries und Frau Bärbel Nachtigall sowie den Studenten des jeweiligen 9./10. Semesters für ihre tatkräftige Hilfe bei der Durchführung der Voruntersuchungen, der Probenbearbeitung, der Laboruntersuchungen und der Sektionen danken.

Großer Dank gilt außerdem Frau Antoinette Huhn für die Hilfe in der parasitologischen und bakteriologischen Diagnostik sowie Frau Prof. Dr. Julia Ponder und Herrn Prof. Dr. Patrick Redig vom Raptor Center der University of Minnesota in St. Paul, USA für die Zusendung der PhD-Schriften zum Thema Aspergillose aus ihrem Hause.

Frau Dr. Dagmar Sommer, Frau Dr. Kristina Maier, Frau Luisa Ziegler und Frau Astrid Golbach danke ich für ihre konstruktiven Anregungen und Korrekturen zum vorliegenden Manuskript sehr herzlich. Ebenso danke ich Herrn Dr. Dirk Enderlein für dessen Unterstützung bei der Formatierung des Textes.

Schließlich möchte ich auch ganz besonders meiner Familie und meinen Freunden für ihre jahrelange und in allen Lebenslagen gewährte Unterstützung und Geduld danken, die sie mit mir, meiner Doktorarbeit und meinen weiteren Nebenprojekten und Hobbies erwiesen haben. Hier hat vor allem meine Lebenspartnerin Luisa Ziegler stets große Geduld und Verständnis bewiesen und mich vielfach unterstützt und motiviert.

Zuletzt danke ich besonders meinem Vater Karl Fischer, der mir neben seinem verstorbenen Geschäftspartner und Mentor Horst Niesters den Weg zur Falknerei gezeigt und meine Liebe und Faszination für Greifvögel und Wildtiere geweckt hat. Ohne ihn hätte ich sicher einen gänzlich anderen Weg eingeschlagen.

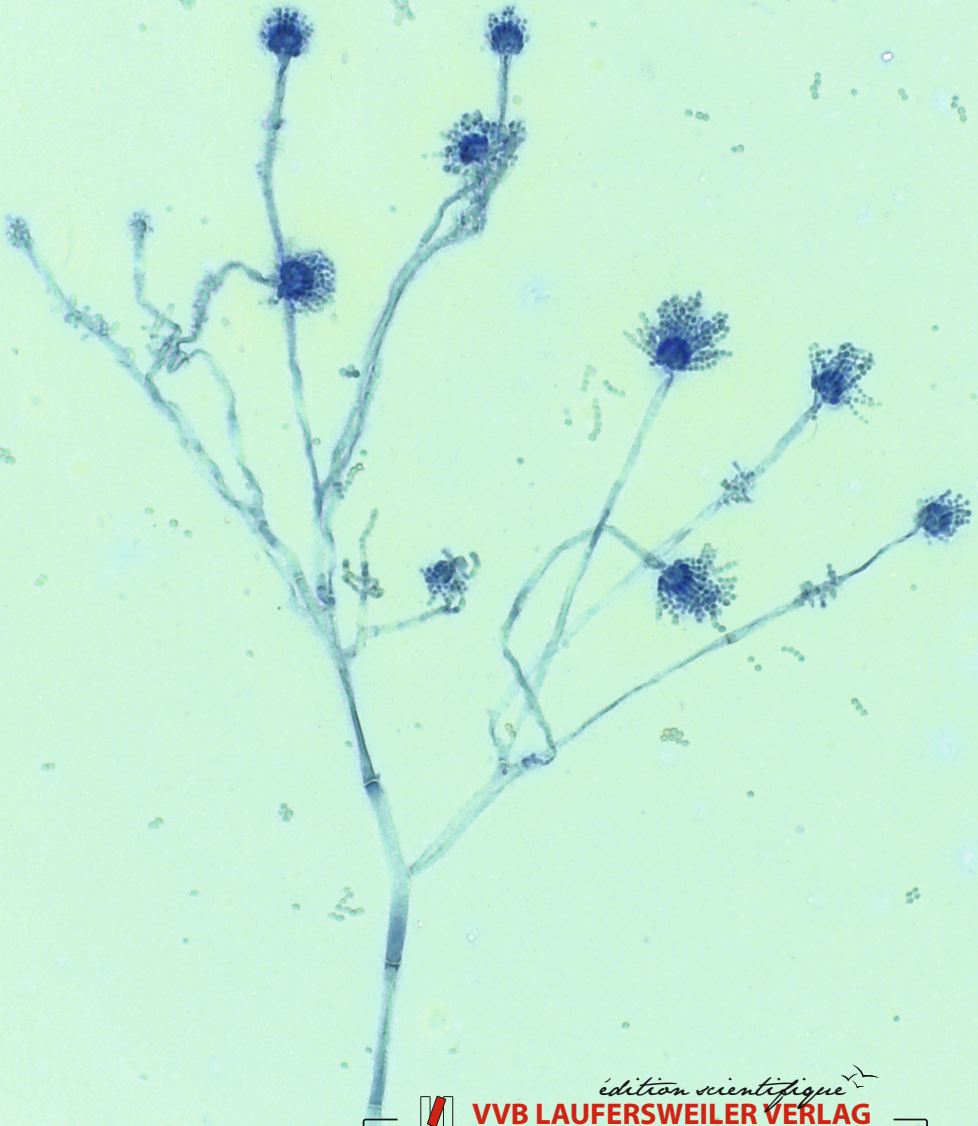
Erklärung

Ich erkläre:

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

Gießen, den 17.07.2017

Dominik Fischer



édition scientifique
 **VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENGRING 15
D-35396 GIESSEN

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


ISBN: 978-3-8359-6634-5


9 783835 1966345