

Untersuchungen zur Wirksamkeit einer
homologen Ölemulsionsvakzine gegen die
Paramyxovirose der Tauben
basierend auf einem
schwach virulenten Tauben-Stamm (P201)

Anya Schmellekamp

2005

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent: Univ.-Prof. Dr. R. T. Korbel
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. B. Aigner

Tag der Promotion: 11. Februar 2005

Aus dem Institut für Geflügelkrankheiten
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Rüdiger Korbel

Untersuchungen zur Wirksamkeit einer
homologen Ölemulsionsvakzine gegen die
Paramyxovirose der Tauben basierend auf einem
schwach virulenten Tauben-Stamm (P201)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Anya Schmellekamp
aus Bergisch Gladbach

München 2005

Ich widme diese Arbeit
Herrn Prof. Dr. Grimm (†)

Im Andenken an sein fröhliches und freundliches Naturell

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen

1.	EINLEITUNG	1
2.	LITERATURÜBERSICHT	2
2.1.	Der Serotyp 1 Aviärer Paramyxoviren	2
2.1.1.	Die taxonomische Zuordnung des Serotyps 1 Aviärer Paramyxoviren	2
2.1.2.	Eigenschaften des Serotyps 1 Aviärer Paramyxoviren	4
2.1.3.	Einteilung in Pathotypen und Virulenzunterschiede	6
2.2.	Die APMV-1 Infektion der Tauben	10
2.2.1.	Das Vorkommen der APMV-1 Infektion bei Tauben - geschichtlicher Überblick und Verbreitung	10
2.2.2.	Seroprävalenz der AMPV-1 Infektion bei Tauben	14
2.2.3.	Relevanz der Tauben APMV-1 Infektion für anderes Geflügel	14
2.3.	Die APMV-1 Infektion (Paramyxovirose) bei Tauben	16
2.3.1.	Das klinische Bild der APMV-1 Infektion bei der Taube	16
2.3.2.	Systemische Erregerausbreitung und –ausscheidung bei der APMV-1 Infektion der Taube	18
2.3.3.	Pathologisch-anatomisches und histopathologisches Bild der APMV-1 Infektion der Taube	20
2.3.4.	Die Schutzimpfung gegen die APMV-1 Infektion bei Tauben	21

3.	MATERIAL UND METHODEN	24
3.1.	Material	24
3.1.1.	Virusstämme	24
3.1.2.	Substanzen für die Virusisolierung	24
3.1.3.	Substanzen für die histologische Untersuchung	25
3.1.4.	Substanzen für die Immunfärbung	26
3.1.5.	Versuchstiere	28
3.2.	Methoden	28
3.2.1.	Haltung der Tauben	28
3.2.2.	Versuchsbeschreibung	29
3.2.3.	Klinischer Pathogenitätsindex	31
3.2.4.	Probenentnahme für den Virusnachweis	31
3.2.5.	Virusisolierung	32
3.2.6.	Durchführung der Sektion	33
3.2.7.	Histologische Untersuchung	33
3.2.8.	Histologischer Pathogenitätsindex	34
3.2.9.	Immunfärbung	35
3.2.10.	Statistische Berechnung	37
4.	ERGEBNISSE	38
4.1.	Manifestation der experimentellen APMV-1 Infektion - Betrachtung der ungeimpften Kontrolltauben	38
4.1.1.	Klinischer Verlauf	38
4.1.2.	Virusausscheidung	44
4.1.3.	Pathologisch-anatomische Befunde	45
4.1.4.	Histopathologische Befunde der experimentellen APMV-1 Infektion	47
4.1.4.1.	Histopathologische Veränderungen an den parenchymatösen Organen	48

4.1.4.2.	Histopathologische Veränderungen am Zentralen Nervensystem	55
4.1.5.	APMV Antigennachweis (Immunfärbung)	57
4.2.	Überprüfung der Schutzwirkung einer Taubentyp APMV-1 (pPMV-1) Impfung	60
4.2.1.	Klinischer Verlauf nach APMV-1 Belastungsinfektion bei geimpften Tauben	60
4.2.2.	Virusausscheidung nach APMV-1 Belastungsinfektion bei geimpften Tauben	63
4.2.3.	Pathologisch-anatomische Befunde nach APMV-1 Belastungsinfektion bei geimpften Tauben	63
4.2.4.	Histologische Untersuchung nach APMV-1 Belastungsinfektion bei geimpften Tauben	64
4.2.5.	Möglichkeiten der Überprüfung der Schutzwirkung im Vergleich von ungeimpften und geimpften APMV-1 infizierten Tauben	67
4.2.5.1.	Statistische Auswertung des Vergleichs der Äusserung klinischer Krankheitsanzeichen geimpfter und ungeimpfter Tauben nach APMV-1 Belastungsinfektion	67
4.2.5.2.	Statistische Auswertung des Vergleichs der Virusausscheidung von geimpften und ungeimpften Tauben nach APMV-1 Belastungsinfektion	68
4.2.5.3.	Statistische Auswertung des Vergleichs histopathologischer Veränderungen geimpfter und ungeimpfter Tauben nach APMV-1 Belastungsinfektion	69
5.	DISKUSSION	76
6.	ZUSAMMENFASSUNG	84

7. SUMMARY 87

8. LITERATURVERZEICHNIS 90

Danksagung

Lebenslauf

Abkürzungen

AAF	Amnioallantoishöhlenflüssigkeit
Abb.	Abbildung
A.dest	Aqua destillata
APMV	Aviäres Paramyxovirus
CAM	Chorioallantoismembran
EID	Eiinfektiöse Dosis
ELD	Eiletale Dosis
Fa.	Firma
g	Gramm
GKIE	Gewebekultur Infektiöse Einheiten
HA	Hämagglutinationstest
HAH	Hämagglutinations-Hemmungstest
HE	Hühnererythrozyten
hrs	hours (Stunden)
ICPI	Intracerebraler Pathogenitätsindex
IFN	Interferon
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
i.m.	intramuskulär
IVPI	Intravenöser Pathogenitätsindex
l	Liter
M	molar
mAK	monoklonaler Antikörper
MDT	Mean death time
ml	Milliliter
min	Minuten
mind.	mindestens
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
nm	Nanometer
ND	Newcastle Krankheit (Newcastle Disease)

OIE	Office Internationale des Epizooties
PBS	phosphate buffered saline
p.ch.	post challenge
PCR	Polymerasekettenreaktion
p.i.	post infectionem
PMV	Paramyxovirus
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SA	Schnellagglutination
SPF	spezifiziert pathogenfrei
Tex	Texaner-Taube
Tg.	Tag
U/min	Umdrehungen pro Minute
W	Watt
z.T.	zum Teil
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Die Paramyxovirose der Tauben ist eine weltweit auftretende, verlustreiche Erkrankung, die Tiere aller Altersgruppen betrifft. Der auslösende Erreger ist das Aviäre Paramyxovirus des Serotyp 1 (APMV-1), das bei Hühnern die wirtschaftlich bedeutsame Newcastle Disease (ND) auslöst. Während in der Vergangenheit die Erkrankung nur sporadisch bei Tauben beschrieben ist, treten seit den frühen 80er-Jahren seuchenhafte Ausbrüche auf (Richter, 1983; Schusser et al., 1984; Tangredi, 1988). Für die Änderung der epidemiologischen Situation wird eine spezielle APMV-1 Variante, der sogenannte Taubentyp, verantwortlich gemacht, die sich antigenetisch mit Hilfe monoklonaler Antikörper von anderen APMV-1 Stämmen differenzieren lässt (Alexander et al., 1987; Collins et al., 1989; Jestin et al., 1989). Eine Bekämpfung basiert auf einer Impfprophylaxe, die zum Schutz der Bestände sowie zur Eindämmung der Erkrankung geführt hat. Seit 1986 wurde dafür eine inaktivierte Vakzine auf der Basis eines homologen Taubentyp APMV-1 Impfstammes erfolgreich eingesetzt (Polten, 1986; Küchler, 1997). Durch die Entscheidung der Europäischen Kommission vom 8. Februar 1993 über die Kriterien für APMV-1 Impfstoffe (93/152/EWG) dürfen diese Impfstoffe nur noch mit schwach virulenten, sogenannten lentogenen Impfstämmen (Intracerebraler Pathogenitätsindex $< 0,7$) hergestellt werden. Da der ursprüngliche Tauben APMV-1 Impfstoff auf einem virulenten Tauben APMV-1 Stamm basierte (P₃G, Knoll, 1986), musste dieser Impfstoff mit Wirkung zum 1. Januar 1995 vom Markt genommen werden. Seitdem standen für die Paramyxovirose-Impfprophylaxe von Tauben nur heterologe Impfstoffe zur Verfügung.

In der vorgelegten Arbeit sollte im Rahmen eines Zulassungsverfahrens die Langzeitwirksamkeit eines neuen homologen Tauben-Impfstoffes (P201), der auf einem lentogenen Stamm beruht, überprüft werden. Anhand der Kontrolltauben, bei denen eine experimentelle Belastungsinfektion ohne vorherige Impfung vorgeschrieben ist, sollten insbesondere die feingeweblichen Veränderungen in Folge der Tauben APMV-1 Infektion detailliert dargestellt werden. Dies diene insbesondere zur Abklärung einer histopathologischen Manifestation etwaiger subklinischer Verläufe

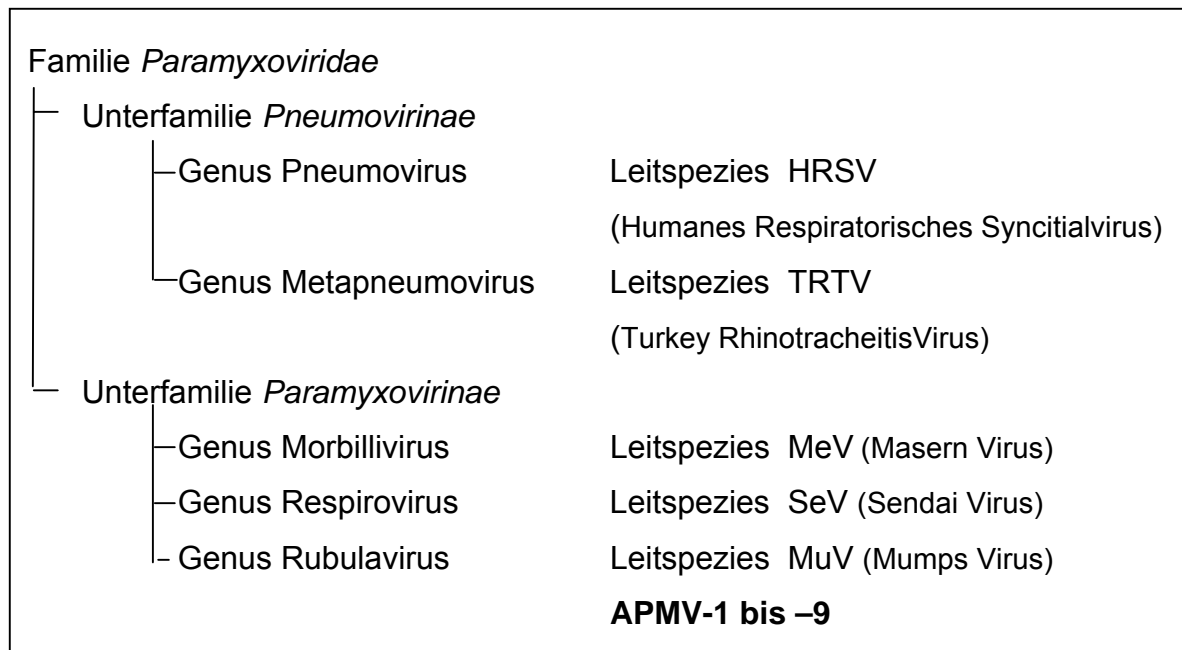
2. Literaturübersicht

2.1. Der Serotyp 1 Aviärer Paramyxoviren

Aviäre Paramyxoviren des Serotyps 1 lösen die seuchenartig verlaufende, hochkontagiöse Atypische Geflügelpest aus (Newcastle Krankheit – Newcastle Disease – ND). Sie wurde erstmals im Jahr 1926 als eine hochpathogene Hühnerkrankheit beschrieben, die zeitgleich auf Java/Indonesien (Kranefeld, 1926) und in England (Doyle, 1927) auftrat. Sie gefährdet auch heutzutage noch mit wechselnden Krankheitsbildern weltweit das Wirtschaftsgeflügel und wird aufgrund der raschen Ausbreitung und der sozioökonomischen Bedeutung vom Office Internationale des Epizooties (OIE) in der Liste A der strategisch bedeutsamen Tierseuchen geführt. Schäden beim Auftreten der ND entstehen nicht nur durch Tierverluste und Leistungsminderungen, sondern auch durch Einschränkungen des Handels. Der Serotyp 1 verursacht ebenfalls die Paramyxovirose der Tauben und kann auch dort zu erheblichen Verlusten führen. Desweiteren konnte der Serotyp 1 (APMV-1) bereits bei 236 Vogel-Spezies nachgewiesen werden (Kaleta und Baldauf, 1988). So kommt es beispielsweise auch im Bereich der Ziervögel, v.a. bei frisch importierten Tieren, zu akuten APMV-1 Infektionen von Papageien (Wachendörfer und Lüthgen, 1971; Alexander und Allan, 1977). Alle Vogelarten gelten als empfänglich für aviäre APMV-1 (Alexander, 1997).

2.1.1. Die taxonomische Zuordnung des Serotyps 1 Aviärer Paramyxoviren

Aviärer Paramyxoviren (APMV) werden in die Familie der *Paramyxoviridae*, Unterfamilie *Paramyxovirinae* eingeordnet und dem Genus *Rubulavirus* zugerechnet (Lamb et al., 2000). Aufgrund von Sequenzanalysen wird die Familie der *Paramyxoviridae* mit ihren zwei Unterfamilien, den *Paramyxovirinae* und *Pneumovirinae*, von fünf Genera gebildet (siehe Abb. 1). Die Unterfamilie *Pneumovirinae* enthält neben dem Genus *Pneumovirus* zusätzlich den Genus *Metapneumovirus*.

Abb. 1: Taxonomische Einteilung der Familie Paramyxoviridae

Demgegenüber wird die Unterfamilie *Paramyxovirinae* in drei Genera unterschieden: Respirivirus, Rubulavirus und Morbillivirus.

Vertreter des Genus Rubulavirus weisen sowohl Hämagglutinin- als auch Neuraminidase-Aktivität auf, und zeichnen sich durch das Fehlen des Offenen Leserahmens (ORF) für das Nicht-Strukturprotein C aus, der bei den Vertretern der beiden anderen Genera Morbillivirus und Respirivirus vorhanden ist. Dem Genus Rubulavirus gehören derzeit die grösste Anzahl an Viren an: Das Mumpsvirus (MuV) als sogenannte Leitspezies, die Aviären Paramyxoviren, die sich in neun Serotypen (APMV-1 bis –9) unterscheiden lassen, das Humane Parainfluenzavirus 2 und 4 (HPIV-2/4a/4b) sowie das Mapuera Virus (MPRV), das Porcine Rubulavirus (PoRV) und das Simian Virus 5 bzw. 41 (SV-5/41) (Lamb et al., 2000). Werden die Aviären Paramyxoviren mit ihren neun Serotypen derzeit noch dem Genus Rubulavirus zugerechnet, so deuten neuere Erkenntnisse über die Genomstruktur auf eine gesonderte Stellung innerhalb der Unterfamilie der *Paramyxovirinae* hin und lassen eine Klassifizierung als eigenes separates Genus gerechtfertigt erscheinen (de Leeuw and Peeters, 1999; Jordan et al., 2000).

Der Serotyp 1 stellte sich lange als einheitlicher Serotyp dar. Durch die Entwicklung monoklonaler Antikörper (mAK) waren antigenetische Unterschiede zwischen Taubenstämmen und anderen APMV-1 Stämmen feststellbar (Alexander et al., 1987; Collins et al., 1989; Jestin et al., 1989). Mit Hilfe monoklonaler Antikörper gegen das HN-Protein liessen sich die Virusisolate aus dem Seuchenzug der Tauben abgrenzen und wurden als Taubentyp P (pPMV-1) innerhalb des Serotyps 1 Aviärer Paramyxoviren bezeichnet.

Desweiteren erlauben molekularbiologische Methoden eine Einteilung der APMV-1 Isolate in acht Genotypen (Ballagi-Pordany et al., 1996; King et al., 1998; Sakaguchi, 1989; Seal et al., 1995; Seal et al., 1996; Seal et al., 2000; Seal et al., 2002; Toyoda, 1989). Taubentyp APMV-1 Isolate werden dem Genotyp VI zugeordnet (Ballagi-Pordany et al., 1996).

2.1.2. Eigenschaften des Serotyps 1 Aviärer Paramyxoviren

Aviäre Paramyxoviren sind behüllte Viren mit einer einzelsträngigen, nicht-segmentierten RNS negativer Polarität. Intakte APMV-1 Viruspartikel haben annähernd sphärische Form und messen 150 bis 200 nm im Durchmesser. Häufig finden sich in negativ-kontrastierten Präparaten auch pleomorphe bis filamentöse Partikel (Kaleta, 1992). Die Viruspartikel bestehen aus einer zweilagigen, lipidhaltigen Hülle, die direkt von der Wirtszelle stammt und das Nucleocapsid umgibt. Die Hülle enthält zwei transmembrane Glycoproteine, das Hämagglutinin-Neuraminidase-Protein (HN) und das Fusionsprotein-Protein (F), die als 8-12 nm lange Projektionen, den sogenannten „Spikes“ aus der Hülle herausragen. Durch diese Oberflächenfortsätze wird die Bindung des Virus an und das Eindringen in die Zielzelle vermittelt. Das HN-Protein weist zwei verschiedene Funktionen auf. Es bindet an Sialinsäure-haltige Rezeptoren der Wirtszelle und bewirkt so die Adsorption des Virus. Da auch die Oberfläche von Erythrozyten mit derartigen Rezeptoren besetzt ist, wird durch das HN-Protein eine Agglutination von Erythrozyten (Hämagglutination) vermittelt, die in der Diagnostik im Hämagglutinationstest (HA) bzw. im Hämagglutinations-Hemmungstest (HAH) genutzt wird. Als zweite Funktion weist das HN-Protein eine Neuraminidase-Aktivität (N-Acetyl-

Neuraminyl-Hydrolase) auf, wodurch das HN-Protein vom Rezeptor abgespalten wird. Es wird vermutet, dass diese zweite Funktion des HN-Proteins essentiell für die Freisetzung neu gebildeter Virionen ist (Iorio et al., 2001).

Das F-Protein induziert die Membranverschmelzung und ermöglicht somit das Eindringen des Virus in die Zielzelle. Es wird zunächst als inaktives Precursor-Protein (F_0) synthetisiert und erreicht seine Funktionalität erst nach proteolytischer Spaltung durch zelluläre Proteasen der Zielzelle (Nagai et al., 1976; Nagai und Klenk, 1977). Von den entstehenden zwei Fragmenten F_1 -Protein (Aminosäure 117-553) und F_2 -Protein (Aminosäure 1-116), die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind, trägt das Amino-terminale Ende des F_1 -Proteins ein sogenanntes Fusionspeptid (Aminosäure 117-142). Das Fusionspeptid ist ein hydrophober Bereich, der innerhalb der Paramyxoviren hoch konserviert ist und maßgeblich an der Membranverschmelzung beteiligt ist (Nagai et al., 1976; Nagai und Klenk, 1977). Die Spaltbarkeit des F_0 -Proteins und damit die funktionelle Aktivierbarkeit variiert bei verschiedenen Isolaten und kann als Virulenzmarker herangezogen werden (Nagai et al., 1989; Gothoh et al., 1992; Ogasawara et al., 1992; Morrison und Portner, 1991) (siehe Abschnitt Virulenzunterschiede).

Der Virushülle innen angelagert ist das nicht glykosilierte Matrix Protein (M-Protein). Es umgibt zusammen mit der Hülle das Nukleokapsid. Elektronenmikroskopisch stellt sich das Nukleokapsid in negativ-kontrastierten Präparaten als gewundener, fischgrätenartiger Strang dar. Das Nukleoprotein (NP) ist die Hauptkomponente des Nucleokapsids und umschließt als linksdrehende Helix mit einem Durchmesser von 13-18 nm die einzelsträngige RNS in einem zentralen Kanal von 5 nm (Scheid, 1987). Die RNS, die rund 15 kilo Basenpaare (kb) lang ist, weist eine Negativstrang-Orientierung auf und ist daher für sich alleine nicht infektiös. Dem NP-Protein angelagert ist das Polymerase Protein (L) und das Phosphoprotein (P) (Matsumoto, 1982; Strauss und Strauss, 1983). Das L-Protein besitzt die enzymatische Aktivität einer RNS-abhängigen RNS-Polymerase und interagiert mit dem P-Protein direkt im Transkriptionskomplex (Hamaguchi et al., 1983; Hamaguchi et al., 1985). Für die Funktionalität des Transkriptionskomplexes muß zudem die virale RNS vom Nukleokapsid umschlossen sein (Horikami et al., 1992). Nur eine Koexpression aller drei Proteine (NP, L und P)

ermöglicht die Virusreplikation mit Transkription von viraler mRNA bzw. genomischer RNA (Peeters et al., 1999; Römer-Oberndörfer et al., 1999).

Neben diesen sechs Hauptproteinen (HN-, F-, M-, NP-, L- und P-Protein) werden ausgehend vom P-Gen durch Nutzung eines alternativen Leserahmens noch das V- und das W-Protein translatiert (Kolakofsky et al., 1998; McGinnes et al., 1988). Durch transkriptionelle Modifikation der mRNA, mit Insertion eines bzw. von zwei Guanin (G) an Position 484 werden das kleinere V- bzw. W-Protein translatiert, die sich vom P-Protein in ihren C-terminalen Enden unterscheiden (Steward et al., 1993). Über die Funktion des V-Proteins, das Zink bindet, ist bisher noch wenig bekannt (Samson et al., 1991; Steward et al., 1993). Untersuchungen mit APMV-1 Mutanten mit erniedrigter V-Expression konnten zeigen, dass das V-Protein an der Regulation der Virusreplikation beteiligt ist und ihm eine Bedeutung als Pathogenitätsfaktor zukommt (Mebatsion et al., 2001). Arbeiten mit V-Deletionsmutanten zeigen eine erhöhte Typ 1 Interferon Sensitivität *in vitro* und *in ovo* beim Fehlen des V-Proteins (Huang et al., 2002).

2.1.3. Einteilung in Pathotypen und Virulenzunterschiede

Der Verlauf einer APMV-1 Infektion und die geäußerten Krankheitszeichen variieren sehr stark. Entsprechend den klinischen Krankheitsverläufen im Wirtssystem Huhn werden vier Pathotypen international unterschieden (Beard und Hanson, 1984):

Velogene Pathotypen verursachen bei rascher Ausbreitung akute Krankheitsverläufe mit hoher Mortalität in allen Altersklassen und Nutzungsrichtungen. Allgemeine Krankheitssymptome, wie Flügel hängen lassen, Anorexie oder gestäubtes Gefieder, werden von starkem Legerückgang begleitet. Je nach Krankheitsverlauf wird beim *velogenen* Pathotyp nochmals eine Unterscheidung in *viscerotrop* und *neurotrop* vorgenommen. Beim *velogen viscerotropen* Verlauf kommt es zu Durchfällen von zumeist grünlich-gelblicher Farbe, die Blutbeimengungen enthalten können, und pathologisch-anatomisch finden sich hämorrhagische Läsionen am Intestinaltrakt. Demgegenüber zeigen sich beim *velogen neurotrophen* Verlauf eher respiratorische Symptome mit Atemnot, die sich in Schnabelatmung äußert, serösem Schnabelausfluß, Lidödem und teilweise einer zyanotischen Verfärbung des Kammes.

Bei einem Teil der überlebenden Tiere treten in der zweiten Krankheitswoche ZNS-Symptome mit Tortikollis, Opisthotonus, Ataxien und einseitige oder beidseitige Paralyse der Flügel oder Ständer auf. Die ZNS-Symptome finden ihr patho-histologisches Äquivalent in einer disseminierten Meningoencephalitis bzw. Polyneuritis. Im Gegensatz zur ersten Krankheitswoche ist zu diesem Zeitpunkt die Mortalität nur noch gering, wobei Tiere auch noch nach drei bis vier Wochen infolge Auszehrung sterben.

Mesogene Pathotypen verursachen altersabhängige Krankheitsverläufe mit geringerer Mortalität von 5-50 % der Tiere. Während Küken bis zu 100 % erkranken, liegt die Morbidität bei adulten Tieren selten über 50 %. Es treten Allgemeinsymptome mit Rückgang der Futteraufnahme und Absinken der Legeleistung auf. Respiratorische und nervale Symptome sind in ihrer Ausprägung nicht so deutlich wie bei den velogenen Verläufen.

Lentogene Pathotypen bewirken in der Regel keine klinische Manifestation. Lediglich bei Hühnerküken werden milde respiratorische Symptome beobachtet. Schwach virulente Virusstämme werden daher erfolgreich als Impfstämme eingesetzt (siehe Abschnitt Schutzimpfung).

Apathogene Pathotypen besitzen eine noch geringere Restpathogenität als lentogene Erreger und die Infektion beschränkt sich auf den Intestinaltrakt. Eine Infektion mit diesem Pathotyp führt häufig zu einer klinisch unbemerkten Durchseuchung eines Bestandes ohne Beeinträchtigung der Legeleistung.

Als Maß für die Virulenz wurden in der Vergangenheit verschiedene Kenngrößen entwickelt, die sich auf die Schädigung von Hühnerembryonen bzw. Hühnerküken beziehen.

Die Mean Death Time (MDT) drückt die mittlere Absterberate 11-tägig beimpfter Hühnerembryonen aus und wird in Stunden ausgedrückt. Der intracerebrale Pathogenitätsindex (ICPI) ergibt sich nach intracerebraler Applikation von virushaltiger AAF in Eintagsküken durch eine durchschnittliche klinische Bewertung pro Küken und Tag, wobei gesund mit 0, erkrankt mit 1 und tote Küken mit 2 bewertet werden. Der intravenöse Pathogenitätsindex (IVPI) errechnet ebenfalls eine Indexzahl und bewertet die klinischen Befunde 8 Wochen alter intravenös infizierter Hühnerküken. Anhand

dieser Parameter werden die Stämme wie folgt eingeteilt (nach Kommers et al., 2001 und Werner et al., 1999):

	<u>MDT</u>	<u>ICPI</u>	<u>IVPI</u>
lentogen	> 90 hrs	< 0.7	= 0.0
mesogen	60 - 90 hrs	0.7 - 1.5	0.0 - 0.5
velogen	< 60 hrs	> 1.5	2.0 - 3.0

In den USA werden velogene neurotrope von velogenen viscerotropen Stämmen mittels Intrakloacaler Inokulation in adulten Hühnern unterschieden (Seal et al., 2000).

Konnte die Virulenz von APMV-1 Isolaten lange Zeit nur mit Hilfe dieser tierexperimentellen Untersuchungsmethoden überprüft werden, so ermöglichen molekularbiologische Kenntnisse des F-Proteins eine weitere Differenzierung für die verschiedenen Pathotypen (Aldous und Alexander, 2001; Cavanagh, 2001; OIE, 2001). Wird die Ausbreitung lentogener Stämme von der Art der im Gewebe vorhandenen zellulären Proteasen limitiert und bleibt damit in der Regel auf den Intestinal- bzw. Respirationstrakt beschränkt, so kann das F₀-Protein virulenter, pantroper Viren von einer Vielzahl von Proteasen effektiv gespalten werden. Anhand der Genomstruktur des F-Proteins ist eine Abgrenzung virulenter Stämme gegenüber apathogenen bzw. lentogenen Inpfstämmen möglich. Beim Vergleich von Aminosäuresequenzen im Bereich der proteolytischen Spaltstelle konnte festgestellt werden, dass virulente Stämme im C-terminalen Ende des F₂-Proteins (Position 112 bis 116) vor der Spaltstelle zwei Paare basischer Aminosäuren (Arginin (R) oder Lysin (K)) tragen (Collins et al., 1994). Das Amino-terminale Ende des F₁-Proteins weist auf Position 117 Phenylalanin (F) auf, so dass sich die Spaltstelle wie folgt darstellt: ¹¹²R/K-R-Q-K/R-R¹¹⁶--F¹¹⁷. Demgegenüber tragen gering virulente Stämme in diesem Bereich insgesamt nur zwei basische Aminosäuren, auf Position 116 Arginin (R) und auf Position 113 Arginin (R) oder Lysin (K). Desweiteren befindet sich an Position 117 Leucin (L) statt dem Phenylalanin (F) virulenter Stämme: ¹¹²G/E-K/R-Q-G/E-R¹¹⁶--L¹¹⁷.

Die funktionelle Bedeutung dieser Sequenz für die Virulenz wurde mittels rekombinanter Viren experimentell bestätigt (Peeters et al., 1999). Mit der Entwicklung neuer diagnostischer Methoden ist damit die molekularbiologische Abgrenzung der velo- und mesogenen Pathotypen von lentogenen Stämmen möglich (Aldous und Alexander, 2001; Cavanagh, 2001; OIE, 2001).

So wird die Newcastle Disease vom OIE über den ICPI und molekularbiologische Kriterien folgendermassen definiert (OIE, 2001):

„Die Newcastle Disease ist eine Infektion von Vögeln mit einem Aviären Paramyxovirus der Serogruppe 1 (APMV-1), das eine der folgenden Kriterien erfüllt:

- Das Virus hat einen ICPI in Eintagsküken von 0.7 oder höher
- Das Virus weist am C-terminalen Ende des F₂-Protein multiple basische Aminosäuren auf und am N-terminalen Ende des F₁-Protein Phenylalanin an Position 117. Die Bezeichnung multiple Aminosäuren bezieht sich auf wenigstens drei Arginin- oder Lysin-Reste innerhalb der Positionen 113 bis 116“

Untersuchungen von Isolaten aus Tauben, dem sogenannten Taubentyp, zeigen, dass diese überwiegend vom mesogenen Pathotyp und nur zu einem geringen Anteil vom velogenen Pathotyp sind. Dagegen werden lentogene Taubentyp APMV-1 Isolate nur selten gefunden. Die Pathogenitätsprüfung von 50 Taubentyp APMV-1 Isolaten aus Tauben, die in Berlin im Rahmen der Routinediagnostik in der Zeit von 1992 bis 1997 gewonnen wurden, ergab mittels ICPI für 49 eine Beurteilung als mesogen und nur einmal mit einem Wert von 1.63 als velogen (Hlinak et al., 1998). Auch die Pathogenitätsprüfung von 129 Taubentyp APMV-1 Isolaten aus Tauben, die im Zeitraum von 1992 bis 1996 von regionalen Untersuchungsämtern gewonnen wurden und im deutschen Nationalen Referenzlabor für ND und Aviäre Influenza charakterisiert worden waren, wurden mit ICPI-Werten zwischen 0.7 und 1.5 überwiegend als mesogen eingestuft (Werner et al., 1999). Nur bei drei Isolaten wurde ein velogener ICPI von über 1.5 ermittelt. Bei virulenten Taubentyp APMV-1 Isolaten aus den Jahren 1983 und 1984 mit hohem ICPI sind nicht, wie bei virulenten Hühnertyp APMV-1 Isolaten zwei Paare basischer Aminosäuren, sondern bei insgesamt drei basischen Aminosäuren nur ein Paar nachweisbar: ¹¹²G-R-Q-K-R¹¹⁶--F¹¹⁷. Taubentyp APMV-1 Isolate aus den Jahren 1998 und 1999 zeigen mitunter auch das für Hühnertypen

klassische Motiv $^{112}\text{R/K-R-Q-K-R}^{116}\text{--F}^{117}$ an der proteolytischen Spaltstelle des F-Proteins (Collins et al., 1993; Meulemans et al., 2002)

2.2. Die APMV-1 Infektion der Tauben

2.2.1. Das Vorkommen der APMV-1 Infektion bei Tauben – geschichtlicher Überblick und Verbreitung

Bereits mit dem ersten Bericht der Newcastle Krankheit im Jahre 1926 bei Hühnern wird erwähnt, dass Tauben nach experimenteller, intramuskulärer Inokulation klinisch an der APMV-1 Infektion erkranken (Doyle, 1927). Im Gegensatz zu Hühnern galten sie allerdings zu der damaligen Zeit als resistent gegenüber einer natürlichen Infektion mit APMV-1. Ein Bericht aus Indien deutet jedoch bereits 1939 auf natürlich vorkommende subklinische APMV-1 Infektionen bei Tauben (Iyer, 1939). Im Zusammenhang mit der Gewinnung von Taubenpockenviren wurden nach experimenteller Infektion mit Gewebehomogenisaten Zeichen einer APMV-1 Infektion in Form von plötzlicher Lähmung der Flügel und Ständer sowie dünnflüssigem, weißlichen Kot beobachtet. Mit dem aus dieser erkrankten Taube gewonnenen, filtrierten Organsuspensions-Überstand konnte nach subkutaner Injektion in Hühnern und Tauben wieder das oben beschriebene Krankheitsbild reproduziert werden. Experimentelle APMV-1 Infektionen von Tauben mit einem virulenten Virusisolat aus einem ND-Seuchenzug bestätigten die Resistenz gegenüber einer per os Infektion (Kaschula et al., 1952), wiesen aber eine Virusausscheidung mit dem Kot am 12.Tg.p.i. nach. In diesen Versuchen wurde die Empfänglichkeit für eine intramuskuläre Infektion bestätigt: Die Tauben erkrankten 4 bis 5 Tage nach der Infektion und zeigten Lähmungen und eine Taube starb im weiteren Infektionsverlauf. Die Resistenz der Tauben gegenüber der natürlichen APMV-1 Infektion wurde durch Berichte einzelner, sporadischer APMV-1 Erkrankungen aus den 50er Jahren relativiert. So wurde in den USA bei Tauben, die zusammen mit ND erkrankten Hühnern gehalten worden waren, ein spontaner Erkrankungsfall beschrieben (Hanson und Sinha, 1951). Die Tiere zeigten Bein- und Flügellähmung sowie Torticollis und die Erkrankung ging mit hohen Verlusten einher. Mittels

Hämagglutinations-Hemmungs-Test (HAH) konnte eine Serokonversion festgestellt werden, der Versuch der Virusisolierung blieb jedoch erfolglos. Experimentell gelang den Autoren eine Infektion von Tauben mit einem ND-Seuchenvirus sowohl nach intravenöser, als auch per os bzw. mittels Aerosol Inokulation. In einem weiteren Bericht erkrankten Tauben nach Futteraufnahme aus APMV-1 kontaminierten Trögen. In diesem Fall gelang die Virusisolation aus dem Kot und mit diesem gewonnenen Isolat liessen sich wiederum Hühner infizieren (Kranefeld und Mansjoer, 1950).

In Deutschland liegen aus dieser Zeit keine Hinweise auf ein Vorkommen natürlicher APMV-1 Infektion bei Tauben vor und sie gelten zu dieser Zeit weiterhin als relativ resistent gegenüber einer Infektion mit APMV-1 (Schopp et al., 1955; Reuss, 1961). Der erste Krankheitsausbruch in einem deutschen Taubenbestand ist Ende 1971 dokumentiert, bei dem 7 von 18 Tieren starben (Hilbrich, 1972). Als klinische Symptome wurden gesträubtes Gefieder, Apathie, Abmagerung und Flugunfähigkeit beobachtet. Als einzige pathologisch-anatomische Veränderung wurde eine katarrhalische Enteritis beschrieben. Schon in der ersten Passage in Hühnereiern konnte ein hämagglutinierendes Agens nachgewiesen werden, dass für 2 Wochen alte Hühnerküken sowohl nach intramuskulärer als auch nach Infektion per os infektiös war. Es induzierte Symptome einer Newcastle Krankheit mit struppigem Gefieder, Hockstellung, Apathie und Dyspnoe und es kam zu Todesfällen. Pathologisch-anatomisch waren petechiale Blutungen auffällig. Der Erreger war im Serum-Neutralisations(SN)-Test durch ein APMV-1 spezifisches Hyperimmunserum neutralisierbar, reagierte mit diesem im Agargelpräzipitationstest (AGP) und im HAH. Im Gegensatz dazu liessen sich mit anderen Hyperimmunseren (Mumps, Parainfluenza, Influenza, SV5), keine hohen Hemmungstiter erreichen. Die Autoren sprechen das Isolat damit als „Newcastlevirus“ an und werten dies als Beweis, dass Tauben zwar weniger empfänglich zu sein scheinen, aber sich dennoch auf natürlichem Weg mit hoch virulenten APMV-1-Stämmen infizieren können. Ebenfalls 1971 kam es in einem Taubenbestand in Großbritannien bei 5 von 26 Tauben zu Krankheitserscheinungen mit Gleichgewichtsstörungen, Flügel- und Beinlähmungen, Kopfschiefhaltung und Danebenpicken bei der Körneraufnahme (Stewart, 1971). Aus den Gehirnen von zwei getöteten Tauben konnte APMV-1 isoliert werden und eine dieser beiden Tauben wies im HAH Antikörper gegen APMV-1 auf.

Stellte die APMV-1 Infektion der Taube bis Ende der 70er Jahre sporadische Einzelfälle dar, kam es Anfang der 80er Jahre zu seuchenhaften Ausbrüchen. Als Ursprung des Seuchengeschehens wird der mittlere Osten vermutet, wo in den späten 70er Jahren eine verlustreiche Erkrankung, die v.a. die Fleischrassen betraf, auftrat (Kaleta et al., 1985; Kaleta, 1992). Diese, zunächst als „Kontagiöse Paralyse“ bzw. „Virale Enzephalomyelitis“ bezeichnete Erkrankung, wies einen akuten Verlauf auf und war hochkontagiös (Mohammed et al., 1978; Al Falluji et al., 1979). Aus erkrankten Tieren wurden zunächst Herpesviren isoliert, spätere Untersuchungen wiesen in einem der Isolate jedoch ebenfalls Aviäres Paramyxovirus der Serogruppe 1 nach (Tantawi et al., 1979; Kaleta et al., 1985). Durch folgende Untersuchungen wurde der Erreger als Taubentyp unter den APMV-1 (pPMV-1) differenziert (Alexander et al., 1987; Collins et al., 1989; Jestin et al., 1989).

Es folgte eine rasche Ausdehnung der Seuche unter Tauben und 1983 war sie in nahezu allen europäischen Ländern zu finden. Die ersten Berichte über das seuchenhafte Auftreten der APMV-1 Erkrankung der Taube in Deutschland für Mitte Dezember 1982 betrafen einen bayerischen Rassetaubenbestand (Richter, 1983; Richter et al., 1983). Bei im gleichen Bestand gehaltenen Hühnern, Fasanen und Pfauen konnten trotz festgestellter Serokonversion keine klinischen Erkrankungen beobachtet werden. Bei diesen Tauben und auch bei folgenden Krankheitsfällen wurde Polyurie, Polydipsie und vermehrte Schreckhaftigkeit beobachtet, später dann ein- oder beidseitige Lähmungen der Ständer sowie Torticollis. Lähmungen der Flügel hingegen wurden nur selten beobachtet. Untersuchungen aus dem Jahr 1983 aus Österreich wiesen mit 139 betroffenen von 306 untersuchten Taubenbeständen einen hohen Durchseuchungsgrad nach (Schusser et al., 1984). Das Vorliegen der APMV-1 Infektion äusserte sich bei den Tauben in Torticollis, Beinschwäche und Flügellähmung. In den USA wurde 1984 zum ersten Mal der Taubentyp von APMV-1 (pPMV-1) isoliert (Pearson et al., 1987). Er verursachte schwere neurologische Verläufe mit hohen Mortalitätsraten in Tauben und minimale Morbidität in Hühnern. In der Folgezeit wurden in den USA klinisch mildere Verläufe mit geringerer Inzidenz und Schwere von neurologischen Symptomen und geringeren Mortalitätsraten verzeichnet (Tangredi, 1988). In der Zeit von 1990 bis 1991 wurde erneut von schweren Krankheitsausbrüchen mit Todesfällen in 13 verschiedenen Taubenbeständen in Kalifornien berichtet (Barton

et al., 1991). Sie äusserten sich in Form von Diarrhoe und neurologischen Symptomen wie Ataxie, Torticollis, Kopftremor und Flugunfähigkeit.

In der heutigen Zeit ist die APMV-1 Infektion der Taube weltweit verbreitet (Alexander et al., 1985; Alexander et al., 1987; Pearson et al., 1987; Vindevogel und Duchatel, 1988) und führt immer noch zu Erkrankungen und Todesfällen in Taubenbeständen.

Neben dem Taubentyp kommen aber weiterhin andere APMV-1 Typen in Tauben vor. So waren 77 von insgesamt 95 Feldisolaten aus erkrankten Taubenpatienten bzw. erkrankten Stadtauben, die in der Zeit von 1985 bis 1990 in dem Institut für Geflügelkrankheiten der LMU-München isoliert wurden, mittels monoklonaler Antikörper (mAk) dem Taubentyp zuzuordnen (Kösters et al., 1992). Allerdings wurden auch sieben APMV-1 Isolate als sogenannte lentogene (4) bzw. mesogene Stämme (3) vom Hühnertyp identifiziert und elf Isolate waren keinem bekannten mAk Bindungsmuster zuzuordnen. Auch die Charakterisierung von 55 APMV-1 Isolaten aus Tauben, die im Rahmen der Routinediagnostik in der Zeit von 1992 bis 1997 in Berlin gewonnen wurden, zeigte, dass mit 50 Isolaten der grösste Anteil von Isolaten dem Taubentyp zuzuordnen ist. Aber auch hier waren fünf der Isolate als velogenes ND-Seuchenvirus anzusprechen (Hlinak et al., 1998). Die umfangreichere Überprüfung von 171 APMV-1 Isolaten aus Tauben, die im Zeitraum von 1992 bis 1996 an das deutsche Nationale Referenzlabor für ND und Aviäre Influenza geschickt wurden, zeigt, dass es sich dabei nicht um regionale Besonderheiten handelt (Werner et al., 1999). Auch bei dieser Untersuchung wurde mit 129 Isolaten (75,5 %) der grösste Anteil der Isolate als Taubentyp APMV-1 charakterisiert. Bei 17 Isolaten (10 %) handelte es sich jedoch um velogenes ND-Seuchenvirus und 25 Isolate (14,5 %) wurden als lentogene Impfstämme typisiert.

Zusammenfassend lässt sich folgern, dass die wiederholte Isolierung von Hühner APMV-1 Seuchenviren die prinzipielle Empfänglichkeit von Tauben für alle APMV-1 Stämme verdeutlicht. Insbesondere ist bemerkenswert, dass auch lentogene Hühner Impfstämme zu klinischen Erkrankungen bei Tauben führen können (Kösters et al., 1992; Vindevogel et al., 1982). Für das momentane APMV-1 Infektionsgeschehen bei Tauben nimmt jedoch der Taubentyp eine herausragende Stellung ein.

2.2.2. Seroprävalenz der APMV-1 Infektion bei Tauben

Routinemässige Untersuchungen von Stadtauben im Zeitraum von 1985 bis 1990 in der Klinik des Instituts für Geflügelkrankheiten der LMU-München wiesen eine APMV-1 Seroprävalenz von bis zu 33,4 % nach (Kösters et al., 1992). In der gleichen Untersuchung wurde bei 29,5 % bzw. 25,5 % der untersuchten Reise- bzw. Rassetauben hämagglutinationshemmende Antikörper nachgewiesen, wobei bei den Tieren nicht sicher zwischen Impftitern und Infektionstitern unterschieden werden konnte. Spätere serologische Untersuchungen, die Seren des Zeitraumes von 1992 bis 1997 aus dem Raum Berlin-Brandenburg erfassten, wiesen mittels HAH insgesamt eine APMV-1 Seroprävalenz von 19,2 % nach (Hlinak et al., 1998). Auch bei dieser Studie zeigte sich bei den Stadtauben mit 26,2 % die höchste Prävalenz.

2.2.3 Relevanz der Tauben APMV-1 Infektion für anderes Geflügel

Neben der primären Bedeutung des seit den 80er Jahren auftretenden APMV-1 vom Taubentyp bei Tauben ist eine Gefährdung für Hühner und anderes Wirtschaftsgeflügel durch diesen APMV-1 Typ nicht auszuschliessen. Die Empfänglichkeit von Hühnern und Puten gegenüber dem Taubentyp APMV-1 wiesen frühere experimentelle Infektionen nach, bei denen es nach Inokulation mittels unterschiedlicher Infektionswege einschließlich Kontaktinfektion zu klinischen Krankheitssymptomen bzw. pathohistologischen Veränderungen der Newcastle Krankheit kam (Schusser et al., 1984).

Zu einer Feld-Übertragung kam es in Großbritannien im Jahr 1984 (Alexander et al., 1985). Ausgehend von an APMV-1 erkrankten Wildtauben kam es durch Kot und Kadaver zu einer Kontamination von Futter in Lagerhallen in Liverpool, die zu über 23 Ausbrüchen von Newcastle Disease bei wirtschaftlich genutzten Hühnern führte. Der Erreger wurde mittels monoklonaler Antikörper als Taubentyp APMV-1 (pPMV-1) charakterisiert, welches auch für die neurotropischen Erkrankungen bei Tauben während der Jahre 1983 und 1984 verantwortlich war. Bei Maßnahmen zur Seucheneindämmung wurden über 800.000 Hühner getötet und es entstanden Kosten

von über 3,4 Millionen US \$ (Seal et al., 2000). Ausbrüche der ND in Irland und Großbritannien 1991 und 1992 wurden ebenfalls durch ein Taubentyp APMV-1 verursacht (Werner, 1995).

Untersuchungen von 371 APMV-1 Isolaten der Jahre 1992 bis 1996 bestätigten das Vorkommen von Infektionen von Hühnern mit dem Taubentyp APMV-1 in Deutschland (Werner et al., 1999). So waren neun Isolate von Hühnern und je ein Isolat aus einem Fasan und einer Ente dem Taubentyp zuzuordnen. In den ursprünglich betroffenen Beständen wurden Krankheitssymptome, wie Kümern betroffener Tiere bzw. auch Todesfälle beobachtet, was das Gefährdungspotential des APMV-1 Taubentyp für Geflügel unterstreicht.

Experimentelle Infektionen mit acht Isolaten belegen eine unterschiedliche klinische Ausprägung der Taubentyp APMV-1 Infektion in Tauben, Hühnern und Puten. In diesen Spezies führten jeweils verschiedene Isolate zu besonders starken klinischen Erscheinungen mit Todesfällen bzw. erschienen als weniger pathogen (Kaleta, 1992). Desweiteren zeigten Isolate aus Tauben nach Passagierung in Hühnern eine Pathogenitätssteigerung für Hühner (Alexander et al., 1984; Alexander et al., 1986). Die gleiche Einschätzung ergaben auch Untersuchungen zur Pathogenität von insgesamt sechs APMV-1 Isolaten aus Tauben (Kommers et al., 2001). Bei vier Isolaten handelte es sich um den Taubentyp APMV-1 und bei zwei Isolaten um velogenes ND-Seuchenvirus. Nach bis zu viermaliger Passage in Hühnern zeigten die Taubentyp APMV-1 Isolate gemessen an den Virulenzparametern MDT, ICPI und IVPI deutliche Pathogenitätssteigerungen. Dabei ließen sich die Taubentyp APMV-1 Isolate nicht einwandfrei in das klassische APMV-1 Schema von MDT, ICPI und IVPI, das sich auf Stämme vom Hühnertyp bezieht, einordnen, so dass beispielsweise das Isolat pigeon /U.S./44407/84 nach der MDT als lentogen, nach dem ICPI allerdings als mesogen einzustufen gewesen wäre. Nach Meinung der Autoren zeigen APMV-1 Isolate, die aus anderen Vögeln als Hühnern stammen, ihre „wahre“ Pathogenität für das Huhn in den herkömmlichen Pathogenitätsprüfungen erst nach mehrmaliger Passagierung in diesen Tieren.

In Bezug auf das Wirtschaftsgeflügel kommt Tauben somit in zweifacher Hinsicht eine Rolle bei der Bekämpfung der atypischen Geflügelpest zu. Sie sind zum einen

prinzipiell empfänglich für die in Hühnern vorherrschenden APMV-1 Seuchenviren, zum anderen können primär in der Taubenpopulation vorkommende Tauben APMV-1 Typen zu seuchenhaften Ausbrüchen bei Hühnern führen.

2.3. Die APMV-1 Infektion (Paramyxovirose) bei Tauben

Die sogenannte Paramyxovirose der Taube ist eine durch den Taubentyp von APMV-1 (pPMV-1) hervorgerufene Erkrankung der Brief-, Rasse-, Stadt- und Wildtauben (Columbiformes). Neben dem Pathotyp des Erregers, haben auch andere Faktoren Einfluss auf den Krankheitsverlauf. Von entscheidener Bedeutung sind unter anderem Menge und Weg der Erregeraufnahme sowie allgemeine Konstitution, und evtl. Belastungen mit anderen Infektionen. Krankheitsfälle wurden sowohl bei Nestlingen als auch bei mehrjährigen Alttauben festgestellt und somit muss davon ausgegangen werden, dass eine natürliche Altersresistenz nicht besteht (Kaleta et al., 1984).

2.3.1. Das klinische Bild der APMV-1 Infektion bei der Taube

Bei der klinisch apparenten APMV-1 Infektion hat neben einer Allgemeinerkrankung die neuronale Form bei Tauben eine besondere Bedeutung. Desweiteren ist eine klinisch inapparente Form bekannt.

Klinisch apparente Form:

Die klinische Allgemeinerkrankung ist primär durch unspezifische Anfangssymptome gekennzeichnet. Betroffene Tiere fallen zunächst durch Apathie, verminderte Futteraufnahme, erhöhte Wasseraufnahme und erhöhte Schreckhaftigkeit auf. Treten im Zusammenhang mit den ersten Symptomen bereits Störungen der Koordination von Bewegungsabläufen auf oder feinschlägiger Tremor von Kopf oder Flügeln auf, so sind auch diese Symptome relativ unspezifisch, können jedoch schon erste Hinweise auf die Art der Erkrankung liefern.

Im folgenden zeigen erkrankte Tauben 5 bis 17 Tage nach der Infektion Polyurie, bei der geformte Kotanteile von grösseren „Wasserlachen“ umgeben sind.

Bei der neuronalen Form treten nervale Krankheitsanzeichen häufig auch ohne vorherige Symptome einer Allgemeinerkrankung auf, wobei einerseits Torticollis, Opisthotonus, Kopfzittern und Taumelbewegungen des Kopfes, andererseits motorische Ausfallserscheinungen der Flügel (Vindevogel und Duchatel, 1988) und seltener der Ständer auftreten. Die neuronale Form bleibt überwiegend subletal und Todesfälle treten hauptsächlich bedingt durch die Unfähigkeit zur Trinkwasser- bzw. Futteraufnahme auf (Kaleta, 1992). Bei Tauben, die nervale Symptome zeigen, wird mitunter eine meist einseitige Konjunktivitis beobachtet.

Seltener treten im Zusammenhang mit der APMV-1 Infektion Mauserstörungen bei Jung- und Alttauben auf, desweiteren werden erhöhte Embryomortalität und schlechte Schlupfergebnisse beobachtet. Latente Infektionen, wie z.B. eine Infektion mit *Chlamydia psittaci*, können durch eine APMV-1-Infektion aktiviert werden (Schmeer et al., 1984)

Klinisch inapparente Form:

Die klinisch inapparente Form ist gekennzeichnet durch das Fehlen klinischer Anzeichen der Erkrankung. Es sind aber APMV-1 spezifische Antikörper im Blut nachweisbar und die Tiere scheiden das Virus mit dem Kot aus. Somit sind diese Tiere, als unbemerkte Träger der Infektion, bedeutsam für die Erregerausbreitung, vor allem im Zusammenhang mit Ausstellungen und Wettflügen.

Zu der möglichen Genesung erkrankter Tauben finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben. Neben der häufigen Einschätzung, dass nur Tiere mit Polyurie oder leichten nervalen Symptomen, nicht aber solche mit Lähmungserscheinungen wieder klinisch ausheilen und auch gesunde Gelege produzieren können, gibt es Beobachtungen, dass auch klinisch schwere Erkrankungsfälle wieder gesunden können. Von der Genesung Paralyse betroffener Tiere bei geringgradiger Ausprägung berichten Pearson et al. (1987). Eine solche Erfahrung bei Tauben mit hochgradigen Störungen, die eine Besserung und klinische Ausheilung nach 2-4 Wochen zeigten, beschreiben auch Richter et al. (1983). Desweiteren gibt es Beobachtungen einer Alterabhängigkeit der klinischen Ausheilung, bei der nur ältere Tiere unter Umständen nach 3 bis 4 Wochen wieder völlig gesunden

(Gerlach, 1994). Insgesamt scheint ein gewisser Prozentsatz auch Paralyse betroffener Tiere wieder klinische Besserung der Symptomatik aufweisen zu können (Tudor, 1991), jedoch werden diese Tiere von den Taubenhaltern häufig vorzeitig aussortiert, bzw. erfahren nicht die notwendige Betreuung.

2.3.2. Systemische Erregerausbreitung und –ausscheidung bei der APMV-1 Infektion der Taube

Die Virusausscheidung erfolgt mit dem Kot und ist nur während begrenzter Krankheitsphasen mittels Virussolierung nachweisbar (Schusser et al., 1985; Fischer, 1986). Ähnlich verhält es sich beim Virusnachweis aus Organen, der aus den parenchymatösen Organen, ZNS, Darm / Kloakeninhalt und gereinigten peripheren Leukozyten möglich ist (Warrlich, 1988). Wie experimentelle Infektionsversuche in Tauben mit einem Taubentyp APMV-1 ergaben, gelingt die Virusisolierung aus Organen nur für einen begrenzten Zeitraum beginnend mit der Virämiephase. Bereits ab dem 1. Tag nach der Infektion ist in peripheren Leukozyten sowie in Lunge, Milz und Leber die Virämie mittels Virusisolation nachweisbar. Ab dem 2. Tag ist Virus aus dem Gehirn isolierbar und die Virusisolierung gelingt am häufigsten bzw. auch über den längsten Zeitraum im Kot und in den Nieren (3.-13. Tag nach der Infektion). Umfangreiche Untersuchungen an 400 natürlich APMV-1 infizierten Tauben sowie an mehreren Gruppen experimentell mit einem Taubentyp APMV-1 infizierter Tauben bestätigten ebenfalls den zeitlich begrenzten Virusnachweis aus Kot und Organen (Meister, 1987). Nach intramuskulärer Infektion wurde eine Virusausscheidung mit dem Kot vom 3. bis zum 11. Tag ermittelt. Ebenso war ein regelmäßiger Virusnachweis aus Organen nur in diesem Zeitraum möglich. Die Häufigkeit eines Virusnachweises nahm dabei bereits ab dem 4. Tag bis zum 9. Tag nach der Infektion ab und gelang im weiteren bis zum 11. Tag nur noch vereinzelt. Ab dem 16. Tag nach der Infektion war die APMV-1 Infektion auch klinisch erkrankter Tauben nur noch mittels serologischem Antikörpernachweis diagnostizierbar. In einem anderen Impf- und Infektionsversuch mit einem Taubentyp APMV-1 gelang nach intramuskulärer Infektion der Virusnachweis aus Organen sowohl bei erkrankten als auch bei klinisch unauffälligen Tauben bis zum

15. Tag (Polten, 1986). Dabei zeigten 4 von 30 Tauben erst 16 bis 21 Tage nach der Infektion die ersten Krankheitssymptome der APMV-1 Infektion. Diese Befunde erklären geringe Virusisolationsraten bei natürlich APMV-1 erkrankten Tauben bei denen typische Krankheitsanzeichen wie Polyurie, Torticollis, Opisthotonus, Koordinationsstörungen, Lähmungen auftreten und die einen positiven Antikörpertiter aufweisen. Bei entsprechenden Untersuchungen an 131 spontan an APMV-1 erkrankten Tauben konnte auch bei klinisch ausgeprägter Symptomatik nur bei 35 % Virus aus dem Kot bzw. den Organen isoliert werden (Fischer, 1986). Die Überlegung, dass zum Zeitpunkt des Einsetzens und der Manifestation der Erkrankung nur sehr geringe Virusmengen vorliegen, wird durch Untersuchungen mittels RT (Reverse Transkriptase)-nested PCR bestätigt (Barbezange und Jestin, 2002). In der frühen Infektionsphase (2.-7. Tag) nach experimenteller oculo-nasaler Inokulation von Tauben mit einem Taubentyp APMV-1 zeigten die Virusisolation mittels embryonierten Hühnereiern und die RT-nested PCR noch vergleichbare Virusnachweisraten. In der mittleren Infektionsphase (10.-17.Tag) wurden mit der RT-nested PCR schon leicht höhere und in der späten Phase (21.-31.Tag) deutlich höhere positive Virusnachweisraten erzielt. In der späten Infektionsphase gelang der Virusnachweis in der PCR zu 66 % gegenüber 11,8 % mittels Virusisolation.

Versuche, eine mögliche persistierende, latente APMV-1 Infektion von Tauben 107 Tage nach experimenteller Infektion durch mehrmalige intraperitoneale Cyclophosphamid-Injektionen zu reaktivieren, schlugen fehl. Es konnte nach dieser Behandlung weder Virus aus dem Kot isoliert werden, noch klinische Symptome der APMV-1 Infektion induziert werden (Meister, 1987).

2.3.3. Pathologisch-anatomisches und histopathologisches Bild der APMV-1 Infektion der Taube

Die pathologisch-anatomischen Veränderungen selbst bei ausgeprägter klinischer Symptomatik einer APMV-1 Infektion von Tauben können als geringgradig ausgeprägt bzw. unspezifisch zusammengefasst werden (Fischer, 1986; Kaleta et al., 1984; Richter et al., 1983; Schusser et al., 1984; Barton et al., 1991; Kuchler, 1997; Vindevogel und Duchatel, 1988). Neben einer Schwellung der Nieren und der Milz, die bei einigen Tauben beobachtet wurde (Fischer, 1986; Kaleta et al., 1984), werden eine geringgradige katharrhalische Enteritis, eine Schwellung des Gehirns mit petechialen Blutungen in der Schädelkalotte (Richter et al., 1983), Hämorrhagien und Blutstauung unterschiedlicher Organe (Kuchler, 1997) sowie eine Vergrößerung des Pankreas (Schusser et al., 1984) beschrieben.

Ähnlich stellen sich die Angaben in der Literatur zu den histopathologischen Befunden an den parenchymatösen Organen dar. Im Vordergrund steht dabei eine nicht-eitrige, interstitielle Nephritis (Kuchler, 1997). Desweiteren werden mononukleäre interstitielle Infiltrate in Leber, Pankreas und Lunge im Zusammenhang mit der APMV-1 Infektion beschrieben (Richter et al., 1983; Schusser et al., 1984; Fischer 1986). Demgegenüber finden sich histologisch deutliche Veränderungen am Zentralen Nervensystem im Sinne einer nicht-eitrigen Panenzephalitis, bzw. nicht-eitrigen Enzephalomyelitis. Beschrieben sind ausgeprägte mononukleäre Infiltrate, die vaskulär und perivaskulär sowie im Neuropil auftreten, eine spongiöse Auflockerung des Neuropils (Fischer et al., 1986), sowie Gliazellproliferationen (Schusser et al., 1994; Barton et al., 1991). Dabei sind im Gehirn v.a. Groß- und Zwischenhirn, Lobus opticus und Medulla oblongata betroffen und nur selten das Kleinhirn. Im Rückenmark finden sich Veränderungen insbesondere in den Ventralhörnern der Intumescencia cervicalis und lumbalis. Nur selten wird von einer Beteiligung der Meningen an pathologischen Prozessen berichtet (Barton et al., 1991). Auch Schusser et al. (1994) beschreiben das Vorliegen einer Panmyelitis, wobei die Veränderungen verstärkt in der grauen Substanz zu finden waren und die weisse Substanz nur milde Gliaknötchen und vaskuläre Infiltrate aufwies. Bei einem Teil der untersuchten Tauben beobachteten die Autoren zudem herdförmige, rundzellige Infiltrate in peripheren Nerven. Einen scholligen Zerfall der Axone und Markscheiden der peripheren Nerven konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Fischer et al., 1986). Auch Veränderungen im Sinne einer Ganglionitis und Radikulitis mit mononukleären

Infiltraten in den Spinalganglien (Fischer, 1986) und Ganglienzelldegenerationen (Schusser et al., 1994) werden beschrieben.

2.3.4. Die Schutzimpfung gegen die APMV-1 Infektion bei Tauben

Mit dem seuchenhaften Auftreten seit dem Jahr 1984 werden Tauben gegen APMV-1 geimpft. Amtlich zugelassen waren inaktivierte Impfstoffe sowie einige Lebendimpfstoffe in Form von Adsorbatvakzinen mit abgeschwächten Erregern. Bereits damals wurden für Tauben hauptsächlich inaktivierte Impfstoffe verwendet (Fritzsche, 1986; Götz, 1999). Lebendimpfstoffe wurden als sogenannte Notimpfungen akut gefährdeter Tauben verwendet. Mitunter eingesetzte Trinkwasservakzine erwiesen sich für Tauben als ungeeignet. Zunächst standen für die Impfung der Taube nur heterologe Impfstoffe auf der Basis von Hühnertyp APMV-1 Stämmen zur Verfügung. Dabei sind Impfstoffe aus den Stämmen Hitchner B₁ und LaSota für Impfungen von Hühnern und Puten am weitesten verbreitet (Alexander et al., 2001). Seit 1986 finden bei Tauben auch homologe Impfstämme auf der Grundlage des Taubentyp APMV-1 Stammes Verwendung (Polten, 1986; Küchler, 1997).

Nach der Geflügelpest-Verordnung müssen Impfstoffe gegen die Newcastle-Krankheit den, in der Entscheidung 93/152/EWG der Europäischen Kommission festgelegten Kriterien entsprechen. Hier wird vor allem ein nicht zu überschreitender Wert für den ICPI eines Virusstammes, aus dem eine Vakzine hergestellt wird, das sogenannte Originalsaatvirus, festgelegt. Für inaktivierte Vakzine, wie sie für die Impfung von Tauben heute ausschliesslich verwendet werden, muss der ICPI des Originalsaatvirus unter 0,7 bei Verabreichung einer Dosis von nicht weniger als 10^8 EID₅₀ an jeden Vogel liegen. Durch diese Regelung, die zunächst nur für heterologe Impfstoffe aus Hühnertyp APMV-1 Stämmen zutraf, verlor der homologe Öl-Emulsionsimpfstoff Nobilis® Paramyxo der Fa. Intervet (Boxmeer) auf Grundlage des Stammes P₃G als Originalsaatvirus seine Zulassung für die Impfung von Tauben. Ein neuer homologer Tauben-Impfstoff P201 der Fa. Intervet entsprach den Anforderungen an den einzuhaltenden ICPI und der Antrag auf Zulassung erforderte eine Impfstoffprüfung.

Zum heutigen Zeitpunkt ist er der einzige zugelassene homologe APMV-1 Impfstoff für Tauben.

Nach der Geflügelpest-Verordnung besteht zwar für alle Hühner und Truthühnerbestände unabhängig von der Bestandsgröße eine Impfpflicht gegen die Newcastle Krankheit, diese gilt aber nicht für Tauben. Allerdings beziehen die Bestimmungen des Anhangs III der Richtlinie 92/66/EWG des Rates vom 14. Juli 1992 über Gemeinschaftsmaßnahmen zur Bekämpfung der Newcastle-Krankheit Brieftauben mit ein. Nach Artikel 17 müssen die Mitgliedsstaaten die Kommission und die anderen Mitgliedsstaaten über freiwillige oder obligatorische Impfungen gegen die Newcastle-Krankheit informieren, das gilt auch für eventuelle Impfprogramme bei Brieftauben. Ungeachtet dessen müssen die Mitgliedsstaaten dafür sorgen, dass Veranstalter von Wettbewerben und Ausstellungen ihrerseits die notwendigen Maßnahmen treffen, damit nur geimpfte Brieftauben an solchen Veranstaltungen teilnehmen. Die Reiseordnung des Verbandes Deutscher Brieftaubenzüchter e.V. vom 13. Januar 1989 geht noch etwas weiter und schreibt für Tauben, die an Vor- und Preisflügen teilnehmen wollen, vor, dass nicht nur die betreffenden Tauben, sondern der gesamte Bestand ausreichend APMV-1 immunisiert sein muss. Dagegen werden in Rassetaubenbeständen einmal jährlich 4-6 Wochen vor Beginn der Ausstellungen in der Regel nur diejenigen Tiere geimpft, die an den Veranstaltungen teilnehmen sollen.

Der Erfolg einer Impfung wird häufig anhand der Antikörperbildung überprüft. Als systemische Immunantwort auf eine Infektion bzw. Impfung kommt es zu einer Bildung von Immunglobulinen der Klasse G (IgG) und damit zu einer messbaren Serokonversion. Hämagglutinationshemmende und neutralisierende Antikörper können im Serum ab dem 6. Tag nach der Infektion nachgewiesen werden (Meister, 1987). Ein Schutz gegenüber einer experimentellen Belastungsinfektion geimpfter Tauben besteht aber auch bei solchen Tieren, die nach Impfung keinen messbaren Antikörper-Titer entwickeln (Küchler, 1997). Darüberhinaus konnte eine Schutzwirkung der Impfung für das Huhn sogar bei B-Zell-defizienten Tieren, denen die humorale Immunantwort fehlt, nachgewiesen werden (Marino et al., 1987; Lam et al., 1987). Neben der humoralen Immunität spielt nach neueren Untersuchungen beim Huhn auch die zelluläre Immunität eine noch nicht genauer definierte Rolle bei der Immunabwehr der APMV-1 Infektion.

So steigt z.B. die Anzahl CD8⁺ T-Zellen zu einem späten Zeitpunkt nach einer APMV-1 Impfung in Hühnern (Russell et al., 1997) und Makrophagen von Hühnern produzieren nach Stimulation durch APMV-1 ChIFN1 und 2, die dem IFN α bzw. IFN γ der Säugetiere entsprechen (Sick et al., 1998). Neben der systemischen Immunabwehr spielen auch lokale Abwehrmechanismen eine entscheidende Rolle. Bei Impfungen mit Lebendvakzinen mittels Aerosol, Trinkwasser oder über das Futter werden lokale Immunmechanismen des Atmungs- und Digestionstraktes, wie z.B. die Produktion lokaler Antikörper (IgA), ausgenutzt (Beard und Easterday, 1967). Dem Nachweis der Produktion von Immunglobulinen der Klasse A kann somit im Zusammenhang mit lokal applizierten Lebendimpfstoffen beim Huhn eine Bedeutung zukommen, nicht aber bei der Verwendung von parenteral verabreichten inaktivierten Impfstoffen bei der Taube. Insgesamt stellen überprüfbare Parameter der humoralen oder auch zellulären Immunabwehr keine aussagekräftigen Messpunkte für eine Schutzwirkung einer erfolgten Impfung dar. Das Europäische Arzneibuch (Pharmeuropa, 1995) schreibt für die Überprüfung der Wirksamkeit eines Newcastle Disease oder Paramyxovirus Impfstoffes (Impfstoffprüfung) lediglich folgende zwei Punkte vor:

1. Serologischer Antikörper-Nachweis:

Die sogenannten „Nullseren“, die zu Beginn der Untersuchung genommen werden, dürfen keine Antikörper gegen APMV-1 aufweisen.

2. Klinische Anzeichen einer APMV-1 Erkrankung:

Mindestens 90 % der als Kontrolltiere dienenden ungeimpften Tauben müssen infolge der Belastungsinfektion klinische Krankheitsanzeichen einer APMV-1 Infektion zeigen und maximal 10 % der geimpften Tiere dürfen klinische Krankheitsanzeichen zeigen.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Virusstämme

Impfstamm P201:

pPMV-Vakzine Nobilis® Paramyxo P201, Fa. Intervet

Batch: 79337, 20-09-1999

Formaldehyd-inaktivierter Ölemulsionsimpfstoff

Challenge-Virus:

pPMV Feldvirusisolat R72/95 von einer Taube mit einem ICPI von 1.15, von der Fa. Intervet in Form von virushaltiger AAF zur Verfügung gestellt, Batch: PMP-99-12-013. Durch mehrmalige Titration auf SPF-Eiern wurde ein mittlerer Titer von $10^{8,5}$ ELD₅₀/ml ermittelt.

3.1.2. Substanzen für die Virusisolierung

PenicillinG:

PenicillinG (Benzylpenicillin) Sodium Salt (Fa. Sigma)

1667 units penicillin-G base/mg

Streptomycin:

Streptomycin sulfate (Fa. Sigma)

761 units/mg

Gentamicin:

10 mg/ml (seromed® Biochrom KG, Berlin, Germany)

Antibiotika-Stammlösung:

5g PenicillinG (entspricht 100.000 U/ml)
3g Streptomycin (entspricht 100 mg/ml)
12,5ml Gentamycin (entspricht 2,5 mg/ml)

ad 50 ml PBS

(laut Arbeitsanleitung zur Labordiagnostik von anzeigepflichtigen Tierseuchen)

PBS

8,0 g NaCl Natriumchlorid reinst (Fa.Merck)
0,2 g KCl Kaliumchlorid (Fa.Roth)
1,15 g Na₂HPO₄ wasserfrei Natrium Phosphate, Dibasic, Anhydrous, A.C.S.
(SIGMA, St.Louis, USA)
0,2 g KH₂PO₄ Kaliumdihydrogenphosphat zur Analyse, ISO
(Fa.Merck)

ad 1000 ml H₂O (Aqua bidest)

pH 7,4 , autoklaviert und bei 4 °C gelagert

3.1.3. Substanzen für die histologische Untersuchung

Formalin (3,7 %) :

Formaldehydlösung mind.37 % (pro analysis) stabilisiert mit etwa 10 % Methanol (Fa. Merck)

10 %tig verdünnt in PBS

Aceton:

Aceton pro analysis (Fa.Merck)

Hämatoxylin:

Mayers Hämalaunlösung (Fa. Merck), gefiltert

Eosin:

Eosin Y Aqueous 0,5 % (Fa. Shandon)

für den Gebrauch auf 50 ml mit 1 Tropfen Essigsäure versetzt

HCl-Alkohol:

HCl 1 mol/l (Fa. Merck)

für den Gebrauch als 0,11 %HCl-Lösung in 70 %igem Alkohol

HistoClear:

verwendet als Xylol-Ersatz (Fa. Shandon)

3.1.4. Substanzen für die Immunfärbung

Tris-HCl-Puffer (0,05M Tris/HCl,0,15M NaCl):

Tris-HCl 13,41 g Trisaminomethanhydrochlorid (Fa. Sigma)

TrisBase 1,85 g Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Fa. Fluka)

NaCl 17,53 g Natriumchlorid reinst (Fa. Merck)

ad ca. 1,9 Liter H₂O (Aqua bidest)

pH-Wert (7,4 bzw. 6,0) einstellen und dann ad 2 Liter H₂O (Aqua bidest) auffüllen

TrisHCl (pH 8,2):

0,1 M Lösung Tris-HCl (Trisaminomethanhydrochlorid, Fa. Sigma) in H₂O (Aqua bidest) herstellen und auf pH-Wert 8,2 einstellen

polyklonales APMV-1-spezifisches Kaninchenhyperimmunserum:

α -ND-Hase (grau) vom 28.1.99

Das Serum wurde durch Immunisierung eines Kaninchens gewonnen und die Spezifität mittels Western Blot überprüft (Grund, 2003)

ABC-Nachweissystem:

Vectastain® ABC-AP Kit (Fa. Linaris, Cat.-No. AK-5001)

ABC (Avidin:Biotinylated enzyme Complex), AP (Alkalische Phosphatase)

2%igem Ziegen Serum-Blockpuffer:

4500 µl TrisHCl-Puffer (pH 7,4) + 90 µl goat normal serum (aus AK 5001)

2. Antikörper Kaninchen-spezifisches (α -rabbit) IgG:

3000 µl TrisHCl/NaCl pH 7,4 + 15 µl α -rabbit IgG (aus AK 5001)

AP-Reagent:

3000 µl TrisHCl/NaCl pH 7,4 + 30 µl Substanz A (Avidin DH) + 30 µl Substanz B (biotinylated alkaline phosphatase H)

Färbesubstrat:

Vectastain® Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I (Fa. Linaris, Cat.No. SK-5100)
jeweils 2 Tropfen der 3 Substanzen in 5 ml TrisHCl-Puffer (pH 8,2) vermischt
+ 1 Tropfen Levamisol

Mayer's Hämatoxylin nach Eigenherstellung:

0,5 g Hämatoxylin Hämatoxylin krist. (Fa. Merck)

in 500 ml H₂O (Aqua dest.) auflösen

100 mg Natriumjodat Natriumjodat pro analysis (Fa. Merck)

25 g Kalialaun Kaliumaluminiumsulfat-12-hydrat, reinst
(Fa. Riedel-de Haën)

in der Hämatoxylinlösung unter Schütteln lösen

25 g Chloralhydrat Chloralhydrat (Fa. Merck)

0,5 g Zitronensäure Citronensäure-Monohydrat pro analysis (Fa. Merck)

zugeben

CAM/AAF/HE (= CAH):

CAM und AAF von 15-tägig bebrüteten, embryonierten SPF-Hühnereiern wurde unter sterilen Bedingungen entnommen und zu gleichen Volumenanteilen mit Seesand gemörsert und abzentrifugiert (bei 1000 rpm für 10 Minuten, Zentrifuge Beckman J6-HC, Rotor TY JS 42, 291,2 g), dann 4,5 ml Überstand mit 0,5 ml Hühnererythrozyten (10 %ige Gebrauchssuspension in PBS) zusammengeben.

3.1.5. Versuchstiere

Bei den Tauben handelte es sich um Brieftauben (*Columba livia* var. *domestica*) aus dem Bestand von Herrn Prof. Grund, Berlin. Die Tiere waren bei Versuchbeginn 5-6 Wochen alt. Bei der Einstellung wurde der Gesundheitszustand aller Versuchstauben klinisch überprüft. Die Tauben wurden in Gruppen eingeteilt und zur Unterscheidung mit farbigen und beschrifteten Plastikringen am Ständer markiert. Zu diesem Zweck erhielt jede Taube eine Nummer, die sich aus einem gruppenspezifischen Buchstaben und einer fortlaufenden Nummer zusammensetzt. Vor der Vakzinierung als jeweiliger Versuchsbeginn wurde bei den jeweiligen Gruppen von allen Tieren eine Blutprobe genommen, um das sogenannte Nullserum im HAH auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen APMV-1 hin zu untersuchen.

3.2. Methoden

3.2.1. Haltung der Tauben

Die Tauben wurden während des gesamten Untersuchungszeitraumes unter konstanten Bedingungen in einem Isolationsstall mit Unterdruck-Belüftung und gefilterter Abluft in mehreren Stallräumen gehalten. Sowohl dem Isolationsstall insgesamt, als auch den einzelnen Stallräumen war jeweils ein Schleusenraum vorgeschaltet. Für die Durchführung der künstlichen Infektion (Challenge) wurden die

betroffenen Gruppen von den anderen Tauben separiert. Der Betonboden wurde täglich durch Abkratzen der Kotverunreinigungen gesäubert, zusätzlich wurde der Stall einschließlich der Wände einmal wöchentlich nass gereinigt, um eine Staubbelastung der Tiere zu vermeiden. Den Tauben wurde einmal die Woche die Gelegenheit zum Baden gegeben. Die Fütterung erfolgte ad libitum mit kommerziellem pelletiertem Futter (all-mash R, Fa. Deuka) und die Wasserversorgung wurde über Stülptränken gewährleistet. Die Wasser- und Futtermittelversorgung, sowie das Stallklima wurden täglich kontrolliert. Ebenso wurde der Gesundheitszustand der Tiere täglich überprüft. In regelmäßigen Abständen wurden Sammelkotproben bakteriologisch auf pathogene Keime untersucht, insbesondere bezüglich einer Belastung mit Salmonellen. Ausfälle aufgrund von spontanen Todesfällen wurden einer Sektion zur pathologisch-anatomischen Beurteilung mit anschließender bakteriologischer Untersuchung von Herz und Leber unterzogen.

3.2.2. Versuchsbeschreibung

In Zusammenarbeit mit der Fa. Intervet wurden zur Überprüfung des Impfschutzes einer Taubentyp APMV-1 Vakzine in Tauben Impf- und Infektionsversuche durchgeführt. Bei den durchgeführten Impfversuchen mit anschließender künstlicher Infektion von geimpften Tieren und ungeimpften Kontrolltieren handelt es sich um eine „Prüfung einer Paramyxovirus-1 Vakzine für Tauben gemäß Europäischem Arzneibuch (PA/PH/Exp.3T(97)236DEF)“.

Diese Prüfung und auch die weiteren im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Impfversuche an Tauben bedurften gemäß § 8 des Tierschutzgesetzes keiner Genehmigung durch die zuständige Behörde, sondern mussten dieser, gemäß § 8a des Tierschutzgesetzes, lediglich spätestens zwei Wochen vor Beginn angezeigt werden. Die Tauben wurden nach einer Eingewöhnungsphase an ihre neue Umgebung gruppenweise laut Herstellerangaben subkutan mit dem homologen Impfstoff Nobilis® Paramyxo P201 der Fa. Intervet vakziniert. Im ersten Monat nach der Vakzinierung wurden wöchentlich, anschliessend dann monatlich Blutproben für die serologische Antikörper-Bestimmung entnommen. Die erste Gruppe (Kennzeichnung: Gruppe D -

ungeimpfte Tauben / Gruppe C - geimpfte Tauben) wurde 3 Monate nach der Vakzinierung experimentell mit dem Challenge-Virus mit einer $ELD_{50} 3,16 \times 10^5$ intramuskulär infiziert. Diese erste Gruppe wird im Weiteren zum einfacheren Verständnis Gruppe A genannt.

Nach der künstlichen Infektion wurden die Tauben für einen Zeitraum von 21 Tagen beobachtet, klinisch überwacht und neben den wöchentlichen Blutproben, nun auch wöchentlich Kloakentupfer für eine Virusisolierung genommen. Am Ende des Beobachtungszeitraumes erfolgte die Sektion mit pathologisch-anatomischer Beurteilung und Probenentnahme für die histologischen Untersuchungen. Die weiteren Gruppen wurden entsprechend nach 6 (Gruppe F/G), 9 (Gruppe D/C) und 12 Monaten (Gruppe F/E) der experimentellen Infektion, dem sogenannten Challenge unterzogen (Tab. 1). Zum einfacheren Verständnis werden diese Gruppen entsprechend der zeitlichen Abfolge Gruppe B, C und D genannt (künstliche Infektion 6, 9 bzw. 12 Monate nach der Impfung).

Tab. 1: Gruppenkennzeichnung der Tauben

Gruppe	A	B	C	D
Zeitpunkt ¹	3	6	9	12
Ungeimpft	D	F	D	F
Geimpft	C	G	C	E

¹ Zeitpunkt der Belastungsinfektion in Monaten nach der Impfung

Mit den Tauben der letzten Gruppe wurden abschliessend insgesamt sieben Negativ-Kontrolltiere seziert, die während des gesamten Versuchzeitraumes unter gleichen Bedingungen gehalten, aber weder geimpft noch infiziert wurden. Diese sieben Negativkontrolltiere finden ihre Erwähnung zwar im Zusammenhang mit der Gruppe D, sind jedoch als absolute Negativ-Kontrolle für den gesamten Versuch zu betrachten.

3.2.3. Klinischer Pathogenitätsindex

Um die klinische Ausprägung der APMV-1 Erkrankung für die verschiedenen Gruppen vergleichen zu können, wurde der klinische Pathogenitätstest (KPI) berechnet (Polten, 1986). Dabei ergibt sich der Index innerhalb einer Untersuchungsgruppe wie folgt:

$$\text{KPI} = \frac{(K_1 + K_2 + K_3 + K_n) + 2 * (T_1 + T_2 + T_3 + T_n)}{N * D}$$

K_n = Dauer der klinischen Erkrankung (Tage) der Taube_n im Beobachtungszeitraum

T_n = Dauer zwischen Tod der Taube_n und Ende des Beobachtungszeitraumes

N = Anzahl der Tiere in der Untersuchungsgruppe

D = Dauer des Beobachtungszeitraumes

Der so errechnete Index ist ein Wert ohne Einheit. Der Index-Wert 0 bedeutet die Gesundheit aller Tiere an jedem Tag des Beobachtungszeitraumes, der Index-Wert 2 bedeutet den Tod aller Tiere am ersten Tag nach der Infektion. Ein Wert zwischen 0 und 2 gibt somit die relative Häufigkeit des Auftretens von sichtbaren Erkrankungen bzw. Todesfällen je Beobachtungstag an. Treten keine Todesfälle auf, so sind bei einem Wert von 0,25 jeden Tag im Beobachtungszeitraum durchschnittlich 25 % der Tiere klinisch erkrankt.

Um bei dieser vergleichenden Betrachtung der Verfälschung durch die vorzeitige Sektion schwer erkrankter Tauben und damit deren Wegfall in der Bewertung Rechnung zu tragen, wurden für die Berechnung des Index diese getöteten Tauben weiterhin unter der Vorgabe einer nicht zu erwartenden klinischen Besserung als erkrankte Tauben mit dem Faktor 1 gewertet.

3.2.4. Probenentnahme für den Virusnachweis

Zur Kontrolle der Virusausscheidung wurden nach der Infektion während des Beobachtungszeitraums von 21 Tagen im wöchentlichen Abstand in den jeweiligen

Gruppen von jeder Taube Kloakentupfer genommen, d.h. 7, 14 und 21 Tg.p.ch. sowohl bei den ungeimpften als auch bei den Kontrolltauben. In der Gruppe D wurden bei den ungeimpften Tauben zusätzliche Kloakentupfer am 4. und 11.Tg.p.ch. genommen, um ein differenzierteres Bild von der Virusausscheidung zu erhalten. Es wurden sterile Tupfer verwendet, die nach erfolgter Probennahme in Röhrchen mit je 2ml Antibiotikallösung (Antibiotika-Stammlösung 1:10 verdünnt in PBS) getaucht wurden. Nach Abbrechen der Tupfer wurden die Röhrchen verschlossen und mit den jeweiligen Ringnummern beschriftet.

3.2.5. Virusisolierung

Das Material der Kloakentupfer wurde in der Antibiotika-Lösung durch Vortexen suspendiert und zur Pelletierung der groben Bestandteile bei 1000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert (Zentrifuge Beckman J6-HC, Rotor TY JS 42, 291,2 g). Jeweils 0,2 ml des Überstandes wurden in die Allantoishöhle von 5 neuntägig bebrüteten, embryonierten SPF-Hühnereiern (Fa. Lohmann) inokuliert. Die Eier wurden bei 37 °C inkubiert, jeden Tag durchleuchtet, abgestorbene Eier aussortiert und bei 4 °C gelagert. Die verbliebenen Eier wurden nach 6-tägiger Inkubation für 1 Stunde bei – 20 °C abgetötet. Dann wurde von allen Eiern Amnioallantoishöhlenflüssigkeit (AAF) entnommen und in der Schnellagglutination (SA) getestet. Positive Proben wurden anschliessend im Hämagglutinationstest (HA) titriert und mittels Hämagglutinationshemmungstest (HAH) bezüglich APMV-1 typisiert.

Negativ getestete AAF wurde ein zweites Mal auf bebrüteten Eiern passagiert und die AAF wiederum auf identische Weise erneut getestet. Insgesamt wurde ein Kloakentupfer dann als positiv bewertet, wenn die AAF von mindestens einem, in der ersten oder zweiten Passage bebrüteten, SPF-Hühnerei APMV-1 positiv war.

Die serologischen Testsysteme bezüglich hämagglutinierender Eigenschaften wurden nach den Vorgaben des Anhangs III der Richtlinie 92/66/EWG des Rates vom 14.Juli 1992 über Gemeinschaftsmaßnahmen zur Bekämpfung der Newcastle-Krankheit durchgeführt.

3.2.6. Durchführung der Sektion

Für die pathologisch-anatomische Untersuchung wurden die Tauben zunächst durch einen Schlag auf den Hinterkopf betäubt und durch Blutentzug getötet. Nach äußerlicher Beurteilung wurden die inneren Organsysteme (Magen-Darm-Trakt einschließlich Leber, Urogenital-Trakt, Atmungsorgane, Herz, lymphatische Organe einschließlich Milz, sowie das Endokrinium mit Pankreas, Nebennieren und Schilddrüsen) untersucht. Das Gehirn wurde ebenfalls beurteilt und in ausgesuchten Fällen auch der Plexus brachialis und lumbosacralis. Im Anschluss an die pathologisch-anatomische Untersuchung wurden die virologischen (unter möglichst sterilen Bedingungen) und histologischen Proben entnommen.

3.2.7. Histologische Untersuchung

Für die feingewebliche Untersuchung wurden bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung Proben von den Organen (Herz, Leber, Milz, Lunge, Niere, Nebenniere, Duodenum/Pankreas, Ileocejunum, Gehirn, Rückenmark, Plexus brachialis) mit einer maximalen Kantenlänge von 1 cm entnommen. Die Proben wurden für mindestens 24 Stunden in PBS gepufferten Formalin (3,7 %) fixiert. Vor der weiteren Behandlung wurden sie eine Stunde gewässert. Für die anschließende Paraffineinbettung im SHANDON Citadel Gewebereinbettungsautomat erfolgte zunächst eine Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 70 %-, 80 %-, 96 %- und 100 %igem Ethanol (jeweils zweimal für eine Stunde), anschließend wurde der Alkohol mittels Intermedium entfernt (1 Stunde Aceton, 1 Stunde HistoClear) um die Proben dann in Paraffin einzubetten (jeweils zweimal für eine Stunde). In einem SHANDON Histocentre Paraffinausgussystem wurden die Proben dann in Blöcke gegossen und 4 µm dicke Schnitte (2055 Autocut, Fa. Leica) angefertigt.

Die angefertigten Schnitte wurden bei 37 °C 1 Stunde getrocknet und in einem SHANDON Linistain GLX Färbungsautomat wie folgt Hämatoxylin-Eosin-gefärbt (Romeis, 1989):

Für jeweils 20 Sekunden werden die Schnitte automatisiert in folgende Medien getaucht:

- Histoclear (3 x)
- 100 %iger Alkohol (2 x)
- 96 %iger Alkohol (2 x)
- A.dest
- Hämatoxylin (3 x)
- HCl-Alkohol
- fließendes Leitungswasser (3 x)
- Eosin (3 x)
- A.dest (2 x)
- 96 %iger Alkohol (3 x)
- 100 %iger Alkohol (3 x)
- Histoclear (2 x)

Die gefärbten Schnitte wurden abschließend mit dem Eindeckmedium Histomount (Fa.SHANDON) und Deckgläschen eingedeckelt. Das Fotografieren der histologischen Schnitte erfolgte mit einer Digitalkamera (DC 300 F, Fa. Leica) unter einem Leitz Aristoplan Mikroskop.

3.2.8. Histologischer Pathogenitätsindex

Um die histopathologischen Befunde besser quantitativ vergleichen zu können, wurde der Histologische Pathogenitätsindex (HPI) berechnet. Unter Berücksichtigung des Ausprägungsgrades der Veränderung wurde dieser innerhalb einer Gruppe wie folgt berechnet:

$$\text{HPI} = \frac{(h_x * n_1) + (h_x * n_2 * 2) + (h_x * n_3 * 3)}{(n)}$$

h_x = histopathologische Veränderung x

n = Anzahl der untersuchten Tiere insgesamt

n_1 = Anzahl der Tiere mit h_x geringgradiger Ausprägung (+)

n_2 = Anzahl der Tiere mit h_x mittelgradiger Ausprägung (++)

n_3 = Anzahl der Tiere mit h_x hochgradiger Ausprägung (+++)

Der HPI ist ein Wert ohne Einheit und wird je histopathologischer Veränderung und je Gruppe berechnet. Er stellt ein Maß für die Häufigkeit und den Ausprägungsgrad einer histopathologischen Veränderung dar. Der Wert 0 bedeutet, dass kein Tier die histopathologische Veränderung des betrachteten Organs zeigt. Der Wert 1 hingegen bedeutet, dass im Durchschnitt jedes Tier eine geringgradige Veränderung zeigt. Der Wert 2 errechnet sich bei durchschnittlich mittelgradiger Veränderung.

3.2.9. Immunfärbung

Für eine Darstellung von APMV-1 Antigen im Rückenmark bzw. Pankreas und Duodenum wurde eine immunhistochemische Färbung der entsprechenden Paraffinschnitte durchgeführt. Hierfür wurden die Schnitte auf die Objektträger HistoBond (Fa. Schubert und Weiß) aufgezogen und ebenfalls bei 37 °C 1 Stunde getrocknet. Die Entparaffinierung und Rehydrierung erfolgte im SHANDON Linistain GLX Färbeautomat, wobei die Schnitte für jeweils 20 Sekunden in HistoClear (3 x) und dann in eine absteigenden Alkoholreihe mit 100 %igem (2 x), 96 %igem Alkohol (2 x) und abschliessend in A.dest zur Rehydrierung getaucht wurden. Anschließend erfolgte eine 20-minütige Erhitzung in Tris-HCl-Puffer (pH 6,0) zur Renaturierung. Um die Antigenbindungsstellen im Gewebe für die Antikörper zugänglich zu machen, wurden die Schnitte in einer Mikrowelle denaturiert. Hierfür wurden sie auf Siedesteinchen in einer Mikrowellenschale mit TrisHCl-Puffer (pH 6,0) bedeckt und in einem Leistungsstufenprogramm insgesamt 20 min erhitzt: 5 min 800 W, 5 min 80 W, 10 min 240 W. Nach erneuter Rehydrierung in Aqua bidest für 15 Minuten wurden durch Inkubation mit 2 %igem Ziegenserum-Blockpuffer für 1 Stunde bei Raumtemperatur unspezifische Bindungsstellen im Gewebe blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Schnitte über Nacht bei + 4 °C mit einem polyklonalem APMV-1-spezifischen Kaninchenhyperimmunserum. Dieser erste Antikörper wurde dafür

zunächst mit CAH 1:2000 vorverdünnt und zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen im Serum zunächst 1 Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Zentrifugation (13.000 rpm für 10 min, Zentrifuge Biofuge pico, Fa. Heraeus, Festwinkelrotor 7500 3324, 16060 g) zur Pelletierung überschüssiger, fester Bestandteile erfolgte eine 1:2 Verdünnung des Überstandes mit 2 %igem Ziegen Serum-Blockpuffer auf die Endverdünnung 1:4000. Als Kontrolle wurde jeweils ein zweiter Schnitt auf die gleiche Weise mit einem Kaninchen-Normalserum inkubiert. Für die Detektion gebundener Antikörper und anschließende Visualisierung mittels Alkalischer Phosphatase wurde ein kommerzieller Test nach Herstellerangaben verwendet (Vectastain[®] ABC-AP Kit / Vectastain[®] Alkaline Phosphatase Substrate, Fa. Linaris). Dafür wurden die Schnitte nach viermaligem Waschen mit TrisHCl-Puffer (pH 7,4) mit dem zweiten Antikörper, einem Kaninchen IgG Hyperimmunserum, für 30 min inkubiert. Es folgte wiederum viermaliges Waschen mit TrisHCl-Puffer (pH 7,4) und zur Verstärkung der Reaktion wurde für 30 min das AP-Reagent eingesetzt. Nach erneutem viermaligem Waschen mit TrisHCl-Puffer (pH 7,4) wurde durch Inkubation mit dem Färbesubstrat die Farbreaktion hervorgerufen. Das Färbesubstrat musste dabei immer frisch hergestellt werden, da es nach 15 min bereits an Wirkung verliert. Desweiteren musste beachtet werden, dem Färbesubstrat zur Hemmung endogener Alkalischer Phosphatase und damit unspezifischer Reaktionen 1 Tropfen Levamisol zuzusetzen. Abschliessend wurde noch einmal mit Leitungswasser gewaschen und für 1 min mit Mayers Hämatoxylin in Eigenherstellung gegengefärbt. Die nun feucht eingedeckelten Präparate (Immu-Mount, Fa. Shandon) wurden fluoreszenzmikroskopisch (Leitz, Aristoplan, Filterblock I3 bzw. N2.1) ausgewertet. Die Beurteilung erfolgte sowohl in der Blau-Anregung (Anregungsfilter: 450-490 nm, Teilerspiegel 510 nm, Sperrfilter (d.h. Emissionslicht) ab 520 nm) als auch in der Grün-Anregung (Anregungsfilter: 515-560 nm, Teilerspiegel 580 nm, Sperrfilter (d.h. Emissionslicht) ab 580 nm). Es wurden nur die Präparate als spezifisch APMV-1 positiv bewertet, die ein Signal bei dem APMV-1 Hyperimmunserum zeigten, aber gleichzeitig kein Signal mit dem Kaninchen-Normalserum als Negativ-Kontrolle.

3.2.10. Statistische Berechnung

In einer statistischen Überprüfung sollte geklärt werden, ob der beobachtete Unterschied zwischen geimpften und ungeimpften Tauben nach der APMV-1 Belastungsinfektion bei den untersuchten Parametern klinische Krankheitsanzeichen, Virusausscheidung und histopathologische Veränderungen auch signifikant ist. Hierzu wurde der χ^2 -Test (chi²-Test) durchgeführt. Eine Signifikanz liegt vor, wenn $p \leq 0,05$ ist. Die Berechnungen wurden mittels Computer-Berechnung im SAS-System (Version 7.0) erstellt. Die Signifikanzüberprüfung drückt die Irrtumswahrscheinlichkeit aus, wenn der angetroffene Unterschied auf alle Tauben verallgemeinert wird.

4. Ergebnisse

Im Rahmen einer Impfstoffprüfung sollte die Langzeitwirkung einer APMV-1 Taubenvakzine überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden Tauben drei, sechs, neun und zwölf Monate nach der Impfung einer Belastungsinfektion unterzogen. Zugleich wurden ungeimpfte Kontrolltauben der gleichen Altersgruppe mit der identischen Virusdosis ($3,16 \times 10^5$ ELD₅₀) eines APMV-1 Isolates vom Taubentyp intramuskulär infiziert. Da die Impfung in einem Alter von sechs Wochen erfolgte, waren die Tauben zum Zeitpunkt der Infektion 4.5 Monate (Gruppe A), 7.5 Monate (Gruppe B), 10.5 Monate (Gruppe C) und 13.5 Monate (Gruppe D) alt.

Die Manifestation der APMV-1 Infektion wurde im Anschluss an die Infektion für maximal 21 Tage klinisch überwacht. Darüber hinaus wurden die Virusausscheidung in dieser Zeit sowie die pathologisch-anatomischen und feingeweblichen Veränderungen untersucht.

4.1. Manifestation der experimentellen APMV-1 Infektion – Betrachtung der ungeimpften Kontrolltauben

4.1.1. Klinischer Verlauf

Nach der APMV-1 Infektion zeigten sich erste Krankheitssymptome in den Gruppen nach vier bis sechs Tagen. Zunächst waren einzelne Tiere betroffen. Im weiteren erkrankten weitere Tauben und es kam zu einer Kumulation neuer Erkrankungsfälle bis zum 9. Tg.p.ch (Tab. 2). Die Symptomatik wurde dominiert von Ausfällen im Bereich der Flügel und äußerte sich initial als einseitiges Flügelzittern und reduzierte Flugfähigkeit. Das Flügelzittern konnte bei moderater Ausprägung durch aufgebrachtes, unruhiges Verhalten beim Betreten des Stalles zunächst nicht beobachtet werden. Erst nach Eintreten eines ruhigeren Zustandes der Tauben, die sich im Stallraum frei bewegen konnten, war die volle Ausprägung dieser Symptomatik sichtbar. Zudem war dann eine unphysiologische Stellung der Flügel erkennbar, die sich gegenüber der

physiologischen Körperhaltung als ein leichtes Absinken der Handschwinge und als leichtes Abstehen im Bereich der Karpalgelenke zeigte. Die reduzierte Flugfähigkeit äußerte sich v.a. im Unvermögen Sitzplätze o.ä. sicher anzufliegen, bzw. höher gelegene Sitzplätze auf Anhieb zu erreichen.

Im weiteren Verlauf stellte sich bei einem Teil der Tauben beidseitiges Flügelzittern oder einseitige bis beidseitige Flügellähmung ein. Die Lähmung äusserte sich in einem Hängen der Flügel, z.T. kam es dabei zu einem Schleifen der Flügelspitze am Boden (Abb. 2 A). Wurde bei Tauben vollständige Flugunfähigkeit festgestellt, war diese nicht immer durch eine entsprechende offensichtliche Flügellähmung begründet. Vielmehr wurde sie auch unabhängig von Flügelzittern bzw. Flügellähmung beobachtet und durch eine Unfähigkeit der Koordination der Flügel verursacht.

Darüber hinaus wurden insgesamt sechs Tauben bei den regelmässigen Kontrolluntersuchungen in Rückenlage vorgefunden (Abb. 2 B). Betroffene Tiere versuchten durch Ruderbewegungen der Flügel und Ständer, sich aus dieser unphysiologischen Lage zu befreien. Diese Bemühungen blieben allerdings erfolglos. Die Überprüfung der Repositionsfähigkeit aus einer Rückenlage als ein Symptom der Erkrankung wurde auch gezielt überprüft. Dafür wurden die Tauben bei Verdacht manuell in diese Körperlage verbracht und das weitere Verhalten beobachtet. Bei einer Taube (D20, Gruppe C) zeigte sich ab dem 8.Tg.p.ch. bei einseitiger Flügellähmung und Flugunfähigkeit nach manuell herbeigeführter Rückenlage eine fehlende Repositionsfähigkeit. Abgesehen von der einseitigen Flügellähmung, die ab dem 14.Tg.p.ch. klinisch nicht mehr erfassbar war, blieb der Zustand der Taube bis zum 21.Tg.p.ch. unverändert.

Eine Taube der Gruppe B wies eine beidseitige Blepharitis auf. Da dieses Tier öfters in Rückenlage vorgefunden worden war, wurde die Blepharitis offenbar durch längeres Liegen auf dem Rücken verursacht.

Die klinischen Krankheitsanzeichen waren in allen Fällen bei ungetrübter Sensorik feststellbar. Neben den zentralnervösen Symptomen wurde in den Gruppen vereinzelt Polyurie festgestellt. Sie stellte sich in Form von grossflächigen Flüssigkeits-Seen dar, in denen geformte Kotanteile sichtbar waren. Auf dem Betonboden waren derartige Flecken auch im bereits eingetrockneten Zustand noch gut erkennbar, aufgrund der Gruppen-Haltung war eine Zuordnung zur betroffenen Taube jedoch nicht möglich.

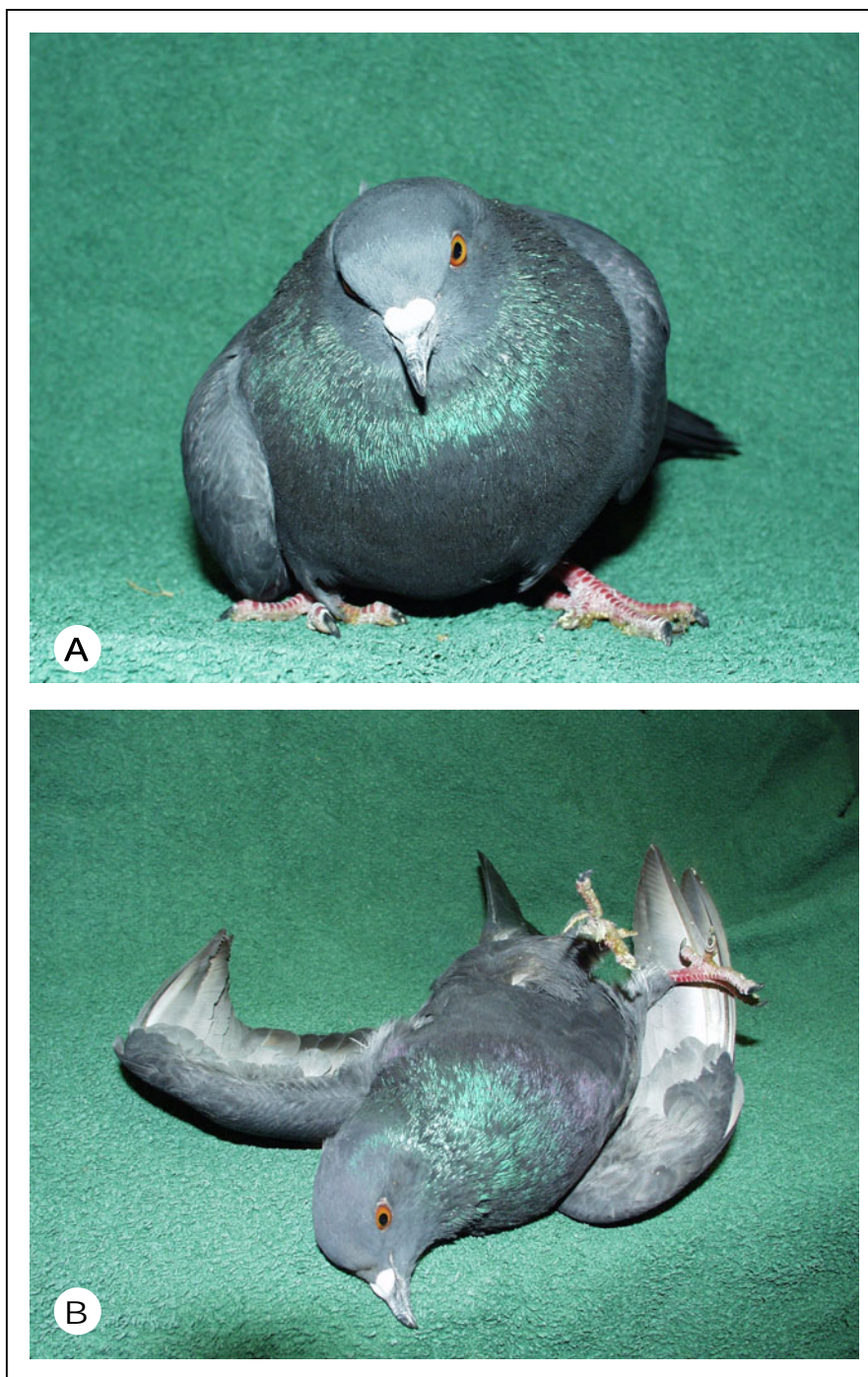


Abb. 2: Zentralnervöse Symptome der APMV-1 Infektion.

Nach intramuskulärer Infektion von adulten Tauben mit einem Taubentyp AMPV-1 wurden bei einem Teil der Tauben zentralnervöse Symptome beobachtet. Dargestellt ist A: Eine Taube mit charakteristischer rechtseitiger Flügellähmung, die sich durch deutliches Hängen des Flügels mit unsymmetrischer Körperhaltung manifestiert und B: Dieselbe Taube festliegend in Rückenlage. Trotz Ruderbewegungen der Ständer und Kippbewegungen des Körpers war es den betroffenen Tauben nicht möglich, sich aus der Rückenlage zu befreien.

Bei Fällen schwerer klinischer Erkrankung, v.a. solche mit Festliegen in Rückenlage wurden die betroffenen Tiere aus tierschützerischen Gründen vor Ablauf der 21-tägigen Beobachtungszeit getötet und den weiteren Untersuchungen unterzogen. Selbständige Todesfälle traten während des Beobachtungszeitraumes in keiner der Gruppen auf.

Bezogen auf das Spektrum der festgestellten klinischen Symptome ergeben sich im Vergleich der Altersgruppen nur sehr geringe Unterschiede. So wurde ein Festliegen in Rückenlage in der Gruppe A nicht beobachtet. Davon abgesehen zeigten alle Altersgruppen die gleiche Bandbreite klinischer Symptomatik.

Für einen quantitativen Vergleich der klinischen Ausprägung wurde der klinische Pathogenitätsindex (KPI) herangezogen (Polten, 1986). Grundlage dieses Index ist die tägliche individuelle Bewertung des Gesundheitszustandes nach den Kategorien: Ohne erkennbare Krankheitsanzeichen (0), klinische Krankheitsanzeichen (1) und gestorben (2). Da bei schweren zentralnervösen Störungen eine klinische Besserung in der 21-tägigen Beobachtungszeit nicht zu erwarten ist (Schusser et al., 1994; Gerlach, 1994; Vindevogel und Duchatel, 1988; Pearson et al., 1987), wurden für die Berechnung des KPI auch die auf Grund der Schwere der Erkrankung vorzeitig getöteten Tauben für den gesamten Beobachtungszeitraum berücksichtigt.

Bei Betrachtung des KPI (Tab. 2) wiesen die Gruppen nur leicht voneinander abweichende Werte auf mit einer moderaten Steigerung der Erkrankungsfälle mit zunehmenden Alter der Tiere. Der KPI lag durchschnittlich bei 0,5 und steigerte sich von 0,41 bei der Gruppe A über 0,49 bzw. 0,53 bei den Gruppen B und C auf 0,58 bei den ältesten Tieren der Gruppe D.

Auch der prozentuale Anteil der kummulativ erkrankten Tauben spiegelt diese Beobachtung wider. Während in der Gruppe A und B 60 % bzw. 63,5 % der Tiere klinische Krankheitsanzeichen aufweisen, sind in Gruppe C 71,5 % klinisch erkrankt. Für die ältesten Tauben in der Gruppe D errechnet sich ein Wert von 72,5 %. Er erreicht bei allen Gruppen spätestens am 9.Tg.p.ch. seinen endgültigen Wert. Eine Ausnahme diesbezüglich bildete die Gruppe C, in der drei moderat erkrankte Tauben, die als Symptome lediglich Flügelzittern oder eine reduzierte Flugfähigkeit aufwiesen, bis zum Ablauf der 21 Tage eine klinische Besserung zeigten. Zwei Tauben fielen mit beidseitigem Flügelzittern auf, die eine für einen Tag am 8.Tg.p.ch., die zweite zwei Tage am 9.Tg.p.ch. und am 13.Tg.p.ch. Bei der dritten Taube trat für vier Tage (6. bis

9.Tg.p.ch.) beidseitiges Flügelzittern auf, nach Besserung wurde dann jedoch ab dem 14.Tg.p.ch. reduzierte Flugfähigkeit festgestellt und zum Ende des Beobachtungszeitraumes (ab dem 20.Tg.p.ch.) war die Taube gänzlich flugunfähig. Desweiteren war bei dieser Taube die letzten drei Tage eine deutliche Schreckhaftigkeit auf akustische und optische Reize feststellbar. Insgesamt stellt sich durch diesen Umstand in dieser Gruppe der endgültige prozentuale Endwert der kummulativ erkrankten Tauben von 71,5 % erst mit dem 13. Tg.p.ch. ein.

Legende zu Tabelle 2:

¹ Darstellung der klinischen Symptomatik: Pro Taube wurde nur die schwerwiegendste klinische Erscheinung gewertet (beim Auftreten mehrerer Symptome keine Mehrfachwertungen). Leere Kästchen bedeuten den Wert Null. Alter der Tauben zum Zeitpunkt der Infektion: 4.5 Monate (Gruppe A), 7.5 Monate (Gruppe B), 10.5 Monate (Gruppe C) und 13.5 Monate (Gruppe D).

□ Hinterlegt: Zeitfenster vom Einsetzen erster Symptome bis zur Manifestation der endgültigen vollen klinischen Ausprägung

² Anteil der kummulativ erkrankten Tauben in Prozent bezogen auf die ursprüngliche Gruppengrösse (n)
KPI: Klinischer Pathogenitätsindex, siehe Material und Methoden

4.1.2. Virusausscheidung

Die Virusausscheidung wurde nach der Infektion mittels Kloakentupfern im wöchentlichen Abstand überprüft, d.h. am 7., 14. und 21.Tg.p.ch. sowie im Zuge vorzeitiger Sektionen zum Zeitpunkt der Tötung. Bei der Gruppe D wurden zusätzlich noch am 4. und am 11.Tg.p.ch. Kloakentupfer genommen.

In den Proben konnte Virus hauptsächlich im Zeitraum vom 4. bis einschliesslich 11.Tg.p.ch. reisoliert werden (Tab. 3). Dabei war die Virusreisolierungsrate am 4.Tg.p.ch., dem frühesten beprobten Zeitpunkt nach der Infektion, noch gering: Aus zwei von elf Proben konnte Virus isoliert werden. Demgegenüber gelang eine Isolierung von APMV-1 am 7. und 8.Tg.p.ch. bei rund der Hälfte der Proben: 19 der insgesamt 36 Proben bzw. zwei von vier genommenen Proben waren APMV-1 positiv. Ähnlich sehen die Ergebnisse vom 11.Tg.p.ch. aus: Bei zwei von fünf entnommenen Proben konnte APMV-1 nachgewiesen werden. Wesentlich geringer war die Virusreisolierungsrate 14 Tage nach der Infektion: Es wurde lediglich aus einer von insgesamt 20 Proben APMV-1 isoliert. Nach 21 Tagen schliesslich war bei keiner der 20 untersuchten Proben eine Virusausscheidung mehr nachweisbar.

Bei der Virusausscheidung ist im Gruppenvergleich eine gewisse Altersabhängigkeit der Ausscheidungsrate zu erkennen, wobei ein höherer Prozentsatz jüngerer Tauben Virus ausschied (Tab. 3). Die älteren Tiere der Gruppe D (13.5 Monate) schieden dagegen seltener Virus mit dem Kot aus, am allgemeinen Höhepunkt der Ausscheidungsphase, dem 7 Tg.p.ch. konnte kein Virus in den Proben nachgewiesen werden. Dagegen konnte zu diesem Zeitpunkt in den Gruppen A und C aus allen genommenen Kloakentupfern APMV-1 isoliert werden. Konform hierzu verhält sich die

Beobachtung, dass die einzige APMV-1 positive Probe vom 14.Tg.p.ch. von den jüngsten Tauben aus der Gruppe A (4.5 Monate) stammte. Bei den älteren Tieren aus den drei anderen Gruppen konnte zu diesem späten Zeitpunkt keine Virusausscheidung mehr nachgewiesen werden.

Tab. 3: Virusausscheidung über die Kloake

Tauben	Tage nach Infektion (Tg.p.ch.)						
	4	6	7	8	11	14	21
Gruppe A	n.d.	n.d.	10/10	n.d.	n.d.	1/7	0/7
Gruppe B	n.d.	1/3	2/8	2/4	n.d.	0/4	0/4
Gruppe C	n.d.	n.d.	7/7	n.d.	n.d.	0/4	0/4
Gruppe D	2/11	n.d.	0/11	n.d.	2/5	0/5	0/5
Gesamt	2/11	1/3	19/36	2/4	2/5	1/20	0/20

positive Kloakentuper / Gesamtanzahl der Tupferproben
n.d. = nicht durchgeführt

4.1.3. Pathologisch-anatomische Befunde

Bei der makroskopischen Untersuchung waren bei allen experimentell infizierten Tauben die Organe des Atmungstraktes (obere Luftwege, Lunge, Luftsäcke), die Organe des Urogenitaltraktes (Nieren, Harnleiter, Gonaden) sowie Herz und auch der Darm unauffällig. Die parasitologische Untersuchung wies keine adulten Parasiten oder parasitäre Entwicklungsstadien nach. Als pathologisch-anatomische Hauptbefunde waren Veränderungen der Milz und des Pankreas makroskopisch sichtbar.

Während an der Milz der sieben als Negativkontrolle dienenden Tauben kein pathologischer Befund zu erheben war, wiesen die infizierten Tauben in allen Gruppen eine geringgradig ausgeprägte Milzschwellung mit einer Längenzunahme des Organs auf über 1,2 cm auf (Tab. 4). Insgesamt zeigten 23 von 39 Tauben diese Veränderung

und in jeder Gruppe war bei mindestens der Hälfte der Tiere die Milz sichtbar geschwollen. Die Milzschwellung war überwiegend geringfügig ausgeprägt, lediglich in der Gruppe D zeigten zwei Tauben eine stärker ausgeprägte Milzschwellung. Eine Taube wies eine mittelgradig ausgeprägte Milzschwellung (Längenzunahme auf über 1,7 cm) auf und eine weitere Taube eine hochgradig ausgeprägte Milzschwellung (Längenzunahme auf über 2 cm und deutliche Dickenzunahme).

Ebenso wie die Milz war das Pankreas der sieben Tauben der Negativkontrolle makroskopisch unauffällig. Bei den infizierten Tauben wurden dagegen nekrotische Veränderungen des Pankreas als weißliche, rundliche, unregelmäßig begrenzte Einsenkungen mit einem Durchmesser von bis zu 5 mm beobachtet (Tab. 4). Insgesamt wurden Pankreasnekrosen bei elf von 39 Tauben gefunden. Desweiteren wurde in fünf Fällen eine Schwellung des Organs festgestellt (drei Tauben in der Gruppe A und zwei in der Gruppe D). Dabei erhob sich das Organ deutlich aus seinem Bett zwischen den Schenkeln des Duodenum hervor.

In Bezug auf die verschiedenen Altersgruppen war eine Häufung der pathologischen Pankreas-Veränderungen mit zunehmenden Alter der Tiere festzustellen. Konnten nekrotische Pankreas-Veränderungen bei der Gruppe A nicht erhoben werden, so war in der Gruppe B bei einer von elf Tauben der Pankreas in Form von weißlichen, miliaren Herden betroffen. In der Gruppe C waren es vier von sieben Tauben mit nekrotischen Veränderungen des Pankreas, je zwei mit geringgradiger bzw. mittelgradiger Ausprägung. Dabei stellten sich die veränderten Bezirke mit einem Durchmesser bis zu 1,5 mm teilweise mit klarem flüssigem Zentrum bzw. auch blasenartig dar. In der Gruppe D schliesslich waren es sechs von elf Tauben mit Pankreasnekrosen, wobei alle hochgradige und damit makroskopisch augenfällige Veränderungen zeigten.

Neben diesen Hauptbefunden an Milz und Pankreas, bleibt zu erwähnen, dass eine Taube der Gruppe D (Taube F39, Sektion am 9.Tg.p.ch.) am Pankreas neben umfangreichen nekrotischen Veränderungen und hellen, schmierigen, abwischbaren Belägen auf diesem Organ auch wenig fadenziehende Flüssigkeit im Abdominalraum aufwies. Dabei waren die serösen Überzüge der Abdominalorgane weißlich-trüb und mit stecknadelfeinen weißen Stippchen durchsetzt.

Neben einigen Fällen von Fettleber (in der Gruppe C und D) wurde bei wenigen Tauben ein rötlich fleckig verfärbtes Parenchym der Leber beobachtet, z. T. einhergehend mit petechialen Blutungen.

Tab.4: Pathologisch-anatomische Veränderungen der experimentell APMV-1 infizierten Tauben

Organ	Veränderung	Gruppe	Infizierte Tauben				Neg.	
			n	+	++	+++	n	+
Milz	Hyperplasie	A	10	6	-	-		
		B	11	8	-	-		
		C	7	5	-	-		
		D	11	4	1	1	7	0
		Gesamt	39	23	1	1	7	0
Pankreas	nekrotische Veränderungen	A	10	-	-	-		
		B	11	1	-	-		
		C	7	2	2	-		
		D	11	-	-	6	7	0
		Gesamt	39	3	2	6	7	0

- kein Tier betroffen, + geringgradig, ++ mittelgradig, +++ hochgradig
n = Anzahl untersuchter Tiere pro Gruppe; Neg. = Negativkontrollen

4.1.4. Histopathologische Befunde der experimentellen APMV-1 Infektion

Für die feingewebliche Untersuchung wurde bei allen Tauben im Rahmen der pathologisch-anatomischen Untersuchung Proben von den Organen (Herz, Leber, Milz, Lunge, Niere, Nebenniere, Duodenum/Pankreas, Ileojejunum) genommen. Zusätzlich wurde bei Tauben aus der Gruppe D das ZNS (Gehirn, Rückenmark) sowie der Plexus brachialis zum Zeitpunkt ausgeprägter nervaler Symptomatik (7., 8., 9. und 21. Tg.p.ch.) mit Flugunfähigkeit, Flügelzittern bzw. -lähmung und Festliegen in Rückenlage untersucht.

4.1.4.1. Histopathologische Veränderungen an den parenchymatösen Organen

Bei der histologischen Untersuchung der parenchymatösen Organe standen vor allem die Veränderungen des Pankreas, der Nebenniere, der Serosa multipler Organe sowie der Niere im Vordergrund des histopathologischen Krankheitsbildes. Die Veränderungen der serösen Überzüge verschiedener Organe (Duodenum/Pankreas, Ileojejunum, Herz, Nebenniere/Aorta und Milz) im Sinne einer nicht-eitrigen Polyserositis zeigten sich bei 23 von 39 Tauben und damit bei über der Hälfte der Tiere (Tab. 5). Die nicht-eitrige Polyserositis stellte sich in Form von z.T. umfangreichen mononukleären Infiltraten mit einhergehender massiver Zellproliferation des physiologischerweise einschichtigen Serosaepithels dar (Abb. 3) und war v.a. in der Gruppe D (Tab. 5) besonders stark ausgeprägt. Bei einer dieser Tauben der Gruppe D (Taube F39, Sektion am 9.Tg.p.ch.) stellte die nicht-eitrige Polyserositis das histopathologische Äquivalent des Sektionsbildes dar, bei dem helle, schmierige, abwischbare Beläge am nekrotisch veränderten Pankreas und wenig fadenziehende Flüssigkeit im Abdominalraum festgestellt worden waren.

Am Pankreas der APMV-1 infizierten Tiere waren neben Parenchymnekrosen ebenfalls Infiltrationsherde mononukleärer Zellen feststellbar (Abb. 4). Parenchymnekrosen zeigten 16 von 39 Tauben, dies entspricht 41 % der Tiere. In der Gruppe A entsprachen die Nekrosen dabei herdförmigen Zelluntergängen mit Verlust der acinären Struktur der exokrinen Pankreasanteile. In der Gruppe D hingegen, die auch hiervon am stärksten betroffen war, waren die Nekrosen als grossflächige Zelluntergänge nicht mehr den unterschiedlichen Pankreasanteilen zuzuordnen. Das Auftreten mononukleärer Infiltrate wurde bei 22 von 39 Tauben und damit bei über der Hälfte der Tiere nachgewiesen. Bei günstiger Schnittebene konnte beobachtet werden, dass diese assoziiert mit Pankreasausführungsgängen auftraten (Abb. 5 C,D).

In einigen Fällen war auch die Nebenniere von Parenchymnekrosen betroffen. Dabei waren die herdförmigen Zelluntergänge, die lediglich bei drei Tauben der Gruppe D vorkamen, mit mononukleären Infiltraten assoziiert (Abb. 5 B).

Mononukleäre Infiltrate in der Nebenniere waren, im Gegensatz zu den bisher aufgeführten Veränderungen am Pankreas, der nicht-eitrigen Polyserositis und auch

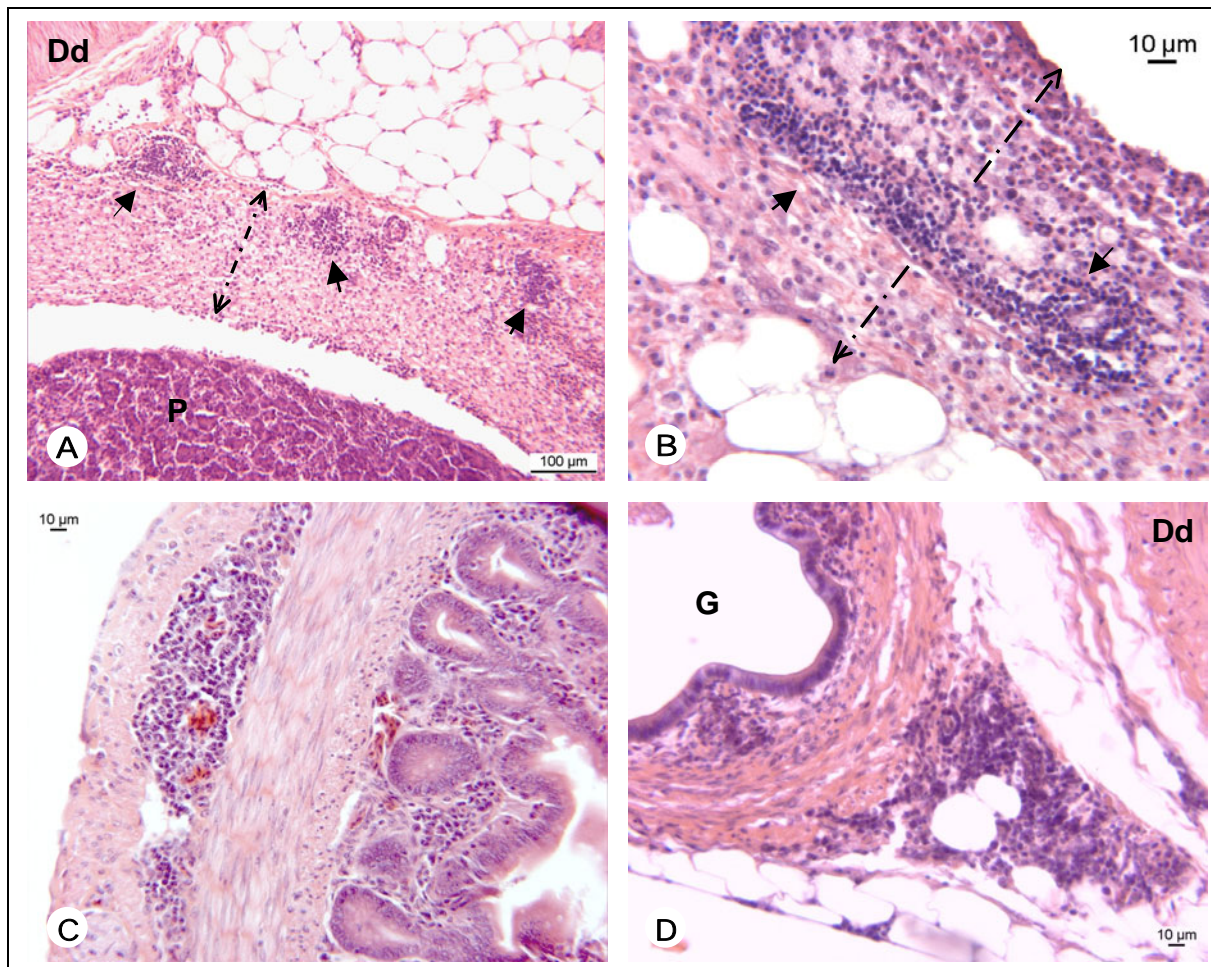


Abb 3: Histopathologische Befunde im Bereich des Magen-Darm-Traktes.

Als histopathologische Befunde wurden nach APMV-1 Infektion eine nicht-eitrige Polyserositis festgestellt mit z.T. umfangreichen mononukleären Infiltraten (→). Dargestellt sind Veränderungen im Bereich des Duodenum und Pankreas, die (A,B <--->) mit massiver Zellproliferation der Serosa des Gekröses einhergingen, bzw. (C) subserös vorlagen. Vereinzelt waren die mononukleären Infiltrate (D) mit dem Ausführungsgang des Pankreas assoziiert. **Dd**: Duodenum, **P**: Pankreas und **G**: Pankreasausführungsgang.

(Vergrößerung: x 90 (A), x 400 (B), x 220 (C,D))

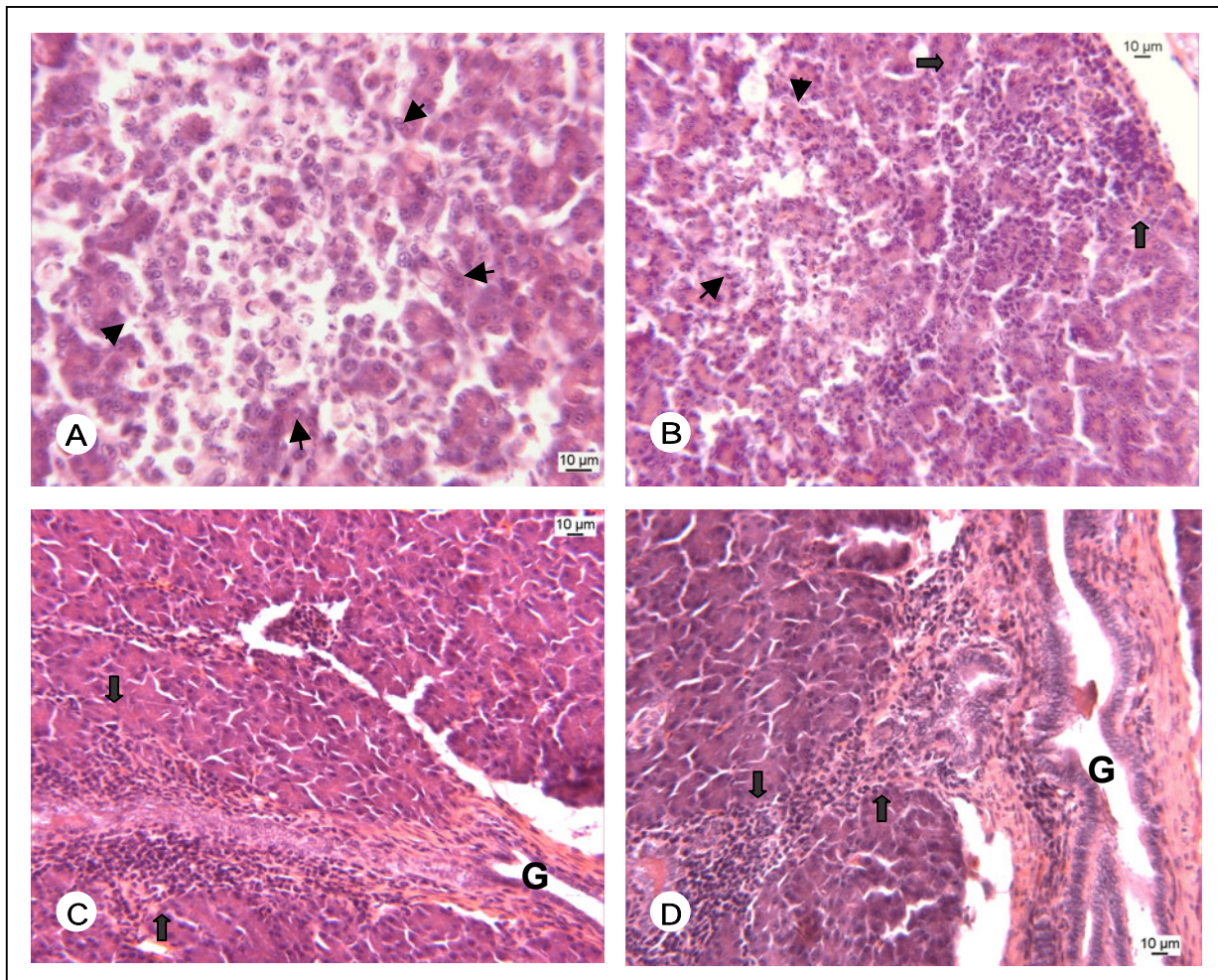


Abb 4: Histopathologische Befunde am Pankreas.

Veränderungen am Pankreas manifestierten sich (A,B) als Parenchymnekrosen in Form von herdförmigen Zelluntergängen mit Verlust der acinären Struktur (→). Bei einer grösseren Anzahl von Tauben (B,C,D) fanden sich diffuse mononukleäre Infiltrate (↗), die z.T. mit Pankreasausführungsgängen (G) assoziiert waren (C,D). (Vergrößerung: x 210 (B,C,D), x 340 (A))

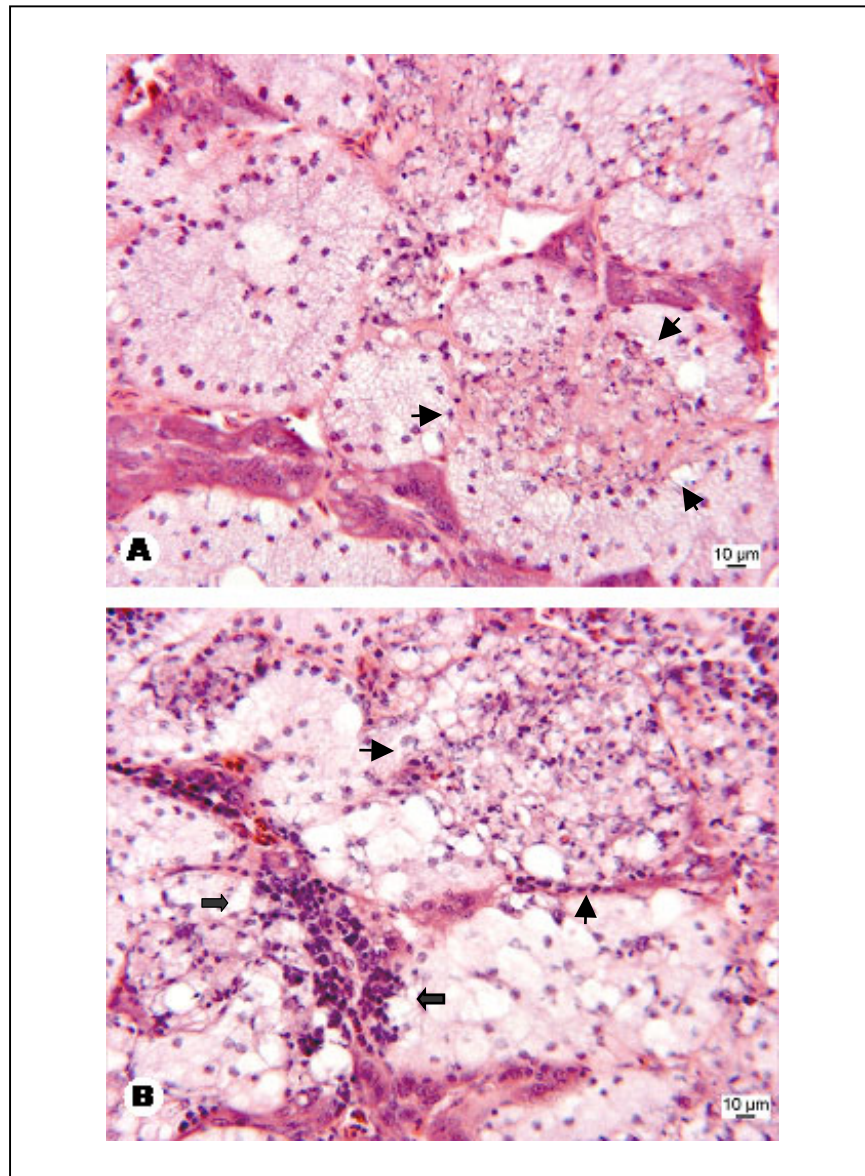


Abb. 5: Histopathologische Befunde an den Nebennieren.

Veränderungen der Nebennieren in Form von Nekrosen (→) traten ausschliesslich in der Gruppe D auf und betrafen v.a. Interrenalzellen (A,B). Diese degenerativen Veränderungen waren häufig mit mononukleären Infiltraten (⇨) assoziiert (B). (Vergrößerung: x 280 (A), x 250 (B))

den Parenchymnekrosen in der Nebenniere, auch bei den sieben Tauben der Negativkontrolle zu finden (Tab. 5). Insgesamt zeigten sowohl 17 von 29 APMV-1 infizierten Tauben als auch drei von vier Negativkontroll-Tauben mononukleäre Infiltrate in der Nebenniere.

Eine interstitielle Nephritis konnte sowohl bei 37 der 39 APMV-1 infizierten Tauben nachgewiesen werden als auch bei vier der sieben Negativkontroll-Tauben. Allerdings fällt auf, dass der Grad der Veränderung bei den infizierten Tauben gegenüber der zumeist nur geringgradigen interstitiellen Nephritis der Kontrolltauben deutlich stärker ausgebildet war.

Um die histopathologischen Befunde besser quantitativ vergleichen zu können, wurde ein histologischer Pathogenitätsindex (HPI) herangezogen (Tab. 5). In der Berechnung des HPI wird neben der Häufigkeit einer histopathologischen Veränderung auch die Stärke des Ausprägungsgrades berücksichtigt. Für die Veränderungen an der Niere verdeutlicht er den graduellen Unterschied des Auftretens der interstitiellen Nephritis bei APMV-1 infizierten Tauben und bei den Negativkontroll-Tauben. Bei den infizierten Tauben variiert der Index von 1,4 bis 2,286 und beträgt im Durchschnitt 1,762. Für die Negativkontrolltauben errechnet sich im Vergleich ein Index von 0,714.

Durch den HPI wird im quantitativen Vergleich deutlich, dass bei den APMV-1 infizierten Tauben mit den Veränderungen am Pankreas, eine nicht-eitrige Polyserositis und auch Parenchymnekrosen der Nebenniere histopathologische Befunde feststellbar waren, die bei den Negativkontrolltauben nicht vorkamen. Während der HPI dieser vier Größen bei den Negativkontrolltauben jeweils den Wert null annimmt, beträgt der HPI für die nicht-eitrige Polyserositis bei den APMV-1 infizierten Tauben bei den Gruppen A und C 0,5 bzw. 0,571, bei der Gruppe B 1,0 und bei der am stärksten betroffenen Gruppe D 1,364. Für die Pankreasnekrosen nimmt der HPI ebenfalls den höchsten Wert bei der Gruppe D an. Die Gruppen A, B und C liegen in der Grössenordnung von 0,364 bis 0,6 dicht beieinander. Gruppe D hingegen weist einen HPI der Pankreasnekrosen von 2,0 auf. Ähnlich verhalten sich die Werte für die monozytären Infiltrate im Pankreas, sie liegen im Bereich von 0,6 bis zu 1,273 bei der Gruppe D. Der HPI der Nebennierennekrosen spiegelt die geringe Häufigkeit des Auftretens wider. Er beträgt bei der Gruppe D 0,5 und in den anderen Gruppen jeweils Null.

Die mononukleären Infiltrate in der Nebenniere kamen sowohl bei den APMV-1 infizierten als auch bei den Negativkontroll-Tauben vor. Dabei weist der HPI keinen graduellen Unterschied in der Ausprägung auf. Die Werte liegen mit durchschnittlich 0,775 für die infizierten Tauben bzw. 0,75 für die Kontrolltauben auf vergleichbarem Niveau.

Ähnlich verhält es sich bei den mononukleären Infiltrate in der Leber. Sie sind bei den infizierten Tauben mit einem durchschnittlichen HPI von 1,5 zu finden, wobei der Wert von 1,0 bis 2,0 variiert. Für die Kontrolltauben ergibt sich mit einem HPI von 1,0 eine vergleichbare Ausprägung.

Legende zu Tabelle 5:

Darstellung der histopathologischen Befunde APMV-1 infizierter Tauben im Gruppenvergleich. Alter der Tauben zum Zeitpunkt der Infektion: 4.5 Monate (Gruppe A), 7.5 Monate (Gruppe B), 10.5 Monate (Gruppe C) und 13.5 Monate (Gruppe D). n = Anzahl der histologisch untersuchten Tauben

Neg.kontrollen = uninfizierte Kontrolltauben

+ geringgradige, 2+ mittelgradige, 3+ hochgradige Veränderungen

Duod. = Duodenum, Pankr. = Pankreas, NN = Nebenniere, Inf. = Infiltrate

HPI: Histopathologischer Pathogenitätsindex, siehe Material und Methoden

□ Hinterlegt: Histopathologische Befunde, die bei APMV-1 infizierten Tauben, aber nicht bei den Negativkontrolltauben feststellbar waren.

Tab. 5: Darstellung der histopathologischen Befunde APMV-1 infizierter Tauben im Gruppenvergleich

Organ	Veränderung	Infizierte Tauben												Neg.kontrollen		
		Gruppe A			Gruppe B			Gruppe C			Gruppe D			Neg.kontrollen		
		n	+ 2+ 3+	HPI	n	+ 2+ 3+	HPI	n	+ 2+ 3+	HPI	n	+ 2+ 3+	HPI	n	+ 2+	HPI
Niere	interst. Nephritis	10	6 4 0	1,400	11	2 6 1	1,545	7	1 3 3	2,286	11	5 3 3	1,818	7	3 1	0,714
Nebenniere	monozytäre Inf.	7	1 3 0	1,000	7	3 2 0	1,000	5	3 0 0	0,600	10	5 0 0	0,500	4	3 0	0,750
	Nekrosen	7	0 0 0	0,000	7	0 0 0	0,000	5	0 0 0	0,000	10	1 2 0	0,500	4	0 0	0,000
Pankreas	monozytäre Inf.	10	4 1 0	0,600	11	3 4 0	1,000	7	1 2 0	0,714	11	1 5 1	1,273	7	0 0	0,000
	Nekrosen	10	1 1 1	0,600	11	1 0 1	0,364	7	1 1 0	0,429	11	0 5 4	2,000	7	0 0	0,000
Leber	monozytäre Inf.	9	0 9 0	2,000	11	2 4 4	2,000	7	7 0 0	1,000	11	11 0 0	1,000	7	7 0	1,000
	Degeneration	9	2 0 0	0,222	11	8 0 0	0,727	7	0 0 0	0,000	11	0 0 0	0,000	7	0 0	0,000
Duod./Pank. Ileojejunum Herz Aorta/NN Milz		10	1 0 0	0,100	11	0 1 0	0,182	7	3 0 0	0,429	11	1 1 2	0,818	7	0 0	0,000
	Serositis	7	0 1 0	0,286	11	0 2 0	0,364	7	1 0 0	0,143	11	2 0 1	0,455	7	0 0	0,000
	non	-	- - -	-	11	2 0 0	0,182	7	0 0 0	0,000	11	2 0 0	0,182	7	0 0	0,000
	purulenta	7	1 1 0	0,429	11	1 0 0	0,091	7	0 0 0	0,000	10	1 0 0	0,100	7	0 0	0,000
		7	1 0 0	0,143	11	2 2 0	0,545	7	0 0 0	0,000	11	5 1 1	0,909	7	0 0	0,000
	Insgesamt	10	1 2 0	0,500	11	3 4 0	1,000	7	4 0 0	0,571	11	5 2 2	1,364	7	0 0	0,000

4.1.4.2. Histopathologische Veränderungen am Zentralen Nervensystem

Zum Zeitpunkt ausgeprägter nervaler Symptomatik (7.,8.,9. und 21.Tg.p.ch.) mit Flugunfähigkeit, Flügelzittern bzw. –lähmung und Festliegen in Rückenlage wurde zusätzlich das ZNS (Gehirn, Rückenmark) sowie der Plexus brachialis bei Tauben aus der Gruppe D untersucht. Dabei dienten insgesamt sieben uninfizierte Tauben als Kontrolltiere für die histologische Untersuchung des Nervengewebes: Texaner Tauben unterschiedlichen Alters aus dem institutseigenen SPF-Taubenbestand. Alle zehn infizierten Tauben wiesen starke Veränderungen des Rückenmarks und des Plexus brachialis auf. Am Rückenmark war vor allem in der grauen Substanz eine vakuoläre Degeneration, eine Gliose sowie Degenerationen von Neuronen und Gliazellen feststellbar (Abb. 6). Veränderungen in der weissen Substanz waren nur geringgradig in Form dezenter Gliazellproliferation (Gliaknötchen) und leichtem Status spongiosus auffindbar.

Mononukleäre Infiltrate waren im umgebenden Bindegewebe und perineuronal im Bereich der Spinalnerven zu finden, aber nicht im Rückenmark selber. Darüberhinaus fanden sich mononukleäre Infiltrate im Sinne einer nicht-eitrigen Neuritis auch in den Nerven bzw. Ganglien selbst. Die Veränderungen am Rückenmark lagen bei acht Tauben in mittel- bis hochgradiger Ausprägung vor, nur bei zwei Tauben vom 21.Tg.p.ch. (F41 und I74) waren sie gering- bis mittelgradig ausgebildet (Tab. 6). Die Spinalganglien und auch die Nerven und Ganglien des Plexus brachialis wiesen vergleichbare Veränderungen in ähnlicher Ausprägung auf. Die histologische Untersuchung von Rückenmark und Plexus brachialis bei den Kontrolltauben verlief überwiegend o.b.B., allerdings zeigten drei Tauben geringgradige Veränderungen. Bei einer Taube (Tex6) wurde eine geringgradige Neuronendegeneration in den Spinalganglien und geringgradige mononukleäre Infiltrate im perineuronalen Bindegewebe im Bereich der Spinalnerven festgestellt. Zwei weitere Tauben (Tex3 und Tex7) wiesen geringgradige mononukleäre Infiltrate in den Spinalnerven im Bereich des Plexus brachialis auf.

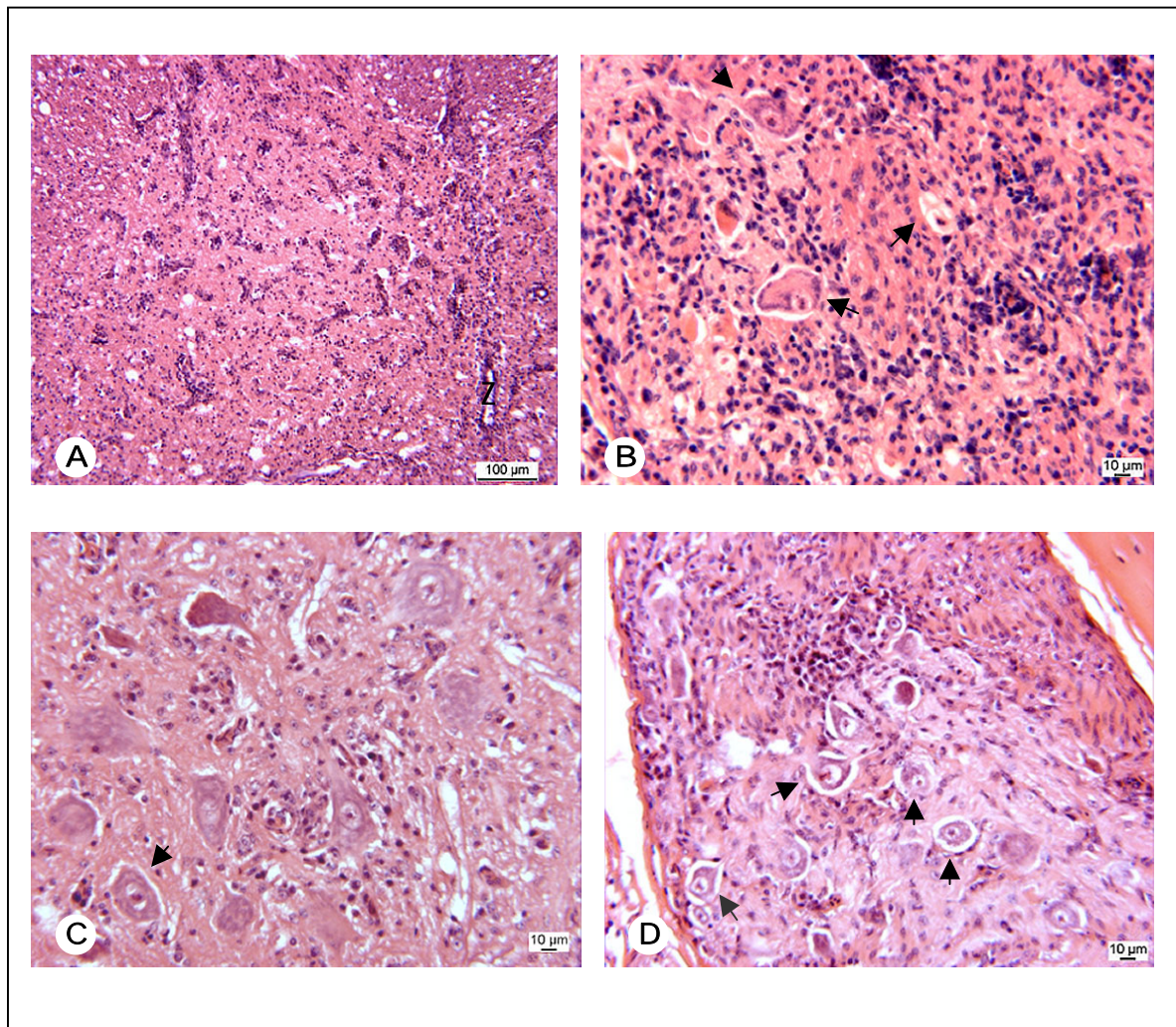


Abb. 6: Histopathologische Befunde an Rückenmark und Spinalganglion.

Die histopathologische Untersuchung des ZNS zum Zeitpunkt ausgeprägter nervaler Symptomatik (7.,8.,9. und 21.Tg.p.ch) ergab bei allen zehn untersuchten APMV-1 infizierten Tauben ausgeprägte Veränderungen des Rückenmarks und des Plexus brachialis. Die Panmyelopathie zeigte sich in Form von vakuolärer Degeneration (**A** – leichter Status spongiosus), Gliose (**A** und **B** - starke Gliazellproliferation, **C** und **D** - leichte Gliazellproliferation) sowie Degenerationen von Neuronen (**B,C,D** →) und Gliazellen vor allem in der grauen Substanz. **A** und **C**: Rückenmark, **B** und **D**: Spinalganglion, **Z**: Zentralkanal
(Vergrößerung: x 78 (**A**), x 200 (**B,D**), x 210 (**C**))

Bei der histologischen Untersuchung des Gehirns waren sowohl bei den Kontrolltauben, als auch bei den infizierten Tauben alle untersuchten Anteile (Endhirn, Zwischenhirn, Mittelhirn und Rautenhirn mit dem Kleinhirn) unverändert.

Tab. 6: Histopathologische Befunde am ZNS bei Tauben der Gruppe D

ZNS	Tg.p.ch.	7		8		9		21			
	Taube	F52	I 77	F31	F66	F39	F50	F41	F67	F65	I 74
Rückenmark											
Vakuoläre Degeneration		++	++	++	-	++	++	-	++	-	-
Gliazell-Proliferation		++	++	++	++	++	++	+	-	-	-
Neuronen-Degeneration		-	-	-	++	++	+++	-	+++	++	++
Gliazell-Degeneration		-	-	-	++	++	-	+	++	++	-
mononukleäre Infiltrate											
perineuronal		++	++	++	-	-	++	-	-	+++	-
Bindegewebe		-	-	-	++	-	++	-	++	-	-
Spinalganglien											
mononukleäre Infiltrate		-	-	-	++	++	+	-	-	-	-
Gliaproliferation		-	-	-	-	-	+	++	-	-	-
Neuronendegeneration		-	-	-	++	-	++	+	+++	-	-
Plexus brachialis											
mononukleäre Infiltrate											
im Nerv		++	-	-	+	-	++	+	+++	-	+
perineuronal		+++	+++	-		-	+++	-	-	-	
Bindegewebe		+++	-	+++	+++	+++	+++	+	++	+++	+
Vakuoläre Degeneration		-	++	-	-	-	-	-	++		+
Ganglien des Plexus brachialis											
Gliazell-Proliferation		+++	++	-	-	+	+	-	-	-	-
mononukleäre Infiltrate		+	+	+	+++	+++	-	-	-	-	-
Neuronen-Degeneration		-	++	-	++	-	+	-	-	-	-
Vakuoläre Degeneration		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

- obB, + geringgradig, ++ mittelgradig, +++ hochgradig

4.1.5. APMV Antigennachweis (Immunfärbung)

Bei den Proben vom ZNS (Gehirn, Rückenmark) sowie des Plexus brachialis von Tauben der Gruppe D, die am 7.,8.,9. und 21.Tg.p.ch. sezirt wurden, wurde zusätzlich zur histopathologischen Untersuchung ein Nachweis von APMV-1 Antigen mittels immunhistochemischer Färbung durchgeführt. Als Negativ-Kontrolle dienten wiederum

die sieben uninfizierten Texaner-Tauben. Von den Tauben vom 7., 8. und 9.Tg.p.ch. wurde aufgrund der beschriebenen starken histopathologischen Veränderungen am Pankreas und den serösen Überzügen am Verdauungstrakt vergleichend eine immunhistochemische Färbung von Pankreas und Duodenum durchgeführt. Bei der immunhistochemischen Färbung des Nervengewebes konnte bei den Tauben vom 7., 8. und 9.Tg.p.ch. sowie bei einer von vier untersuchten Tauben vom 21.Tg.p.ch. APMV-1 Antigen dargestellt werden (Abb. 7). Das APMV-1 Antigen wurde hauptsächlich in der grauen Substanz, die auch die stärksten histopathologischen Veränderungen gezeigt hatte, lokalisiert. Am ausgeprägtesten war das Signal in den ventralen Hörnern, etwas schwächer in den dorsalen Hörnern und vereinzelt in der Pars intermedia (Tab. 7). Dabei waren, neben degenerierten Neuronen, Bereiche mit vakuolärer Degeneration und auch solche mit Gliaproliferation deutlich APMV-1 positiv. Auch in vital erscheinenden Neuronen war APMV-1 Antigen nachweisbar. Bei drei Tauben waren auch Neuronen in den Spinalganglien deutlich APMV-1 positiv. Bei der Taube vom 21.Tg.p.ch. zeigte nur das Rückenmark mittelgradig positive APMV-1 Reaktionen, die in einem der dorsalen, wie auch in beiden ventralen Hörnern nachweisbar war.

Bei der immunhistochemischen Färbung von Pankreas und Duodenum konnte zu keinem Zeitpunkt nach Infektion APMV-1 Antigen in einem der Organe oder in den serösen Überzügen in diesem Bereich dargestellt werden

Bei keiner der sieben uninfizierten Texaner-Tauben, die als Kontrolle mitgeführt wurden, konnte ein APMV-1 positives Signal nachgewiesen werden.

Tab. 7: Immunhistochemische Färbung des Nervengewebes

Tg.p.ch.	7		8		9		21			
Taube	F52	I 77	F31	F66	F39	F50	F67	F41	F65	I 74
Cornu dorsale	++	+	+	+	++	-	++	-	-	-
Cornu ventrale	+++	++	+	+++	+++	+++	++	-	-	-
Pars intermedia	-	-	+++	++	+	++	-	-	-	-
Neuronen der Spinalganglien	++	-	-	+++	+	-	-	-	-	-

- obB, + geringgradig, ++ mittelgradig, +++ hochgradig

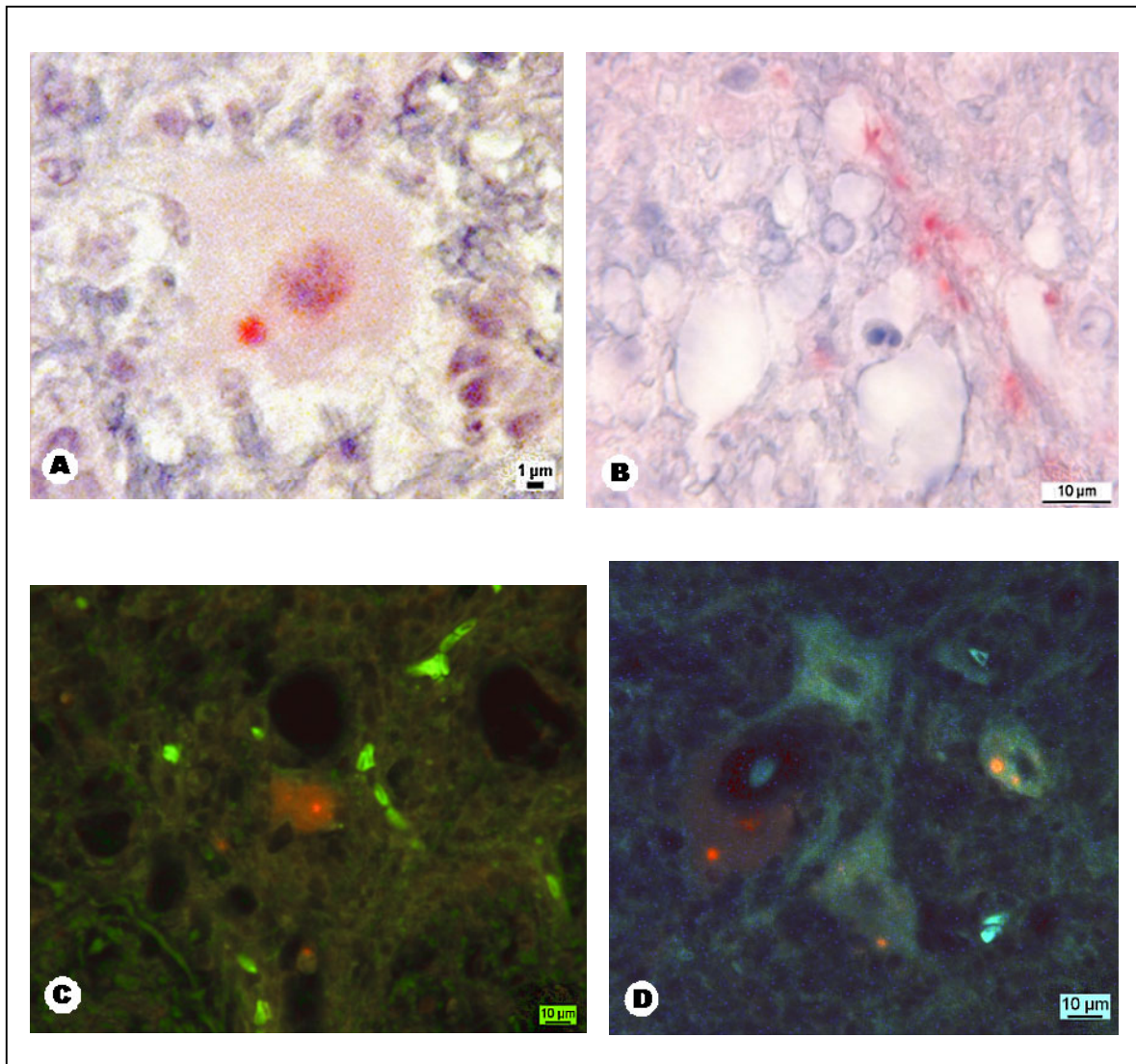


Abb. 7: Immunhistochemischer Nachweis von APMV-1 Antigen im Rückenmark experimentell infizierter Tauben.

Nach Auftreten zentralnervöser Symptome wurden Tauben zwischen dem 7. und 9. sowie 21 Tage nach der Infektion getötet und das Rückenmark im Bereich des Plexus brachialis entnommen. Mittels immunhistochemischen Nachweis (siehe Material und Methoden) ließ sich Antigen in Form von roten Einschlusskörperchen sowohl im Cytoplasma vital erscheinender Nervenzellen (**A,C,D**) als auch degenerierter Nervenzellen dargestellt, desweiteren in Bereichen mit vakuolärer Degeneration (**B**) bzw. Gliazellproliferation.

(Vergrößerung: x 2200 (**A**), x 950 (**B**), x 350 (**C**), x 480 (**D**)
Fluoreszenzmikroskopisch: grün (**C**), blau (**D**))

4.2. Überprüfung der Schutzwirkung einer Taubentyp APMV-1 (pPMV-1) Impfung

Für die Impfstoffprüfung einer homologen Taubentyp APMV-1 (pPMV-1) Vakzine wurden die Tauben drei, sechs, neun und zwölf Monate (Gruppe A, B, C und D) nach der Impfung einer Belastungsinfektion unterzogen. Analog zu der Betrachtung der infizierten Kontrolltauben wurden klinische Krankheitsanzeichen, Virusausscheidung und pathologisch-anatomische Veränderungen sowie die Ausbildung histopathologischer Veränderungen überprüft.

4.2.1. Klinischer Verlauf nach APMV-1 Belastungsinfektion bei geimpften Tauben

Die geimpften Tauben (Impflinge) zeigten im Anschluss an die Belastungsinfektion, die drei, sechs und neun Monate nach der Impfung durchgeführt wurde (Gruppe A, B und C) keinerlei klinische Symptomatik einer APMV-1 Erkrankung (Tab. 8). Von den 15 Impflingen in der Gruppe D, die der Belastungsinfektion zwölf Monate nach der Impfung ausgesetzt wurden, blieben elf Tauben ebenfalls klinisch ohne jegliche sichtbare Krankheitsanzeichen.

Bei drei Tauben der Gruppe D wurde ab dem 9. bis 13.Tg.p.ch. bei physiologischer Haltung der Flügel ein dezentes Flügelzittern beobachtet. Im Vergleich zu den ungeimpften Tieren war dieses jedoch sehr feinschlägig. Das dezente Flügelzittern entsprach in der Ausprägung nicht den Symptomen der ungeimpften Tauben und wurde somit als nicht spezifisch für die APMV-1 Infektion gewertet (in der Tabelle durch die Angabe in Klammern verdeutlicht).

Eine Taube ließ dagegen klinische Krankheitsanzeichen erkennen. Bei der Taube (E8) fiel ab dem 8.Tg.p.ch. bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes von 21 Tagen eine reduzierte Flugfähigkeit auf, die sich vom 14. bis zum 18.Tg.p.ch. zur Flugunfähigkeit ausweitete. Die Flugunfähigkeit ging dabei nicht mit einer Flügellähmung einher,

sondern wurde durch unkoordinierten Einsatz des linken Flügels gegenüber dem gleichmässig schlagenden rechten Flügel verursacht.

Daraus ergibt sich die Grundlage für die Berechnung der klinischen Parameter Klinischer Pathogenitätsindex (KPI) und prozentualer Anteil kummulativ erkrankter Tauben, in die drei Tauben mit unspezifischen Flügelzittern nicht miteinbezogen wurden. Für die Gruppe D spiegeln die Werte die geringe Häufigkeit klinischer Symptomatik wider: Der KPI beträgt hier 0,04 und der prozentuale Anteil der kummulativ erkrankten Tauben 7,7 %. Entsprechend dem Fehlen klinischer Symptomatik in den Gruppen A-C ergibt sich für diese Gruppen sowohl beim KPI als auch beim prozentualen Anteil der kummulativ erkrankten Tauben der Wert Null (Tab. 8).

Tab. 8: Klinischer Verlauf der APMV-1 Belastungsinfektion bei geimpften Tauben im Gruppenvergleich

Tg.p.ch.	Gr.A n=12		Gr.B n=16		Gr.C n=9		Gr.D n=15					
	o.b.B.	Kummulativ erkrankte Tauben (%) ¹	o.b.B.	Kummulativ erkrankte Tauben (%) ¹	o.b.B.	Kummulativ erkrankte Tauben (%) ¹	o.b.B.	reduziert flugfähig	fluguntfähig	Flügelzittern		Kummulativ erkrankte Tauben (%) ¹
										eins.	beids.	
1-3	12	0	16	0	9	0	15					0
4	12	0	16	0	9	0	15					0
5	12	0	16	0	9	0	15					0
6	12	0	16	0	9	0	15					0
7	12	0	16	0	9	0	15					0
8	12	0	16	0	9	0	14	1				7,7
9	12	0	16	0	9	0	14	1		(1)		7,7
10	12	0	16	0	9	0	14	1				7,7
11	12	0	16	0	9	0	14	1				7,7
12	12	0	16	0	9	0	14	1			(1)	7,7
13	12	0	16	0	9	0	14	1			(2)	7,7
14	12	0	16	0	9	0	14		1		(2)	7,7
15	12	0	16	0	9	0	14		1	(1)	(1)	7,7
16	12	0	16	0	9	0	14		1	(1)	(1)	7,7
17	12	0	16	0	9	0	14		1	(1)	(1)	7,7
18	12	0	16	0	9	0	14		1	(1)	(1)	7,7
19	12	0	16	0	9	0	14	1		(2)	(1)	7,7
20	12	0	16	0	9	0	14	1		(2)	(1)	7,7
21	12	0	16	0	9	0	14	1		(2)	(1)	7,7
	KPI: 0		KPI: 0		KPI: 0		KPI: 0,04					

Belastungsinfektion nach 3 Monaten (Gruppe A), 6 Monaten (Gruppe B), 9 Monaten (Gruppe C) und 12 Monaten (Gruppe D).

Leere Kästchen bedeuten den Wert Null, in Klammern angegebene Zahlen eine dezente Ausprägung der Symptomatik

¹ Anteil der kummulativ erkrankten Tauben in Prozent bezogen auf die ursprüngliche Gruppengrösse (n)

KPI: Klinischer Pathogenitätsindex, siehe Material und Methoden

4.2.2. Virusausscheidung nach APMV-1 Belastungsinfektion bei geimpften Tauben

Bei den geimpften Tauben zeigte sich eine deutlich reduzierte Virusausscheidung (Tab. 9). Es wurde nur aus einem Kloakentupfer, bei einem Probenumfang von insgesamt 52 Tupfern, von einer Taube aus der Gruppe A am 7.Tg.p.ch. Virus reisoliert.

Tab. 9: Virusausscheidung bei den geimpften Tauben

Impflinge	Tage nach Infektion (Tg.p.ch.)		
	7	14	21
Gruppe A	1/12	0/12	0/12
Gruppe B	0/16	0/16	0/16
Gruppe C	0/9	0/9	0/9
Gruppe D	0/15	0/15	0/15
Gesamt	1/52	0/52	0/52

positive Kloakentupfer / Gesamtanzahl der Tupferproben

4.2.3. Pathologisch-anatomische Befunde nach APMV-1 Belastungsinfektion bei geimpften Tauben

In allen Gruppen waren bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung geimpfter Tauben nach der Belastungsinfektion die Organe des Atmungstraktes (obere Luftwege, Lunge, Luftsäcke), die Organe des Urogenitaltraktes (Nieren, Harnleiter, Gonaden) sowie Herz und auch der Magen-Darm-Trakt unauffällig. Die parasitologische Untersuchung wies keine adulten Parasiten oder parasitäre Entwicklungsstadien nach. Ebenso konnte in keiner der Gruppen eine pathologische Veränderung des Pankreas festgestellt werden. Bei insgesamt 13 der 52 Impflingen war als einzige

makroskopische Veränderung eine geringgradige Milzschwellung (leichte Längenzunahme auf über 1,2 cm) sichtbar. Dies entspricht 25 % der Tauben. Nur bei einer dieser 13 Tauben wurde eine hochgradige Schwellung (Längenzunahme auf über 2 cm und deutliche Dickenzunahme) festgestellt. Von insgesamt zwölf Impfungen in der Gruppe A, die drei Monate nach der Impfung der Belastungsinfektion ausgesetzt wurden, wiesen elf Tiere eine leichte Längenzunahme auf und stellen damit den überwiegenden Anteil der Tiere mit einer Milzschwellung. Analog zu den ungeimpften Tieren wurde auch bei einigen Impfungen eine Fettleber vorgefunden (in der Gruppe C und D).

4.2.4. Histopathologische Befunde nach APMV-1 Belastungsinfektion bei geimpften Tauben

Als histopathologische Befunde nach der APMV-1 Belastungsinfektion konnten bei ungeimpften Tauben Veränderungen der serösen Überzüge der Organe, der Niere, der Nebenniere und des Pankreas festgestellt werden. Bei einigen der insgesamt 52 geimpften Tauben (Impfungen) wurden in geringem Umfang Veränderungen im Sinne einer nicht-eitrigen Serositis gefunden: Eine von zwölf Tauben der Gruppe A, eine von neun Tauben der Gruppe C und vier von 15 Tauben der Gruppe D zeigten eine geringgradige, auf ein Organ beschränkte Serositis, v.a. am Duodenum bzw. Ileojejunum. Auffällig war die Gruppe B, bei der immerhin acht der 16 Impfungen diesen histopathologischen Befund aufwiesen und sich bei zwei Tauben die Serositis zudem als nicht-eitrige Polyserositis auf mehrere Organe ausdehnte. Bis auf diese zwei Ausnahmen beschränkte sich die Serositis auf das Vorliegen von kleineren mononukleären Infiltraten im Vergleich zu umfangreichen Ansammlungen mononukleärer Infiltrate, wie sie bei den ungeimpften Tieren nach der APMV-1 Infektion gefunden worden waren. Desweiteren wurde bei den Impfungen keine Zellproliferation beobachtet, die die nicht-eitrige Polyserositis der ungeimpften Tauben so eindrucksvoll ausprägt hatte.

Geringgradige mononukleäre Infiltrate in der Nebenniere wurden bei 13 Impfungen festgestellt, im Pankreas dagegen nur bei vier Tauben. Bei keinem der 52 Impfungen wurden Nekrosen in der Nebenniere oder im Pankreas gefunden.

Eine interstitielle Nephritis war bei 39 der 52 geimpften Tauben feststellbar. Sie lag überwiegend in geringgradiger Ausprägung vor, lediglich bei einer Taube wurde eine mittelgradige interstitielle Nephritis befundet. Dass die Häufigkeit und Ausprägung der interstitiellen Nephritis bei den geimpften Tauben mit den Negativkontroll-Tauben vergleichbar ist, verdeutlicht der Histologische Pathogenitätsindex (HPI). Er variiert bei den Impfungen 0,625 bis 0,917 und beträgt im Durchschnitt 0,78 und liegt damit in einer Größenordnung, wie sie mit einem Wert von 0,714 bei den Negativkontrolltauben zu finden ist (Tab. 10).

Der HPI für mononukleäre Infiltrate in der Nebenniere zeigt mit einem Wert von durchschnittlich 0,291, dass diese dort häufiger zu finden waren als mononukleäre Infiltrate im Pankreas mit einem HPI von durchschnittlich nur 0,07.

Der HPI der nicht-eitrigen Serositis bei den Gruppen A, C und D mit 0,083 bis 0,267 dicht beieinander, für die Gruppe B hingegen errechnet sich abweichend hoher Wert von 0,5. Dies spiegelt die Beobachtung wider, dass in der Gruppe A, C und D nur einzelne Tauben, in der Gruppe B jedoch immerhin die Hälfte der Tiere eine nicht-eitrige Serositis zeigten.

Mononukleäre Infiltrate der Leber sind mit einem durchschnittlichen HPI von 1,261 bei den Impfungen zu finden.

Legende zu Tabelle 10:

Darstellung der histopathologischen Befunde APMV-1 geimpfter Tauben nach Belastungsinfektion im Gruppenvergleich. Zeitpunkt der Belastungsinfektion nach 3 Monaten (Gruppe A), 6 Monaten (Gruppe B), 9 Monaten (Gruppe C) und 12 Monaten (Gruppe D). n = Anzahl der histologisch untersuchten Tauben
Neg.kontrollen = ungeimpfte, uninfizierte Kontrolltauben

+ geringgradige, 2+ mittelgradige Veränderungen

Duod. = Duodenum, Pankr. = Pankreas, NN = Nebenniere, Inf. = Infiltrate

HPI: Histopathologischer Pathogenitätsindex, siehe Material und Methoden

□ Hinterlegt: Histopathologische Befunde, die bei ungeimpften, APMV-1 infizierten Tauben, aber nicht bei den Negativkontrolltauben feststellbar waren (siehe Tab.XY).

Tab. 10: Darstellung der histopathologischen Befunde APMV-1 geimpfter Tauben nach Belastungsinfektion im Gruppenvergleich

Organ	Veränderung	Geimpfte Tauben												Neg.kontrollen								
		Gruppe A			Gruppe B			Gruppe C			Gruppe D			n	+	2+	HPI					
		n	+	2+	HPI	n	+	2+	HPI	n	+	2+	HPI					n	+	2+	HPI	
Niere	interst. Nephritis	12	11	0	0,917	16	10	0	0,625	9	5	1	0,778	15	12	0	0,800	7	3	1	0,714	
Nebenniere	monozytäre Inf.	3	0	0	0,000	13	3	0	0,231	5	2	0	0,400	15	8	0	0,533	4	3	0	0,750	
	Nekrosen	3	0	0	0,000	13	0	0	0,000	5	0	0	0,000	15	0	0	0,000	4	0	0	0,000	
Pankreas	monozytäre Inf.	12	1	0	0,083	16	1	0	0,063	8	0	0	0,000	15	2	0	0,133	7	0	0	0,000	
	Nekrosen	12	0	0	0,000	16	0	0	0,000	8	0	0	0,000	15	0	0	0,000	7	0	0	0,000	
Leber	monozytäre Inf.	12	7	5	1,417	16	4	11	1,625	9	9	0	1,000	15	15	1,000	7	7	0	1,000		
	Degeneration	12	0	0	0,000	16	2	1	0,250	9	0	0	0,000	15	0	0,000	7	0	0	0,000		
Duod./Pank.																						
Ileojejunum	Serositis	12	1	0	0,083	16	2	0	0,125	9	0	0	0,000	15	2	0,133	7	0	0	0,000		
	non	12	0	0	0,000	16	5	0	0,313	9	1	0	0,111	15	0	0,000	7	0	0	0,000		
Aorta/NN	purulenta	-	-	-	-	16	2	0	0,125	9	0	0	0,000	15	0	0,000	7	0	0	0,000		
		12	0	0	0,000	16	0	0	0,000	9	0	0	0,000	15	0	0,000	7	0	0	0,000		
Milz		12	0	0	0,000	16	1	0	0,063	9	0	0	0,000	14	2	0,143	7	0	0	0,000		
Insgesamt		12	1	0	0,083	16	8	0	0,500	9	1	0	0,111	15	4	0,267	7	0	0	0,000		

4.2.5. Möglichkeiten der Überprüfung der Schutzwirkung im Vergleich von ungeimpften und geimpften APMV-1 infizierten Tauben

Zur Überprüfung, ob die Tauben durch die Impfung gegenüber der experimentellen Belastungsinfektion messbar geschützt sind, wurden die Daten, soweit dies möglich war, einer statistischen Auswertung unterzogen. Der χ^2 -Test wurde bei den Daten bezüglich der klinischen Krankheitsanzeichen und histopathologischer Veränderungen angewendet und sollte abklären, ob die beobachteten Unterschiede signifikant sind. Der χ^2 -Test wurde im SAS-System berechnet und der betrachtete Unterschied ist signifikant, wenn p Werte $\leq 0,05$ annimmt.

4.2.5.1. Statistische Auswertung des Vergleichs der Äusserung klinischer Krankheitsanzeichen geimpfter und ungeimpfter Tauben nach APMV-1 Belastungsinfektion

Für die statistische Überprüfung, ob die Unterschiede bei der Äusserung klinischer Krankheitsanzeichen infolge der APMV-1 Belastungsinfektion zwischen ungeimpften und geimpften Tauben signifikant sind, wurde als Merkmal in gesund und krank unterschieden. Als krank wurden Tauben eingestuft, die für die APMV-1 Infektion spezifische Krankheitssymptome zeigten. Nicht in die Bewertung miteinbezogen wurden unspezifische Symptome bzw. zwei Tauben aus der Gruppe C, die nur an einem bzw. zwei Tagen vorübergehendes Flügelzittern zeigten, dass sich klinisch wieder besserte. Ein drittes Merkmal für verendete Tauben, wurde aufgrund fehlender selbständiger Todesfälle nicht generiert.

Die Tauben wurden einmal insgesamt betrachtet, wobei alle Gruppen zusammengefasst wurden (Tab.11). Mit einem Erkrankungsfall bei den geimpften Tauben gegenüber 26 bei den ungeimpften Tauben errechnete sich für p der Wert 0,000 und somit liegt ein signifikanter Unterschied vor. Auch bei der Betrachtung der einzelnen Altersgruppen, insbesondere der Gruppe D mit dem längsten Interval

zwischen Impfung und Belastungsinfektion von 12 Monaten, bestätigte sich die Signifikanz.

Tab. 11: Statistische Auswertung des Vergleichs klinischer Krankheitsanzeichen geimpfter und ungeimpfter Tauben nach APMV-1 Belastungsinfektion

Gruppe	Klin.Status	Impflinge	Kontrollt.	χ^2 -Wert	p
Gesamt	gesund	51	13	44,767	0,000
	krank	1	26		
A	gesund	12	4	9,900	0,002
	krank	0	6		
B	gesund	16	4	13,745	0,000
	krank	0	7		
C	gesund	9	2	9,351	0,002
	krank	0	5		
D	gesund	14	3	12,236	0,001
	krank	1	8		

Auswertung mittels χ^2 -Test im Vergleich insgesamt sowie der einzelnen Altersgruppen. Zeitpunkt der Belastungsinfektion nach 3 Monaten (Gruppe A), 6 Monaten (Gruppe B), 9 Monaten (Gruppe C) und 12 Monaten (Gruppe D).

Der Unterschied zwischen geimpften (Impflingen) und ungeimpften Tauben (Kontrollt.) ist signifikant wenn $p \leq 0,05$.

4.2.5.2. Statistische Auswertung des Vergleichs der Virusausscheidung von geimpften und ungeimpften Tauben nach APMV-1 Belastungsinfektion

Eine Überprüfung, ob die mittels Kloakentupfer gemessene Virusausscheidung geimpfter Tauben signifikant geringer war gegenüber den ungeimpften Tauben, lässt sich nur an den Ergebnissen vom 7.Tg.p.ch. durchführen. Da am 14. und am 21.Tg.p.ch. auch bei den ungeimpften Tauben keine Virusausscheidung mehr feststellbar war, kann sich hier auch kein Unterschied zu den geimpften Tauben

ergeben. Für den Vergleich der Ergebnisse vom 7.Tg.p.ch. errechnet sich ein χ^2 -Wert von 31,326 und mit $p = 0,001$ eine Signifikanz des Unterschiedes (Tab. 12).

Tab.12: Statistische Auswertung des Vergleichs der Virausscheidung geimpfter und ungeimpfter Tauben nach APMV-1 Belastungsinfektion

Virausscheidung / Kloakentupfer					
Tg.p.ch.	Tupfer	Impflinge	Kontrollt.	χ^2 -Wert	p
7	positiv	1	19	31,326	0,001
	negativ	51	17		
14	positiv	0	0	n.b.	n.b.
	negativ	52	20		
21	positiv	0	0	n.b.	n.b.
	negativ	52	20		

Auswertung mittels χ^2 -Test. Der Unterschied zwischen geimpften (Impflingen) und ungeimpften Tauben (Kontrollt.) ist signifikant wenn $p \leq 0,05$.
n.b. = nicht zu berechnen

4.2.5.3. Statistische Auswertung des Vergleichs histopathologischer Veränderungen geimpfter und ungeimpfter Tauben nach APMV-1 Belastungsinfektion

Für die statistische Überprüfung, ob die Unterschiede bei der Betrachtung der histopathologischen Befunde von ungeimpften und geimpften Tauben nach APMV-1 Belastungsinfektion signifikant sind, wurden vier Merkmale generiert. Neben der Bewertung 0 für das Fehlen einer Veränderung, wurden geringgradige (1+), mittelgradige (2+) und hochgradige (3+) Veränderungen eines Organs unterschieden. Dadurch konnte nicht nur das Vorliegen einer histopathologischen Veränderung als solches verglichen werden, sondern auch der unterschiedliche Ausprägungsgrad miteinbezogen werden. Deutlich wird dies bei Betrachtung der interstitiellen Nephritis (Tab. 13-A). Dieser Befund konnte sowohl bei ungeimpften als auch bei geimpften Tauben gestellt werden, bei geimpften Tieren allerdings in überwiegend geringgradiger Ausprägung. Dagegen zeigten mehr als die Hälfte der ungeimpften Tauben eine mittel-

oder hochgradige Ausprägung. Der χ^2 -Test ergab hier sowohl für alle Gruppen insgesamt als auch für jede Altersgruppe im einzelnen eine Signifikanz des Unterschieds. Ähnlich verhält es sich bezüglich der nicht-eitrigen Polyserositis (Tab. 13-F). Für die Betrachtung der Gruppen insgesamt ergibt sich mit einem Wert für p von 0,001 eine Signifikanz des Unterschiedes zwischen geimpften und ungeimpften Tauben. Auch für die einzelnen Altersgruppen B, C und D nimmt p Werte $\leq 0,05$ an, obwohl in der Gruppe B acht geimpfte Tauben ebenfalls eine geringgradige nicht-eitrige Serositis aufwiesen. In dieser Gruppe zeigten vier ungeimpfte Tauben eine mittelgradige Ausprägung der Polyserositis und so errechnet sich ein signifikanter Unterschied auch für diese Gruppe. Bei der Altersgruppe A, die 3 Monate nach Impfung der Belastungsinfektion ausgesetzt wurde, ist dies aufgrund der geringen Häufigkeit des Befundes bei den ungeimpften Tauben nicht der Fall. Bezüglich der monozytären Infiltrate im Pankreas errechnen sich signifikante Unterschiede zwischen geimpften und ungeimpften Tauben für alle Gruppen insgesamt und für die Gruppen B und D (Tab. 13-D). In der Gruppe A wurde der Befund fünfmal bei ungeimpften und nur einmal bei geimpften Tauben gestellt. Jedoch ergibt die χ^2 -Wert Berechnung keinen signifikanten Unterschied. Ebenso verhält es sich in der Gruppe C, in der der Befund nur bei drei ungeimpften Tauben feststellbar war, jedoch bei keiner geimpften. Bei dem zweiten histopathologischen Befund am Pankreas, den Nekrosen, spiegelt die χ^2 -Wert Berechnung den Umstand wider, dass dieser Befund in der Gruppe D am häufigsten angesprochen wurde (Tab. 13-E). Nur für die Gruppe D sowie für alle Gruppen insgesamt, lässt sich die Signifikanz des Unterschiedes berechnen und p nimmt Werte $\leq 0,05$ an. Die monozytären Infiltrate in der Nebenniere ergeben in der Berechnung eine Signifikanz des Unterschiedes nur für die Gruppe B und für alle Gruppen insgesamt (Tab. 13-B). Die Nekrosen der Nebenniere entziehen sich weitestgehend der Berechnung, da der Befund in den Gruppen A, B und C weder bei geimpften noch bei ungeimpften Tauben festgestellt wurde (Tab. 13-C). Für die betroffene Gruppe D (Belastungsinfektion 12 Monate nach der Impfung) sowie für alle Gruppen insgesamt ergibt sich keine Signifikanz des Unterschiedes. Die Überprüfung einer Signifikanz eines Unterschiedes bezüglich histopathologischer Befunde an der Leber, ergibt dreimal Werte für $p \leq 0,05$ (Tab. 13-G und H): Bei den monozytären Infiltraten in der

Leber für die Gruppe A und bei degenerativen Veränderungen für die Gruppe B und für alle Gruppen insgesamt. Dabei war der χ^2 -Test viermal nicht berechenbar.

Insgesamt bleibt bei der statistischen Auswertung des χ^2 -Testes zu betonen, dass die Ergebnisse aufgrund der zum Teil geringen Gruppengrößen vorsichtig zu bewerten sind.

Tab. 13 (A-H): Statistische Auswertung des Vergleichs der histopathologischen Befunde geimpfter und ungeimpfter Tauben nach APMV-1 Belastungsinfektion

Tab. 13-A: Interstitielle Nephritis

Niere	interst. Nephritis	0	1+	2+	3+	χ^2 -Wert	p
Gesamt	Impflinge	14	38	1	0	39,087	0,001
	Kontrolltiere	2	14	16	7		
Gruppe A	Impflinge	1	11	0	0	6,341	0,042
	Kontrolltiere	0	6	4	0		
Gruppe B	Impflinge	6	10	0	0	13,884	0,003
	Kontrolltiere	2	2	6	1		
Gruppe C	Impflinge	3	5	1	0	9,566	0,023
	Kontrolltiere	0	1	3	3		
Gruppe D	Impflinge	3	12	0	0	11,540	0,009
	Kontrolltiere	0	5	3	3		

Tab. 13-B: Monozytäre Infiltrate in der Nebenniere

Nebenniere	monozytäre Inf.	0	1+	2+	3+	x²-Wert	p
Gesamt	Impflinge	23	13	0	0	7,834	0,020
	Kontrolltiere	12	12	5	0		
Gruppe A	Impflinge	3	0	0	0	1,527	0,466
	Kontrolltiere	7	1	3	0		
Gruppe B	Impflinge	10	3	0	0	6,081	0,048
	Kontrolltiere	2	3	2	0		
Gruppe C	Impflinge	3	2	0	0	0,400	0,527
	Kontrolltiere	2	3	0	0		
Gruppe D	Impflinge	7	8	0	0	0,027	0,870
	Kontrolltiere	5	5	0	0		

Tab. 13-C: Nekrosen der Nebenniere

Nebenniere	Nekrosen	0	1+	2+	3+	x²-Wert	p
Gesamt	Impflinge	36	0	0	0	3,531	0,171
	Kontrolltiere	29	1	2	0		
Gruppe A	Impflinge	3	0	0	0	n.b.	n.b.
	Kontrolltiere	7	0	0	0		
Gruppe B	Impflinge	13	0	0	0	n.b.	n.b.
	Kontrolltiere	7	0	0	0		
Gruppe C	Impflinge	5	0	0	0	n.b.	n.b.
	Kontrolltiere	5	0	0	0		
Gruppe D	Impflinge	15	0	0	0	3,877	0,144
	Kontrolltiere	10	1	2	0		

Tab. 13-D: Monozytäre Infiltrate im Pankreas

Pankreas	monozytäre Inf.	0	1+	2+	3+	χ^2 -Wert	p
Gesamt	Impflinge	47	4	0	0	27,881	0,001
	Kontrolltiere	17	9	12	1		
Gruppe A	Impflinge	11	1	0	0	4,909	0,086
	Kontrolltiere	5	4	1	0		
Gruppe B	Impflinge	15	1	0	0	10,813	0,004
	Kontrolltiere	4	3	4	0		
Gruppe C	Impflinge	8	0	0	0	4,286	0,117
	Kontrolltiere	4	1	2	0		
Gruppe D	Impflinge	13	2	0	0	18,899	0,001
	Kontrolltiere	2	0	5	4		

Tab. 13-E: Nekrosen des Pankreas

Pankreas	Nekrosen	0	1+	2+	3+	χ^2 -Wert	p
Gesamt	Impflinge	51	0	0	0	25,447	0,001
	Kontrolltiere	23	3	7	6		
Gruppe A	Impflinge	12	0	0	0	3,147	0,37
	Kontrolltiere	10	1	1	1		
Gruppe B	Impflinge	16	0	0	0	2,644	0,267
	Kontrolltiere	11	1	0	1		
Gruppe C	Impflinge	8	0	0	0	2,015	0,365
	Kontrolltiere	7	1	1	0		
Gruppe D	Impflinge	15	0	0	0	9,087	0,011
	Kontrolltiere	11	0	5	4		

Tab. 13-F: Nicht-eitrige Polyserositis

Insgesamt	Serositis	0	1+	2+	3+	χ^2 -Wert	p
Gesamt	Impflinge	38	14	0	0	17,5	0,001
	Kontrolltiere	16	13	8	2		
Gruppe A	Impflinge	11	1	0	0	2,73	0,255
	Kontrolltiere	7	1	2	0		
Gruppe B	Impflinge	8	8	0	0	6,917	0,031
	Kontrolltiere	4	3	4	0		
Gruppe C	Impflinge	8	1	0	0	3,883	0,049
	Kontrolltiere	3	4	0	0		
Gruppe D	Impflinge	11	4	0	0	9,962	0,019
	Kontrolltiere	2	5	2	2		

Tab. 13-G: Monozytäre Infiltrate in der Leber

Leber	monozytäre Inf.	0	1+	2+	3+	χ^2 -Wert	p
Gesamt	Impflinge	1	35	16	0	6,378	0,095
	Kontrolltiere	1	20	13	4		
Gruppe A	Impflinge	0	7	5	0	7,875	0,005
	Kontrolltiere	0	0	9	0		
Gruppe B	Impflinge	1	4	11	0	7,256	0,064
	Kontrolltiere	1	2	4	4		
Gruppe C	Impflinge	0	9	0	0	n.b.	n.b.
	Kontrolltiere	0	7	0	0		
Gruppe D	Impflinge	0	15	0	0	n.b.	n.b.
	Kontrolltiere	0	11	0	0		

Tab. 13-H: Degenerative Veränderungen in der Leber

Leber	Degeneration	0	1+	2+	3+	x ² -Wert	p
Gesamt	Impflinge	49	2	1	0	10,128	0,006
	Kontrolltiere	28	10	0	0		
Gruppe A	Impflinge	12	0	0	0	2,947	0,086
	Kontrolltiere	7	2	0	0		
Gruppe B	Impflinge	13	2	1	0	10,276	0,006
	Kontrolltiere	3	8	0	0		
Gruppe C	Impflinge	9	0	0	0	n.b.	n.b.
	Kontrolltiere	7	0	0	0		
Gruppe D	Impflinge	15	0	0	0	n.b.	n.b.
	Kontrolltiere	11	0	0	0		

Legende zu Tab. 13 (A-H):

Auswertung mittels x²-Test zum Vergleich histopathologischer Befunde von geimpften und ungeimpften Tauben für alle Gruppen insgesamt sowie jeweils der einzelnen Altersgruppen.

Zeitpunkt der APMV-1 Belastungsinfektion nach 3 Monaten (Gruppe A), 6 Monaten (Gruppe B), 9 Monaten (Gruppe C) und 12 Monaten (Gruppe D).

Der Unterschied zwischen geimpften (Impflingen) und ungeimpften Tauben (Kontrollt.) ist signifikant wenn $p \leq 0,05$. n.b. = x²-Test ist nicht zu berechnen

5. Diskussion

Die vorgestellte Arbeit präsentiert Ergebnisse, die im Rahmen einer Impfstoffprüfung eines APMV-1 Impfstoffes für Tauben erarbeitet wurden. Die Wirksamkeitsprüfung erfolgte gemäß dem Europäischen Arzneibuch der Europäischen Gemeinschaft (Pharmeuropa, 1995). Diese Richtlinie sieht ungeimpfte Kontrolltiere vor, bei denen eine Belastungsinfektion die Erkrankung reproduziert. Bei den in dieser Studie experimentell APMV-1 infizierten Kontrolltauben konnten die klassischen neurologischen APMV-1 Krankheitsanzeichen der Taube reproduziert werden. Sie wurden dominiert von motorischen Ausfallserscheinungen der Flügel und äußerten sich klinisch in Form von reduzierter Flugfähigkeit, Flugunfähigkeit, Flügelzittern mit deutlichem Absinken der Handschwinge, Flügellähmung und Festliegen in Rückenlage. Insgesamt lag der Anteil kummulativ klinisch erkrankter Tauben in den unterschiedlichen Altersgruppen bei 60 bis 72,5 % bei einer Inkubationszeit von vier bis neun Tagen. Symptome einer klinischen Allgemeinerkrankung wie Apathie, verminderte Futteraufnahme oder erhöhte Wasseraufnahme, die als unspezifische Anfangssymptome der Infektion gelten (Kaleta, 1992) oder Todesfälle wurden nicht beobachtet. Dies ist bemerkenswert, da das verwendete APMV-1 Isolat mit einem ICPI von 1.15 als mesogen einzustufen ist und bei natürlich APMV-1 infizierten Tieren eine Mortalität von bis zu 40 % beobachtet wird. Die moderate klinische Manifestation nach experimenteller APMV-1 Infektion von Tauben deckt sich jedoch mit Beobachtungen anderer Studien. Mehrere Untersuchungen berichten von lediglich moderaten Erkrankungsraten und ausbleibenden oder nur vereinzelt Todesfällen nach experimenteller APMV-1 Infektion (Küchler, 1997; Meister, 1987; Polten, 1986). So erkrankten beispielsweise nach intramuskulärer Infektion von 10^6 GKIE₅₀ des Taubentyp APMV-1 Stammes 1829/83 maximal 50 % der Tiere (Warrlich, 1988). Dabei stellt die intramuskuläre Applikation zwar einen unnatürlichen Infektionsweg dar, ist aber als die stärkste experimentelle Belastungsform anzusehen. So zeigen Untersuchungen über unterschiedliche Infektionswege am Wirtssystem Huhn, dass es nur nach intramuskulärer Belastungsinfektion zu Todesfällen kam, nicht jedoch nach aerogener, oculärer oder nasaler Infektion (Beard and Easterday, 1967). Auch in Tauben erreichte eine experimentelle Taubentyp APMV-1 Infektion mittels eye-drop

oder oculo-nasaler Applikation, die eher dem natürlichen Infektionsweg entsprechen, nur geringe Erkrankungsraten bei fehlender Mortalität (Küchler, 1997; Barbezange und Jestin, 2002). Bei der Belastungsinfektion mittels „eye-drop“ Applikation von $10^{7,1}$ EID₅₀ des Taubentyp APMV-1 Stammes R72/95 zeigten acht von 14 Kontrolltauben lediglich Polyurie als Symptom der Infektion, jedoch keine zentralnervösen oder nervalen Symptome (Küchler, 1997). Infolge einer oculo-nasalen Belastungsinfektion, bei der 10^5 EID₅₀ des Taubentyp APMV-1 Stammes 99299 verwendet wurden, berichten Barbezange und Jestin (2002), dass nach der Belastungsinfektion innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von bis zu 31 Tagen weder klinische Symptome noch Todesfälle auftraten. Eine Blepharitis, die im Zusammenhang mit APMV-1 Infektionen bei Tauben beschrieben ist (Kaleta, 1992), trat nach der in der Literatur beschriebenen Infektion mittels Applikation des Virus ins Auge nicht auf. In der vorgestellten Studie wurde allerdings eine beidseitige Blepharitis diagnostiziert. Da die betroffene Taube öfters in Rückenlage vorgefunden wurde, ist als Ursache eine „mechanische“ Irritation anzunehmen.

Ob die klinische Manifestation durch eine höhere Virus-Inokulationsmenge zu steigern wäre, bleibt fraglich. So belegen Untersuchungen zur Dosis-Wirkungsbeziehung der experimentellen intramuskulären Taubentyp APMV-1 Infektion, dass sich die Morbiditätsrate mit höheren Virusdosen mitunter auf 100 % steigern lässt (Meister, 1987). Jedoch ließ sich dies nicht bei der Mortalitätsrate erreichen. Auch bei der höchsten Infektionsdosis von $1,0 \times 10^{8,3}$ EID₅₀ waren keine Todesfälle zu verzeichnen. Insgesamt ist daher nur von einer begrenzten Reproduzierbarkeit der Mortalität durch eine experimentelle APMV-1 Infektion in Tauben auszugehen. Für die Ausprägung der APMV-1 Infektion werden daher verschiedene zusätzliche Faktoren diskutiert. Dies deckt sich mit Beobachtungen aus der Praxis, bei der auch moderate Verläufe mit Morbiditätsraten zwischen 3 und 22 % und einer Mortalität von bis zu 5 % beschrieben werden (Schusser et al., 1984; Richter, 1983; Vindevogel und Duchatel, 1986). Eine mögliche Altersresistenz (Küchler, 1997; Erickson et al., 1980), die zu einer Abschwächung der klinischen Manifestation bei experimentellen APMV-1 Infektionen beitragen könnte, kann in dieser Studie nicht nachvollzogen werden. So stieg die Anzahl kumulativ erkrankter Tauben mit zunehmendem Alter der Tiere von 60 auf

72,5 % und der KPI von 0,41 bei der Gruppe A über 0,49 bzw. 0,53 bei den Gruppen B und C auf 0,58 bei den ältesten Tieren der Gruppe D. Andere mögliche Ursachen für die stärkere Ausprägung von Feldinfektionen wären belastende Begleitfaktoren, die den Gesundheitsstatus beeinflussen. Dazu zählen neben Haltungs- / bzw. Witterungsbedingungen mögliche unterschwellige parasitäre Infestationen (z.B. Trichomonadose, Kokzidiose) bzw. bakterielle oder virale Infektionen (z.B. Salmonellen, Chlamydien oder Adenoviren).

Um in Bezug auf die Tiere, die keine klinischen Anzeichen der APMV-1 Infektion zeigten, eine mögliche subklinische Infektion abzuklären, wurden für diese Studie als weitere Parameter der APMV-1 Infektion die histopathologischen Veränderungen berücksichtigt sowie die Virusausscheidung erfasst. Analog zu den klinisch neurologischen Symptomen im Bereich der Flügel wurden histologisch Veränderungen des Plexus brachialis beobachtet. Neben einer nicht-eitrigen Panmyelopathie trat eine nicht-eitrig Neuritis bzw. Ganglionitis auf. In den ventralen Hörnern der grauen Substanz des Rückenmarks liegen die somatomotorischen Kerngebiete, und die Innervation der Flügel erfolgt durch die Nerven des Plexus brachialis (Dubbeldam, 1993). Veränderungen in diesem Bereich können somit für die motorischen Ausfallserscheinungen verantwortlich gemacht werden (Fischer et al., 1986; Schusser et al., 1984). In diesen schwer geschädigten Gebieten des Rückenmarks war APMV-1 Antigen nachweisbar. Dabei zeigten sowohl vital erscheinende Neuronen als auch Bereiche mit vakuolärer Degeneration und mit Gliaproliferation sowie degenerierte Neuronen ein deutliches Signal. Somit konnte die APMV-1 Virusreplikation unmittelbar in Beziehung zu den histopathologischen Rückenmarks-Schädigungen gesetzt werden. Zudem weisen die immunhistochemischen Befunde auf eine mögliche verlängerte Virusreplikation im ZNS. So war in einer von vier untersuchten Proben vom 21.Tg.p.ch. Antigen darstellbar, eine Virusausscheidung war jedoch in Kloakentupfern zu diesem Zeitpunkt nicht mehr nachweisbar. Da auch bei Tieren ohne klinische Manifestation eine ausgeprägte nicht-eitrig Panmyelopathie nachweisbar war, weisen diese Befunde auf die Eignung der histopathologischen Untersuchung zum Nachweis einer subklinischen APMV-1 Infektion über einen Zeitraum von 21 Tagen hin. Spezifische Veränderungen konnten dementsprechend durch histologische Untersuchungen auch

in anderen Organen nachgewiesen werden. Neben einer nicht-eitrigen Polyserositis waren mononukleäre Infiltrate und Nekrosen im Pankreas und Nekrosen in der Nebenniere bei den APMV-1 infizierten Tieren nachzuweisen. Tauben der Negativkontrolle, die weder geimpft noch infiziert wurden, wiesen diese Veränderungen nicht auf. Die Befunde decken sich mit Beobachtungen anderer Autoren im Zusammenhang mit einer APMV-1 Infektion bei Tauben. So werden bei natürlich APMV-1 erkrankten Tauben Schwellung des Pankreas, eine grau-weiß fleckige Beschaffenheit des Pankreas oder auch nekrotische Veränderungen des Pankreas beschrieben (Fischer, 1986; Gylstorff und Grimm, 1998; Gerlach 1994, Schusser et al., 1984). Von Schusser et al. (1984) wird im Zusammenhang mit spontanen APMV-1 Erkrankungen in Taubenbeständen in Österreich eine Pankreasschwellung und histologisch eine interstitielle Pankreatitis beschrieben. Auch bei Untersuchungen an 131 spontan APMV-1 erkrankten Tauben in Deutschland zeigten einige Tiere bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung eine grau-weiß-fleckige Beschaffenheit des Pankreas, und histopathologisch wiesen 60 % der untersuchten Tiere interstitielle mononukleäre Infiltrate im Pankreas auf. Lymphoplasmatische Infiltrate und Nekrosen im Pankreasparenchym werden auch in einem Fallreport über einen Ausbruch einer APMV-1 Infektion bei Rassetauben in Kalifornien beschrieben und zusammen mit histopathologischen Befunden am ZNS und einer lymphoplasmatischen, interstitiellen Nephritis als typisch und konsistent für die APMV-1 Infektion bewertet (Barton und Bickford, 1991).

Neu und in der Literatur bisher nicht erwähnt ist der beobachtete Tropismus zu den serösen Überzügen der Abdominalorgane. Eine nicht-eitrige Polyserositis zeigten mit 59 % über die Hälfte der ungeimpften APMV-1 infizierten Tauben. Diese bleibt makroskopisch überwiegend unauffällig. Lediglich bei einer Taube der Gruppe D wurde eine pathologisch-anatomisch sichtbare Serositis der Abdominalorgane in Form von hellen, schmierigen Belägen und einer geringen Menge an fadenziehender Flüssigkeit im Abdominalraum festgestellt. Histopathologisch bestätigte sich bei dieser Taube eine nicht-eitrige Polyserositis.

Bei drei der ältesten Tauben aus der Gruppe D traten in der Nebenniere Parenchymnekrosen auf. Eine morphologische Zuordnung zu den Interrenalzellen oder

den Adrenalzellen war bei den Tauben jedoch nicht möglich. Aufgrund des Tropismus von APMV-1 zum Nervengewebe wäre eine Schädigung der Adrenalzellen, die funktionell dem Nebennierenmark entsprechen und die aus der Neuralleiste abstammen (Sinowatz und Frewein, 1992; Harvey et. al, 1986), anzunehmen.

Als unspezifisch erwiesen sich die mononukleären Infiltrate in der Nebenniere sowie die Leberveränderungen, da diese ebenfalls bei den Tauben der Negativkontrolle nachgewiesen wurden. In Bezug auf die Leber gelten Infiltrate von mononukleären Zellen im Parenchym allgemein bei der Klasse der Vögel aufgrund des regelmässigen Auftretens als „normaler“ Zustand (Riddell, 1987). Eine mögliche Erklärung für das Auftreten dieser Befunde auch bei den Tauben der Negativkontrolle als allgemeiner Hintergrund an histopathologischen Veränderungen, ist die alltägliche Auseinandersetzung mit nicht pathogenen Keimen. In Anbetracht des Umstandes, dass Tauben keine Lymphfollikel als vorgeschaltete Immunabwehr besitzen (Waibl und Sinowatz, 1992; Glick, 1986), könnten solche alltäglichen, unterschweligen Infektionen zu diesen Hintergrund-Befunden führen. Das Auftreten von Entzündungszellen in Organen von gesunden Tieren erschwert ebenfalls die Beurteilung der in der Literatur im Zusammenhang mit APMV-1 Infektionen beschriebenen nicht-eitrigen, interstitiellen Nephritis (Küchler, 1997; Richter et al., 1983; Schusser et al., 1984; Fischer, 1986). So waren mononukleäre interstitielle Infiltrate sowohl bei den APMV-1 infizierten als auch bei den Tauben der Negativkontrolle in vergleichbarer Häufigkeit nachweisbar. Allerdings war die Ausprägung bei den Tieren der Negativkontrolle deutlich schwächer. Um diese Unterschiede erfassen zu können und eine Spezifität für die APMV-1 Infektion verifizieren zu können, wurde ein quantitativer Vergleich mit Hilfe des Histologischen Pathogenitätsindex durchgeführt. Nach diesem Index ist die interstitielle Nephritis bei den ungeimpften Kontrolltauben mit einem HPI von 1,4 bis 2,286 gegenüber den Tauben der Negativkontrolle (HPI: 0,714) stärker ausgebildet. Die Signifikanz des Unterschiedes, der sich bei vergleichbarer Häufigkeit des Befundes auf den stärkeren Ausprägungsgrad bezieht, bestätigt sich in der statistischen Überprüfung. Damit wird auch die mittel- bis hochgradig ausgeprägte interstitielle Nephritis als spezifisch für die hier gesetzte experimentelle APMV-1 Infektion bewertet. Parenchymnekrosen des Pankreas wurden bei 41 % der infizierten Tiere mit einem HPI

von 0,364 bis 2,0 festgestellt, und das Auftreten mononukleärer Infiltrate wurde bei 56 % der ungeimpften Tauben mit einem HPI von 0,6 bis 1,273 nachgewiesen. Auch die nicht-eitrige Polyserositis zeigten mit 59 % über die Hälfte der ungeimpften APMV-1 infizierten Tauben mit einem HPI von 0,5 bis 1,364. Dagegen zeigte keine Taube der Negativkontrolle diese Befunde, und der HPI betrug folglich jeweils 0. Somit können die oben aufgeführten histopathologischen Veränderungen als spezifisch für die hier gesetzte experimentelle APMV-1 Infektion gewertet werden. Ob auch die Parenchymnekrosen in den Nebennieren spezifisch durch die APMV-1 Infektion verursacht worden sind, bleibt trotz eines HPI von 0,5 bei den ungeimpften Tauben im Vergleich zu 0 bei den Tauben der Negativkontrolle fraglich, da sie insgesamt bei lediglich drei Tieren beobachtet worden sind. Es erscheint aber ratsam, die Nebenniere in zukünftigen diagnostischen Überprüfungen der APMV-1 Infektion zu berücksichtigen.

Insgesamt belegen die histopathologischen Befunde das Vorliegen einer generalisierten Infektion, die aber bei 27,5 bis 40 % der Tiere subklinisch geblieben ist. Dabei sind bezüglich Qualität und Stärke dieser histopathologischen Veränderungen keine Unterschiede zwischen klinisch manifest erkrankten und klinisch inapparent infizierten Tieren auszumachen. Vielmehr hat die histopathologische Untersuchung gezeigt, dass es auch bei den Tauben, die klinisch keine Symptome zeigten, in Folge der APMV-1 Infektion zu einer generalisierten Infektion gekommen ist. In erster Linie ist dies an den für die APMV-1 Infektion charakteristischen histopathologischen Veränderungen am Nervengewebe festzumachen. In dieser Untersuchung konnte aber demonstriert werden, dass sich auch die Manifestation an den serösen Überzügen der Organe, des Pankreas, der Nebenniere und der Niere bei den klinisch unauffälligen Tieren nicht von den klinisch apparent APMV-1 infizierten Tieren unterscheiden lässt.

Überprüfung der Schutzwirkung der Impfung:

Eine Impfung soll einen Schutz des vakzinierten Tieres bezüglich der Vermehrung und Ausbreitung des Erregers und seiner Schädwirkungen erzeugen (Gedek et al., 1993). Um eine belastungsfähige Immunität nachzuweisen, wird nach dem Europäischen Arzneibuch (Pharmeuropa, 1995) gefordert, dass weniger als 10% der geimpften Tiere klinisch erkranken. In den vorgestellten Untersuchungen traten bei den geimpften Tauben insgesamt nur bei einem Tier der Gruppe D, die zwölf Monate nach der Impfung der Belastungsinfektion ausgesetzt wurde, klinische Krankheitsanzeichen einer APMV-1 Infektion auf. Der KPI der Gruppe betrug 0,04 und war damit signifikant niedriger als bei ungeimpften Tauben. Der prozentuale Anteil der kummulativ erkrankten Tauben lag bei 7,7 %. Wie die Untersuchungen an der Kontrollgruppe belegen, ist jedoch anhand fehlender klinischer Krankheitsanzeichen eine sichere Aussage über den APMV-1 Infektionsstatus und damit auch über die Schutzwirkung der Impfung nicht möglich. Dafür ist die Betrachtung der histopathologischen Befunde im Vergleich mit der Manifestation der APMV-1 Infektion bei den ungeimpften Kontrolltauben heranzuziehen. Die histopathologischen Befunde bei den geimpften Tauben belegen, dass durch die Schutzimpfung eine Reduktion der APMV-1 induzierten Veränderungen an den inneren Organen erreicht wird. Die Betrachtung des HPI zeigt, dass sie gegenüber den ungeimpften Tauben vor den spezifischen Veränderungen am Pankreas (Pankreasnekrosen, mononukleäre Infiltrate) sowie an der Niere geschützt und diese Unterschiede hoch signifikant waren. Die geimpften Tauben zeigten keine Parenchymnekrosen und nur in sehr geringem Umfang mononukleäre Infiltrate im Pankreas (HPI geimpfte Tauben: 0,0 bis 0,083; HPI ungeimpfte Tauben: 0,6 bis 1,273). Die Ausprägung der interstitiellen Nephritis ist im Vergleich zu den ungeimpften bei den geimpften Tauben geringer und befindet sich auf einem Niveau mit den Tauben der Negativkontrolle (HPI geimpfte Tauben: 0,625 bis 0,917; HPI ungeimpfte Tauben: 1,4 bis 2,286; HPI Tauben der Negativkontrolle: 0,714). Trotz der statistisch signifikanten Reduktion der histopathologischen Manifestation zeigen die Untersuchungen aber auch, dass es bei den geimpften Tauben zu einer generalisierten Infektion kommt. Darauf deuten die Befunde einer nicht-eitrigen Serositis, die bei 14 von 52 APMV-1 geimpften Tieren auftrat und in zwei Fällen sogar

als Polyserositis nachweisbar war. Jedoch war der HPI in Bezug auf Häufigkeit und Ausprägungsgrad statistisch signifikant niedriger als bei den ungeimpften Tauben (HPI geimpfte Tauben: 0,083 bis 0,5; HPI ungeimpfte Kontrolltauben: 0,5 bis 1,364).

Eine Impfung soll die Ausbreitung der Infektion minimieren. In diesem Sinne konnte eine deutliche Reduktion der Virusausscheidung bei den geimpften Tauben aufgezeigt werden. Während bei 19 der 36 ungeimpften Kontrolltiere Virus nach der experimentellen APMV-1 Infektion aus Kloakentupfern isoliert wurde, war bei den geimpften Tieren Virus nur bei einer von 52 Tauben nachweisbar. Dieser deutliche Unterschied zwischen geimpften und ungeimpften Tauben ist signifikant.

Unter Berücksichtigung der klinischen und histologischen Befunde sowie der Ergebnisse der Virusisolierung konnte durch diese Studie eine Schutzwirkung bis zwölf Monate nach der Impfung nachgewiesen werden. Damit entspricht der mit einem lentogenen Taubentyp APMV-1 Stamm hergestellte Impfstoff in der Schutzwirkung einer Vakzine auf der Basis eines velogenen Taubentyp APMV-1 Stammes (pigeon/munich/14/83 P₃ g/1) (Knoll, 1986). Da seit dem 1. Januar 1995 APMV-1-Impfstoffe nur noch mit einem Originalsaatvirus hergestellt werden dürfen, dessen ICPI unterhalb von 0,7 liegt, stellt der in dieser Arbeit getestete Impfstoff den einzigen Taubenimpfstoff dar, der auf einem homologen Impfstamm basiert (Entscheidung der Europäischen Kommission vom 8. Februar 1993 über die Kriterien für APMV-1 Impfstoffe (93/152/EWG)). Berücksichtigt man die nachweisbaren antigenetischen Unterschiede des Taubentyp APMV-1 gegenüber Hühnertyp APMV-1 Stämmen im Bereich des für die Schutzwirkung wichtigen HN-Hüllglykoproteines, stellt die Verwendung einer homologen Vakzine eine Optimierung der Impfung dar. Die Verfügbarkeit eines homologen Impfstoffes leistet somit einen wichtigen Beitrag für die APMV-1 Impfprophylaxe bei Tauben.

6. Zusammenfassung

In der vorgelegten Arbeit wurde ein Tauben APMV-1 Impfstoff (Paramyxovac[®], Fa. Intervet), der auf einem schwach virulenten homologen Tauben APMV-1 Stamm basiert, auf seine Schutzwirkung nach drei, sechs, neun und zwölf Monaten getestet. Anhand der ungeimpften Kontrolltiere wurde die Manifestation der experimentellen APMV-1 Infektion bei Tauben untersucht, unter besonderer Berücksichtigung der feingeweblichen Veränderungen. Bei den ungeimpften Kontrolltauben wurden durch die Infektion ($10^{5,5}$ EID₅₀, i.m.) klassische neurologische APMV-1 Krankheitsanzeichen in Form von motorischen Ausfallserscheinungen der Flügel induziert. Diese manifestierten sich in Form von reduzierter Flugfähigkeit, Flugunfähigkeit, Flügelzittern mit deutlichem Absinken der Handschwinge, bis hin zur Flügelähmung und Festliegen in Rückenlage. Die Morbidität betrug bei den beiden jüngeren Altersgruppen, die im Alter von 4,5 (Gr.A, n = 10) und 7,5 Monaten (Gr.B, n = 11) infiziert wurden, 60 % bzw. 63,5 % und stieg auf 71,5 % (Gr.C, 10,5 Monate alt, n = 7) bzw. 72,5 % bei den ältesten Tauben (Gr.D, 13,5 Monate alt, n = 11) an. Todesfälle traten innerhalb der 21-tägigen Beobachtungszeit jedoch nicht auf. Histologisch war mit dem siebten Tag im Rückenmark im Bereich des Plexus lumbosacralis eine nicht-eitrige Panmyelopathie sowie eine nicht-eitrige Neuritis bzw. Ganglionitis nachweisbar. In den geschädigten Gebieten des Rückenmarks wurde immunhistochemisch APMV-1 Antigen sieben, acht und neun Tage nach der Infektion bei jeweils zwei untersuchten Tauben nachgewiesen. Bei vier Tauben, die am 21.Tag nach der Infektion untersucht wurden und von denen zwei keine klinische Symptomatik gezeigt hatten, war bei einer Taube mit neurologischer Symptomatik APMV Antigen nachweisbar. Auch die histopathologischen Befunde der inneren Organe wies auf eine generalisierte Infektion hin. Neben einer nicht-eitrigen Pankreatitis, die bei 22 von 39 der Tauben auftrat, wurden bei 16 von 39 Tieren Nekrosen des Pankreasparenchyms und bei 3 von 29 Nekrosen des Nebennierenparenchyms beobachtet. Gegenüber uninfizierten Negativ-Kontrolltauben, bei denen in der Niere eine geringgradige Infiltration mit mononukleären Entzündungszellen zu beobachten war, trat bei 37 von 39 der experimentell infizierten Tauben eine mittel- bis hochgradige nicht-eitrige, interstitielle Nephritis auf. Für den quantitativen Vergleich zwischen den unterschiedlichen Gruppen wurde ein Histologischer Pathogenitätsindex (HPI)

herangezogen, der neben der relativen Häufigkeit auch die Stärke des Ausprägungsgrades berücksichtigt. Nach diesem Index ist die interstitielle Nephritis bei den ungeimpften Kontrolltauben mit einem HPI von bis zu 2,286 (Gr.A: 1,4, Gr.B: 1,545, Gr.C: 2,286 und Gr.D: 1,818) gegenüber den Tauben der Negativkontrolle (HPI: 0,714) stärker ausgebildet. Neu im Zusammenhang mit der APMV-1 Infektion der Taube ist der Befund einer nicht-eitrigen Polyserositis, der bei 23 von 39 der APMV-1 infizierten Kontrolltauben erhoben wurde.

Bei den geimpften Tauben wurde nach Belastungsinfektion, die drei (Gr.A, n = 12), sechs (Gr.B, n = 16) und neun Monate (Gr.C, n = 9) nach der Impfung erfolgte, keine klinischen Symptomatik beobachtet. In der Gruppe D, die zwölf Monate nach der Impfung infiziert wurde, zeigte eine von 15 Taube reduzierte Flugfähigkeit bis Flugunfähigkeit, so dass der prozentuale Anteil der kummulativ erkrankten Tauben in dieser Gruppe bei 7,7 % lag. Histologisch konnte aufgezeigt werden, dass die Impfung eine Reduktion der APMV-1 induzierten Veränderungen an den inneren Organen vermittelt. So trat zwar bei 14 von 52 APMV-1 geimpften Tieren eine nicht-eitrige Serositis auf, der HPI weist jedoch in Bezug auf Häufigkeit und Ausprägungsgrad eine statistisch signifikant geringere Ausprägung ($p = 0,001$) gegenüber den ungeimpften Tauben nach (HPI geimpfte Tauben: 0,083 bis 0,5; HPI ungeimpfte Kontrolltauben: 0,5 bis 1,364). Durch Betrachtung des HPI konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die geimpften gegenüber den ungeimpften Tauben vor spezifischen Veränderungen am Pankreas (Pankreasnekrosen, mononukleäre Infiltrate) sowie an der Niere geschützt waren. Bei den geimpften Tauben wurden keine Parenchymnekrosen nachgewiesen und mononukleäre Infiltrate im Pankreas waren nur im sehr geringen Umfang vorzufinden (HPI geimpfte Tauben: 0,0 bis 0,083; HPI ungeimpfte Tauben: 0,6 bis 1,273). Die Ausprägung der interstitiellen Nephritis bei den geimpften Tauben ist im Vergleich zu den ungeimpften geringer und befindet sich auf einem Niveau mit den ungeimpften und uninfizierten Negativ-Kontrolltauben (HPI geimpfte Tauben: 0,625 bis 0,917; HPI ungeimpfte Tauben: 1,4 bis 2,286; HPI Negativ-Kontrolltauben: 0,714). Neben der klinischen Schutzwirkung durch die Impfung wurde ebenfalls die Reduzierung der Erregerausbreitung nachgewiesen. Die ungeimpften Kontrolltauben zeigten eine zeitlich begrenzte Virusausscheidung mit dem Kot bis zum 11.Tag nach

der Infektion bei insgesamt 19 der 36 Proben. Dagegen war eine Virusausscheidung bei den geimpften Tieren nur bei einer von 52 Taube nachweisbar und durch die Impfung wurde somit eine deutliche Reduktion der Virusausscheidung erreicht.

Die Ergebnisse der, für die Impfstoffprüfung vorgeschriebenen, Belastungsinfektion belegen die Wirksamkeit der homologen APMV-1 Vakzine für Tauben. Die Impfung bewirkte einen Schutz vor dem klinischen Krankheitsbild der Paramyxovirose. Des weiteren erwiesen sich vakzinierte Tiere anhand der beobachteten Reduzierung von APMV-1 induzierten, histopathologischen Veränderungen als geschützt gegenüber der Ausbildung einer subklinischen APMV-1 Infektion. Neben diesem Schutz der vakzinierten Tieres vor den Schadwirkungen der Infektion wird durch die Impfung auch eine reduzierte Virusausscheidung und damit eine verminderte Ausbreitung des Erregers erreicht.

7. Summary

Efficacy of an homologous pigeon paramyxovirus vaccine based on a low virulent strain (P201)

In this study efficacy of the pigeon APMV-1 vaccine (Nobilis® Paramyxo P201, Intervet) were tested over the period of three, six, nine and twelve months. This vaccine is based on a low virulent, homologous pigeon APMV-1 strain. By using non-vaccinated birds the manifestation of experimental APMV-1 infection was analysed with particular interest in histo-pathological alterations. The classical neurological APMV-1 signs of loss of motoric flight capability was induced in the test birds by infecting them intramuscular with a dose of $10^{5.5}$ EID₅₀. Clinical Manifestation became evident by reduced flight ability, complete loss of flight ability, wing trembling with significant subsidence of its distal part as well as wing paralysis and complete immobility, finally lying in the back position.

Morbidity in the two younger groups of birds which were infected at the age of 4.5 months (Group A, n = 10) and 7,5 months (Group B, n=11) was 60 % and 63,5 % respectively, rising to 71,5 % in the Group C (10.5 months old, n= 7) and 72,5 % in the group of oldest birds (Group D, 13.5 months old, n=11). Mortality was however not observed in the 21 day observation period. On day seven a non-suppurative panmyelopathy as well as a non- suppurative neuritis / ganglionitis could be observed histologically in the *Plexus lumbosacralis* area of the spinal cord. In each of two birds examined after seven, eight and nine days post infection immunohistochemical APMV-1 antigen was detected in the affected areas. In pigeons examined 21 days post infection, two of which showed no clinical symptoms, APMV antigen was present in 1 of 4 animals. This particular APMV-antigen positive pigeon had obvious neurological symptoms. The histo-pathological findings of the inner organs indicated a general infection. Apart from a non-suppurative pancreatitis in 22 of 39 pigeons it was observed that 16 of the 39 birds had necrosis of the pancreas and 3 of the 29 birds were affected by necrosis of the adrenal gland.

In comparison to non-infected negative control birds, in which a low-level infiltration of mononuclear inflammatory cells could be observed, 37 of the 39 experimentally infected birds were affected by a medium to high level non-suppurative interstitial nephritis.

For quantitative comparison purposes between the various groups a histological pathogenitential index (HPI) has been established, which not only takes into account the frequency but also the level of strength of the alteration. According to this index the interstitial nephritis was in the case of unvaccinated pigeons with a HPI of up to 2.286 (Gr.A: 1,4, Gr.B: 1,545, Gr.C: 2,286 and Gr.D: 1,818) as opposed to negative control pigeons with an HPI of 0,714 far more developed.

It is a new finding that in connection with APMV-1 infection of pigeons a non-suppurative polyserositis could be ascertained in 23 of the 39 APMV-1 infected pigeons examined.

In the vaccinated pigeons no clinical symptoms were observed after being infected three months (Gr.A, n = 12), six months (Gr.B, n = 16) and nine months (Gr.C, n = 9) later. The birds in Group D which were infected 12 months after vaccination, 1 of 15 showed reduced ability or total flight disability and so reflected 7,7 % of the total number of pigeons. It could be histologically demonstrated that vaccination reduced the affects of APMV-1 infection of the inner organs. Although 14 of the 52 APMV-1 infected birds revealed a non-suppurative serositis the HPI reflects a statistically significant lower frequency and level of illness ($p=0.001$) in birds vaccinated in comparison with non-vaccinated birds (HPI-vaccinated pigeons: 0,083 to 0,5; HPI-non-vaccinated pigeons: 0,5 to 1,364). By HPI it could also be verified that vaccinated birds were protected from specific changes to the pancreas (necrosis, mononuclear infiltrations) as well as the kidneys. In vaccinated birds no necrosis was present and only minimal infiltration with mononuclear cells were observed (HPI-vaccinated pigeons: 0,0 to 0,083; HPI-non-vaccinated pigeons: 0,6 to 1,273).

Compared to non-vaccinated pigeons the level of the interstitial nephritis is considerably lower in vaccinated birds and is at a similar level to the non-vaccinated and non-infected negative control pigeons (HPI-vaccinated pigeons: 0,625 to 0,917; HPI-non-vaccinated pigeons: 1,4 to 2,286; HPI-negative control pigeons: 0,714). In addition to the clinical manifestation, vaccination also reduced the spread of infection.

The non-vaccinated pigeons showed virus excretion in the faeces of up to 11 days after infection in 19 of the 36 samples. In contrast only 1 of the 52 vaccinated birds shed virus via it's faeces after infection demonstrating that vaccination achieves a significant reduction of virus excretion.

The results of the experimental infection, required for the approval, indicate that the homologous APMV-1 vaccine for pigeons is effective. Vaccination achieves protection from clinical apparent paramyxovirose. In addition vaccinated birds proved to be more resilient to a subclinical APMV-1 infection on account of the reduced APMV-1 induced, histopathological changes. Apart from the protection against infection provided for the birds the vaccination also achieves a reduced virus excretion and thus a reduction in the spread of the virus.

8. Literaturverzeichnis

1. 92/66/EWG. Richtlinie des Rates der Europäischen Gemeinschaft vom 14. Juli 1992 über Gemeinschaftsmaßnahmen zur Bekämpfung der Newcastle-Krankheit. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften 1992;L260:1-20.
2. AL FALLUJI MM, AL SHEIKHLY F, TANTAWI HH. Viral encephalomyelitis of pigeons: Pathology and virus isolation. *Avian Diseases* 1979;23:77.
3. ALDOUS EW, ALEXANDER DJ. Technical review: detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). *Avian Pathology* 2001;30:117-128
4. ALEXANDER DJ, ALLAN WH, SILLARS T. Isolation of myxoviruses from dead birds arriving at Heathrow airport, London. *J.Hyg., Camb.* 1977;79:243-247.
5. ALEXANDER DJ, PARSONS G, MARSHALL R. Infection of fowls with Newcastle disease virus by food contaminated with pigeon faeces. *Veterinary Record* 1984;115:601-602.
6. ALEXANDER DJ, RUSSELL PH, PARSONS G, ABU ELZEIN EM, BALLOUGH A, CERNIK K, ENGSTROM B, FEVEREIRO M, FLEURY HJA, GUITTET M, KALETA EF, KIHM U, KÖSTERS J, LOMNICZI B, MEISTER J, MEULEMANS G, NEROME K, PETEK M, POKOMUNSKI S, POLTEN B, PRIP M, RICHTER R. Antigenic and biological characterization of avian paramyxovirus type 1 isolates from pigeons-an international collaborative study. *Avian Pathology* 1985;14:365-376.
7. ALEXANDER DJ, WILSON GWC, RUSSELL PH, LISTER SA, PARSONS G. Newcastle disease outbreaks in fowl in Great Britain during 1984. *Veterinary Record* 1985;117:429-434.
8. ALEXANDER DJ, PARSONS G. Pathogenicity for chickens of avian paramyxovirus type 1 isolates obtained from pigeons in Great Britain during 1983-85. *Avian Pathology* 1986;15:487-493.
9. ALEXANDER DJ, MANVELL RJ, KEMP PA, PARSONS G, COLLINS MS, BROCKMAN S, RUSSELL PH, LISTER SA. Use of monoclonal antibodies in the

- characterization of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates submitted to an international reference laboratory. *Avian Pathology* 1987;16:553-565.
10. ALEXANDER DJ. Newcastle disease and other avian *paramyxoviridae* infections. In: *Diseases of Poultry*. Eds.: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald L, Saif YM. 10 ed. Ames, IA: Iowa State University Press, 1997:541-569.
 11. ALEXANDER DJ, JONES RC. Paramyxoviridae. In: *Poultry Diseases*. Eds: Alexander DJ, Pattison M, Faragher T. 4 ed. London: W.B.Saunders, 2001:257-268.
 12. BALLAGI-PORDÁNY A, WEHMANN E, HERCZEG J, BELÀK S, LOMNICZI B. Identification and grouping of Newcastle disease virus strains by restriction site analysis of a region from the F gene. *Arch.Virol.* 1996;141:243-261.
 13. BARBEZANGE C, JESTIN V. Development of a RT-nested PCR test detecting pigeon Paramyxovirus-1 directly from organs of infected animals. *J Virol Methods* 2002;106:197-207.
 14. BARTON JT, BICKFORD AA, COOPER GL, CHARLTON BR, CARDONA CJ. Avian paramyxovirus type 1 infections in racing pigeons in California. I. Clinical signs, pathology and serology. *Avian Diseases* 1991;36:463-468.
 15. BEARD CW, EASTERDAY BC. The influence of the route of administration of Newcastle disease virus on host response. III. Immunofluorescent and histopathological studies. *J.Infect.Dis.* 1967;117:66-70.
 16. BEARD CW, HANSON RP. Newcastle disease. In: Hofstad MS, Barnes HJ, Calnek BW, Reid WM, Yoder HW, eds. *Diseases of poultry*. 8 ed. Ames, IA: Iowa State University Press, 1984:452-470.
 17. CAVANAGH D. Nucleic acid probes in the diagnosis and study of avian nononcogenic viral disease. In: *Nononcogenic avian viruses*. Ed.: Pandey R. *Prog. Vet. Microbiol. Immunol.* Basel: Karger 2001;5:1-15.
 18. COLLINS MS, ALEXANDER DJ, BROCKMAN S, KEMP PA, MANVELL RJ. Evaluation of mouse monoclonal antibodies raised against an isolate of the variant

- avian paramyxovirus type 1 responsible for the current panzootic in pigeons. Arch.Virol. 1989;104:53-61.
19. COLLINS MS, BASHIRUDDIN JB, ALEXANDER DJ. Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity. Arch.Virol. 1993;128:363-370.
 20. COLLINS MS, STRONG I, ALEXANDER DJ. Evaluation of the molecular basis of pathogenicity of the variant Newcastle disease viruses termed "pigeon PMV-1 viruses". Arch.Virol. 1994;134:403-411.
 21. DE-LEEuw OS, PEETERS B. Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: Evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae. J.Gen.Virol. 1999;80:131-136.
 22. DOYLE TM. A hitherto unrecorded disease of fowls due to a filter passing virus. J.Comp.Path.Therap 1927;40:144-169.
 23. DUBBELDAM L. In: Handbook of Avian Anatomy: Nomina Anatomica Avium. Eds.: Baumel JJ, King A, Breazile JE, Evans HE, Vanden Berge JC. 2 ed., Nuttall Ornithological Club, Cambridge, 1993:555-584.
 24. ERICKSON GA, BRUGH M, BEARD CW. Viscerotropic velogenic Newcastle disease in pigeons: clinical disease and immunization. Avian Diseases 1980;24:257-267.
 25. FISCHER, E. Untersuchungen zur Pathologie der spontanen Paramyxovirus-1-Infektion der Taube. 1986. Justus Liebig-Universität zu Gießen.
 26. FISCHER E, FRESE K, MEISTER J, KALETA EF. Zur Histopathologie der spontanen PMV-1-Infektion der Taube. V.Tagung über Vogelkrankheiten in München 1986;:141-149.
 27. FRITZSCHE K. Folgerungen aus dem bisherigem Verlauf der Paramyxovirose der Tauben. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 1986;93:20-23.
 28. GEDEK B, KAADEN O-R, MAHNEL H, MAYR A. Aktive und Passive Schutzimpfung. In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Eds: Rolle M, Mayr A. 6 ed. Stuttgart: Enke Verlag, 1993:108-122.

29. GERLACH H. Viruses. In: Avian Medicine: principles and application. Eds: Ritchie BW, Harrison GJ, Harrison LPLake Worth, Fl. Wingers Publ. Inc., 1994:862-948.
30. GÖTZ M. Die tierseuchenrechtliche Bekämpfung der Newcastle-Krankheit in der Europäischen Union - Eine vergleichende Betrachtung der Maßnahmen in den Einzelstaaten. 1999. Ludwig-Maximilians-Universität München.
31. GLICK B. Immunophysiology. In: Avian physiology. Ed.: Sturkie PD. 4 ed. New York, Berlin, Heidelberg, Tokio: Springer Verlag, 1986:87-101.
32. GOTOH B, OHNISHI Y, INOCENCIO NM, ESAKI E, NAKAYAMA K, BARR PJ, THOMAS G, NAGAI Y. Mammalian subtilisin-related proteinases in cleavage activation of the paramyxovirus fusion glycoprotein superiority of furin. J.Virol. 1992;66:6391-6597.
33. GYLSTORFF I, GRIMM F. Vogelkrankheiten. 2 ed. Stuttgart:Verlag Eugen Ulmer, 1998.
34. HAMAGUCHI M, YOSHIDA T, NISHIKAWA K, NARUSE H, NAGAI Y. Transcriptive complex of Newcastle disease virus. I. Both L and P proteins are required to constitute an active complex. Virology 1983;128:105-117.
35. HAMAGUCHI M, NISHIKAWA K, TOYODA T, YOSHIDA T, HANAICHI RP, NAGAI Y. Transcriptive complex of Newcastle disease virus. II. Structural and functional assembly associated with the cytoskeletal framework. Virology 1985;147:295-308.
36. HANSON RP, SINHA SK. Epizootic of Newcastle disease in pigeons and studies on transmission of the virus. Poultry Science 1951;31:404-408.
37. HARVEY S, SCANEF CG, BROWN KI. Adrenals. In: Avian physiology. Ed.: Sturkie PD. 4 ed. New York, Berlin, Heidelberg, Tokio: Springer Verlag, 1986:479-493.
38. HEIL U. Untersuchungen zur Charakterisierung und Klassifizierung des "Tauben-Paramyxovirus" sowie Überprüfung der Schutzwirkung verschiedener Newcastle-Disease-Impfstoffe bei Tauben (*Columba livia* Gmel. 1789 var.dom.). 1984. Ludwig-Maximilians-Universität München.

39. HILBRICH P. Natürliche Newcastle-Infektion in einem Taubenbestand. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 1972;79:177-204.
40. HLINAK A, WERNER O, ZIEDLER K. Untersuchungen zum Vorkommen der Paramyxovirus-1 (PMV 1) - Infektion bei Tauben. Berl.Münc.h.Tierärztl.Wschr. 1998;111:332-336.
41. HORIKAMI SM, CURRAN J, KOLAKOWSKY D, MOYER SA. Complexes of Sendai virus NP-P and P-L proteins are required for defective interfering particle genome replication in vitro. J.Virol. 1992;66:4901-4908.
42. HUANG Z, PANDA A, SAMAL SK. The V protein of Newcastle disease virus blocks the antiviral action of interferon. 21st Annual Meeting American society for virology; Lexington, KN 2002:90.
43. IORIO RM, FIELD GM, SAUVRON JM, MIRZA AM, DENG R, MAHON PJ, LANGEDIJK JP. Structural and functional relationship between the receptor recognition and neuraminidase activities of the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase protein: Receptor recognition is dependent on neuraminidase activity. J.Virol. 2001;75:1918-1927.
44. IYER SG. Paralysis in a pigeon due to Doyle's (Ranikhet) disease virus. Indian J.Vet.Sci.Anim.Husbandry 1939;9:379-382.
45. JESTIN V, CHERBONNEL M, MORIN M, GUITTET M, BENNEJEAN G. Characterization of french avian paramyxovirus type 1 (PMV 1) isolates with a panel of monoclonal antibodies to the Ploufragan strain of Newcastle disease virus. Arch.Virol. 1989;105:189-198.
46. JORDAN IK, SUTTER BA, MCCLURE MA. Molecular evolution of Paramyxoviridae and Rhabdoviridae multiple-protein-encoding P gene. Mol 2000;17:75-86.
47. KÜCHLER B. Untersuchungen zur Wirksamkeit, unter Berücksichtigung der Dauer der Immunität, von drei inaktivierten und einem Lebendadsorbat-Impfstoff gegen die Paramyxovirus-1-Infektion der Tauben. 1997. Justus Liebig-Universität zu Gießen.

48. KALAKOWSKY D, PELET T, GARCIN D, HAUSMANN S, CURRAN J, ROUX L. Genome length: the rule of six revisited. *J.Virol.* 1998;72:891-899.
49. KALETA EF, MEISTER J, HÖRBER E, POLTEN B. Beitrag zur Klinik, Epizootiologie, Diagnose und Prophylaxe der Paramyxovirusinfektion der Taube. *Der praktische Tierarzt* 1984;65:522-525.
50. KALETA EF, ALEXANDER DJ, RUSSELL PH. The first isolation of the PMV-1virus responsible for the current panzootic in pigeons. *Avian Pathology* 1985;14:553-557.
51. KALETA EF, BALDAUF C. Newcastle disease in free-living and pet birds. In: *Newcastle Disease*. Ed.: Alexander DJ. 1 ed. Boston: Kluwer Academic Publications, 1988:197-246.
52. KALETA EF. Paramyxovirus-1-Infektion der Tauben. In: *Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels*. Eds.: Heider G, Monreal G. 1 ed. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag Jena, 1992:628-638.
53. KALETA EF. Vergleichende Pathogenitätsprüfungen von acht Tauben-Paramyxovirus-1-Variantisolaten in Tauben, Puten und Hühnern. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 1992;99:475-478.
54. KALETA EF, KRAUTWALD-JUNGHANNS M-E. *Kompendium der Ziervogelkrankheiten*. 1 ed. Hannover: 1999.
55. KASCHULA VR. The domestic pigeon as possible carrier of Newcastle disease. *Onderstepoort J.Vet.Research* 1952;25:25-27.
56. KING DJ, SEAL BS. Biological and molecular characterization of Newcastle disease virus isolates from surveillance of live bird markets in the Northeastern United States. *Avian Diseases* 1998;42:507-516.
57. KÖSTERS J, SCHNEEGANß D, KORBEL R. Erfahrungen mit der Impfung gegen Paramyxovirus-Infektion bei Tauben in der Bundesrepublik Deutschland. *Der praktische Tierarzt* 1992;9:861-869.

58. KNOLL M. Untersuchungen zur Wirksamkeit einer homologen Ölemulsionsvakzine gegen die Paramyxovirose der Tauben. 1986. Ludwig-Maximilians-Universität München.
59. KOMMERS GD, KING DJ, SEAL BS, BROWN CC. Virulence of pigeon-origin Newcastle disease virus isolates for domestic chickens. *Avian Diseases* 2001;45:906-921.
60. KRANEVELD FC. A poultry disease in the Dutch East Indies. *Ned.Indisch B1 Diergeneesk* 1926;28:448-450.
61. KRANEVELD FC, MANSJOER M. Twee Mogelijkheden tot besmetting van Pluimveebedrijven met Pseudovogelpest. *Hemera Zoa* 1950;52:166-170.
62. LAM KM, HAO Q. Vaccination of cyclophosphamide-treated chickens against Newcastle disease virus infection. *Vet.Microbiology* 1987;15:41-48.
63. LAMB RA, COLLINS PL, KOLAKOWSKY D, METERO JA, NAGAI Y, OLDSTONE MBA, PRINGLE CR, RIMA B. Paramyxoviridea. In: *Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses. The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Eds.: Van Regenmortel, M.H.V.; Fauquet, C.M.; Bishop, D.H.L.; Carstens, E.B.; Estes, M.K.; Lemon, S.M.; Maniloff, J.; Mayo, M.A.; McGeoch, D.J.; Pringle, C.R.; Wickner, R.B. 7 ed. San Diego: Academic Press, 2000:553-561.
64. MARINO OC, HANSON RP. Cellular and humoral response of in ovariectomized chickens to experimental challenge with velogenic Newcastle disease virus. *Avian Diseases* 1987;31:293-301.
65. MATSUMOTO T. Assembly of paramyxoviruses. *Microbiol.Immunol.* 1982;26:285-320.
66. MCGINNIS LW, MCQUAIN C, MORRISON T. The P protein and the nonstructural 38K and 29K proteins of Newcastle disease virus are derived from the same open reading frame. *Virology* 1988;164:256-264.
67. MEBATSION T, VERSTEGEN S, DEVANN LTC, RÖMER-OBBERDÖRFER A, SCHRIER CC. A recombinant Newcastle disease virus with low-level V Protein

- expression is immunogenic and lacks pathogenicity for chicken embryos. *J.Virol.* 2001;75:420-428.
68. MEISTER JA. Untersuchungen zur Diagnose, Differentialdiagnosen, Klinik, Epizootiologie und Immunprophylaxe der Paramyxovirus-1-Infektion der Haustaube (*Columa livia*, Gmelin, 1789 var. *domestica*). 1987. Justus Liebig-Universität zu Gießen.
69. MEULEMANS G, VAN DEN BERG TP, DECAESSTECKER M, BOSCHMANS M. Evolution of pigeon Newcastle disease virus strains. *Avian Pathology* 2002;31:515-519.
70. MOHAMMED MA, SOKKAR SM, TANTAWI HH. Contagious paralysis of pigeons. *Avian Pathology* 1978;7:637-643.
71. MORRISON T, PORTNER A. Structure, function and intracellular processing of the glycoproteins of *Paramyxoviridae*. In: *Paramyxoviruses*. Ed: Kingsbury DW, New York: Plenum Press, 1991:347-382.
72. NAGAI Y, KLENK H-D, ROTT R. Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. *Virology* 1976;72:494-508.
73. NAGAI Y, KLENK H-D. Activation of precursors to both glycoproteins of Newcastle disease virus by proteolytic cleavage. *Virology* 1977;77:125-134.
74. NAGAI Y, HAMAGUCHI M, TOYODA T. Molecular biology of Newcastle disease virus. In: *Nononcogenic Avian Viruses*. Ed.: Pandey R. 5 ed. Basel: Karger 1989:16-64.
75. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Newcastle Disease. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. 4 ed. Paris 2001
76. OGASAWARA T, GOTOH B, SUZUKI H, ASAKA J, SHIMOKATA K, ROTT R, NAGAI Y. Expression of Factor X and its significance for the determination of paramyxovirus tropism in the chick embryo. *The EMBO Journal* 1992;11:467-472.

-
77. PEARSON JE, SENNE D, ALEXANDER DJ, TAYLOR WD, PETERSON LA, RUSSELL PH. Characterization of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus-1) isolated from pigeons. *Avian Diseases* 1987;31:105-111.
 78. PEETERS BPH, LEEUW OD, KOCH G, GIELKENS ALJ. Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: Evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J.Virol.* 1999;73:5001-5009.
 79. PHARMEUROPA. Monographie 870: Newcastle disease or paramyxovirus vaccine, inactivated. Vol 7., No.4. 1995:553-556.
 80. POLTEN B. Beitrag zur Immunprophylaxe der Paramyxovirus-1-Infektion der Taube. 1986. Justus Liebig-Universität zu Gießen.
 81. REUSS U. Die Empfänglichkeit der Haustauben für die atypische Geflügelpest. *Monatsh. f. Tierheilkunde* 1961;13:153-161.
 82. RICHTER R, KÖSTERS J. Paramyxovirusinfektion bei Rassetauben. *Der praktische Tierarzt* 1983;3:250-250.
 83. RICHTER R, KÖSTERS J, KRÄMER K. Zur Paramyxovirusinfektion bei Tauben. *Der praktische Tierarzt* 1983;64:915-917.
 84. RICHTER R. Paramyxovirusinfektion bei Tauben. Fachgruppe Geflügelkrankheiten der DVG 1983;III. Tagung über Vogelkrankheiten - Schwerpunkt Taube, München:86-95.
 85. RIDDELL C. *Avian histopathology*. 1 ed. Allen Press Inc., Lawrence, Kansas 1987:57-66.
 86. RÖMER-OBERDÖRFER A, MUNDT E, MEBATSION T, BUCHHOLZ UJ, METTENLEITNER TC. Generation of recombinant lentogenic Newcastle disease virus from cDNA. *J.Gen.Virol.* 1999;80:2987-2995.
 87. ROMEIS B. *Mikroskopische Technik*. 17 ed. München, Wien, Baltimore:Urban & Schwarzenberg, 1989.
 88. RUSSELL PH, DWIVEDI PN, DAVISON TF. The effects of cyclosporin A and cyclophosphamide on the populations of B and T cells and virus in the Haderian

- gland of chickens vaccinated with the Hitchner B1 strain of Newcastle disease virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1997;60:171-185.
89. SAKAGUCHI T, TOYODA T, GOTOH B, INOCENCIO NM, KUMA K, MIYATA T, NAGAI Y. Newcastle disease virus evolution. I. Multiple lineages defined by sequence variability of the hemagglutinin-neuraminidase gene. *Virology* 1989;169:260-272.
90. SAMSON ACR, LEVESLEY I, RUSSEL PH. The 36K polypeptide synthesized in Newcastle disease virus-infected cells possesses properties predicted for the hypothesized 'V' protein. *J Gen Virol* 1991;72:1709-1713.
91. SCHEID A. Paramyxoviridea. In: *Animal virus structure*. Eds.: Nermut S. New York, Amsterdam, London, Tokyo: Elsevier Science, 1987:233-252.
92. SCHMEER N, MEISTER J, KALETA EF, POLTEN B. Ist Chlamydia psittaci ein komplizierender Faktor bei der Paramyxovirus-1-Infektion der Tauben? *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 1984;91:398-399.
93. SCHNEEGANß D, KORBEL R. Zum aktuellen Vorkommen aviärer Paramyxovirose. *Tierärztliche Praxis* 1988;16:159-160.
94. SCHOOP G, SIEGERT R, GALASSI D, KLÖPPEL G. Newcastle-Infektionen beim Steinkauz (*Athene noctua*), Hornraben (*Bucorvus* sp.), Seeadler (*Haliaeetus albicilla*) und Riesenvogel (*Dacelo gigas*). *Münchener Tierheilkunde* 1955;7:223-235.
95. SCHUSSER G, LECHNER C, LOUPAL G, WÖRGÖTTER J, VASICEK L. Paramyxovirus-1-Infektion bei Tauben in Österreich. *Wien.Tierärztl.Mschr.* 1984;71:353-365.
96. SCHUSSER G, WÖRGÖTTER J, LECHNER C, ABADZIEV V. Vakzination gegen die Paramyxovirus-1-Infektion bei Tauben. *Wien.Tierärztl.Mschr.* 1985;72:342-346.
97. SEAL BS, KING DJ, BENNETT JD. Characterization of Newcastle disease virus isolates by reverse transcriptase PCR coupled to direct nucleotide sequencing and

- development of sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiology analysis. *J.Clin.Microbiol.* 1995;33:2624-2630.
98. SEAL BS, KING DJ, BENNETT JD. Characterization of Newcastle disease virus vaccines by biological properties and sequence analysis of hemagglutinin-neuraminidase protein gene. *VACCINE* 1996;14:761-766.
99. SEAL BS, KING DJ, MEINERSMANN RJ. Molecular evolution of the Newcastle disease virus matrix protein gene and phylogenetic relationships among paramyxoviridae. *Virus Research* 2000;66:1-11.
100. SEAL BS, KING DJ, SELLERS HS. The avian response to Newcastle disease virus. *Developmental and Comparative Immunology* 2000;24:257-268.
101. SEAL BS, CRAWFORD JM, SELLERS HS, LOCKE DP, KING DJ. Nucleotide sequence analysis of the Newcastle disease virus nucleocapsid protein gene and phylogenetic relationships among the Paramyxoviridae. *Virus Research* 2002;83:119-129.
102. SICK C, SCHULTZ U, MUNSTER U, MEIER J, KASPERS B, STAEHELI P. Promoter structures and differential responses to viral and nonviral inducers of chicken type I interferon genes. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273:9749-9754.
103. SINOWATZ F, FREWEIN J. Nebenniere, glandula adrenalis. In: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*. Eds.: Nickel CK, Schummer A, Seiferle E. 2 ed. Berlin, Hamburg: Paul Parey Verlag, 1992:276-279.
104. STEWARD M, VIPOND IB, MILLAR NS, EMMERSON PT. RNA Editing in Newcastle disease virus. *J.Gen.Virol.* 1993;74:2539-2547.
105. STEWART GH. Naturally occurring clinical Newcastle disease in the racing pigeon (*Columba livia*). *Veterinary Record* 1971;89:225-226.
106. STRAUSS EG, STRAUSS JR. Replication strategies of single stranded RNA viruses of eukaryotes. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 1983;105:1-98.
107. TANGREDI BP. Avian paramyxovirus type 1 infection in pigeons: Recent changes in clinical observations. *Avian Diseases* 1988;32:839-841.

-
108. TANTAWI HH, AL FALLUJI MM, AL SHEIKHLY F. Viral encephalomyelitis of pigeons: Identification and characterization of the virus. *Avian Diseases* 1979;23:785-793.
 109. TOYODA T, SAKAGUCHI T, HIROTA H, GOTOH B, KUMA K, MIYATA T, NAGAI Y. Newcastle disease virus evolution. II. Lack of gene recombination in generating virulent and avirulent strains. *Virology* 1989;169:273-282.
 110. TUDOR DC. Paramyxovirus Infection. In: *Pigeon Health and Disease*. Ed.: Tudor DC. 1 ed. Ames: Iowa State Press, 1991:25-30.
 111. VINDEVOGEL H, THIRY E, PASTORET PP, MEULEMANS G. Lentogenic strains of Newcastle disease virus in pigeons. *Veterinary Record* 1982;110:497-499.
 112. VINDEVOGEL H, DUCHATEL J-P. Paramyxovirus type 1 infection in pigeons. In: *Acute virus infections of poultry*. Eds.: McFerran JB, McNulty MS. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1986:67-77.
 113. VINDEVOGEL H, DUCHATEL J-P. Panzootic Newcastle disease virus in pigeons. In: *Newcastle Disease*. Ed.: Alexander DJ. 1 ed. Boston: Kluwer Academic Publications, 1988:184-196.
 114. WACHENDÖRFER G, LÜTHGEN W. Untersuchungen über die Pathogenität eines aus Papageien isolierten Newcastle disease-Virus. *Prakt.Tierarzt* 1971;52:612-614.
 115. WAIBL H, SINOWATZ F. Periphere Lymphgewebe. In: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*. Eds.: Nickel CK, Schummer A, Seiferle E. 2 ed. Berlin, Hamburg: Paul Parey Verlag, 1992:324-325.
 116. WARRLICH A. Untersuchungen zur experimentellen Paramyxovirus-1-Infektion der Brieftaube. 1988. Justus Liebig-Universität zu Gießen
 117. WERNER O. Newcastle Disease - Aktuelle Seuchensituation in Deutschland aus der Sicht des Nationalen Referenzlabors. *Fachgruppe Geflügelkrankheiten der DVG* 1995;48. Fachgespräch, Hannover:87-105.

-
118. WERNER O, OBERDÖRFER A, KÖLLNER B, MANVELL RJ, ALEXANDER DJ.
Characterization of avian paramyxovirus type 1 strains isolated in Germany during
1992 to 1996. *Avian Pathology* 1999;28:79-88.

Danksagung

Zum Schluß möchte ich allen herzlich Danken, die zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Korbelt sowie allen Mitarbeitern des Institutes für Geflügelkrankheiten für die stets gewährte Unterstützung.

Der Firma Intervet danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung von Materialien und Hilfsmitteln sowie den fachlichen Austausch.

In ganz besonderer Weise möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Grund für seine herausragende Betreuung, intensive Unterstützung, inspirative Motivation und seine konstruktive und unerschöpfliche Kritik bedanken. Des Weiteren möchte ich das überaus angenehme Arbeitsklima dankend anerkennen, das Herr PD Dr. Grund und die Mitarbeiter der Virologischen Abteilung mir geboten haben. Die Arbeit dort war immer vom guten Teamgeist, regem Austausch und produktiver Unterstützung geprägt, ein besonderes Dankeschön diesbezüglich geht an die zwei „Labormäuse“ Kathrin und Dana.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Schmahl von Institut für Tierpathologie für die sehr freundliche und euphorische Unterstützung bei der Auswertung der histologischen Schnitte bedanken.

Herrn Prof. Dr. Dr. Osterkorn danke ich für die Hilfe bei der statistischen Verarbeitung der Daten.

Zu guter Letzt geht ein dickes Dankeschön an meine Familie und Freunde für den zuverlässigen Rückhalt während der angenehmen Jahre der Erstellung meiner Doktorarbeit.