

**CIRCOVIRUSINFEKTIONEN BEI WELLENSITTICHEN:  
KLINISCHE UND MOLEKULAREPIDEMIOLOGISCHE  
UNTERSUCHUNGEN**

von Claudia Anita Löbel

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

**CIRCOVIRUSINFEKTIONEN BEI WELLENSITTICHEN:  
KLINISCHE UND MOLEKULAREPIDEMIOLOGISCHE  
UNTERSUCHUNGEN**

von Claudia Anita Löbel  
aus München

München 2018

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische

Arbeit angefertigt unter der Leitung von

Priv.-Doz. Dr. Monika Rinder

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

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

**Berichterstatter:** Priv.-Doz. Dr. Monika Rinder

**Korreferent:** Priv.-Doz. Dr. Elisabeth G. Kemter

**Tag der Promotion:** 27. Juli 2018

Für meine Familie und Freunde, für meine Tiere  
und in Gedenken an meinen verstorbenen Vater, Werner Löbel,  
und meinen verstorbenen Bruder, Thomas Löbel.

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>II. LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1. Der Wellensittich (<i>Melopsittacus undulatus</i>).....</b>	<b>3</b>
<b>2. Befiederungsstörungen.....</b>	<b>7</b>
2.1. Mangelernährung .....	8
2.2. Infektiöse Ursachen .....	9
2.3. Viruserkrankungen.....	11
2.4. Intoxikationen .....	13
2.5. Systemische Erkrankungen .....	13
2.6. Tumore und Zysten.....	14
2.7. Ekzeme .....	15
2.8. Xanthomatose.....	15
2.9. Verhaltensbedingte Störungen - Federrupfen .....	15
2.10. Sonderform der Befiederungsstörung: „Feather Duster Syndrome“ .....	16
<b>3. Circovirusinfektion der Papageien (PBFD).....</b>	<b>17</b>
3.1. Ätiologie .....	18
3.2. Epidemiologie .....	19
3.3. Pathogenese und Pathologie.....	20
3.4. Klinik .....	22
3.4.1. Akute Verlaufsform .....	23
3.4.2. Chronische Verlaufsform .....	23
3.4.3. Perakute Verlaufsform.....	26
3.5. Diagnose.....	27
3.5.1. Nachweis mittels Polymerase-Kettenreaktion .....	27
3.5.2. Histologischer Nachweis .....	28
3.5.3. Serologische Nachweisverfahren .....	28
3.5.4. Sonstige Nachweismöglichkeiten .....	29
3.6. Therapie .....	29
3.7. Prophylaxe.....	31

<b>III. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>34</b>
<b>1. Untersuchungsmaterial und Probenahme .....</b>	<b>34</b>
1.1. Patienten .....	34
1.1.1. Bestand 1 .....	35
1.1.2. Bestand 2 .....	35
1.1.3. Bestand 3 .....	36
1.1.4. Bestand 4 .....	37
1.1.5. Bestand 5 .....	38
1.1.6. Bestand 6 .....	38
1.1.7. Bestand 7 .....	39
1.1.8. Bestand 8 .....	39
1.1.9. Bestand 9 .....	40
1.1.10. Bestand 10 .....	41
<b>2. Gefiederprotokoll.....</b>	<b>42</b>
<b>3. Probenaufbereitung und Analyse.....</b>	<b>44</b>
3.1. DNA-Isolierung .....	45
3.1.1. Extraktion der DNA aus Tupfern und Federn.....	45
3.1.2. Extraktion der DNA aus Blut.....	46
3.1.3. Extraktion der DNA aus Organen.....	46
3.2. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	46
3.2.1. Duplex-PCR.....	47
3.2.2. Breitspektrum-PCR.....	48
3.3. Gelelektrophorese und Sequenzierung .....	49
3.4. Sequenzauswertung und Erstellung phylogenetischer Stammbäume .....	49
<b>IV. ERGEBNISSE.....</b>	<b>51</b>
<b>1. Überblick des Untersuchungsablaufs .....</b>	<b>51</b>
<b>2. Duplex-PCR- und nested Breitspektrum-PCR-Ergebnisse und Auswertung Gefiederprotokolle .....</b>	<b>51</b>
2.1. Überblick und Auswertung der Ergebnisse, Bestand 1 .....	52
2.2. Überblick und Auswertung der Ergebnisse, Bestand 2 .....	55
2.3. Überblick und Auswertung der Ergebnisse, Bestand 3 .....	56
2.4. Überblick und Auswertung der Ergebnisse, Bestand 4 .....	57
2.5. Überblick und Auswertung der Ergebnisse, Bestand 5 .....	59

2.6. Überblick und Auswertung der Ergebnisse, Bestand 6 .....	59
2.7. Überblick und Auswertung der Ergebnisse, Bestand 7 .....	60
2.8. Überblick und Auswertung der Ergebnisse, Bestand 8 .....	61
2.9. Überblick und Auswertung der Ergebnisse, Bestand 9 .....	61
2.10. Überblick und Auswertung der Ergebnisse, Bestand 10 .....	61
<b>3. Phylogenetische Analyse der Sequenzergebnisse aus den Beständen 1, 2, 3, 4, 5, 10 .....</b>	<b>62</b>
<b>V. DISKUSSION.....</b>	<b>68</b>
1. In die Studie einbezogene Vögel .....	68
2. Diagnosestellung.....	69
3. Klinisches Erscheinungsbild beim Wellensittich und anderen Psittaziden....	72
4. Artenspektrum der zusätzlich zu Wellensittichen als Circovirus-DNA- positiv identifizierten Papageien.....	73
5. Phylogenetische Untersuchung .....	75
6. Zur Wirtsspezifität von BFDV.....	77
7. Schlussfolgerungen für die Praxis .....	81
<b>VI. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>85</b>
<b>VII. SUMMARY .....</b>	<b>87</b>
<b>VIII. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>89</b>
<b>IX. ANHANG .....</b>	<b>105</b>
1. Tabellenverzeichnis .....	105
2. Abbildungsverzeichnis .....	107
<b>X. DANKSAGUNG .....</b>	<b>109</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
APV	Aviäres Polyomavirus (avian polyomavirus)
BC	Buffy coat
BFD	Wellensittichnestlingserkrankung (budgerigar fledgling disease)
BFDV	Erreger der Schnabel- und Federkrankheit der Papageien (beak and feather disease virus)
bP	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
CoCV	Taubencircovirus (columbid circovirus)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEPC-Wasser	mit DEPC behandeltes doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleinacid)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Eppi	Eppendorf-Reaktionsgefäß
et al.	und andere (et alteri)
evt.	eventuell
ggf.	gegebenenfalls
ggr.	geringgradig
h	Stunde (hour)
hgr.	hochgradig
IVH	Industrieverband Heimtierbedarf e.V.
IUCN	International Union for Conservation of Nature
kb	Kilobasen
m	männlich
max.	maximal
min.	Minuten
mgr.	mittelgradig
ml	Milliliter
MM	Mastermix
n	Anzahl (number)
n. a.	unbekannt (not available)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Nr.	Nummer
Nt	Nukleotide

o. b. B	ohne besonderen Befund
ORF	Leserahmen (open reading frame)
PBFD	Schnabel- und Federkrankheit der Papageien (psittacine beak and feather disease)
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (phosphat buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
Rep-Protein	mit der Replikation assoziiertes Protein
rpm	Relative Zentrifugalbeschleunigung pro Minute (rounds per minute)
s	Sekunden
sog.	sogenannte
spp.	Spezies
Tab.	Tabelle
Taq. Pol.	Taq-Polymerase
TuFe	Tupfer Feder
u. a.	unter anderem
u. v. m.	und vieles mehr
v. a.	vor allem
w	weiblich
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
z. T.	zum Teil
ZZF	Zentralverband Zoologischer Fachbetriebe Deutschlands e.V.
µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm

## I. EINLEITUNG

Die Schnabel- und Federkrankheit der Papageien (Psittacine Beak and Feather Disease, PBFD), eine der bedeutendsten Viruserkrankungen der Papageien, wird durch Circoviren verursacht und kommt weltweit vor. Bei der PBFD sind unterschiedliche Verlaufsformen bekannt. Perakut verlaufende Erkrankungen sind durch plötzliche Todesfälle insbesondere bei Nestlingen gekennzeichnet, während bei akuten bis chronischen Verläufen abnormes Federwachstum und ein symmetrischer Federverlust, häufig bei den Flugfedern, und Schnabelveränderungen, aber auch Immunsuppressionen und damit verbunden ein gehäuftes Auftreten von Sekundärinfektionen vorkommen. Subklinische Verläufe, bei denen Tiere Virusausscheider sein können, ohne Krankheitssymptome zu zeigen, sind ebenfalls bekannt und besitzen für die Epidemiologie der Erkrankung eine große Bedeutung (Ritchie et al., 1989).

Der Erreger, das Beak and Feather Disease Virus (BFDV), wurde bisher bei über 60 Papageienspezies nachgewiesen (Cerníková et al., 2017; Fogell et al., 2016; Hulbert et al., 2015; Mora-Chavarría et al., 2017; Sarker et al., 2014; Todd, 2004). Auch vom Aussterben bedrohte Arten wie z. B. der Schwalbensittich (Sarker et al., 2013) oder der Goldbauchsittich (Peters et al., 2014) in Australien sind betroffen. Das Virus stellt somit eine ernstzunehmende Bedrohung sowohl für Papageien in Gefangenschaft als auch für freilebende Arten in der Wildnis dar. Da eine ätiologische Therapie und Impfstoffe derzeit nicht verfügbar sind, kommt einer raschen Diagnostik und einer Unterbrechung der Infektketten bei der Bekämpfung, also der Verhinderung der Einschleppung des Virus in Bestände und der horizontalen Übertragung, eine Schlüsselrolle zu.

Ein Kennzeichen der Circoviren und damit auch des BFDV ist eine sehr hohe genetische Heterogenität, die mit dem Vorkommen einer Vielzahl von Varianten oder Stämmen verbunden ist. Ob alle genetischen Varianten in der Lage sind, das breite Spektrum an Papageienarten zu infizieren, oder ob es Stämme mit einer stärker ausgeprägten Wirtsspezifität gibt, wird derzeit diskutiert. Für das Verständnis der Epidemiologie der PBFD ist die Beantwortung dieser Frage jedoch von hoher Relevanz.

Wellensittiche gehören in Deutschland zu den populärsten in Menschenobhut

gehaltenen Ziervogelarten. Sie werden häufig gemeinsam mit anderen Psittaziden gehalten. An der Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische, und sicherlich auch in anderen Tierarztpraxen in Deutschland, stellen sie bei den Vogelpatienten zahlenmäßig die bedeutendste Art dar und sind häufig von der PBFD betroffen. In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, inwieweit eine Übertragung von Circoviren von Wellensittichen auf andere Papageienarten in gemischten Beständen möglich erscheint. Hierzu sollten in einem ersten Schritt Wellensittiche, die an der Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien, und Zierfische als Patienten vorgestellt wurden und PBFD-typische Veränderungen zeigten, im Rahmen der klinischen Diagnostik mittels PCR auf Circoviren untersucht werden. Im Zuge einer Bestandsuntersuchung sollten bei Circovirus-positiven Wellensittichen anschließend auch Untersuchungen bei weiteren Papageienspezies durchgeführt werden, um mögliche Infektketten zu identifizieren. Dabei sollte einerseits das Spektrum befallener Papageienarten in den einzelnen Haltungen ermittelt werden und andererseits die Verwandtschaft der vorkommenden Viren mittels molekulargenetischer Methoden untersucht werden. Zusätzlich sollte die klinische Relevanz einer Circovirusinfektion bei den unterschiedlichen Papageienvögeln der Bestände durch Protokollierung des Gefiederzustandes der Tiere erfasst werden.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Der Wellensittich (*Melopsittacus undulatus*)

Der Wellensittich in seiner Wildform gehört mit seinen ca. 18 cm Länge zu einer der kleinsten Spezies in der Ordnung Psittaciformes. Ursprünglich beheimatet sind die geselligen Schwarmvögel in den Steppen / Grasebenen Australiens. Allerdings gelten sie heute als die wahrscheinlich weltweit verbreitetste Art der Papageienvögel in menschlicher Obhut. Bereits Mitte des 19. Jahrhunderts wurden die ersten Tiere in Europa eingeführt und als Ziervögel gehalten (Bolle, 1859). Der Name *Melopsittacus undulatus* („gewellter Singpapagei“) leitet sich aus dem Griechischen, *mélos* „Gesang“, *psittacus* „Papagei, Sittich“ und aus dem Lateinischen, *undulatus* „gewellt“ (Wellenzeichnung des Gefieders) ab. Im deutschsprachigen Raum hat sich daher die Bezeichnung Wellensittich eingebürgert.

Wegen der hohen Intelligenz und der Begabung, Geräusche, Worte oder sogar ganze Sätze nachzuahmen, wurden die Tiere oft als Stubenvogel angeschafft. Laut Befragung von Heimtierbesitzern durch den Zentralverband Zoologischer Fachbetriebe Deutschlands e.V. (ZZF) und den Industrieverband Heimtierbedarf e.V. (IVH) lag der Anteil an Wellensittichen bei 59 % unter allen Ziervögeln (Burmeister, 2017; IVH und ZZF, 2013). Auch heute noch zählt der Wellensittich zu den am häufigsten gehaltenen Heimtieren in Deutschland, im Jahr 2016 waren insgesamt 4,6 Millionen Ziervögel vertreten (IVH und ZZF, 2016).

In der Wellensittichzucht unterscheidet man mittlerweile mehrere Zuchtformen in den verschiedensten Farbschlägen und mit differierenden Zeichnungen (z. B. Normale Grünreihe, Normale Blaureihe, Zimter, Opaline, Schecken, Inos, Spangle, usw.) und Haubenarten (z. B. Spitzhaube, Rundhaube). Die lebhaften „Farbenwellensittiche“ sind der Wildform noch am ähnlichsten und haben ein glattes, eng anliegendes Gefieder. Sie sind idealerweise 17 - 18 cm groß (Kopf- bis Schwanzspitze), wiegen ca. 35 - 45 g und haben maximal 6 Kehltupfen (3 pro Seite), die gleichmäßig in der Maske verteilt sein sollen. Ihre Augen sind aus jeder Perspektive zu erkennen – dieses Merkmal wird auch als sogenannte „Mausaugen“ bezeichnet. „Schauwellensittiche“ unterscheiden sich bereits deutlich in Größe (ab ca. 22 cm), Gewicht (ca. 50 - 60 g), Form und Haltung (Steilstellung der

Rückenlinie, 30° zur Senkrechten). Durch ihr prägnant vergrößertes, buschiges Kopfgefieder (Haube) sind die Augen von vorne betrachtet nicht mehr sichtbar. Nur in der Seitenansicht sind sie noch zu erkennen. Extreme Zuchtformen der „Schauwellensittiche“ haben mit der ursprünglichen Wildform kaum noch etwas gemein. Diese Tiere sind mit ca. 25 cm und ca. 55 - 65 g viel größer und schwerer als ihre natürlichen Artgenossen. Außerdem sind sie gekennzeichnet durch massiv vergrößerte Hauben, wodurch die Augen zum Teil nicht einmal mehr von der Seite betrachtet zu sehen sind. Durch die Behäbigkeit und die Visuseinschränkung ist im Vergleich zu den „Farbenwellensittichen“ kein so wendiger Flug mehr möglich. Ein weiteres Merkmal sind die vielen und großen Kehlflecken, die oft auch als Halskette bezeichnet werden.



**Abbildung 1:** Zwei männliche Wellensittiche in einer Mischform aus „Farben- und Schauwellensittich“, links in „Normal Dunkelblau“, rechts in „Normal Hellgrün“

Nach einem Exportverbot für Wellensittiche, das von der australischen Regierung im Jahre 1884 erlassen wurde, musste die steigende Nachfrage in Europa mittels extensiver Nachzuchten gedeckt werden. Somit wurden und werden viele dieser Tiere auf Vogelausstellungen gekauft, verkauft oder getauscht. Einerseits ist dies gut, um den betreffenden Genpool möglichst vielfältig zu halten, andererseits besteht ein

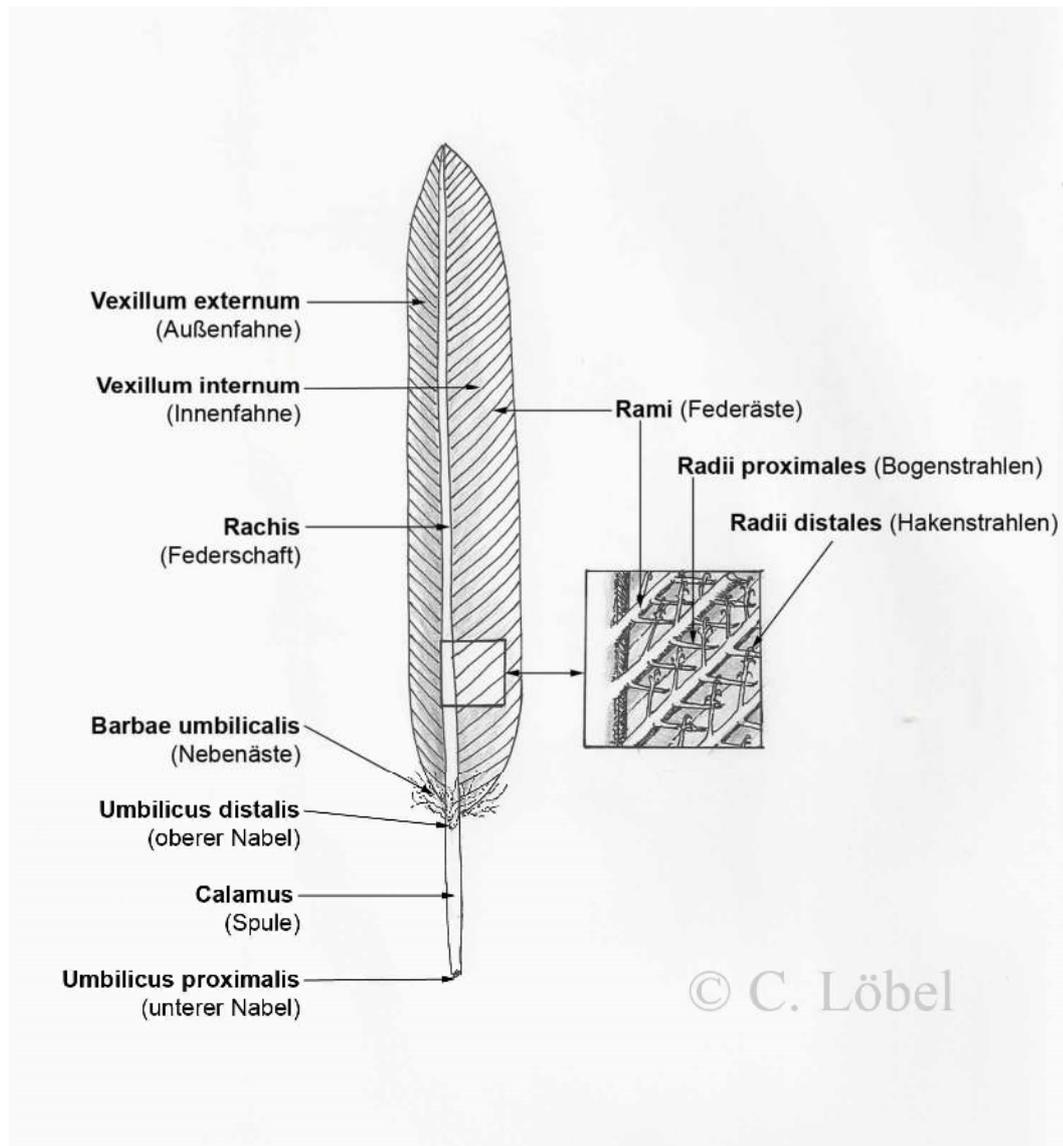
hohes Risiko einer Verbreitung von Viren und anderen Krankheitserregern (wie z. B. PBFD-Virus) durch subklinisch kranke Tiere.

### 1.1. Befiederung beim Wellensittich, Federaufbau und -einteilung

Beim Gefieder von Vögeln kann man Konturfedern (*Pennae contourae*) und Unterfedern unterscheiden, letztere werden auch Daunen (*Plumae*) genannt. Bei Wellensittichen teilen sich die Konturfedern weiter auf in die Schwungfedern der Flügel (*Remiges*), die Steuerfedern des Schwanzes (*Rectrices*) (i.d.R. 6 Stück pro Körperhälfte) und die Deckfedern (*Tectrices*) (siehe Tab. 1). Die Schwungfedern an den Flügeln lassen sich noch in die Handschwingen (i.d.R. 10 Stück pro Handschwinge) und die Armschwingen (i.d.R. 12 Stück pro Armschwinge) aufteilen (siehe auch Gefiederprotokoll - Abb. 17). Die Konturfedern bestehen aus dem Federkiel (*Scapus*) und den Federfahnen (*Vexillae*). Der Federkiel ist weiter aufgeteilt in Federschaft (*Rachis*) und Federspule (*Calamus*). Am Federschaft befinden sich die äußere und innere Federfahne (*Vexillum externum* und *internum*). Die Federfahnen wiederum bestehen aus Federästen (*Rami*), von denen aus Hakenstrahlen (*Radii distales*) und Bogenstrahlen (*Radii proximales*) entspringen. Hakenstrahlen und Bogenstrahlen verbinden sich jeweils mit denen des Nachbarastes, so dass eine zusammenhängende Federfahne gebildet wird. Das Prinzip ähnelt dem eines Klettverschlusses. Nach Auftreten von Defekten kann beim Putzen des Gefieders die Anordnung und Verbindung meist wieder gut hergestellt werden, was für die Flugfunktion der Federn unerlässlich ist. Die Dunen sind kurz und ihre Haken- und Bogenstrahlen greifen nicht ineinander. Sie sind daher eher bauschig und bilden das wärmende Untergefieder.

**Tabelle 1:** Schematische Gefiedereinteilung beim Wellensittich nach allgemeinen anatomischen Kenntnissen

Konturfedern ( <i>Pennae contourae</i> )		Dunen ( <i>Plumae</i> )
Kleingefieder	Großgefieder	
↓ Deckfedern ( <i>Tectrices</i> )	↓ Steuerfedern ( <i>Rectrices</i> )	↓ Schwungfedern ( <i>Remiges</i> )
	↓ Schwanzfedern	↓ Arm- und Handschwingen
	Untergefieder	



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des Federaufbaus, hergeleitet aus allgemein bekannten anatomischen Strukturen

Die Mauser ist ein physiologischer Vorgang, der von der Schilddrüse hormonell gesteuert wird und der zur Erneuerung des Gefieders dient. So können verschlissene Federn in regelmäßigen Abständen erneuert werden. Die Federn werden in den sogenannten Follikelscheiden aus Epidermalgewebe gebildet und bestehen aus Keratin. Während des Wachstums sind die Federn am proximalen Ende noch gut vaskularisiert und werden jeweils von einer Federscheide geschützt, die später aufplatzt. Für ein einwandfreies Wachstum der Federn benötigen Vögel vor allem Eiweiße und Aminosäuren.

Da die Mauser beim Wellensittich ganzjährig erfolgt, ist der Federverlust manchmal schwierig von einem Krankheitsbild zu unterscheiden. In aller Regel mausern die

Tiere nur so stark, dass sie noch flugfähig bleiben. Treten vermehrt in Federhülsen steckengebliebene Federn auf, oder verdrehte und verkrüppelte Federn, oder bleibt das Wachstum gar ganz aus, so handelt es sich eindeutig um eine Befiederungsstörung. Diese kann vielfältige Ursachen haben (König et al., 2016).

## 2. Befiederungsstörungen

Ziervögel werden beim Tierarzt meist nur aufgrund von sehr deutlich sichtbaren Symptomen, wie z. B. Gefiederproblemen, vorgestellt. Oft bleiben systemische Erkrankungen wegen mangelnden Krankheitsanzeichen unentdeckt. Befiederungsstörungen sind dagegen auch für Besitzer gut zu erkennen. Bei Papageien tritt ein größerer und andauernder Federverlust in der Regel nicht in Zusammenhang mit der Mauser auf und ist daher meist ein Hinweis auf eine vorliegende Erkrankung des Tieres (siehe Tab. 2).

Auch farbliche Veränderungen der Federn können ein Hinweis auf eine systemische Erkrankung sein. Während rote Schwanzfedern bei Kongo-Graupapageien physiologisch sind, können rote Federn im Deckgefieder bei dieser Vogelart auf einen Leberschaden hinweisen. Sie werden allerdings auch bei einer Infektion mit dem BFDV beschrieben (Gerlach, 1994; Korbel, 2015).



**Abbildung 3:** Kongo-Graupapagei (*Psittacus erithacus*) mit einer nachgewiesenen BFDV-Infektion und rötlichen Verfärbungen im Bereich des dorsalen Deckgefieders, post mortem

**Tabelle 2:** Differentialdiagnostik von Befiederungsstörungen bei Psittaziden

Mangelernährung
Vitamin A Mangel
Mangel an essentiellen Aminosäuren
Absoluter Eiweißmangel (gestörte Mauser)
Infektiöse Ursachen:
Parasiten z. B. Räudemilbe ( <i>Knemidokoptes pilae</i> ), Federmilben ( <i>Falculifer</i> spp., <i>Hapyrhynchus</i> spp., <i>Syringophilus</i> spp., <i>Dermoglyphus</i> spp.), Federbalgmilben ( <i>Megninia</i> spp.), rote Vogelmilbe ( <i>Dermanyssus gallinae</i> ), Nordische Vogelmilbe ( <i>Omithonyssus sylviarum</i> )
Viruserkrankungen z. B. Circovirus (BFDV), Polyomavirus (APV)
Bakterien und Pilze (auch als Abszess oder Pulpitis) z. B. <i>Streptococcus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Malassezia</i> sp., <i>Aspergillus</i> spp.
Intoxikationen:
Bleiintoxikation
Zinkintoxikation
Systemische Erkrankungen:
Endokrin (Hypothyreose)
Leberstoffwechselstörungen
Tumore und Zysten
Ovarialzysten
Federbalgzysten
Lebertumor
Flügel tumor
Lipom
Xanthomatose
Ekzeme
EMA-Komplex
Verhaltensstörung Federrupfen (krankheitsbedingt und / oder haltungsbedingt)
Sonderform „feather duster“ (wahrscheinlich genetisch bedingt, bei „Schauwellensittichen“)

### 2.1. Mangelernährung

Ernährungsdefizite können aufgrund einseitiger Ernährung ohne Frischfutter oder durch sogenannte Futterselektierer entstehen. Ein Vitamin A-Mangel kann z. B. eine ungleichmäßige Befiederungsstörung und trockene, schuppige Haut hervorrufen. Bei adäquater Verabreichung von Vitamin A erholt sich das Gefieder wieder (Baker, 1996). Auffälligkeiten im Federkleid, wie etwa Stockmauser, Federverfärbungen, schlampiges Gefieder oder Federverlust können auch durch einen Mangel an

essentiellen Aminosäuren (Lysin, Arginin, Methionin, Threonin), Vitaminen und Mineralstoffen hervorgerufen werden (Krautwald-Junghanns, 2007). Malabsorptionen, resultierend aus bakteriellem, virologischem oder parasitärem Befall, treten ebenso als Ursache auf.

## **2.2. Infektiöse Ursachen**

Beim Vogel kommen unterschiedliche Arten von Ektoparasiten vor. Beim Wellensittich spielen häufig Federmilben und Knemidokoptesmilben eine Rolle, klinische Symptome treten meistens im Rahmen von Faktorenerkrankungen auf. Die Arthropoden können das Gefieder durch Federfraß direkt schädigen, aber auch sekundäre Schäden verursachen, z. B. durch Juckreiz und damit verbundenem gesteigerten Putzverhalten (Baker, 1996) oder durch Hyperkeratose aufgrund von Epithelproliferation. Des Weiteren gibt es noch blutsaugende Ektoparasiten, die bei starkem Befall zu einer Anämie führen können, wie zum Beispiel die rote Vogelmilbe.



**Abbildung 4:** Wellensittiche mit Knemidokoptesbefall. Bohrgänge am Oberschnabel (oben links und oben rechts). Massive, schwammartige Veränderung der Wachshaut und der umliegenden Haut mit Hyperkeratose (oben rechts). Kalkbeinräude hervorgerufen durch Epithelproliferation und Bohrgänge der Milben (unten)



**Abbildung 5:** Massiver Federmilbenbefall an Arm- und Handschwingen eines Wellensittichs

Bei Adspektion der Federunterseiten im hellen Licht, legen sich die lichtscheuen Federmilben oft dicht an den Federkiel an, so dass sie nur schwierig zu erkennen sind. Bei einem geringen Befall können sie unter dem Mikroskop oft besser gesehen werden. Zusätzlich kommen beim Vogel einige Endoparasiten vor, welche einen Vitamin- und Mineralstoffmangel hervorrufen können und dadurch einen indirekten Einfluss auf die Befiederung haben (Krautwald-Junghanns, 2007).

Eine Infektion der Haut und eventuell der Federpulpa mit Bakterien (Baker, 1996) oder Pilzen, aber auch eine Vergiftung durch Pilztoxine, z. B. durch Aflatoxin kontaminiertes Futter, kann zu Befiederungsstörungen führen. Darüber hinaus können Gefiederschäden auch iatrogen bedingt sein, z. B. durch Gabe bestimmter Entwurmungsmittel, Kokkzidiostatika, Chlortetrazyklinen und Cortisonanwendungen (Krautwald-Junghanns, 2007).

### 2.3. Viruserkrankungen

Insbesondere zwei Virusinfektionen können bei Papageienspezies massive Befiederungsstörungen hervorrufen. Es handelt sich um das *Budgerigar Fledgling Disease Virus*, das der Art *Aves Polyomavirus 1* und der Familie der Polyomaviridae zugeordnet wird und früher als Aviäres Polyomavirus (APV) bezeichnet wurde und um den Erreger der Schnabel- und Federkrankheit der Papageien, das *Beak and*

*feather disease virus* (BFDV) aus der Familie Circoviridae. Beide Erreger spielen besonders bei Jungtieren eine große Rolle, können aber auch bei erwachsenen Vögeln Symptome hervorrufen. Eine Infektion mit APV wird beim Wellensittich auch als “Französische Mauser” bezeichnet. Beide Erkrankungen ähneln sich in Bezug auf die Befiederungsstörungen klinisch sehr stark. Sie sind als äußerst ansteckend einzustufen und können zu massiven Nestlingsverlusten in Beständen führen. Überlebende Jungtiere, die oft aufgrund von deformierten oder fehlenden Schwanz- und Schwungfedern flugunfähig sind, werden umgangssprachlich auch als “Renner” bezeichnet. Das Gefieder kann sich allerdings vermutlich trotz Viruspersistenz nach einer oder mehreren Mausem wieder normalisieren (Johne et al., 2003; Koehler, 2009; Sarker et al., 2015; Thumann, 1983). Daher stellen besonders symptomlose, adulte Tiere ein wichtiges Reservoir für die Virusverbreitung dar. Aufgrund der aktuell fehlenden kausalen Therapiemöglichkeiten, sollten Neuzugänge in Beständen immer erst einer Virusroutinediagnostik unterzogen werden, sowie eine Quarantäne durchlaufen. Ein sehr typisches Anzeichen für eine Erkrankung mit der PBFD kann symmetrischer Federverlust, v. a. des Großgefieders sein. Die Schnabel- und Federkrankheit der Papageienvögel wird in Kapitel 3 detailliert dargestellt.



**Abbildung 6:** Durch BFDV chronisch erkrankter Wellensittich, umgangssprachlich auch als „Renner oder Hopser“ bezeichnet

#### **2.4. Intoxikationen**

Bei Gefiederveränderungen werden auch Intoxikationen mit Zink und Blei als Ursache diskutiert (Scope, 2007). Da Zink und Blei häufig in Leber und Niere akkumulieren (Markowski et al., 2013), könnte eine Schädigung v. a. der Leber zu Automutilationen beitragen. Die Ermittlung des Bleigehaltes in Federn kann als nicht invasive Methode für den Nachweis einer Bleiintoxikation dienen (Markowski et al., 2013). Der Zinkgehalt kann im Blut bestimmt werden (Scope, 2007).

#### **2.5. Systemische Erkrankungen**

Informationen über die Hypothyreose als endokrine Ursache für Befiederungsstörungen beim Papagei sind in der Literatur nur spärlich zu finden. Ein gut dokumentierter Fall einer diagnostizierten Hypothyreose bei einem männlichen hellroten Ara stammt aus dem Jahr 1992 (Oglesbee et al., 1992). Die Verdachtsdiagnose Hypothyreose wurde anhand der klinischen Auffälligkeiten, wie z. B. Federverlust, Lethargie und eine milde Adipositas, sowie den dazugehörigen Laborwerten, mit einer leichten nicht regenerativen Anämie, Hypercholesterolämie und einem niedrigen T4-Basalwert, gestellt. Zusätzlich wurde ein TSH-Stimulationstest durchgeführt, welcher die Verdachtsdiagnose weiter erhärtet hat. Die daraufhin eingeleitete Behandlung mit L-Thyroxin (0,2 µg / kg Körpergewicht alle 12 h) führte zu einem normalen Wachstum der Federn, einem Verlust des übermäßig angereicherten Fettgewebes, sowie zu einer adäquaten Thyroxinkonzentration im Serum (Oglesbee et al., 1992). Die Diagnose Hypothyreose sollte immer anhand der klinischen Symptome und eines zusätzlich durchgeführten TSH-Stimulationstests gestellt werden. Die Anwendbarkeit und Aussagekraft eines TSH-Stimulationstest bei Papageien wurde bereits 1985 dargestellt (Lothrop et al., 1985). In der Studie wurden die durchschnittlichen Thyroxinkonzentrationen sowohl vor als auch nach dem TSH-Stimulationstest für Kakadus, Amazonen, hellrote Aras, Gelbbrustaras, Kongo-Graupapageien, Conuren und Nymphensittiche ermittelt.

Gefiederdepigmentierungen und -verfärbungen (grau zu dunkelbraun; grün zu schwarz), Federverlust, Juckreiz und Dermatitis können auch aufgrund von infektiösen oder nicht infektiösen Erkrankungen der Leber entstehen. Zusätzlich können Nierenerkrankungen zu einer Dermatitis und zu Federverlust, allerdings ohne Juckreiz, führen (Krautwald-Junghanns, 2007).

## 2.6. Tumore und Zysten

Es sind mehrere Arten von Federzysten beschrieben. Die wohl auffälligsten Zysten sind häufig an den Arm- und / oder Handschwingen und dem Schwanzgefiederansatz lokalisiert. Die sogenannten Federbalgzysten haben eine mehr oder weniger harte Kapsel mit gelblich, käsigem und Federreste enthaltendem Inhalt (Baker, 1996). Oft müssen sie chirurgisch entfernt werden, da sie eine enorme Größe erreichen können.



**Abbildung 7:** Wellensittich mit multiplen Federbalgzysten (oben). Wellensittich mit Flügelspitzentumor (unten links). Wellensittich mit Bürzeldrüsentumor, post mortem (unten rechts)

Bei Lipomen handelt es sich um gutartige Tumoren, die je nach Größe ein ernsthaftes Problem darstellen können. Aufgrund der Hautschwellung oder durch Benagen kann es zu Federverlust kommen (Baker, 1996). Eine weitere Ursache für Federwachstumsstörungen, ohne Juckreiz, können Tumore oder Zysten der Gonaden sein (van Zeeland und Schoemaker, 2014). Hier kommt es infolge einer Hormonstörung zu Problemen bei der Federneubildung. Federverlust, Juckreiz und Verlust der wasserabweisenden Eigenschaft des Gefieders können auch durch einen Bürzeldrüsentumor entstehen (Krautwald-Junghanns, 2007).

### **2.7. Ekzeme**

Ekzeme treten bei Papageien meist sekundär, infolge von Federrupfen oder Dermatitis auf. Eine Sonderform der Ekzeme kommt als multifaktorielles Geschehen, als sogenanter EMA-Komplex (*Ekzema Melopsittacus et Agapornis*), gehäuft bei Wellensittichen und Agaporniden vor. Die auslösenden Faktoren sind bis heute nicht alle bekannt, oft scheinen haltungsbedingte Faktoren (Stress und rangniedere Positionen) und systemische Erkrankungen mit einer Rolle zu spielen. Die nässenden und juckenden Ekzeme sind meist an Flügelunterseiten oder im Schulterbereich am Rücken lokalisiert. Häufig kommen Sekundärinfektionen mit Bakterien und Pilzen hinzu (Kummerfeld, 1980).

### **2.8. Xanthomatose**

Bei der Xanthomatose handelt es sich um eine nichttumoröse, lederartige Hautverdickung unbekannter Ursache, die beim Wellensittich und anderen Psittaziden vorkommt. Durch die derbe, gelbliche Verdickung und Zubildung der Haut kann es lokal zu Federverlust oder Missbildungen kommen. In der Histologie können typischerweise eine Ansammlung von lipidhaltigen Makrophagen und Riesenzellen sowie freies Cholesterin und fibrotische Areale gesehen werden.

### **2.9. Verhaltensbedingte Störungen - Federrupfen**

Es wird geschätzt, dass ca. 10 - 15 % aller Papageien in Gefangenschaft selbstzerstörerisches Verhalten in Form von Federrupfen zeigen (Lumeij und Hommers, 2008). Oft ist es schwierig, die Ursachen zu ermitteln. Es kommen haltungsbedingte, medizinisch bedingte oder rein verhaltensbedingte Faktoren in Frage. Bei einem sogenannten Federrupfer ist typischerweise der Kopf voll befiedert. Es muss allerdings auch bedacht werden, dass ein Partnertier als Rupfer in Frage kommen kann. Daher ist ein sorgfältiger Vorbericht mit genauer Analyse der

Haltungsbedingungen besonders wichtig (van Zeeland und Schoemaker, 2014).

### **2.10. Sonderform der Befiederungsstörung: „Feather Duster Syndrome“**

Das „Feather Duster Syndrome“ ist bis dato nur bei den sogenannten hochgezüchteten Formen der „Schauwellensittiche“ beschrieben worden. Man geht daher davon aus, dass es sich um einen genetisch bedingten Defekt aufgrund von Inzucht handelt. Elterntiere die einen „feather duster“ hervorgebracht haben, sowie die phänotypisch unauffälligen Geschwister des „feather dusters“ müssen daher laut Gutachten zur Auslegung von § 11b des Tierschutzgesetzes (Verbot von Qualzuchtungen) der Sachverständigengruppe Tierschutz und Heimtierzucht aus der Zucht genommen werden. Bereits 1996 wurde bei einer Untersuchung von Wellensittichen auf Ausstellungen in England über mehrere „feather duster“- Fälle berichtet, die aufgrund von speziellen Verpaarungen reproduzierbar waren (Baker, 1996). Betroffene Wellensittichnestlinge zeigen von Anfang an ein gesteigertes Bettelverhalten, mit andersartigen Lautäußerungen. Erst später, wenn die Befiederung der normalen Jungvögel fertig ausgebildet ist, wird sichtbar, dass bei einem „feather duster“ das Federwachstum nicht stoppt. Die Federn wachsen weiter in die Länge und oft haben die Jungtiere zusätzlich eine Microphthalmie, wodurch der Visus stark eingeschränkt wird (Baker, 1996). Die Funktion der Federn in Bezug auf das Fliegen ist stark eingeschränkt, und die Flugunfähigkeit hindert die Tiere an der Ausübung normalen Verhaltens. Meistens erreichen sie nur ein sehr geringes Alter (wenige Wochen bis zu einem Jahr), da aufgrund des abnormen Federwachstums u. a. ein nicht therapierbares Eiweißmangelsyndrom besteht (Hochleithner M, 1993; Oser und Berens von Rautenfeld, 1977).



**Abbildung 8:** Juveniler Wellensittich „feather duster“, post mortem

### **3. Circovirusinfektion der Papageien (Pbfd)**

Die Schnabel- und Federkrankheit der Papageien, auf Englisch “psittacine beak and feather disease” (Pbfd) ist eine der häufigsten und bedeutendsten Viruserkrankung der Papageienvögel. Eine Infektion mit BFDV ist sowohl bei Großpapageien und Kakadus als auch bei kleineren Sittichen beschrieben worden (Bert et al., 2005; Hsu et al., 2006; Julian et al., 2013; Rahaus et al., 2003).

Die Infektion besitzt auch hinsichtlich des Artenschutzes große Bedeutung. Von den 78 Arten, bei denen BFDV bisher nachgewiesen wurde, sind lediglich 50 Arten von der Weltnaturschutzorganisation (International Union for Conservation of Nature, IUCN) als nicht gefährdet eingestuft, 7 Arten gelten als potentiell gefährdet und 19 Arten als gefährdet (Fogell et al., 2016). Eine deutschlandweite Studie mit 32 unabhängigen Zuchtbeständen und insgesamt 146 symptomlosen Tieren aus 19 verschiedenen Genera ergab, dass bei 39 % der untersuchten Psittaziden das Virus per PCR nachgewiesen werden konnte. Subklinische Infektionen scheinen daher in ganz Deutschland eine große Rolle zu spielen (Rahaus et al., 2003).

### 3.1. Ätiologie

Die Erkrankung wurde erstmals 1975 bei Kakadus in Australien entdeckt (Albertyn et al., 2004; Latimer et al., 1990). Der Erreger der Schnabel- und Federkrankheit der Papageien ist ein unbehülltes, einzelsträngiges DNA-Virus der Gattung *Circovirus*, das in die Familie *Circoviridae* eingeordnet wird (Ritchie et al., 1989; Todd et al., 2005). Vor kurzem wurde die Familie *Circoviridae* einer umfangreichen Revision unterzogen, bei der das ursprünglich zweite Genus der Familie, *Gyrovirus*, mit dem *Chicken anaemia virus* (CAV) (Biagini et al., 2011) in die Familie *Anelloviridae* eingegliedert wurde (Hino und Prasetyo, 2009; Rosario et al., 2017). Stattdessen wurde das relativ neue Genus *Cyclovirus* in die Familie *Circoviridae* eingeordnet, da die Genome signifikante Charakteristika teilen (Biagini et al., 2013; Breitbart et al., 2017; Li et al., 2010; Tarján et al., 2014). Nach der aktuellen Klassifizierung der Viren (Rosario et al., 2017) kommen 11 *Circovirus*-Spezies bei Vögeln vor. Dabei handelt es sich um das, „*Beak and feather disease virus*“, „*Goose circovirus*“, „*Duck circovirus*“, „*Swan circovirus*“ (Halami et al., 2008), „*Gull circovirus*“ (Todd et al., 2007), „*Pigeon circovirus*“, „*Canary circovirus*“, „*Finch circovirus*“ (Todd et al., 2007), „*Starling circovirus*“ (Johne et al., 2006) und „*Zebra finch circovirus*“ (Rinder et al., 2015) (siehe auch Tab. 3).

**Tabelle 3:** Taxonomie der Familie *Circoviridae* (Rosario et al., 2017)

Familie <i>Circoviridae</i>	Aviäre Vertreter Genus <i>Circovirus</i> :
	Beak an feather disease virus (BFDV)
	Pigeon circovirus (PiCV)
	Goose circovirus (GoCV)
	Canary circovirus (CaCV)
	Duck circovirus (DuCV)
	Gull circovirus (GuCV)
	Finch circovirus (FiCV)
	Raven circovirus (RaCV)
	Starling circovirus (StCV)
	Swan circovirus (SwCV)
	Zebra finch circovirus (ZfCV)
	Aviäre Vertreter Genus <i>Cyclovirus</i>
	Chicken associated cyclovirus 1 (ChickACyV)

Circoviren gehören mit 14 bis 21 nm Durchmesser zu den kleinsten tierpathogenen Viren. Sie besitzen ein zirkuläres, einzelsträngiges DNA-Genom mit ambisense-Polarität (single stranded DNA, ssDNA) und einer Größe von etwa 2000 Nukleotiden, das in einem icosphaerischen Kapsid eingeschlossen ist (Heath et al., 2004; Ritchie et al., 1989). Im Genom des Beak and feather disease virus wurden zwei offene Leserahmen (ORFs) identifiziert, die mit ORF V1 und ORF V2 bezeichnet wurden und für ein Replicase- (rep) bzw. ein Capsid- (cap) Protein kodieren. Außerdem gibt es noch weitere ORFs, deren Funktion bis dato unklar ist (Bassami et al., 1998; Heath et al., 2004; Julian et al., 2013; Ritchie et al., 1989; Todd et al., 1991).

Circoviren als einzelsträngige DNA-Viren sind durch eine sehr hohe Mutationsrate gekennzeichnet, die sich in einer hohen genetischen Heterogenität und der Existenz vieler Virusstämme äußert. Das Rep-Protein-Gen (V1) scheint im Gegensatz zum Cap-Protein-Gen (C1) in seiner Nukleotidsequenz etwas konservierter zu sein (Julian et al., 2013; Varsani et al., 2001). Dies könnte an den verschiedenen Funktionsweisen der Proteine liegen. Das als Replicase oder „replication-associated protein“ bezeichnete Rep ist zuständig für die Einleitung der Virus-DNA-Replikation (Bassami et al., 1998). Funktionsausfälle des Proteins müssten daher fatale Folgen für die Virusvermehrung haben. Eine Veränderung des Cap-Proteins hingegen könnte eine vorteilhafte Anpassung an das Wirts-Immunsystem widerspiegeln, da es für die Kapselbildung des Virus und seine Einschleusung in die Wirtszelle und die Passage durch die Kernmembran verantwortlich ist (Heath et al., 2004, 2006; Köhler, 2009; Niagro et al., 1998; Sarker et al., 2015).

### **3.2. Epidemiologie**

PBFD ist weltweit bei vielen in Gefangenschaft lebenden Papageienarten, aber auch bei wildlebenden Populationen nachgewiesen worden. Es ist eine der schwerwiegendsten Viruserkrankungen dieser Vögel, die zu massiven wirtschaftlichen Verlusten in der Tierzucht und im Handel führt, z. B. laut einer Einschätzung von Heath et al. (2004) bis zu 20 % Verluste jährlich in Zuchtbeständen in Südafrika (Fogell et al., 2016; Woods and Latimer, 2003). In der Literatur wird diskutiert, dass sich die verschiedenen Virusstämme sowohl anhand ihrer Wirtsspezifität, aber auch aufgrund ihrer Virulenzfaktoren oder anhand ihres geographischen Vorkommens eingruppierten (Bassami et al., 2001; de Kloet und de Kloet, 2004; Heath et al., 2004; Khalesie et al., 2005; Ogawa et al., 2013; Varsani et al., 2011). Eine Wirtsspezifität

wurde u. a. für Viren bei Wellensittichen (Ogawa et al., 2005; Ritchie et al., 2003; Varsani et al., 2011), bei Nymphensittichen (Shaerer et al., 2008), bei Schwalbensittichen (Sarker et al., 2013), bei Loris (Das et al., 2016; Ritchie et al., 2003) und Kakadus (Ritchie et al., 2003) vermutet. Studien ergaben aber auch, dass sich viele Virusstämme nicht einzelnen Papageienspezies zuweisen lassen, und dass z. T. in ein und demselben Tier mehrere Virusstämme nachweisbar sind. Ogawa et al. (2013) berichtete von einem afrikanischen Graupapagei, bei dem 5 verschiedene BFDV-Sequenzen im Blut festgestellt wurden und Sarker et al. (2014) von einem Helmkakadu bei dem 7 genotypische Varianten detektiert wurden. Der weltweite Handel und eine enge Nachbarschaft der verschiedensten Papageienarten in Zuchten oder Privathaushalten und z. T. auch möglicher Kontakt zu freilebenden Populationen scheinen das Auftreten von multiplen Infektionen mit BFDV und Rekombinationen zwischen Virusstämmen zu begünstigen (Ogawa et al., 2013; Varsani et al., 2011). Wahrscheinlich sind alle Papageienspezies für eine Infektion mit BFDV empfänglich (Sarker et al., 2014; Shaerer et al., 2008).

Da es noch keine eindeutige Richtlinie zur Klassifizierung der einzelnen Circovirusisolate bei Papageien gibt, machten Varsani et al. (2011) einen Vorschlag zur Unterteilung der BFDV Stämme, der auf der phylogenetischen Untersuchung von 87 Vollgenomsequenzen basierte. In dieser Studie wurden die taxonomischen Einheiten Virusstamm, Stammvariante und Subtyp innerhalb der Spezies BFDV mittels Identitäten von Vollgenomsequenzen definiert. Für Virusstämme wurde ein Grenzwert für die Genomsequenzidentität von 94 % beschrieben, wobei sich Isolate mit einer genetischen Übereinstimmung von > 94 % zum selben Virusstamm einordnen, während Virusisolate mit einer Übereinstimmung von > 98 % als Subtypen klassifiziert wurden. Bei Identitäten von 94 – 98 % wurden Virusisolate in dieser Studie als Virusvariationen desselben Stammes aufgefasst. Bei der Einteilung der 87 Circovirusisolate von 30 Papageienspezies aus 10 Ländern kam die Arbeitsgruppe zu dem Ergebnis, dass es 14 verschiedene Stämme gibt, wobei sich ein Stamm von Wellensittichen aus Japan und China sehr deutlich von den restlichen Viren abgrenzte (Varsani et al., 2011).

### **3.3. Pathogenese und Pathologie**

Eine horizontale Übertragung des Beak and Feather Disease Virus erfolgt entweder durch direkten Kontakt oder über Kot und Federn, getrocknete Faeces, Federstaub und Hautpartikel. Das Virus kann mehrere Monate bis Jahre in der Umgebung

persistieren, in Volieren z. B. in Vogelnestern oder auf anderen Einrichtungsgegenständen. Da das Virus auch in Kropfsekreten zu finden ist, kann eine Infektion auch durch das Verfüttern von Kropfinhalt durch Eltern- oder Partnertiere zu Stande kommen (Köhler, 2009; Latimer et al., 1991). Zusätzlich wurde ein vertikaler Übertragungsweg vermutet, da Circovirus-DNA in embryonierten Eiern von infizierten Hennen nachgewiesen wurde (Rahaus et al., 2008). Auch eine mechanische Übertragung der Viruspartikel durch Milben und die orale Aufnahme von Insekten könnten eine Rolle spielen, Insekten scheinen als Vektoren in Betracht zu kommen (Portas et al., 2017). In einer Studie aus Australien waren alle Vögel, die nicht den Psittaziden zugehörig waren, bei denen jedoch BFDV-DNA in Leberproben nachgewiesen werden konnte, Insektenfresser. In derselben Veröffentlichung wurde psittazides Virusgenom in Leberproben von verschiedenen Greifvögeln nachgewiesen. Das detektierte BFDV-Genom passte zu dem jeweiligen Beutespektrum der Greifvögel, z. B. Allfarblori (*Trichoglossus haematodus*) als Beutetier vom Riesenkauz (*Ninox strenua*). Oft waren auch räumliche Zusammenhänge rekonstruierbar, wie z. B. gemeinsame Nistmöglichkeiten (Amery-Gale et al., 2017).

Nach der Virusaufnahme folgt eine kurze Virämie-Phase mit anschließender Ansiedlung in sich schnell teilenden Zellen in lymphatischem Gewebe, Federfollikeln, Haut, Kropf, Leber, Milz, Darm, Ovar, Hoden, usw. (Latimer et al., 1991; Johne et al., 2004; Ramis et al., 1998). Unter anderem befällt das Virus die Bursa fabricii und den Thymus, dies führt wahrscheinlich zu einer verminderten Lymphozytenproduktion und einer Immunsuppression (Hakimuddin et al., 2016; Latimer et al., 1991; Ritchie et al., 1989; Trinkaus et al., 1998). Virale Einschlusskörper wurden auch im Knochenmark gefunden (Latimer et al., 1990).

Das Virus infiziert hauptsächlich sich schnell teilende Zellen und wird bei histologischen Untersuchungen häufig in Federepithelzellen und Federfollikelzellen gefunden. Aufgrund einer Störung der Keratinbildung in den Federfollikelzellen können Federdeformation und Federverlust entstehen (Trinkaus et al., 1998). Hyperkeratosen führen zu persistierenden Federscheiden und zu abnormem und übermäßigem Schnabel- und Krallenwachstum. Als Folge von Nekrosen in den Epithelzellen treten gelockte und verdrehte Federn auf. Schädigungen in der Federpulpa können zu charakteristischen Einblutungen in den Federschaft sowie zu Einschnürungen und Grimalen (Hungermalen) der Federn führen

(Pass und Perry, 1984) (siehe Abb. 9). Zusätzlich sind Gewebnekrosen sowohl in der Haut als auch den inneren Organen beschrieben worden (Latimer et al., 1991; Schoemaker et al., 2000; Trinkaus et al., 1998).



**Abbildung 9:** Schwungfedern eines Wellensittichs mit Grimalen, sog. „Hungermalen“, und Einblutungen in den Federschäften; Federschäfte haben z. T. auf Höhe der Grimalen auch strukturelle Veränderungen / Linien, welche Sollbruchstellen darstellen können

### 3.4. Klinik

Circoviren wurden weltweit bei mindestens 78 verschiedensten Papageienspezies in Gefangenschaft und in freier Wildbahn nachgewiesen (Fogell et al., 2016), wobei sich das klinische Bild enorm unterscheiden kann. Die Symptome einer Infektion mit PBFV können vielfältig sein und sogar von Individuum zu Individuum, innerhalb einer Spezies, stark variieren. Diese Variationen sind wahrscheinlich durch Faktoren vonseiten des Virus, also zum Beispiel durch Virulenzunterschiede zwischen Virusstämmen, und der Virusexposition (Fogell et al., 2016; Ritchie et al., 1989), aber auch durch Wirtsfaktoren, also zum Beispiel durch den Immunstatus des Einzeltieres und das Alter bedingt (Bonne et al., 2009; Jackson et al., 2014). Bei Federverlust, insbesondere symmetrischem Verlust, bei starkem Schnabel- und Krallenwachstum (Todd, 2004), bei einer Immunsuppression unklarer Genese, sowie bei ständig wiederkehrenden Sekundärinfektionen (Ramis et al., 1998), sollte daher immer auch an PBFV gedacht werden. Schnabelveränderungen wurden insbesondere bei Kakadus beschrieben (Gerlach, 1994; Latimer et al., 1991;

Ortiz-Catedral et al., 2010; Pass and Perry, 1984). Bei einigen Spezies stehen eher farbliche Gefiederveränderungen (gelbe Federn werden grün und blaue Federn werden weiß) und schlampig aussehendes Gefieder im Vordergrund, z. B. beim Königssittich (*Alisterus scapularis*) und beim Alexandrasittich (*Polytelis alexandrae*) (Doneley, 2003).

Generell werden akute, chronische und perakute Verlaufsformen beschrieben (Gerlach, 1994), die im Folgenden näher dargestellt sind.

#### **3.4.1. Akute Verlaufsform**

Akute Krankheitsverläufe werden vor allem bei Nestlingen und Jungtieren beobachtet (Gerlach, 1994; Bert et al., 2005). Die Symptome variieren von Spezies zu Spezies stark. Eine Infektion kann bei Wellensittichen innerhalb von 2 - 3 Wochen zum Tod führen (Hess et al., 2005). Häufig treten Federänderungen beim Wechseln der Erstlingsdunen zum Jugendgefieder auf - statt normal ausgebildeten Federn wachsen verkrüppelte und verdrehte Federn (Köhler, 2009; Ritchie et al., 1990). Zusätzlich kann aufgrund eines akuten Leberschadens ein Ikterus und erhöhte Blutungsneigung auftreten (Phalen, 2006).

#### **3.4.2. Chronische Verlaufsform**

Beim chronischen Bild steht eine Schädigung der Federfollikel und -epithelzellen im Vordergrund. Deformierte, keulenförmige, eingeschnürte, anderweitig missgebildete und um die Achse verdrehte Federn erscheinen häufig bei der Mauser, genauso wie persistierende Federscheiden. Des Weiteren können zu locker in Federscheiden sitzende Federn auftreten, welche kurz nach dem Erscheinen/Schieben aus dem Follikel, ausfallen (Australian Government, Department of the Environment, 2015; Gerlach, 1994; Pass und Perry, 1984; Ritchie et al., 1989) (siehe auch Abb. 10, oben links und rechts). Persistierendes Blut in bereits ausgewachsenen, aber verkrüppelten oder abgebrochenen Federn sind keine Seltenheit (siehe Abbildungen 10). Fehlender Federstaub und der damit verbundene Verlust des Wasserabweisens lassen die Federn oft schlampig und ungepflegt erscheinen (Australian Government, Department of the Environment, 2015; Doneley, 2003).



**Abbildung 10:** Zu locker sitzende Federn mit verdickten und persistierenden Blutkielen und persistierende Federscheiden (oben links und rechts, unten links und rechts)



**Abbildung 11:** Verdrehte Schwanzfeder (oben). Renner mit massiver Schnabeldeformation, fehlenden Steuerfedern und Gefiederschäden an Schwung- und Deckfedern (unten links). Renner mit Großgefiederschaden (unten rechts)

Die chronische Form wird oft als progressiv fortschreitend beschrieben, wobei nach jeder Mauser eine Verschlechterung des Gefiederzustandes bis hin zum völligen Verlust eintreten kann (Gerlach, 1994; Köhler, 2009; Pass und Perry, 1984). Allerdings wurde auch von spontanen Ausheilungen der Gefiederschäden bei Vögeln berichtet. Bei einer wildlebenden Population Regenbogenspinten (Bienenfressern) mit massiven Federveränderungen, bis hin zum Federverlust wurde eine Infektion mit BFDV festgestellt. Diese stellte sich als selbstlimitierend heraus. Tiere, bei denen anfangs mittels PCR Virus-DNA in Blut und Federn nachgewiesen wurde, wurden nachdem sich ihr Gefieder nach 6 Monaten erholt hatte, mittels PCR negativ getestet (Sarker et al., 2015). Auch in einer seit 30 Jahren bestehenden Zucht von verschiedensten Wellensittichen (z. B. Farbenwellensittiche und Schauwellensittiche in unterschiedlichsten Farbschlägen und mit unterschiedlichen Hauben), konnte die Erfahrung der Regeneration von Gefiederschäden bei BFDV-positiven Jungtieren bestätigt werden (Thumann H, persönliche Mitteilungen).

Häufig können bei einer chronischen Erkrankung insbesondere bei Kakadus auch

Schnabeldeformationen und farbliche Veränderungen des Schnabels beobachtet werden. Abnormales Längenwachstum, brüchiges Schnabelhorn, bis hin zu Schnabelfrakturen wurden bereits 1989 bei Kakadus beschrieben (Raidal et al., 2005; Ritchie et al., 1989). Schnabeldeformationen sind auch als Todesursache bei diversen Kakadus bekannt, da betroffene Tiere durch massive Schnabelverformungen nicht mehr ausreichend Futter aufnehmen können (Australian Government, Department of the Environment, 2015). Bei einem Gelbhaubenkakadu und einem Rosakakadu mit chronischen BFDV-Infektionen, wurde von einem starken Federverlust, der Konturfedern und auch Dunen betraf, und von multiplen Schnabelfrakturen berichtet (Raidal et al., 2005).



**Abbildung 12:** Persistierende Federscheiden und brüchiges Schnabelhorn bei einem männlichen Wellensittich, post mortem

Aufgrund der Hyperkeratose kann zusätzlich ein übermäßiges Krallenwachstum auftreten.

### 3.4.3. Perakute Verlaufsform

Eine besonders schwere Form der PBFDF tritt bei Nestlingen auf und endet meist tödlich. Das massive Jungtiersterben dauert im Bestand meist nur eine kurze Phase an und ist durch Lethargie, Enteritis, Septikämie und plötzlichem Tod der Einzeltiere

gekennzeichnet, ohne dass die typischen, oben bereits beschriebenen klinischen Symptome der Befiederungsstörungen auftreten (Australian Government, Department of the Environment, 2015). Auch bei Graupapageien im Alter von bis zu 12 Monaten ist eine perakute Form mit Anämie und Leukopenie, ohne die typischen Federveränderungen, beschrieben worden. Nach dem Auftreten der ersten Symptome starben die Jungtiere meist innerhalb von 36 h. In histopathologischen Untersuchungen konnten multifokale Nekrosen in Milz, Leber, Pankreas, Darm und Nebenniere sowie diffuse spongioforme Veränderungen mit fokalen Nekrosen im Gehirn festgestellt werden (Doneley, 2003; Robino et al., 2010; Schoemaker et al., 2000; Stanford, 2004).

### **3.5. Diagnose**

Oft wird bei Patienten nach sorgfältiger Anamnese und Allgemeinuntersuchung eine Blutuntersuchung durchgeführt, um einen besseren Überblick über den Gesamtzustand des Tieres zu erhalten. Anzeichen für eine BFDV-Infektion im Blutbild können eine massive Leukopenie ( $< 2 \times 10^9 / L$ ) und eine nicht-regenerative Anämie (Hämatokrit 10 – 25 %) sein (Ortiz-Catedral et al., 2010; Schoemaker et al., 2000; Stanford, 2004; Tomasek und Tukac, 2007). Nachgeschaltet werden dann spezifischere Tests eingeleitet, die im Folgenden näher erläutert werden.

#### **3.5.1. Nachweis mittels Polymerase-Kettenreaktion**

Die aufgrund der klinischen Symptome erhobene Verdachtsdiagnose PBFD kann mittels PCR durch Nachweis von Virus-DNA bestätigt werden. Die PCR wird in Publikationen als eine der am häufigsten angewandten Untersuchungsmethode zitiert (Fogell et al., 2016). Protokolle von Ypelaar et al. (1999), Ritchie et al. (2003) und Ogawa et al. (2005), die für den Nachweis von BFDV entwickelt wurden, werden dabei häufig angewendet. Eine geschachtelte Breitspektrum-PCR von Halami et al. (2008) kann für den Nachweis von BFDV ebenfalls eingesetzt werden. Es wird empfohlen, sowohl Tupferproben und Federn als auch Blut zu untersuchen, um das Virus möglichst sicher zu detektieren (Hess et al., 2004; Katoh et al., 2008; Khalesie et al., 2005). Bei verstorbenen Tieren kann die PCR-Untersuchung von Organen zielführend für eine Bestätigung der Infektion mit BFDV sein. Insbesondere in Herzmuskulatur, Leber und Darm, aber auch in Hoden, Trachea, Kropf und Kloake konnte das Virus post mortem nachgewiesen werden (Rahaus et al., 2008).

### **3.5.2. Histologischer Nachweis**

Histologisch können Proben mittels Licht- und Elektronenmikroskopie auf vorhandene Viruseinschlusskörper gescreent werden (Shaerer et al., 2008; Todd, 2004). Bei einer vorliegenden Erkrankung können bei verstorbenen Tieren intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen in Makrophagen von Schnabel und Gaumen, Bursa fabricii, Thymus, Zunge, Nebenschilddrüse, Kropf, Oesophagus, Milz, Eingeweide, Knochenmark, Leber, Schilddrüse, Hoden, Ovarien und Nebennieren, gefunden werden (Latimer et al., 1990; Ramis et al., 1998). Besonders im Federfollikelepithel konnten bei infizierten Tieren Massen an Virionen mittels Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden (Latimer et al., 1991; Murphy et al., 1999). Die Elektronenmikroskopie hat allerdings aktuell wegen einer geringen Sensitivität und des hohen technischen Aufwandes für die Routinediagnostik der Pbfd keine Bedeutung.

### **3.5.3. Serologische Nachweisverfahren**

Da Circoviren hämagglutinierende Eigenschaften besitzen, konnten auch Haemagglutinationstests (HA-Tests) und Haemagglutinationsinhibitions-Tests (HI-Tests) entwickelt werden, um Antikörper- und Antigennachweise durchzuführen (Raidal et al., 1993; Shaerer et al., 2008). Eine Studie im Jahre 2005 zeigte, dass adulte symptomlose Vögel hohe Antikörperspiegel aufwiesen, aber der Antigennachweis negativ ausfiel, wohingegen chronisch oder akut kranke Tiere niedrige oder gar keine Antikörperspiegel hatten (Khalesie et al., 2005). Als geeignet für den HA-Test haben sich frisch gezogene Blutkiele, von gerade nachwachsenden Federn, bewährt. Ältere, also bereits ausgewachsene Federn können ein falsch negatives Ergebnis begünstigen (Doneley, 2003). Bei HI-Assays scheint die Erythrozytenauswahl von verschiedenen Spezies und zum Teil auch von verschiedenen Individuen einer Spezies einen Einfluss auf das Testergebnis zu haben. Erythrozyten von Kakadus, aber zum Beispiel nicht von Wellensittichen oder Hühnern, erwiesen sich für diese Tests als geeignet (Ritchie et al., 1991; Sanada und Sanada, 2000). Dies schränkt die praktische Anwendbarkeit dieser Tests entscheidend ein.

Da bis dato geeignete Zellkultursysteme für die Virusanzucht fehlen, sind die diagnostischen Möglichkeiten generell limitiert (Bonne et al., 2009; Johne et al., 2004; Pass und Perry, 1985; Raue et al., 2004; Ritchie et al., 1989). Es wurden einige ELISA- (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Tests entwickelt um

BFDV- spezifische Antikörper in Psittaziden-Seren zu detektieren und ein ausreichend standardisiertes Testverfahren zu ermöglichen (Johne et al., 2004; Ritchie et al., 1992; Shaerer et al., 2009). Ein von Johne et al. (2004) entwickelter ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) mit einem rekombinanten Kapsidprotein als Antigen zeigte eine große Übereinstimmung der Testergebnisse mit einem parallel durchgeführten HI-Test und einem Immunoblot. Allerdings wurden in der Studie nur Seren von 11 Tieren parallel untersucht. Grundsätzlich ist es denkbar, dass serologische Testverfahren durch die individuellen Unterschiede in den Virus-Genabschnitten, z. B. des C1 Gens, in ihrer Anwendbarkeit eingeschränkt sind (Johne et al., 2004; Raue et al., 2004).

Die Kombination von PCR mit serologischen Verfahren wie zum Beispiel dem HA- und HI-Test kann gewiss die höchste diagnostische Sicherheit zu einer Infektion mit BFDV und der Immunität eines Tieres gegen das Virus liefern (Khalesie et al., 2005).

#### **3.5.4. Sonstige Nachweismöglichkeiten**

Auch wenn generell ein Screening auf Krankheitserreger aus Umgebungsproben mittels Luftkeimmessgerät eine gute und noninvasive Alternative zu Einzeltierproben zu sein scheint, trifft dies offenbar für BFDV nicht zu. In einer Studie in Slovenien konnte BFDV zwar in 42,9 % der Kotproben nachgewiesen werden, jedoch nicht in Proben, die mittels Luftkeimmessgerät gesammelt wurden (Dovč et al., 2016).

#### **3.6. Therapie**

Eine kausale Therapie ist derzeit nicht möglich. Da bei erkrankten Tieren meist eine Immunsuppression beobachtet wird (Ramis et al., 1998), sollte das Augenmerk auf der Prophylaxe von Sekundärinfektionen liegen. Es gilt, Stress zu vermeiden und das Immunsystem zu stärken.

Um klinische Symptome zu mildern, ist es sinnvoll, die Haltungsbedingungen zu optimieren. Auch wenn ein Effekt der im Folgenden geschilderten Maßnahmen bislang nicht durch kontrollierte Studien belegt ist, sind sie vermutlich dennoch zu empfehlen. Hierzu gehören eine ausgewogene Vitamin- und Mineralstoffversorgung, Frischluftzufuhr, ausreichende Luftfeuchtigkeit sowie Freiflug und eventuell die Gabe von Laktobazillen, um das Darmmikrobiom zu stabilisieren. Moderate

UV-Licht-Zufuhr kann das Federwachstum positiv beeinflussen. Zusätzlich könnte versucht werden den Virusdruck zu senken, z. B. durch Luftwäscher, um infektiöse Federstaubpartikel zu minimieren. Eine regelmäßige Reinigung und Desinfektion von Käfig, Einrichtungsgegenständen und Räumlichkeiten reduzieren möglicherweise die Ansammlung infektiösen Federstaubes und auch Sekundärinfektionen durch Bakterien, Pilzen, usw.. Ausreichend viele und abwechslungsreiche Beschäftigungsmöglichkeiten, z. B. Naturholzzweige, Futterspielzeug, usw. können zusätzlich helfen, dem Stress vorzubeugen.

Interferone werden bei einigen Virusinfektionen des Menschen, zum Beispiel dem Hepatitis-C-Virus, erfolgreich zur Behandlung eingesetzt. Sie besitzen vermutlich eine strikt speziesspezifische Wirkung und für Vögel, insbesondere für Psittaciformes, sind entsprechende Substanzen bislang nicht kommerziell verfügbar. Ob eine Behandlung mit Interferon bei BFDV-Infektionen erfolgversprechend ist, wie aus Ergebnissen einer Studie aus dem Jahr 2004 mit Graupapageien gefolgert wurde, ist derzeit noch unklar. Graupapageien die mit Circoviren natürlich infiziert waren und eine massive Leukopenie zeigten, wurde über einen Zeitraum von 90 Tagen aviäres Gamma Interferon verabreicht, das aus Hühnerembryoblastoidzellen gewonnen worden war, also ein Interferon von einer nur entfernt verwandten Vogelart. Sieben von 10 Graupapageien überlebten dabei einen Zeitraum von 30 Wochen, während im Allgemeinen diese akuten Krankheitsformen durch eine sehr hohe Mortalität bei dieser Papageienart gekennzeichnet sind. Die Leukozytenzahlen erreichten nach 180 Tagen wieder Normalwerte, und im Blut und auch in der Federpulpa konnten keine Circoviruspartikel mehr nachgewiesen werden. Da in der Studie nur eine geringe Zahl an Individuen nur einer Vogelspezies eingeschlossen war und eine Kontrollgruppe fehlte, müssten hierzu allerdings noch weiterführende Untersuchungen unternommen werden (Stanford, 2004). Ähnlich ist auch eine Behandlung mit  $\beta$ -(1,3/1,6)-D-Glucan, gewonnen aus Austern-Seitlingen, einer Pilzart, zu beurteilen. In Studien mit Hornsittichen, die einen chronischen Verlauf mit Befiederungsstörungen zeigten, und mit subklinisch infizierten Inkakakadus waren 9 bzw. 13 Monate nach der Behandlung Circoviren nicht mehr nachweisbar, und die Befiederungsstörungen der Hornsittiche verbesserten sich. Dieser positive Effekt wurde auf einen immunmodulierenden Effekt des  $\beta$ -Glukans zurückgeführt. Die mögliche Wirksamkeit einer derartigen Behandlung müsste ebenfalls in einer größer angelegten Studie überprüft werden (Tomasek and Tukac, 2007).

### 3.7. Prophylaxe

Derzeit gibt es keine Impfprophylaxe für PBFV. Alle bisherigen Versuche eine Virusanzucht in vitro durchzuführen, um ausreichend Antigen für eine kommerziell erhältliche Impfung herstellen zu können, sind bis dato gescheitert (Bonne et al., 2009; Fogell et al., 2016; Hakimuddin et al., 2016; Köhler, 2009; Robino et al., 2014; Sarker et al., 2015). Infizierte Psittaziden nur für eine Antigen-Produktion zu züchten, scheint aus ethischer und moralischer Sicht nicht akzeptabel zu sein.

Für den Einsatz rekombinanter Antigene liegen erste Ergebnisse vor, es konnte bislang aber noch keine zufriedenstellende Wirkung der auf diese Weise produzierten Impfstoffe erreicht werden. In einer Studie zu einer Vakzine mit einem rekombinanten BFDV-Kapsid-Protein als Antigen wurde ein Baculovirus-Sf9-Insektenzellsystem für die Proteinexpression genutzt (Stewart et al., 2007). In dem anschließenden Impf- und Infektionsversuch konnte zwar nachgewiesen werden, dass bei geimpften Nasenkakadus eine persistierende Virämie und eine Virusausscheidung über die Federn vermieden werden konnte, eine BFDV Replikation konnte aber nicht vollständig verhindert werden. Daher besteht auch hier noch Weiterentwicklungsbedarf (Bonne et al., 2009).

Da zur kommerziellen Impfstoffherstellung und für diagnostische Assays eine große Menge an kostengünstig produziertem und qualitativ hochwertigem Antigen nötig ist, konzentrieren sich neuere Studien insbesondere auf eine praktikable und preiswerte Produktion des Kapsid-Proteins. Es existieren bereits zahlreiche Ansätze zur Expression des kompletten Cap-Proteins oder Teilen davon mittels Baculovirussystem (Heath et al., 2006; Stewart et al., 2007) und auch mittels bakterienbasierten Systemen (Johns et al., 2004; Patterson et al., 2013; Sarker et al., 2015). Patterson et al. (2013) erreichten eine hohe Ausbeute eines rekombinanten Cap-Antigens von einem Circovirusisolat eines Nasenkakadus (*Cacatua tenuirostris*) mittels eines E. coli Expressionssystems und Modifikationen von Pufferlösungen. Eine erfolversprechende Methode zur preisgünstigen Herstellung von Mengen an rekombinantem Cap-Protein mit hoher Reinheit (> 95 %) im Milligrammbereich, wurde von Sarker et al. (2015) entwickelt. Die Auswahl der geeigneten E. coli Zelllinie (E. coli BL21, DE3, pLysS und Rosetta 2) und der pH-Wert des verwendeten Puffers (CAPS-Puffer-B, pH 10,5) war hierbei im Hinblick auf die Ausbeute und Löslichkeit des produzierten Antigens entscheidend. Drei

unterschiedliche Circovirusisolate, und zwar von einem Inka-Kakadu (*Lophochroa leadbeateri*), einem Braunkopfkakadu (*Calyptorhynchus latami*) und einem Helmkakadu (*Callocephalon fimbriatum*) brachten dieselben erfolgversprechenden Resultate, die weitere biochemische und strukturelle Studien des Circovirus-Capsid-Proteins ermöglichen (Sarker et al., 2015). Allerdings besteht auch hier noch weiterer Forschungsbedarf.

Aktuell steht folglich die Prävention einer möglichen Infektion immer noch an erster Stelle der Bekämpfung. Die Einhaltung einer strikten Hygiene, sowie einer strikten Quarantäne mit Screenen von Neuzugängen sind hierzu unerlässlich.

In Australien hat es sich bewährt, eine mindestens 63 tägige Quarantäne einzuhalten und am Tag 0, Tag 28 und Tag 56 der Quarantäne diagnostische Tests zum Nachweis von BFDV durchzuführen. Dabei sollten parallel Haemagglutinationstests zum Nachweis vorhandener Antikörper und PCR-Untersuchungen zur Detektion viraler DNA durchgeführt werden, um eine möglichst hohe diagnostische Sicherheit zu erreichen (Australian Government, Department of the Environment and Heritage, 2006).

Aufzuchtstationen für bedrohte Arten könnten aufgrund ihres meist gemischten Bestandes auch eine Gelegenheit für das Virus bieten, auf andere Arten überzugreifen. Daher sollten bei Nachzuchtprojekten vor dem Auswildern unbedingt Screenings auf BFDV vorgesehen sein (Massaro et al., 2005).

Die Inaktivierung und Elimination, insbesondere von unbehüllten DNA-Viren, gestaltet sich schwierig. Da das BFDV nicht kulturell für Desinfektionsversuche angezüchtet werden kann, aber wie das „*Porcine circovirus type 2*“ (PCV2) zur Familie der *Circoviridae* gehört, nimmt man an, dass es bei beiden Virusarten Ähnlichkeiten in der Tenazität und Empfindlichkeit gegenüber Umweltbedingungen und Desinfektionsmitteln gibt. Für PCV2 ist beschrieben worden, dass es 30 min bei 80°C feuchter Hitze (Raidal und Cross, 1994) und bei 120°C trockener Hitze ohne weiteres übersteht (Welch et al., 2006) und auch bis zu einem pH-Wert 3 säurebeständig ist (Royer et al., 2001). Daher muss die Reinigung und Desinfektion kontaminierter Gegenstände und Räumlichkeiten stets unter akribischer Einhaltung der für die einzelnen Desinfektionsmittel vorgeschriebenen Einwirkkonzentration und -zeit durchgeführt werden. In der Desinfektionsmittelliste der DVG sind gegen Circoviren wirksame Mittel besonders ausgewiesen (<http://www.desinfektion->

[dvg.de/fileadmin/FG\\_Desinfektion/Dokumente/Listen/Tierhaltungsbereich/DVG-Desinfektionsmittelliste\\_TH.pdf](http://dvg.de/fileadmin/FG_Desinfektion/Dokumente/Listen/Tierhaltungsbereich/DVG-Desinfektionsmittelliste_TH.pdf)). Zusätzlich muss beachtet werden, dass das Desinfektionsmittel in direkten Kontakt mit dem Virus kommen muss - größere Mengen Kot, Schmutz, usw. können eine Desinfektion beeinträchtigen, da das Mittel nicht bis zu allen kontaminierten Bereichen vordringt. Ein geeignetes Desinfektionsmittel ist zum Beispiel eine Kombination der aktiven Inhaltsstoffe Kalium-Peroxymonosulfat und Natriumchlorid, in einer 1 - 2 %igen Konzentration (Virkon S, Antec International, Sudbury, Suffolk, UK), für das, angewendet für 10 min bei 20°C, eine Inaktivierung von PCV2 nachgewiesen wurde (Royer et al., 2001). Daraus wurde auch eine Wirkung des Desinfektionsmittels für BFDV abgeleitet. Darüber hinaus weist dieses Mittel nur eine geringe Toxizität für Menschen und Vögel auf (Australian Government, Department of the Environment and Heritage, 2006).

### **III. MATERIAL UND METHODEN**

In dieser Studie sollte die Verbreitung von Psittaziden-Circoviren (Beak and Feather Disease Virus, BFDV) in Beständen mit unterschiedlichen Arten von Papageienvögeln einschließlich Wellensittiche untersucht werden. In einem ersten Schritt wurden im Rahmen der klinischen Routinediagnostik an der Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische der LMU München PBFD-verdächtige Wellensittiche auf eine Circovirus-Infektion untersucht. In die Studie eingeschlossen wurden dann Wellensittiche aus Beständen, die noch andere Psittaziden-Arten enthielten. In einem zweiten Schritt wurden dann in den jeweiligen gemischten Haltungen im Rahmen einer Bestandsuntersuchung von möglichst vielen verschiedenen Papageien-Spezies klinische Proben für die BFDV-Untersuchung mittels PCR und anschließender Sequenzierung, gewonnen. Alle Vögel stammten aus kleinerer Gruppenhaltung von Privathaltern oder aus größerer Gruppenhaltung in Zuchtbeständen. Die Tiere waren vorberichtlich meist mehrere Monate bis hin zu Jahren, im Besitz.

#### **1. Untersuchungsmaterial und Probenahme**

Bei der Probensammlung wurden stets Kloakentupfer und Federn (TuFe) als Proben genommen. Wenn möglich, wurden zusätzlich Blut und, bei verstorbenen Tieren, Organe entnommen. Bei manchen Tieren wurde die Entnahme von Blutproben aus gesundheitlichen oder züchterischen (Balzphase, Brutphase) Gründen nicht durchgeführt oder war vom Besitzer nicht gewünscht.

##### **1.1. Patienten**

Insgesamt wurden 344 Psittaziden in die Untersuchung einbezogen. Dabei handelte es sich um Patienten der Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische der LMU München, und dabei primär um verdächtige Tiere, also Tiere, die entsprechende Symptome zeigten, aber auch deren Partnertiere oder im selben Bestand lebende Tiere. Für die Bestandsuntersuchungen, bei denen der Gefiederzustand mit einem Gefiederprotokoll dokumentiert wurde und die nachgewiesenen Viren genauer charakterisiert wurden, wurden 10 gemischte Psittazidenbestände ausgewählt. Auf die 10 selektierten Bestände wird im Nachfolgenden näher eingegangen.

### 1.1.1. Bestand 1

Im Bestand 1 wurden insgesamt 64 Tiere untersucht (Einzeltiere siehe Tab. 4). Es befanden sich auch noch diverses Zier- und Nutzgeflügel und Greifvögel im Bestand, wie z. B. Hühner, Gänse, Enten, Tauben, Zebrafinken, Kanarienvögel und Bussarde.

**Tabelle 4:** Übersicht der getesteten Tiere und des Probenmaterials aus Bestand 1

Spezies	Anzahl untersuchter Tiere	Probenmaterial
Wellensittich ( <i>Melopsittacus undulatus</i> )	38	TuFe, BC, Organe
Nymphensittich ( <i>Nymphicus hollandicus</i> )	12	TuFe, BC
Blaustirnamazone ( <i>Amazona aestiva</i> )	2	TuFe, BC
Kongo-Graupapagei ( <i>Psittacus erithacus</i> )	5	TuFe, BC
Weißhaubenkakadu ( <i>Cacatua alba</i> )	2	TuFe, BC
Orangehaubenkakadu ( <i>Cacatua sulphurea citrinocristata</i> )	1	TuFe, BC
Gelbbrustara ( <i>Ara ararauna</i> )	2	TuFe, BC
Kea ( <i>Nestor notabilis</i> )	2	TuFe, BC, Organe
Summe untersuchter Tiere:	64	

### 1.1.2. Bestand 2

Der Bestand wurde ca. 4 Jahre vor der Untersuchung von einem neuen Halter übernommen und umfasste ca. 90 „Schau-Wellensittiche“ und 2 Schwalbensittiche, die nur durch Volierengitter voneinander getrennt waren (siehe Tab. 5). Vorberichtlich traten seit der zweiten Zuchtsaison nach Übernahme Probleme auf. Es entwickelten sich ca. 35 „Renner“ unter den Jungtieren. Auch bei den adulten Tieren wurden Gefiederprobleme festgestellt. In der dritten Zuchtsaison wuchsen noch ca. 10 „Renner“ heran und bis dato unauffällige, adulte Neuzugänge entwickelten nach einiger Zeit Federbalgzysten sowie Gefiederdefekte und -verluste. Des Weiteren kam im Bestand im Probenahmezeitraum auch ein „feather duster“ vor (siehe Abb. 13). Die Zucht wurde daraufhin komplett eingestellt.



**Abbildung 13:** Juveniler Wellensittich mit „feather duster syndrome“

Das Jungtier wurde nur wenige Wochen alt. Auffällig war das extreme Längenwachstum der Federn, die sehr weich und pudrig waren. Zusätzlich zeigte es abnormes Verhalten, wie z. B. extensives Betteln mit schrillen akustischen Signalen und Probleme mit dem Halten des Gleichgewichtes. Nachdem der Vogel verstorben war, wurde er zusätzlich pathologisch untersucht.

**Tabelle 5:** Übersicht der getesteten Tiere und des Probenmaterials aus Bestand 2

Spezies	Anzahl untersuchter Tiere	Probenmaterial
Wellensittich ( <i>Melopsittacus undulatus</i> )	23	TuFe, BC, Organe
Schwalbensittich ( <i>Lathamus discolor</i> )	2	TuFe, BC
Summe untersuchter Tiere:	25	

### 1.1.3. Bestand 3

Der Bestand umfasste ca. 250 Wellensittiche und ca. 60 Unzertrennlische (*Agapornis* spp.) (siehe Tab. 6). Die Tiere waren in aneinander angrenzenden Volieren, bzw. in derselben Räumlichkeit untergebracht, so dass die Möglichkeit einer vertikalen und / oder horizontalen Übertragung gegeben war. Ein Agapornide wurde wegen ständiger Automutilation (EMA-Komplex) und Gefiederdefekten und letztendlich aufgrund einer Oberschnabelfraktur (Abb. 14) euthanasiert.



**Abbildung 14:** Agapornide mit Oberschnabelfraktur, EMA-Komplex und Befiederungsstörung, post mortem

**Tabelle 6:** Übersicht der getesteten Tiere und des Probenmaterials aus Bestand 3

Spezies	Anzahl untersuchter Tiere	Probenmaterial
Wellensittich ( <i>Melopsittacus undulatus</i> )	15	TuFe, BC
Unzertrennlige ( <i>Agapomis</i> spp.)	6	TuFe, BC, Organe
Summe untersuchter Tiere:	21	

#### 1.1.4. Bestand 4

Im Bestand 4 wurden u. a. Wellensittiche, Singsittiche, eine Blaustirnamazone, Blaukrönchen, Graupapageien, Maskenzwergpapageien und Eulen gehalten (siehe Tab. 7). Zum Zeitpunkt der Untersuchung befanden sich balzende oder brütende Zuchtpaare in einigen Volieren, daher konnten nicht bei allen Tieren Proben genommen werden. Die Tiere waren zum Teil nur durch Volierengitter, zum Teil aber auch räumlich voneinander getrennt.

**Tabelle 7:** Übersicht der getesteten Tiere und des Probenmaterials aus Bestand 4

Spezies	Anzahl untersuchter Tiere	Probenmaterial
Wellensittich ( <i>Melopsittacus undulatus</i> )	10	TuFe, BC
Singsittich ( <i>Psephotus haematonotus</i> )	1	TuFe, BC
Blaustirnamazone ( <i>Amazona aestiva</i> )	1	TuFe, BC
Blaukrönchen ( <i>Loriculus galgulus</i> )	4	TuFe
Summe untersuchter Tiere:	16	

### 1.1.5. Bestand 5

Im Bestand wurden Wellensittiche, Nymphensittiche, Halsbandsittiche und Gelbbrustaras gehalten. Für die Diagnostik standen nur Proben von 2 Gelbbrustaras und einem Halsbandsittich zur Verfügung (siehe Tab. 8). Die Tiere waren in benachbarten Volieren untergebracht.



**Abbildung 15:** Links Gelbbrustara mit Befiederungsstörung, brüchigem Schnabelhorn und übermäßigem Krallenwachstum und rechts Halsbandsittich mit Befiederungsstörung

**Tabelle 8:** Übersicht der getesteten Tiere und des Probenmaterials aus Bestand 5

Spezies	Anzahl untersuchter Tiere	Probenmaterial
Halsbandsittich (kleiner Alexandersittich, <i>Psittacula krameri</i> )	1	TuFe
Gelbbrustara ( <i>Ara ararauna</i> )	2	TuFe
Summe untersuchter Tiere:	3	

### 1.1.6. Bestand 6

Im Bestand waren Wellensittiche, Schönsittiche, Prachtsittiche, Ziegensittiche, Kanarienvögel und Magellanzeisige (siehe Tab. 9). Die Tiere waren alle in einer gemeinsamen Voliere untergebracht.

**Tabelle 9:** Übersicht der getesteten Tiere und des Probenmaterials aus Bestand 6

Spezies	Anzahl untersuchter Tiere	Probenmaterial
Wellensittich ( <i>Melopsittacus undulatus</i> )	5	TuFe, BC
Schönsittich ( <i>Neophema pulchella</i> )	2	TuFe, BC, Organe
Prachtsittich ( <i>Polytelis</i> spp.)	1	TuFe, BC
Ziegensittich ( <i>Cyanoramphus novaezelandiae</i> )	3	TuFe, BC
Kanarienvogel ( <i>Serinus canaria</i> )	3	TuFe
Magellanzeisig ( <i>Spinus magellanicus</i> )	1	TuFe
Summe untersuchter Tiere:	15	

**1.1.7. Bestand 7**

Im Bestand befanden sich Wellensittiche, Sperlingspapageien, sowie ein Stanleysittich (siehe Tab. 10). Die Tiere waren in unterschiedlichen Volieren, jedoch im selben Raum untergebracht. Bei einem Wellensittich wurde im Vorfeld in der Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische der Verdacht auf Circoviren erhoben, da das Tier massive Gefiederveränderungen aufwies. Die Federläsionen, bzw. der Federverlust entsprachen dem Bild einer PBFD beim Wellensittich.

**Tabelle 10:** Übersicht der getesteten Tiere und des Probenmaterials aus Bestand 7

Spezies	Anzahl untersuchter Tiere	Probenmaterial
Wellensittich ( <i>Melopsittacus undulatus</i> )	2	TuFe, BC
Sperlingspapagei ( <i>Forpus</i> spp.)	2	TuFe, BC
Stanleysittich ( <i>Platycercus icterotis</i> )	1	TuFe, BC
Summe untersuchter Tiere:	5	

**1.1.8. Bestand 8**

Im Bestand waren Wellensittiche, Nymphensittiche sowie 2 Pärchen Katharinasittiche (siehe Tab. 11). Die Tiere lebten zusammen in einer Voliere. Im Rahmen einer Bestandskontrolle wurde in der Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische die Untersuchung auf BFDV durchgeführt. Es sollten weitere Tiere in den Bestand aufgenommen werden.

**Tabelle 11:** Übersicht der getesteten Tiere und des Probenmaterials aus Bestand 8

Spezies	Anzahl untersuchter Tiere	Probenmaterial
Wellensittich ( <i>Melopsittacus undulatus</i> )	6	TuFe
Nymphensittich ( <i>Nymphicus hollandicus</i> )	5	TuFe
Katharinasittich ( <i>Bolborhynchus lineola</i> )	3	TuFe
Summe untersuchter Tiere:	14	

**1.1.9. Bestand 9**

Im Bestand 9 wurden Wellensittiche, Katharinasittiche und ein Zebrafink gehalten. Die Tiere lebten zusammen in mehreren Volieren in einem Raum. Im Rahmen einer Bestandskontrolle wurde in der Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische die Untersuchung auf BFDV durchgeführt (siehe Tab. 12). Es sollten weitere Tiere in den Bestand aufgenommen werden. Ein juveniler Wellensittich war wenige Tage nach Zukauf in den Bestand akut verstorben. Bei der ungewollten Einschleppung des Virus in den Bestand (2 adulte Wellensittiche), konnten bei einem Wellensittich akut Apathie, Lethargie und Diarrhoe beobachtet werden. Das Tier erholte sich innerhalb von 3 Wochen wieder und zeigte keine dauerhaften Befiederungsstörungen.

**Tabelle 12:** Übersicht der getesteten Tiere und des Probenmaterials aus Bestand 9

Spezies	Anzahl untersuchter Tiere	Probenmaterial
Wellensittich ( <i>Melopsittacus undulatus</i> )	3	TuFe, BC, Organe
Katharinasittich ( <i>Bolborhynchus lineola</i> )	2	TuFe, BC
Zebrafink ( <i>Taeniopygia guttata</i> )	1	TuFe
Summe untersuchter Tiere:	5	



**Abbildung 16:** Zwei männliche Wellensittiche und ein Pärchen Katharinasittiche des Bestandes 9

#### 1.1.10. Bestand 10

Der Bestand umfasste Prachtfinken, Wellensittiche, ein Schwarzköpfchen und einen Mohrenkopfpapagei. Letzterer wurde im Vorfeld zur pathologischen Untersuchung in die Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische eingeschickt (siehe Tab. 13). Die Tiere lebten zum Teil im gleichen Raum, jedoch in getrennten Gittervolieren. Der verstorbene Mohrenkopfpapagei kam ursprünglich von einer Züchterin von Wellensittichen, Nymphensittichen, Ziegensittichen, Prachtrosellas und Mohrenkopfpapageien. Von diesem ursprünglichen Herkunftsbestand waren keine Proben vorhanden.

**Tabelle 13:** Übersicht der getesteten Tiere und des Probenmaterials aus Bestand 10

Spezies	Anzahl untersuchter Tiere	Probenmaterial
Wellensittich ( <i>Melopsittacus undulatus</i> )	7	TuFe, BC
Schwarzköpfchen ( <i>Agapornis personatus</i> )	1	TuFe, BC
Mohrenkopfpapagei ( <i>Poicephalus senegalus</i> )	1	Organe
Summe untersuchter Tiere:	9	

## 2. Gefiederprotokoll

Da die Beurteilung des Gefieders möglichst einheitlich und objektiv vorgenommen werden sollte, wurde ein Formular zur Dokumentation und zur Ermittlung eines sogenannten feather scores entwickelt, bezeichnet als Gefiederprotokoll („Feather score system“). Die Gestaltung des Formblattes zur Dokumentation der Gefiederschäden erfolgte in Anlehnung an das „New feather scoring system“ (Zeeland et al., 2008) – das System wurde vereinfacht und eine Schemazeichnung, die selbst erstellt wurde, eingesetzt. Die Gefiederschäden wurden als Großgefieder- (Hand-, Armschwingen und Schwanzfedern), Kleingefieder- und Daunenschäden in das Formular eingezeichnet und so die Lokalisation dokumentiert.

### **Ermittlung der Gefiederschäden mittels modifiziertem „feather score system“:**

Für jede Feder (Arm-, Handschwingen und Steuerfedern) wurde das Ausmaß der Schädigung in einem dreistufigen Score beurteilt - für die Deckfedern wurde die Gesamtheit der Deckfedern, jeweils an Kopf, Rücken und Brust / Bauch beurteilt:

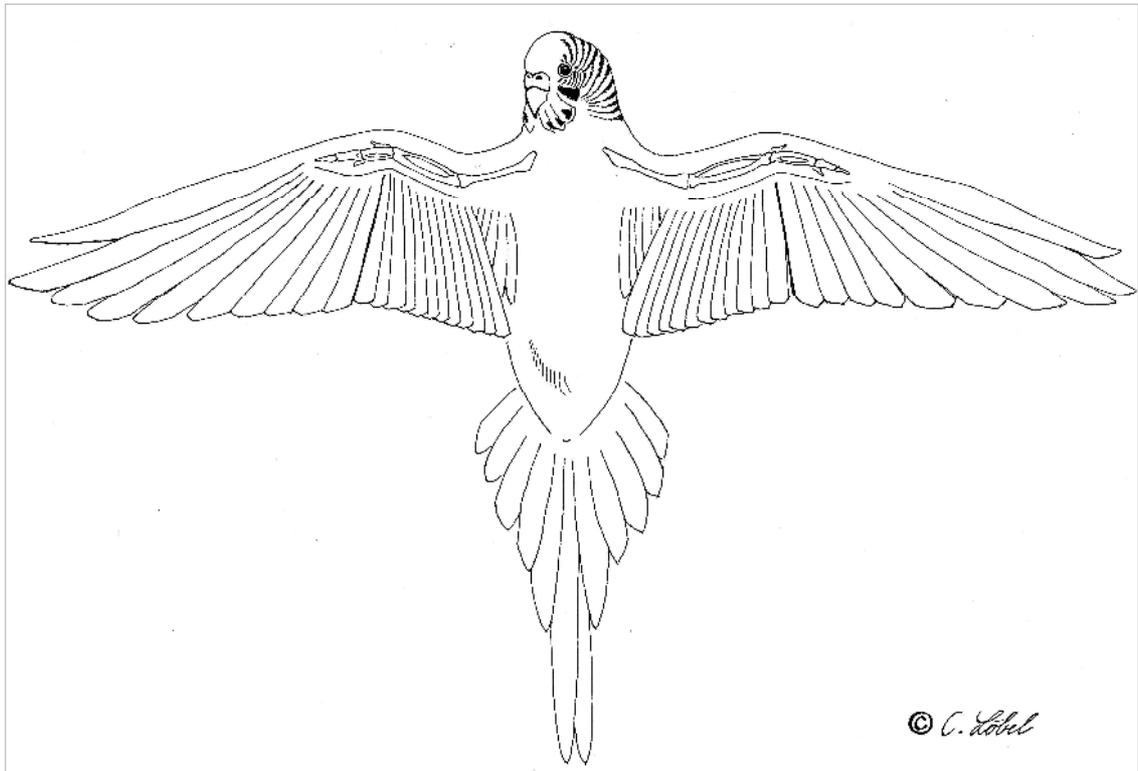
0 = Feder mit keiner oder geringer Abnutzung

1 = Feder weniger als 50 % Abnutzung, Bruchschaden oder sonstigem Defekt

2 = Feder über 50 % Abnutzung, Bruchschaden oder sonstigem Defekt

3 = Feder fehlt komplett

Anschließend wurde bei den untersuchten Vögeln jeweils für die Handschwingen, Armschwingen, Steuerfedern und Deckfedern der Gesamtscore ermittelt.



**Abbildung 17:** Gefiederprotokoll (Schematische Abbildung des Wellensittichgefieders)

Außerdem wurden für jeden Vogel routinemäßig auf dem vorgefertigten Protokoll zusätzliche Angaben vermerkt, die in Tabelle 14 dargestellt sind. Die Brüchigkeit und das Längenwachstum von Schnabelhorn und Krallen wurden jeweils folgendermaßen beurteilt: ohne besonderen Befund (o. b. B.) (0 %); geringgradig (ggr.) (0 - 15 %), mittelgradig (mgr.) (15 - 50 %) und hochgradig (hgr.) (> 50 %). (siehe Abb. 18).



**Abbildung 18:** Von links nach rechts, Beurteilungsvorlage Schnabelhorn am Beispiel Wellensittich: o. b. B.; ggr. brüchig; mgr. brüchig; hgr. brüchig

**Tabelle 14:** Datenerhebung Gefiederprotokoll

Datum:		Beurteilung von:	
Patientennummer:		Schnabelhorn:	<b>brüchig:</b> <input type="checkbox"/> obB <input type="checkbox"/> ggr <input type="checkbox"/> mgr <input type="checkbox"/> hgr <b>überlang:</b> <input type="checkbox"/> obB <input type="checkbox"/> ggr <input type="checkbox"/> mgr <input type="checkbox"/> hgr
Ringnummer:		Krallen:	<b>brüchig:</b> <input type="checkbox"/> obB <input type="checkbox"/> ggr <input type="checkbox"/> mgr <input type="checkbox"/> hgr <b>überlang:</b> <input type="checkbox"/> obB <input type="checkbox"/> ggr <input type="checkbox"/> mgr <input type="checkbox"/> hgr
Vogelart:		Deckfedern Kopf:	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2
Geschlecht:		Deckfedern Rücken:	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2
Alter:		Deckfedern Brust / Bauch:	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2
Probenart:		Sonstiges:	z. B. Einblutungen ins Schnabelhorn, Nasenausfluß, Federmilben, usw.

### 3. Probenaufbereitung und Analyse

Kloakentupfer und möglichst frisch gezogene Federn wurden sofort nach der Entnahme in einem sterilen 2 ml großen Probengefäß (safe-lock tube, Eppendorf, Köln) ohne Medium verschlossen. Vorzugsweise wurden bei der Entnahme veränderte Federn gewählt. Die Blutentnahme erfolgte durch sterile Punktion an der rechten Jugularvene. Das gewonnene Blut wurde sofort in Lithium-Heparinröhrchen 1,3 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt. In der Pathologie der Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische wurden von toten Vögeln standardmäßig Organproben von Gehirn, Trachea, Lunge, Herz, Speiseröhre, Drüsenmagen, Muskelmagen, Darm mit Pankreas, Milz, Leber und Niere entnommen.

Alle Proben wurden entweder sofort weiter bearbeitet oder zunächst bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Blutproben wurden vor dem Einfrieren zentrifugiert (3 min,  $2376 \times g$ ) und das Plasma und der leukozytenreiche "buffy coat", sowie die Erythrozyten in getrennten Gefäßen aufbewahrt.

### 3.1. DNA-Isolierung

Die DNA wurde mittels DNeasy blood and tissue kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben extrahiert. Alle Extraktionsschritte wurden mit DNase-freiem Material durchgeführt. Arbeitsflächen und Geräte wurden nach jedem Durchlauf desinfiziert und zur Zerstörung von DNA mit 2%iger Natriumhypochlorit-Lösung (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) behandelt. Die isolierte DNA wurde entweder sofort in der PCR eingesetzt oder bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C eingefroren.

#### 3.1.1. Extraktion der DNA aus Tupfern und Federn

Die TuFe-Proben wurden mit ca. 400 µl Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS) versetzt und gründlich gemischt (Vortex-Genie 2, scientific industries Roth, Karlsruhe). Danach wurde der Tupfer im Gefäß ausgedrückt und entfernt - die Federspulen wurden so zwischen Gefäß-Deckel und -Rand ausgequetscht, dass die Pulpa im Gefäß verblieb. Anschließend wurde der Mix aus PBS, Federpulpa und gewonnener Tupferflüssigkeit noch einmal gut gemischt und 200 µl dieses Ansatzes wurden mit 20 µl Proteinase K und 200 µl Lysepuffer „Buffer AL“ versetzt.

**Inkubation und Lysis:** Das Ganze wurde erneut gut gemixt und 10 min bei 70°C inkubiert (ThermoStat plus, Eppendorf, Köln), um eine vollständige Lyse der Zellen zu erreichen.

**DNA-Fällung:** Der Ansatz wurde nach Zugabe von 200 µl 96%igem Ethanol (Carl Roth, Karlsruhe) erneut gevortext.

**Aufreinigung und Elution:** Die Flüssigkeit wurde in ein DNeasy spin column überpipettiert und 1 min bei 6082 x g zentrifugiert. Die DNA wurde dabei an die Silicagelmembran in der Säule gebunden. Die Säule wurde anschließend in ein neues 2 ml-Sammelröhrchen gesteckt und der Durchfluss wurde verworfen. Nach Zugabe von 500 µl Puffer „Buffer AW1“ wurde erneut 1 min bei 6082 x g zentrifugiert. Die Säule wurde abermals in ein neues leeres Röhrchen gesteckt und der Durchfluss verworfen. Nun wurde 500 µl Puffer „Buffer AW2“ zugegeben und 1 min bei 16060 x g zentrifugiert. Die Säule wurde wieder in ein neues Röhrchen gesteckt und noch einmal 2 min bei 16060 x g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses wurde die Säule in ein steriles 1,5 ml Probengefäß eingesetzt. Als letzter Schritt wurde zur Elution der DNA 200 µl Puffer „Buffer AE“ zupipettiert, das Ganze 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und abschließend 1 min bei 6082 x g

zentrifugiert. Das so gewonnene Eluat mit DNA verblieb im Probengefäß und wurde sofort in die PCR eingesetzt oder bei -20°C aufbewahrt.

### 3.1.2. Extraktion der DNA aus Blut

Das Blut wurde schnellstmöglich nach der Entnahme für 3 min. bei 2376 x g zentrifugiert. Das Plasma wurde abpipettiert und bei -70°C eingefroren. 5 - 10 µl „buffy coat“ wurde in ein steriles Probengefäß überführt und mit 20 µl Proteinase K, 220 µl PBS und 200 µl Lysepuffer „AL Buffer“ versetzt. Alle weiteren Schritte wurden identisch zu **Inkubation und Lysis, DNA-Fällung, Aufreinigung und Elution** von Punkt 3.1.1. (siehe oben) durchgeführt.

### 3.1.3. Extraktion der DNA aus Organen

Es wurde aus allen routinemäßig entnommenen Organen ein Mix mit ca. 25 mg gepoolt, mit Ausnahme von Haut mit Federproben, um eine Kontamination durch Federstaub zu vermeiden. Dem Organmix wurden 180 µl Puffer „Buffer ATL“ und 20 µl Proteinase K zugegeben, dann gemischt und mindestens 2 h bei 55°C inkubiert (teilweise auch über Nacht, bis sich das Gewebe aufgelöst hatte). Danach wurde erneut gut gemischt und 200 µl Puffer „Buffer AL“ zugegeben. Auch hier wurden die übrigen Schritte übereinstimmend zu **Inkubation und Lysis, DNA-Fällung und Aufreinigung und Elution** von Punkt 3.1.1. (siehe oben) durchgeführt.

## 3.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die isolierte DNA wurde entsprechend zweier bereits publizierter PCR-Protokolle amplifiziert, welche weiter unten näher beschrieben werden. Die PCR ist ein künstliches, enzymbasiertes Verfahren zur Vermehrung (Amplifikation) spezifischer ausgewählter DNA-Fragmente. Zur Durchführung werden mindestens 2 Primer, einzelne Nukleosidtriphosphat-Moleküle sowie eine hitzestabile Polymerase benötigt. Die verwendete Polymerase stammt ursprünglich aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* und heißt daher Taq-Polymerase. In der vorliegenden Untersuchung wurde eine Hotstart-Taq-Polymerase verwendet (Hotstar-Taq, Qiagen, Hilden, Deutschland), die zunächst durch Erhitzen aktiviert werden muss. Nach Zugabe aller Komponenten laufen im Anschluss an die Aktivierung der Taq-Polymerase bei 95°C die folgenden Schritte nach einem voreingestellten Protokoll automatisch mittels Thermocycler (hier: SensoQuest LabCycler, Biomedizinische Elektronik, Göttingen, Deutschland) ab:

**Denaturierung:** Aufspaltung der Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der doppelsträngigen DNA-Helix. Da dies unter Hitzezufuhr von 95°C geschieht, nennt sich dieser Schritt auch Einschmelzen. Die DNA liegt nun in Form von Einzelsträngen vor.

**Annealing:** Die Anlagerung (Annealing) der Primer an ihre Zielsequenz eines DNA-Einzelstranges erfolgt bei einer von der Nukleotidsequenz der Primer abhängigen Optimaltemperatur, im vorliegenden Fall bei 56 bzw 62°C.

**Elongation:** Die Bildung des Komplementärstranges durch Auffüllen mit freien Nukleotiden, mit Hilfe der Polymerase, erfolgt meist bei einer Temperatur von 72°C.

Zyklen aus Denaturierung, Annealing und Elongation werden viele Male (hier 35 bis 45 mal) durchlaufen, so dass die DNA-Stränge immer wieder eingeschmolzen und vervielfältigt werden. Es kommt so im Idealfall zu einer exponentiellen Vermehrung der amplifizierten DNA.

Alle Arbeiten wurden an Arbeitsplätzen und unter Laminas (LaminAir, Heraeus instruments GmbH, München) durchgeführt, bei denen auf die Freiheit von amplifizierter DNA geachtet wurde. Die Arbeitsschritte Extraktion, Herstellung des PCR-Mastermixes, Durchführung der PCR und die weiter unten beschriebene Gelelektrophorese erfolgten unter Einhaltung räumlicher Trennung. Zudem wurde auf DNase freies Einwegmaterial und Handschuhe geachtet. Die Desinfektion erfolgte mittels Lysovet (Schülke und Mayr, Norderstedt) und für mobile Gerätschaften mittels Korsolex basic (Bode Chemie, Hamburg).

### 3.2.1. Duplex-PCR

Duplex Circo-/Polyomavirus PCR-Protokoll nach Ogawa et al. (2005)

Für die Amplifikation eines 495 bp großen Fragmentes des BFDV-Genoms (Zielgen: ORF C1 oder Kapsidprotein-Gen) wurde das Protokoll von Ogawa et al. (2005) verwendet. Es handelt sich hier um eine Duplex-PCR, bei der gleichzeitig auch DNA von aviären Polyomaviren (APV) amplifiziert wird, die Erreger der sogenannten Wellensittich-Nestlingssterblichkeit. In einem Gesamtvolumen von 25 µl PCR-Ansatz waren 2,5 µl 10x-Puffer, 0,3 µl (12,5 µM each) eines Mixes aus 4 Primern (siehe Tab. 15), 0,2 µl (25 µM each) dNTP, 19,38 µl Aqua Bidest und 0,13 µl (5u/µl) Hotstar-Taq-Polymerase (Qiagen, Hilden, Deutschland) enthalten. Nach Zugabe von 2,5 µl Proben-DNA wurde die PCR im Thermocycler, mit folgendem Ablauf,

gestartet: nach 15 min initialer Taq-Polymerase-Aktivierung bei 95°C folgten 35 Zyklen aus 30 s bei 94°C, 30 s bei 62°C und 30 s bei 72°C.

**Tabelle 15:** Primer-Sequenzen der Duplex-PCR nach Ogawa et al. (2005)

Primer -Sequenzen:	
BFDdupF:	CAG GCC TTA TAT CCT GTT TGC GTC
BFDdupR:	GAT ATC AAG ACT GCC TAT CGT CGC
PBFDdupF:	TTG GGT CCT CCT TGT AGT GGG ATC
PBFDdupR:	CAG ACG CCG TTT CTC AAC CAA TAG

Bei jedem Lauf wurden jeweils eine Positiv-Kontrolle für BFDV und für APV sowie mindestens eine Negativ-Extraktionskontrolle mitgeführt.

### 3.2.2. Breitspektrum-PCR

Breitspektrum Circovirus PCR-Protokoll nach Halami et al. (2008)

Für die Amplifikation eines 350 bp großen Fragments des BFDV (Zielgen ORF V1 oder Replikase-Gen) wurde das Protokoll von Halami et al. (2008) verwendet. Es handelt sich hier um eine geschachtelte („nested“) PCR, bei der zwei PCRs hintereinander geschaltet werden. In ein Gesamtvolumen von 25 µl wurden 2,5 µl 10x PCR-Puffer, jeweils 0,2 µl (50 µM) eines Vorwärts- und Rückwärts-Primers (1. Runde Cv-s und Cv-as, 2. Runde Cn-s und Cn-as, siehe Tab. 16), 0,2 µl (25 µM each) dNTP, 0,5 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,125 µl (5 u/µl) Taq-Polymerase enthalten. Bei der ersten Runde wurde 2,5 µl Proben-DNA, bei der zweiten Runde 0,5 µl des PCR-Ansatzes der ersten Runde zugesetzt. Die Thermoprofile beinhalteten für die erste und die zweite PCR-Runde jeweils initial 15 min bei 95°C, gefolgt von jeweils 45 Zyklen aus 30 s bei 94°C, 60 s bei 46°C und 60 s bei 72°C. Am Ende folgte eine finale Elongationsphase von 7 min bei 72°C

**Tabelle 16:** Primer-Sequenzen für nested Breitspektrum-PCR nach Halami et al. (2008)

Primer -Sequenzen:	
1. Runde:	
Cv-s:	AGA GGT GGG TCT TCA CNH TBA AYA
Cv-as:	AAG GCA GCC ACC CRT ARA ART CRT C
2. Runde:	
Cn-s:	AGC AAG GAA CCC CTC AYY TBC ARG G
Cn-as:	ACG ATG ACT TCN GTC TTS MAR TCA CG

Als Kontrollen wurden bei jedem Lauf jeweils eine Positiv-Kontrolle (Tauben-Circovirus-DNA), sowie Negativ-Kontrollen (DNA-Extraktionskontrollen, jeweils eine pro DNA-Extraktionsdurchgang der klinischen Proben) mitgeführt.

### **3.3. Gelelektrophorese und Sequenzierung**

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese unter Verwendung von 2%iger Agarose aufgetrennt und die erhaltenen DNA-Fragmente mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. Ein DNA-Größenstandard (100 bp ladder, Invitrogen, Carlsbad, USA) wurde bei der Gelelektrophorese mitgeführt, um Produkte erwarteter Größe (bei der Duplex-PCR: Circovirus: 495 bp und Polyomavirus 298 bp; bei der zweiten Runde der Breitspektrum-PCR: Circovirus: 350 bp) zu erkennen. Für die Sequenzierung wurden in der Regel nur PCR-Produkte der zweiten Runde der Breitspektrum-PCR verwendet. PCR-Produktbanden erwarteter Größe wurden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mittels QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben extrahiert.

Die Proben wurden zum direkten Sequenzieren an die GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland) gesendet. Für die Sequenzierung nach Sanger (Sanger et al., 1977) wurden die PCR-Primer eingesetzt.

### **3.4. Sequenzauswertung und Erstellung phylogenetischer Stammbäume**

Die Chromatogramme der Sequenzierungen wurden mit Hilfe des frei verfügbaren Programmes 4peaks (GATC viewer) ausgelesen und anschließend per MegaBLAST (NCBI, [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)) mit bereits in der NCBI GenBank veröffentlichten Sequenzen verglichen. Bei einer großen Übereinstimmung (highly similar result = größer als 200 Nukleotide) mit einer bereits veröffentlichten BFDV-Sequenz wurden sowohl die eigene Sequenz als auch die ähnlichsten Sequenzen (Max score: die höchsten Ergebnisse; Query: > 60 %; E-score: < 1e-3) als FASTA-Dateien abgespeichert.

Phylogenetische und molekulare Evolutionsanalysen wurden unter Verwendung des Software-Paketes MEGA Version 6 (Tamura et al., 2013) durchgeführt. Zur Ausrichtung/Abstimmung (alignment) der Sequenzen wurde das frei verfügbare Programm MUSCLE (Edgar 2004) benutzt, welches in MEGA6 ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)) enthalten ist. Die phylogenetischen Analysen wurden mit

---

den Methoden „neighbour joining“ (Seitou & Nei, 1987) und „maximum composite likelihood“ (Tamura et al., 2004) durchgeführt. Die Robustheit der erhaltenen phylogenetischen Stammbäume wurde mittels „bootstrapping“ mit 1000 Wiederholungen (Felsenstein, 1995) ermittelt.

## IV. ERGEBNISSE

### 1. Überblick des Untersuchungsablaufs

Aus dem Patientengut der Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische wurden sowohl Wellensittiche ohne Befiederungsstörungen, als auch Wellensittiche mit Befiederungsstörungen auf Pbfd untersucht. Der Nachweis viraler DNA wurde routinemäßig mittels Duplex PCR durchgeführt. Bei den 10 ausgewählten Beständen wurde zusätzlich die nested Breitspektrum PCR durchgeführt und die Ergebnisse zum Teil mit denen der Duplex-PCR gegenüber gestellt. Darüber hinaus wurde von fast allen getesteten Tieren ein Gefiederprotokoll angefertigt und die PCR-Einzelergebnisse mit dem Gefiederstatus in Zusammenhang ausgewertet. Insgesamt zeigten sowohl Tiere, die in der PCR auf BFDV positiv, als auch Tiere die negativ getestet wurden, Gefiederveränderungen. Von den selektierten Beständen wurden die Gefiederveränderungen / Auffälligkeiten pro Bestand ausgewertet. Die Auffälligkeiten wurden jeweils von Hand- und Armschwingen, Steuerfedern und Deckfedern prozentual zusammengefasst. Zusätzlich wurde die Summe aller Tiere eines Bestandes mit Veränderungen an Schnabel und an Krallen in Prozent angegeben. Die Beurteilung der einzelnen Federn, mit Eintrag auf dem Gefiederprotokoll (von 0 bis 3), diente lediglich als Dokumentationshilfe für Verlaufskontrollen oder Endkontrollen.

### 2. Duplex-PCR- und nested Breitspektrum-PCR-Ergebnisse und Auswertung Gefiederprotokolle

Insgesamt wurden bei der PCR-Untersuchung auf BFDV bei 105 von 141 Tieren Produkte in der erwarteten Größe erhalten. Diese Produkte wurden als positiv bewertet auch wenn dadurch die Spezifität der PCR-Produkte möglicherweise überschätzt wurde. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde eine Auswahl an PCR-Produkten zum Sequenzieren geschickt - 25 Vögel erbrachten eine Übereinstimmung mit bereits bekannten BFDV-Sequenzen in der Gendatenbank der NCBI GenBank. In den nachfolgenden Tabellen **“BFDV-Übereinstimmungen in der GenBank (NCBI), Bestand 1 – 10“** (Tab. 19 – 24), wurden die relevanten „accessionnumbers“ mit den höchsten „max scores“ aus den BLAST-Analysen angegeben.

Vögel aus den 10 ausgewählten Beständen unterscheiden sich zum Teil in den

Ergebnissen der Duplex-PCR und der nested Breitspektrum-PCR sowie in den unterschiedlichen Probenmaterialien. Eine detaillierte Aufstellung erfolgte von 28 Wellensittichen aus Bestand 1 (siehe Tab. 18).

### **2.1. Überblick und Auswertung der Ergebnisse, Bestand 1**

Alle Nymphensittiche und Großpapageien waren mittels Duplex-PCR negativ, lieferten in der nested Breitspektrum PCR dagegen zum Teil Banden in erwarteter Größe. In einer der nachfolgenden Tabellen (Tab. 18) wurden von 28 verstorbenen Wellensittichen dieselben Proben TuFe, Blut und Organe jeweils separat mittels Duplex-PCR und nested Breitspektrum PCR untersucht. In der Duplex PCR wurde bei 11 % in TuFe, 0 % in BC und 0 % im Organpool ein positives Ergebnis auf BFDV detektiert (siehe Tab. 18). Ein Wellensittich war zusätzlich in einer PCR für APV in der Organ-Poolprobe positiv. In der nested Breitspektrum-PCR wurden 86 % in TuFe, 14 % in BC und 68 % im Organpool als positiv detektiert. Nur ein Tier war in allen Untersuchungen komplett negativ (siehe Tab. 18, WS #5), dieses Tier wies allerdings auch Gefiederveränderungen auf. Gefiederprotokolle wurden von allen Tieren angefertigt (siehe Tab. 17). Bei den Wellensittichen konnte durchgängig ein ggr. bis hgr. Befall mit Federmilben festgestellt werden. Eine Stockmauser der Deckfedern im Kopfbereich war bei über 50 % der Wellensittiche vorhanden. Die Stockmauser wurde jeweils nicht zu Auffälligkeiten in den Deckfedern dazu gezählt, sondern extra angegeben. Bei den Veränderungen der Deckfedern wurden Farbveränderungen, fehlende Deckfedern und kaputte Deckfedern festgestellt. Als zusätzlichen Nebenbefund hatten 2 Wellensittiche beidseitige Sohlenballengeschwüre, mehrere Tiere Einblutungen in das Schnabelhorn und 3 Tiere Nasenausfluss. Bei den restlichen, untersuchten Vögeln im Bestand fiel ein Graupapagei auf, der rote Deckfedern am Übergang zu den Beinen hatte. Die Auswertung der Gefiederprotokolle zeigte, dass hauptsächlich Auffälligkeiten an den Steuerfedern (78 %), gefolgt von den Handschwingen (67 %), den Armschwingen (26 %) und den Deckfedern (11 %) vorhanden waren. Das Schnabelhorn war bei 46 % und die Krallen bei 19 % aller Tiere verändert.

**Tabelle 17:** Tabellarische Übersicht der angefertigten Gefiederprotokolle von den Vögeln aus Bestand 1 mit Auffälligkeiten im Gefieder (Summe der Tiere mit Abnutzung und / oder Bruchschaden < 50 % und > 50 %), aufgeteilt in Handschwingen Armschwingen, Steuerfedern, Deckfedern und zusätzliche Beurteilung, Auffälligkeiten von Schnabel (nur brüchig) und Krallen (brüchig und lang)

Gefiederprotokolle	Beurteilung Federn (Anzahl auffälliger Tiere)				Beurteilung Sonstiges (Anzahl auffälliger Tiere)	
	Hand- schw.	Arm- schw.	Steuer- fed.	Deck- fed.	Schnabel	Krallen
Tiere (insgesamt 54 = 100 %)						
Wellensittiche (28)	20	7	19	0	24	8
Nymphensittiche (12)	8	3	12	1	0	0
Blaustirnamazone (2)	2	2	2	1	0	0
Kongo-Graupapagei (5)	3	1	3	1	0	0
Weißhaubenkakadu (2)	1	1	2	2	0	1
Orangehaubenkakadu (1)	1	0	1	1	1	1
Gelbbrustara (2)	1	0	2	0	0	0
Kea (2)	0	0	0	0	0	0
insgesamt auffällige Tiere:	36 (67 %)	14 (26 %)	42 (78 %)	6 (11 %)	25 (46 %)	10 (19 %)

**Tabelle 18:** Gegenüberstellung Duplex-PCR und nested Breitspektrum PCR

Tier	Ergebnisse Duplex-PCR			Ergebnisse nested Breitspektrum-PCR		
	TuFe	BC	Organe	TuFe	BC	Organe
WS #1	+ schwach	-	-	+	-	-
WS #2	-	-	- *	+	-	+
WS #3	-	-	-	+	-	+
WS #4	+ schwach	-	-	+	+ schwach	+
WS #5	-	-	-	-	-	-
WS #6	-	-	-	+	-	+
WS #7	-	-	-	-	+ schwach	+
WS #8	-	-	-	+	-	+
WS #9	-	-	-	+	-	+
WS #10	-	-	-	+	-	-
WS #11	-	-	-	+	-	+
WS #12	-	-	-	+	+ schwach	+
WS #13	-	-	-	+	-	-
WS #14	-	-	-	-	-	+
WS #15	-	-	-	+	-	-
WS #16	-	-	-	+	-	+
WS #17	-	-	-	+	-	-
WS #18	-	-	-	+	-	+
WS #19	-	-	-	-	-	+
WS #20	-	-	-	+	-	-
WS #21	-	-	-	+	-	+
WS #22	-	-	-	+	-	+
WS #23	-	-	-	+	-	-
WS #24	-	-	-	+	-	+
WS #25	+ schwach	-	-	+	-	+
WS #26	-	-	-	+	+	+
WS #27	-	-	-	+	-	-
WS #28	-	-	-	+	+ schwach	+
insgesamt BFDV positiv:	3 (11 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	24 (86 %)	4 (14 %)	19 (68 %)

\* schwach Polyoma positiv!

Folgende Proben wurden zum Sequenzieren eingeschickt:

Wellensittiche: 3 x TuFe, 3 x BC, 3 x Organe (siehe Tab. 18)

Nypensittiche: 4 x TuFe

Großpapageien: 9 x BC, 4 x TuFe

Bei 3 Organproben von Wellensittichen konnte eine Übereinstimmung mit BFDV-Sequenzen in der GenBank ermittelt werden (siehe Tab. 19).

**Tabelle 19:** BFDV-Übereinstimmungen in der GenBank (NCBI), Bestand 1

Tier:	Probenmaterial	Übereinstimmungen GenBank
Wellensittich Nr. 4	Organe	KT583308 (max score: 507)
Wellensittich Nr. 7	Organe	KT583308, JX221028, JX221026, JX221025, DQ384625 (max score: 523)
Wellensittich Nr. 25	Organe	KT583308, JX221028, JX221026, JX221025, DQ384625 (max score: 520)

## 2.2. Überblick und Auswertung der Ergebnisse, Bestand 2

Alle untersuchten Tiere waren mittels Duplex-PCR sowohl in Tu/Fe, als auch im BC negativ. Auch die Organpoolproben der 2 verstorbenen Tiere waren in der Duplex-PCR negativ. In der nested Breitspektrum PCR wurden bei 14 von 22 Wellensittichen in TuFe und bei 14 Tieren im BC Banden in erwarteter Größe erhalten (es wurde nur von 14 Vögeln Blut genommen). Zusätzlich waren beide Organpoolproben positiv. Von den Schwalbensittichen war ein Tier in Tu/Fe positiv.

Die Schwalbensittiche zeigten keinerlei Auffälligkeiten am Gefieder, dem Schnabel und an den Krallen. Von den 22 routinemäßig getesteten Wellensittichen hatten 77 % Veränderungen der Federn an den Handschwingen, 41 % an den Armschwingen, 100 % an den Steuerfedern und 36 % an den Deckfedern. Das Schnabelhorn war bei 91 % der Vögel ggr. bis mgr. brüchig. Die Krallen waren bei 27 % der Wellensittiche ggr. brüchig. Einige Tiere hatten zusätzlich ggr. Einblutungen im Schnabelhorn, Nasenausfluss, Durchfall, Stockmauser, Federbalgzysten und einen ggr. Befall mit Federmilben.

Der verstorbene „feather duster“ wies an allen Federn Auffälligkeiten, wie z. B. abnormes Wachstum und verdrehte Federn mit Zusammenhangstrennungen der Fahnen, auf. In der pathologischen Untersuchung konnte ein ggr. reduzierter Ernährungszustand, sowie Einblutungen am Herzen festgestellt werden. Der Muskelmagen war hgr. mit Grit gefüllt und Leber und Milz waren mgr. geschwollen.

Das zweite verstorbene Tier wies nur geringe Veränderungen am Gefieder auf. Allerdings waren beidseits Sohlenballengeschwüre vorhanden und die Schnabelspitze war frakturiert. Bei der pathologischen Untersuchung wurde eine mgr. geschwollene Fettleber festgestellt. Die Milz war hgr. geschwollen und rupturiert. Es befanden sich Blutkoagel in der Bauchhöhle. Am Übergang vom Drüsenmagen zum Muskelmagen wurde eine hgr. Infektion mit dem Pilz *Macrorhabdus ornithogaster* nachgewiesen.

Folgende Proben wurden zum Sequenzieren eingeschickt:

Wellensittiche: 3 x TuFe, 3 x BC, 2 x Organe

Schwalbensittiche: 1 x TuFe

Bei 3 TuFe-Proben und 2 Organpoolproben von Wellensittichen konnte eine Übereinstimmung mit BFDV-Sequenzen in der GenBank ermittelt werden (siehe Tab. 20).

**Tabelle 20:** BFDV-Übereinstimmungen in der GenBank (NCBI), Bestand 2

Tier:	Probenmaterial	Übereinstimmungen GenBank (ähnlichste Ergebnisse)
Wellensittich Nr. 17	TuFe	KT583308, JX221028, JX221026, JX221025, DQ384625 (max score: 503)
Wellensittich Nr. 19	TuFe	KT583308, JX221028, JX221026, JX221025, DQ384625 (max score: 490)
Wellensittich Nr. 22	TuFe	JX221031, JX221030, JX221029 (max score: 496)
Wellensittich „feather duster“ (ohne Nummer)	Organe	KT583305 (max score: 468)
Wellensittich „lila Ring“ (ohne Nummer)	Organe	JX221028, JX221026, JX221025 (max score: 514)

### 2.3. Überblick und Auswertung der Ergebnisse, Bestand 3

Die 21 Tiere wurden per Zufall aus den Volieren gefangen und waren alle mittels Duplex-PCR in TuFe und BC negativ. In der Breitspektrum-PCR waren alle Vögel sowohl in TuFe, als auch im BC positiv.

Die Auswertung aller Gefiederprotokolle ergab insgesamt Auffälligkeiten bei 60 % der Vögel an den Handschwingen, bei 20 % an den Armschwingen, bei 55 % an den Steuerfedern und bei 10 % an den Deckfedern. Schnabelveränderungen wurden bei 80 % der Tiere dokumentiert. Die Krallen waren bei 55 % der Tiere anomal. Einige

Vögel hatten Stockmauser, Nasenausfluss, Depigmentierungen im Gefieder, Einschnürungen im Großgefieder, Federbalgzysten, persistierende Federscheiden, verdrehte Federn und Krallen, Bissverletzungen und Sohlenballengeschwüre. Federmilben und Räudemilben konnten bei fast allen Vögeln beobachtet werden - flugunfähige Vögel waren massiv befallen.

Es wurden folgende Proben zum Sequenzieren eingesendet:

Wellensittiche: 3 x TuFe, 3 x BC

Agaporniden: 2 x TuFe, 2 x BC

Bei jeweils zwei Proben TuFe und BC von Wellensittichen und Agaporniden konnte eine Übereinstimmung mit BFDV-Sequenzen in der GenBank ermittelt werden (siehe Tab. 21).

**Tabelle 21:** BFDV-Übereinstimmungen in der GenBank (NCBI), Bestand 3

Tier:	Probenmaterial	Übereinstimmungen GenBank (ähnlichste Ergebnisse)
Wellensittich Nr. 1	TuFe	KT583304, KT583303, KT583302 (max score: 455)
Wellensittich Nr. 1	BC	FJ685985, AY521234 (max score: 496)
Wellensittich Nr. 9	BC	FJ685985 (max score: 497)
Wellensittich Nr. I (anderes Tier als Nr. 1!)	TuFe	JX221031, JX221030, JX221029 (max score: 499)
Agapornide Nr. 1	TuFe	JX221031, JX221030, JX221029 (max score: 496)
Agapornide Nr. 1	BC	FJ685985, AY521234 (max score: 496)
Agapornide Nr. 4	TuFe	JX221031, JX221030, JX221029 (max score: 496)
Agapornide Nr. 4	BC	FJ685985 (max score: 497)

#### 2.4. Überblick und Auswertung der Ergebnisse, Bestand 4

Von allen 16 Tieren wurden TuFe-Proben genommen, aber nur bei 12 Tieren konnte eine Blutentnahme erfolgen. Alle untersuchten Tiere waren in der Duplex-PCR in TuFe und im BC negativ. In der Breitspektrum-PCR waren alle Tiere in den TuFe-Proben positiv und 11 Tiere im BC positiv. Bei der Analyse der Gefiederprotokolle zeigten die untersuchten Vögel Auffälligkeiten zu 50 % an den Handschwingen, 25 % an den Armschwingen, 94 % an den Steuerfedern und 12,5 % an den Deckfedern. Bei 56 % der Tiere war das Schnabelhorn brüchig und bei 25 % waren die Krallen brüchig und z. T. zu lang und verdreht. Als sonstige Befunde wurden Federbalgzysten, verdrehte Schwanzfedern, Stockmauser, Grimale der

Schwungfedern, persistierende Blutkiele, Nasenausfluss, Sohlenballengeschwüre, eine Augenentzündung und eine abgebrochene Schnabelspitze dokumentiert.

Es wurden folgende Proben zum Sequenzieren eingeschickt:

Wellensittiche: 3 x TuFe, 3 x BC

Singsittich: 1 x TuFe, 1 x BC

Blaustirnamazone: 1 x TuFe, 1 x BC

Blaukrönchen: 3 x TuFe

Bei drei Proben TuFe und drei Proben BC von Wellensittichen, einer Probe TuFe von einem Singsittich, einer Probe Blut von einer Blaustirnamazone und drei Proben TuFe von Blaukrönchen konnte eine Übereinstimmung mit BFDV-Sequenzen in der GenBank ermittelt werden (siehe Tab. 22).

**Tabelle 22:** BFDV-Übereinstimmungen in der GenBank (NCBI), Bestand 4

Tier:	Probenmaterial	Übereinstimmungen GenBank (ähnlichste Ergebnisse)
Wellensittich Nr. 1	TuFe	KT583308, JX221028, JX221026, JX221025, DQ384625 (max score: 505)
Wellensittich Nr. 2	BC	KT583308, JX221028, JX221026, JX221025, DQ384625 (max score: 510)
Wellensittich Nr. 4	BC	KT583308, JX221028, JX221026, JX221025, DQ384625 (max score: 512)
Wellensittich Nr. 4	TuFe	JX221028, JX221026, JX221025, DQ384625 (max score: 505)
Wellensittich Nr. 9	TuFe	KT583308, JX221028, JX221026, JX221025, DQ384625 (max score: 514)
Wellensittich Nr. 9	BC	JF501528, GU047347, GQ329705, GQ120621 (max score: 501)
Singsittich Nr. 11	TuFe	JX221028, JX221026, JX221025, DQ384625 (max score: 501)
Blaustirnamazone Nr. 12	TuFe	JX221028, JX221026, JX221025, DQ384625 (max score: 512)
Blaukrönchen Nr. 14	TuFe	KT583308, JX221028, JX221026, JX221025, DQ384625 (max score: 508)
Blaukrönchen Nr. 15	TuFe	JX221028, JX221026, JX221025, DQ384625 (max score: 514)
Blaukrönchen Nr. 16	TuFe	KT583308, JX221034, JX221028, JX221026, JX221025, JF501524, AB277746, DQ384625 (max score: 302)

## 2.5. Überblick und Auswertung der Ergebnisse, Bestand 5

Obwohl im Bestand Wellensittiche, Nymphensittiche, Halsbandsittiche und Gelbbrustaras waren, konnten nur 3 Proben TuFe (Feder mit Blutkiel) jeweils von einem Halsbandsittich und zwei Gelbbrustaras untersucht werden. Der Halsbandsittich und ein Gelbbrustara wurden mittels Breitspektrum-PCR positiv detektiert.

Der Gefiederzustand des Halsbandsittichs wies massive Defizite auf. Alle langen Schwung- und Steuerfedern waren nicht vorhanden und an Brust und Oberschenkeln fehlten zum Teil die Deckfedern (siehe Abb. 15). Das Tier war flugunfähig und wurde als „Renner“ vorgestellt. Beim dem negativ getesteten Ara fehlte das Gefieder komplett an Brust und Beinen, der Rest war unauffällig. Zusätzlich waren der Schnabel und die Krallen geringgradig zu lang. Bei dem positiv getesteten Ara war der Gefiederzustand insgesamt schlecht. Schwung- und Steuerfedern wiesen multiple Grimale auf und am rechten Flügel fehlten etliche Handschwingen oder waren > 50 % defekt. Zusätzlich fehlte das Gefieder am Hinterkopf und teilweise an der seitlichen Brustwand und an den Beinen (siehe Abb. 15).

Es wurden folgende Proben zum Sequenzieren eingeschickt:

Halsbandsittich: 1 x TuFe (Feder mit Blutkiel)

Gelbbrustara: 1 x TuFe (Feder mit Blutkiel)

Bei beiden Proben TuFe, jeweils von einem Halsbandsittich und einem Gelbbrustara, konnten Übereinstimmungen mit BFDV-Sequenzen in der GenBank ermittelt werden (siehe Tab. 23).

**Tabelle 23:** BFDV-Übereinstimmungen in der GenBank (NCBI), Bestand 5

Tier:	Probenmaterial	Übereinstimmungen GenBank (ähnlichste Ergebnisse)
Halsbandsittich (kleiner Alexandersittich)	TuFe	KT583305, AB277751 (max score: 473) (JX221003, JX221003 (max score: 457))
Gelbbrustara	TuFe/Blut-Mix	JF501528, GU047347, GQ329705, GQ120621(max score: 507)

## 2.6. Überblick und Auswertung der Ergebnisse, Bestand 6

Insgesamt wurden 15 Tiere untersucht, 15 x TuFe, 1 x Organe (verstorbener Schönsittich) und 8 x Blut (4 Wellensittiche, 1 Schönsittich, 3 Ziegensittiche). In der Duplex-PCR waren alle TuFe-Proben und alle Blutproben negativ. Die Organpool-

Probe ergab ein schwach positives Ergebnis. In der Breitspektrum-PCR waren alle TuFe-Proben, außer von einem Wellensittich, positiv. Die Blutproben wiesen unspezifische Nebenbanden auf.

Eine Auswertung der Gefiederprotokolle zeigte Auffälligkeiten, bei 33 % an den Handschwingen, bei 13 % an den Armschwingen, bei 53 % an den Steuerfedern und bei 0 % an den Deckfedern. Das Schnabelhorn war bei 60 % der Vögel brüchig und die Krallen waren bei 20 % brüchig, bzw. zu lang. Zusätzlich hatten einige Tier einen mittelgradigen Befall mit Federmilben, persistierende Federscheiden und Blutkiele, locker sitzende Steuerfedern, Grimale und Stockmauser. Der verstorbene Schönsittich hatte nur 10 Steuerfederanlagen.

Es wurden folgende Proben zum Sequenzieren eingeschickt:

Wellensittiche: 3 x TuFe

Schönsittich: 1 x TuFe

Prachtsittich: 1 x TuFe

Ziegensittich: 1 x TuFe

Bei keiner der eingeschickten Proben konnte eine Übereinstimmung mit BFDV-Sequenzen in der GenBank ermittelt werden. Es wurden lediglich mehrere Übereinstimmungen mit CoCV gefunden.

## **2.7. Überblick und Auswertung der Ergebnisse, Bestand 7**

Alle 5 untersuchten Tiere waren mittels Duplex-PCR sowohl in Tu/Fe-Proben, als auch im Blut negativ. In der Breitspektrum-PCR war eine Tu/Fe-Probe positiv. Bei 4 Blutproben waren Banden sichtbar, welche knapp über der Vergleichsbande lagen. Vorsichtshalber wurden auch diese Proben zum Sequenzieren versendet.

Die Vögel wiesen nur geringgradige, unspezifische Federveränderungen, wie z. B. einzelne abgebrochene Federn, auf. Lediglich bei einem Wellensittich wurden zwei verdrehte Schwanzfedern und übermäßiges Krallenwachstum festgestellt.

Es wurden folgende Proben zum Sequenzieren eingeschickt:

Wellensittiche: 2 x BC

Sperlingspapageien: 1 x TuFe, 2 x BC

Bei keiner der eingeschickten Proben konnte eine Übereinstimmung mit BFDV-Sequenzen in der GenBank ermittelt werden.

### **2.8. Überblick und Auswertung der Ergebnisse, Bestand 8**

Von den 14 untersuchten Vögeln standen nur Tu/Fe-Proben für eine Bestandskontrolle, inklusive BFDV-Diagnostik, zur Verfügung. In der Duplex-PCR waren alle Tiere negativ. Die Breitspektrum-PCR zeigte bei 6 Tieren eine sehr schwache Bande in der erwarteten Größe. Gefiederprotokolle konnten nicht angefertigt werden. Es wurden keine Proben zum Sequenzieren eingeschickt, da die Banden der PCR zu schwach gewesen sind. Aus Erfahrung erbringen derartig schwache Banden kein verwertbares Ergebnis.

### **2.9. Überblick und Auswertung der Ergebnisse, Bestand 9**

In den Bestand wurde ein juveniler Wellensittich aufgenommen, der kurz danach akut verstorben war. Daher wurde vor Aufnahme weiterer Tiere eine allgemeine Bestandskontrolle durchgeführt. Von den 5 Vögeln waren 2 Wellensittiche in der Duplex-PCR positiv (1 x Tu/Fe und 1 x Organe). Es wurden keine Proben zum Sequenzieren eingeschickt, da die Banden zu schwach gewesen sind. Die Vögel zeigten keine Gefiederdefekte. Lediglich die Krallen der Katharinasittiche waren mittelgradig zu lang und mussten in regelmäßigen Abständen gekürzt werden.

### **2.10. Überblick und Auswertung der Ergebnisse, Bestand 10**

Ein 6 Monate alter Mohrenkopfpapagei, war als Neuzugang im Bestand, nach 2 Monaten akut erkrankt und in der Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische bereits einen Tag nach Vorstellung verstorben. Mittels Duplex-PCR wurde post mortem eine Infektion mit BFDV festgestellt. Gefiederdefizite waren lediglich geringgradig und, in Form von Grimalen an den Steuerfedern feststellbar. Klinisch auffällig war das hgr. gestörte Allgemeinbefinden, eine Kopfschiefhaltung, eine Umfangsvermehrung am Hals, sowie Nasenausfluss. Im Blutbild war ein sehr niedriger Hämatokrit, von nur 9 % apparent. Der anschließende pathologische Befund umfasste einen hgr. blassen Herzmuskel, eine mgr. geschwollene und hellbeige Leber, eine ggr. geschwollene Milz, ggr. geschwollene Nieren, ein hgr. Lungenödem, sowie mgr. Einblutungen in Kleinhirn und Hirnstamm. In der bakteriologischen Untersuchung konnte eine hgr. Infektion mit *Pseudomonas fluorescens* in der Lunge und eine ggr. Infektion in der Leber festgestellt werden.

Daraufhin wurde eine Bestandskontrolle aller Tiere durchgeführt. Die 7 Wellensittiche und das Schwarzköpfchen waren alle mittels Duplex-PCR negativ. Lediglich in der Breitspektrum-PCR waren z. T. schwache Banden sichtbar.

Es wurden folgende Proben zum Sequenzieren eingesendet:

Mohrenkopfpapagei: 1 x Organe

Bei der Probe Organe von einem Mohrenkopfpapagei konnte eine Übereinstimmung mit BFDV-Sequenzen in der GenBank ermittelt werden (siehe Tab. 24).

**Tabelle 24:** BFDV-Übereinstimmungen in der GenBank (NCBI), Bestand 10

Tier:	Probenmaterial	Übereinstimmungen GenBank (ähnlichste Ergebnisse)
Mohrenkopfpapagei	Organe	JX221034 (max score: 769) GQ165756, GQ165757, GQ165758 (max score 752)

### 3. Phylogenetische Analyse der Sequenzergebnisse aus den Beständen 1, 2, 3, 4, 5, 10

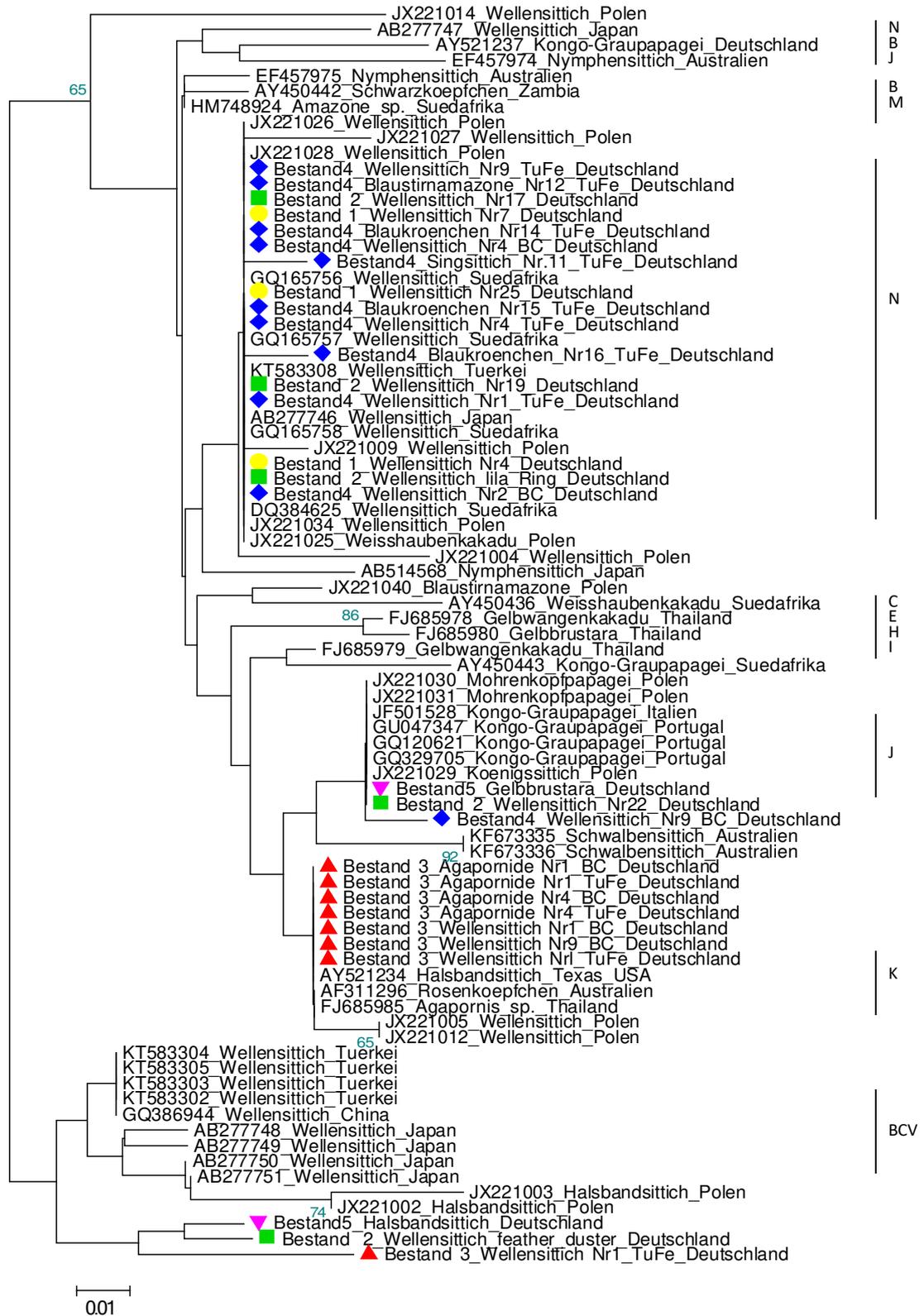
Die ermittelten Sequenzen aller Bestände wurden mit bereits veröffentlichten Sequenzen aus der Literatur und der NCBI GenBank (siehe Tab. 25) verglichen. Die Angaben in der Tabelle beinhalten den Speziesnamen, den Trivialnamen, die Zugangsnummer in der GenBank, die Bezeichnung des Virusstammes, das Jahr und Ursprungsland des Isolates, bzw. der Analyse und das Probenmaterial, falls bekannt.

Die phylogenetische Analyse (Abb. 19) umfasst insgesamt 81 Circovirussequenzen von Viren aus 13 Vogel-Gattungen. Die 29 in der vorliegenden Studie ermittelten Virusisolate beinhalten Sequenzen von 18 Wellensittichen (*Melopsittacus undulatus*), 6 Agaporniden (*Agapornis* spp.), 2 Blaukrönchen (*Loriculus galgulus*), 1 Halsbandsittich (*Psittacula krameri*), 1 Blaustirnamazone (*Amazona aestiva*) und 1 Gelbbrustara (*Ara ararauna*), aus insgesamt 5 Beständen. Der phylogenetische Stammbaum basiert auf den Rep-Regionen bzw. den partiellen Rep-Regionen der Circovirusisolate, in den Dendrogrammen sind nur Bootstrap-Werte > 60 % für die Verzweigungen dargestellt.

**Tabelle 25:** Übersicht der in die phylogenetische Analyse einbezogenen BFDV-Virusstämme aus der GenBank (NCBI), sowie zusätzlich verwendete Referenz-Sequenzen von Psittaziden

Trivialname	Zugangsnummer GenBank NCBI	Virusstamm	Ursprungs- land	Jahr	Proben-material
Spezies: <i>Melopsittacus undulatus</i>					
Wellensittich	AB277746	MU-JP1P	Japan	2010	Leber
Wellensittich	AB277747	MU-JP2P	Japan	2010	Feder
Wellensittich	AB277748	MU-JP3P	Japan	2010	Leber
Wellensittich	AB277749	MU-JP4P	Japan	2010	Leber
Wellensittich	AB277750	MU-JP5P	Japan	2010	Leber
Wellensittich	AB277751	MU-JP6P	Japan	2010	Feder
Wellensittich	DQ384625	UFS5	Südafrika	2006	Blut
Wellensittich	GQ165756	BKS1ZA_84	Südafrika	2003	Blut
Wellensittich	GQ165757	BKS2ZA_85	Südafrika	2003	Blut
Wellensittich	GQ165758	BKS3ZA_86	Südafrika	2003	Blut
Wellensittich	GQ386944	QD-CN01	China	2008	Leber
Wellensittich	JX221004	BFDV-Q_PL-1067_2010	Polen	2010	Blut u / o Feder
Wellensittich	JX221005	BFDV-T_PL-1068_2010	Polen	2010	Blut u / o Feder
Wellensittich	JX221009	BFDV-Q_PL-1240_2011	Polen	2011	Blut u / o Feder
Wellensittich	JX221012	BFDV-T_PL-1297_2011	Polen	2011	Blut u / o Feder
Wellensittich	JX221014	BFDV-I_PL-149_2005	Polen	2005	Blut u / o Feder
Wellensittich	JX221026	BFDV-B-D_PL-482_2007	Polen	2007	Blut u / o Feder
Wellensittich	JX221027	BFDV-B-D_PL-483_2007	Polen	2007	Blut u / o Feder
Wellensittich	JX221028	BFDV-B-D_PL-496_2007	Polen	2007	Blut u / o Feder
Wellensittich	JX221034	BFDV-N_PL-680_2008	Polen	2008	Blut u / o Feder
Wellensittich	KT583308	TR-46	Türkei	2014	Feder
Wellensittich	KT583305	TR-11	Türkei	2014	Feder
Wellensittich	KT583304	TR-4	Türkei	2014	Feder
Wellensittich	KT583303	TR-3	Türkei	2014	Feder
Wellensittich	KT583302	TR-2	Türkei	2014	Feder
Spezies: <i>Nymphicus hollandicus</i>					
Nymphensittich	EF457974	05-106	Australien	2007	Feder
Nymphensittich	EF457975	05-726	Australien	2007	Feder
Nymphensittich	AB514568	CO-JP	Japan	2010	Blut und Feder
Spezies: <i>Lathamus discolor</i>					
Schwalbensittich	KF673335	BFDV_AUS_SP_04_233A	Australien	2004	Blut
Schwalbensittich	KF673336	BFDV_AUS_SP_04_233B	Australien	2004	Blut

Trivialname	Zugangsnummer GenBank NCBI	Virusstamm	Ursprungs- land	Jahr	Proben-material
Spezies: <i>Psittacula krameri</i>					
Halsbandsittich	AY521234	PK01	USA, Texas	2004	Blut
Halsbandsittich	JX221002	BFDV-B-B_PL-1035_2010	Polen	2010	Blut u / o Feder
Halsbandsittich	JX221003	BFDV-B-B_PL-1036_2010	Polen	2010	Blut u / o Feder
Halsbandsittich	JX221010	BFDV-B-B_PL-1248_2011	Polen	2011	Blut u / o Feder
Spezies: <i>Alisterus scapularis</i>					
Königssittich	JX221029	BFDV-U_PL-543_2008	Polen	2008	Blut u / o Feder
Spezies: <i>Psittacus erithacus</i>					
Kongo-Graupapagei	GQ329705	PT09	Portugal	2009	Leber, Milz, Lunge
Kongo-Graupapagei	AY521237	PEG07	Deutschland	2004	Blut
Kongo-Graupapagei	AY450443	AFG3ZA	Südafrika	2004	Blut
Kongo-Graupapagei	JF501528	IT-26	Italien	2010	Feder
Kongo-Graupapagei	GU047347	PT09-2	Portugal	2009	Leber, Milz
Kongo-Graupapagei	GQ120621	BFDV-PT08-2	Portugal	2008	Blut
Spezies: <i>Cacatua alba</i>					
Weißhaubenkakadu	JX221025	BFDV-B-D_PL-479_2007	Polen	2007	Blut u / o Feder
Weißhaubenkakadu	AY450436	UC1-ZA	Südafrika	2004	Blut
Spezies: <i>Ara ararauna</i>					
Gelbbrustara	FJ685980	BFDV8	Thailand	2006	Feder, Blut
<i>Amazona</i> spp.					
Amazone ( <i>Amazona</i> sp.)	HM748924	BFDV_ZA_Am_83e_2008	Südafrika	2008	Blut
Blaustirnamazone ( <i>Amazona aestiva</i> )	JX221040	BFDV-R_PL-742_2008	Polen	2008	Blut u / o Feder
<i>Agapornis</i> spp.					
Rosenköpfchen ( <i>A. roseicollis</i> )	AF311296	BCL1-ZA	Australien	2000	Feder
Schwarzköpfchen ( <i>A. nigrigenis</i> )	AY450442	BCL1-ZA	Zambia (Afrika)	2004	Blut
Unzertrennlicher, Agapornide ( <i>Agapornis</i> sp.)	FJ685985	BFDV13	Thailand	2005	Feder, Blut
Spezies: <i>Poicephalus senegalus</i>					
Mohrenkopfpapagei	JX221031	BFDV-J_PL-571_2008	Polen	2008	Blut u / o Feder
Mohrenkopfpapagei	JX221030	BFDV-J_PL-570_2008	Polen	2008	Blut u / o Feder



**Abbildung 19:** Phylogenetische Analyse basierend auf partiellen Rep-Gen-Sequenzen mit insgesamt 29 Circovirusisolationen aus 5 Beständen der vorliegenden Studie unter Einbeziehung von 52 bereits veröffentlichten Sequenzen von Isolationen aus der GenBank. Die Bezeichnung der in dieser Studie untersuchten Vögel umfasst die Bestandsnummer, die Spezies (so genau wie möglich) inklusive der Identifikationsnummer im jeweiligen Bestand, das Probenmaterial und das Land, in dem die Probe gezogen und untersucht wurde. Angaben zu Sequenzen der GenBank (NCBI) oder der Literatur umfassen die „accession number“, die Species und das Land der Beprobung, bzw. Analyse. Die Clustereinteilung mit Buchstaben auf der rechten Seite entspricht der Einteilung von bereits klassifizierten Vollgenomisolationen in der Publikation von Varsani et al. (2011)

Da es aktuell noch keine offizielle Richtlinie zur Klassifizierung der psittaziden Circovirusstämme und ihrer Subtypen gibt, werden die in Abbildung 19 dargestellten Gruppierungen nach Varsani et al. (2011) gewählt. Die in dieser Veröffentlichung angegebene Einteilung basiert auf paarweisem Genomsequenzvergleichs von 87 Vollgenomsequenzen und wird häufig in der Literatur zitiert (Julian et al., 2013; Massaro et al., 2012; Peters et al., 2014; Robino et al., 2014).

Entsprechend dem taxonomischen System nach Varsani et al. (2011), in dem die Begriffe Virusstamm und Subtyp für BFDV konkret definiert wurden, und nach dem 1.) Viren, die Identitäten von weniger als 94 % zeigen, unterschiedlichen Virusstämmen zugeordnet werden 2.) Viren, die Identitäten von 94 – 98 % zeigen, unterschiedlichen Virusstammvarianten zugeordnet werden und 3.) Virusisolate, die eine paarweise Genom-Identität von > 98 % besitzen, als Subtypen klassifiziert werden, wurden 14 Virusstämme, bezeichnet als Stamm A-N, festgelegt. Zusätzlich wurde angedeutet, das Cluster der Wellensittiche AB277748, AB277749, AB 277750, AB277751 aus Japan AB277748, AB277749, AB 277750, AB277751 und GQ386944 aus China als eigene Wellensittich-Circovirus-Spezies („budgerigar circovirus“ - BCV) mit 3 Subtypen (BCV-A, -B, -C) einzuteilen (Varsani et al., 2011).

Die Eingruppierung der in der vorliegenden Studie erhaltenen Sequenzen in das System nach Varsani et al. (2011) ist in Abbildung 19 dargestellt. Der phylogenetische Stammbaum zeigt eine gemeinsame Einordnung des „feather dusters“ aus Bestand 2, des Wellensittichs Nr.1 aus Bestand 3 (TuFe) und des Halsbandsittichs aus Bestand 5 in das Cluster BCV der Wellensittiche aus Japan (AB277748, AB277749, AB 277750, AB277751), aus der Türkei (KT583302, KT583303, KT583304, KT583305), aus China (GQ386944) und 2 Halsbandsittichen aus Polen (JX221002, JX221003). Das gemeinsame Cluster grenzt sich hier deutlich von den anderen, oberen Clustern ab. Die 3 erwähnten Tiere aus den süddeutschen Beständen bilden hierbei noch einmal eine Untergruppe.

Der Halsbandsittich aus Bestand Nr. 5, sowie die Halsbandsittiche aus Polen (JX221002, JX221003) ordnen sich in das Wellensittichcluster (BCV) ein, wohingegen sich der Halsbandsittich aus Texas, USA (AY521234; de Kloet und de Kloet, 2004), mit den Agaporniden und Wellensittichen aus Bestand 3, dem Rosenköpfchen aus Australien (AF311296) und dem Agaporniden aus

Thailand (FJ685985) in das Cluster „K“ einordnet.

Sowohl der Gelbrustara aus Bestand 5, als auch der Wellensittich Nr. 22 aus Bestand 2 und der Wellensittich Nr. 9 (BC) aus Bestand 4 ordnen sich in das Cluster „J“ mit 3 Kongo-Graupapageien (GU047347, GQ120621, GQ329705) aus Portugal ein.

Die restlichen 16 in dieser Studie detektierten Circovirusisolate (Isolate von 11 Wellensittichen, 1 Singsittich, 1 Blaustirnamzone und 2 Blaukrönchen) gruppieren sich in das Cluster „N“ zu Isolaten von Wellensittichen aus Japan (AB277746) und Südafrika (GQ165757, GQ165756, GQ165758).

Die phylogenetische Analyse zeigt enge Zusammenhänge zwischen den Virusstämmen der Vögel aus jeweils ein und demselben Bestand, mit wenigen Ausnahmen („feather duster“ Bestand 2, Wellensittich Nr.1 Bestand 3 (TuFe) und Halsbandsittich Bestand 5) (Gelbrustara Bestand 5, Wellensittich Nr. 22 Bestand 2 und Wellensittich Nr. 9 (BC) Bestand 4).

## V. DISKUSSION

Aviäre Circoviren sind weltweit verbreitet und bei Papageienvögeln als Auslöser von Feder- und Schnabelveränderungen (Psittacine Beak and Feather Disease, PBFD) bekannt, eine der bedeutendsten Viruserkrankungen der Papageien, die zu massiven Verlusten in Zuchtbeständen und schweren Erkrankungen führt. In dieser Studie sollte unter anderem untersucht werden, ob sich verschiedene PBFD-Virusstämme in ihrer Wirtsspezifität unterscheiden. Daher wurden in gemischten Beständen, bei denen Circovirusinfektionen bei Wellensittichen nachgewiesen worden waren, weitere Papageienvögel untersucht, um mögliche Übertragungswege und epidemiologische Zusammenhänge besser verstehen zu können. Zusätzlich sollten Möglichkeiten zur optimalen Diagnostik mittels unterschiedlicher PCR-Methoden untersucht werden und nach einer anschaulichen und praktikablen Dokumentation für Gefieder-, Schnabel- und Krallendefekten gesucht werden.

### 1. In die Studie einbezogene Vögel

Bei der hier vorliegenden Studie wurden in einem ersten Schritt Wellensittiche auf das Vorhandensein einer Infektion mit Circoviren untersucht. Wenn ein BFDV-positiver Wellensittich zusammen mit anderen Psittaziden in direktem oder indirektem Kontakt (ein Bestand) gehalten wurde, wurden weitere Vögel des Bestandes und wenn möglich, der komplette Bestand in die Studie einbezogen. Bei den Vögeln handelte es sich um Patienten der Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische, die aus Hobby- und Zuchtbeständen aus dem süddeutschen Raum stammten und dann im Rahmen einer von den Haltern angeforderten Bestandskontrolle untersucht wurden. Psittaziden aller Altersstufen (Nestlinge, Juvenile, Adulte) waren vertreten, allerdings bestandsspezifisch zum Teil nur mit einer geringen Anzahl an Einzeltieren. Eine Aufteilung in Altersgruppen konnte daher nicht vorgenommen werden. Insgesamt wurden 10 gemischte Bestände zur näheren Diagnostik ausgewählt, in denen folgende Spezies vertreten waren.

Bestand 1 – Wellensittiche, Nymphensittiche, Kongo-Graupapageien, Keas, Weißhaubenkakadus und ein Orangehaubenkakadu. Bestand 2 – Wellensittiche und Schwalbensittiche. Bestand 3 – Wellensittiche und Agaporniden. Bestand 4 – Wellensittiche, Singsittich, Blaustirnamazone und Blaukrönchen. Bestand 5 – Wellensittiche, Nymphensittiche, Halsbandsittiche und Gelbbrustaras.

Bestand 6 – Wellensittiche, Schönsittiche, Prachtsittiche, Ziegensittiche, Kanarienvögel und Magellanzeisige. Bestand 7 – Wellensittiche, Sperlingspapageien und ein Stanleysittich. Bestand 8 – Wellensittiche, Nymphensittiche und Katharinasittiche. Bestand 9 Wellensittiche, Katharinasittiche und ein Zebrafink. Bestand 10 – Wellensittiche, ein Schwarzköpfchen und ein Mohrenkopfpapagei.

Da alle Vögel natürlich infiziert waren und keine Verlaufsstudie durchgeführt wurde, kann keine Aussage darüber getroffen werden, wann sich die Tiere angesteckt haben und in welcher Phase der Infektion sie sich befanden. Eine Infektion kann daher in den aktuellen Beständen erfolgt sein (Nachzuchten) oder vor Aufnahme in den Bestand, also bereits bei den Vorbesitzern oder auf Vogelbörsen.

Es ist bekannt, dass sich durch den Handel mit Papageien, die als Haustiere gehalten werden, PBFV-Viren über Länder und Kontinente hinweg verbreiten können (Massaro et al. 2012; Zhuang et al., 2012; Araújo et al., 2015; Cerníková et al., 2017; Ho et al., 2017). So kann ein Eintrag von neuen BFDV-Stämmen eventuell auch in wildlebende Populationen stattfinden (Fogell et al., 2016). Phylogenetische Untersuchungen stützen die Auffassung, dass der Handel ein wichtiger Faktor bei der Verbreitung der Viren darstellt. Virusstämme, die in einer Studie in China im Jahre 2011 charakterisiert wurden, wiesen eine enge Verwandtschaft zu Stämmen in Japan auf (Zhuang et al., 2012).

## **2. Diagnosestellung**

Die Untersuchung auf eine Infektion mit Circoviren fand mittels PCR statt. PCR-Analysen sind im Allgemeinen sehr sensitiv, da sie auch geringe Spuren von DNA nachweisen können. Für den Nachweis von Psittaziden-Circoviren etablierte PCR-Protokolle unterscheiden sich jedoch in ihrer Sensitivität. Da Circovirus-Genome eine sehr hohe Variabilität und Heterogenität aufweisen (Julian et al., 2013; Sarker et al., 2014), lassen sich mit einer einzelnen PCR-Methode meist nicht alle Isolate nachweisen (Khalesie et al., 2005; Cerníková et al., 2017), es besteht daher ein nicht unerhebliches Risiko für falsch negative Ergebnisse. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit zwei verschiedene PCR-Methoden als vergleichende Untersuchung durchgeführt (siehe Tab. 18). Jeweils derselbe DNA-Probenextrakt wurde für beide PCR-Protokolle als Ausgangsmaterial verwendet.

Da die Infektion mit Polyomaviren eine der Hauptdifferentialdiagnosen für PBFV ist,

wurde eine Duplex-PCR (Ogawa et al., 2005) verwendet, die nicht nur ein breites Spektrum von Psittaziden-Circoviren nachweist, sondern auch eine robuste Methode zum Nachweis von APV darstellt. In dieser Duplex-PCR unterscheiden sich die Produkte für BFDV und APV, beide Viren können also anhand der Größe des Produktes unterschieden werden. Stichprobenhafte Sequenzierungen bestätigen in der vorliegenden Studie die Identität der PCR-Produkte einer Größe von ca. 500 bp als PBFD-Virus. Zumindest bei einigen PBFD-Virusstämmen scheint jedoch die Sensitivität niedriger zu sein als bei der zweiten PCR nach Halami et al. (2008), die in dieser Studie verwendet wurde. So konnten bei der Untersuchung eines Bestandes mit 28 verstorbenen Wellensittichen (Bestand 1, Tab. 18) mit der Duplex-PCR nur bei 3 Tieren (11 %) BFDV (und bei einem Tier (4 %) APV) detektiert werden. Bei der Untersuchung mittels nested Breitspektrum PCR (Halami et al., 2008) wurden nahezu alle Wellensittiche dieses Bestandes (96 %) als positiv ermittelt. Ein wesentlicher Nachteil der verwendeten PCR nach Halami et al. (2008) ist jedoch, dass es sich um eine nested Breitspektrum-PCR handelt und daher das Risiko sowohl einer Laborkontamination als auch einer Umweltkontamination mit anderen Circoviren, außer BFDV, groß ist. Da aus Kostengründen nur eine Auswahl an Einzeltier-PCR-Produkten der jeweiligen Bestände zur Sequenzierung geschickt wurde, kann in der vorliegenden Studie keine eindeutige Aussage zur Verlässlichkeit der nested Breitspektrum auf BFDV getroffen werden und die Nachweishäufigkeit wird möglicherweise überschätzt. Nur ein Tier aus Bestand 1 wurde bei der Analyse mittels beider PCR-Methoden und bei allen 3 Einzelproben (TuFe, BC, Organe) als negativ eingestuft. Klinisch fiel der Vogel jedoch durch mittelgradige Stockmauser, einen hochgradigen Befall mit Federmilben, geringgradigen Einblutungen und brüchigen Stellen am Schnabelhorn, sowie einzelnen Veränderungen an Hand-, Armschwingen und Steuerfedern auf. Ob dieser Vogel tatsächlich frei von BFDV war oder ob die Virusmenge lediglich unter der Nachweisgrenze der verwendeten Tests lag, ist unbekannt. Serologische Untersuchungen zum Nachweis von Antikörpern, die eine eventuell ausgebildete Immunität nachweisen könnten, wurden in der vorliegenden Studie nicht durchgeführt.

Bei der Probensammlung wurden routinemäßig Kloakentupfer und Federn (TuFe) als Proben genommen, bei denen jedoch ein Fremd-Kontaminationsrisiko durch in der Umwelt vorhandene Viren gegeben ist (Sarker et al., 2015). Wann immer möglich, wurden daher zusätzlich Blut- und / oder Organproben entnommen. Bei den

Kloakentupfern und Federn könnte eine Fremdkontamination durch andere Tiere im Bestand denkbar sein, da z. B. mit den Faeces intermittierend hohe Mengen an Viruspartikeln ausgeschieden werden können (Hulbert et al., 2015) und Circoviren eine außerordentlich hohe Tenazität in der Umwelt besitzen (Raidal und Cross, 1994; Royer et al., 2001; Welch et al., 2006).

Diese Überlegung gilt auch bei Untersuchungen zur Wirtsspezifität der Circoviren, wenn für einzelne Virusstämme in der Genbank (NCBI) und in der Literaturreferenz lediglich Informationen zur Vogelart gegeben werden, aber konkrete Angaben über das entsprechende Probenmaterial fehlen, aus dem die Sequenz gewonnen wurde. So ist z. B. für die Sequenz mit der Genbank-Zugangsnummer JX221025 (Weißhaubenkakadu aus Polen, Julian et al., 2013), die sich in ein Wellensittich-Viren-Cluster (Varsani et al., 2011) eingruppiert und für die Angaben zum untersuchten Probenmaterial fehlen, unklar, wie sicher eine externe Kontamination auszuschließen ist. Auch die Verwendung von Speiseröhre, Drüsenmagen, Muskelmagen und Darmabschnitten aus verstorbenen Tieren zur Untersuchung ist unter Umständen weniger sicher, da die Möglichkeit der Fremdkontamination mit Viruspartikeln durch orale Aufnahme bestehen könnte.

Welches Material für eine Untersuchung besonders geeignet ist, ist sicherlich auch von dem Infektionsstadium abhängig, in dem sich der Vogel befindet. In der vorliegenden Studie konnte Virus-DNA bei einigen Vögeln nur in einem Probenmaterialtyp, in Bestand 1 z. B. bei zwei Vögeln nur in Organen, nachgewiesen werden (siehe Bestand 1, Tabelle 18, WS #14 und 19). Die meisten positiven BFDV-DNA-Nachweise in diesem Bestand erfolgten allerdings in Tupfer- / Federproben (86 %), gefolgt von Organproben verstorbener Tiere (68 %), während die Nachweisrate im Blut nur gering war (14 %). Generell ist davon auszugehen, dass bei Circovirusinfektionen der Papageien eine Virämie nur zeitlich begrenzt zu finden ist, so dass Tiere in nicht virämischen Phasen bei Verwendung von Blut falsch negative Testergebnisse bezüglich ihres Infektionsstatus zeigen (Araújo et al., 2015).

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen stützen frühere Studien, in denen bei unterschiedlichen Probenmaterialien ein- und desselben Tieres ähnlich diskrepante Ergebnisse erzielt wurden. So erbrachte die PCR-Untersuchung der Feder eines Allfarbloris einen positiven Virus-DNA-Nachweis, EDTA-Blut und Filterpapier mit eingetrocknetem Blut hingegen waren negativ. In der gleichen Studie

wurden 2 Wellensittiche in getrockneten Blutproben auf Filterpapier positiv detektiert, aber deren Federproben waren negativ (Ritchie et al., 2003). Bei einer weiteren Studie wurde Virus-DNA am häufigsten aus Feder-Proben nachgewiesen (67 %), gefolgt von Kloakentupfern (45 %) und Blutproben (21 %). Die Ergebnisse schwankten in dieser Studie allerdings im Studienverlauf, und als Ursache wurden auch hier unterschiedliche Infektionsphasen vermutet. Positive Resultate im Blut gingen oft einher mit klinischen Symptomen, während klinisch unauffällige Tiere meist mittels Feder- und Kloakentupfer als positiv identifiziert werden konnten (Hess et al., 2004).

### **3. Klinisches Erscheinungsbild beim Wellensittich und anderen Psittaziden**

Das klinische Erscheinungsbild bei BFDV-positiven Vögeln war meist durch Veränderungen des Federkleids, des Schnabels und zum Teil der Krallen gekennzeichnet, vermutlich meist beeinflusst durch Sekundärinfektionen. Im Bestand 1 konnten bei 78 % der Steuerfedern, bei 67 % der Handschwingen, 26 % der Armschwingen und 11 % der Deckfedern Auffälligkeiten ermittelt werden. Diese umfassten sowohl Bruchschäden als auch Degenerationen oder Totalverluste. Der Mauserstatus der Tiere wurde bei der Auswertung nicht mit berücksichtigt. Sogenannte Renner waren in den Beständen 2, 3, 4 und 5 vorhanden.

Gefiederveränderungen sollten allerdings stets kritisch hinterfragt werden, da diese nicht zwingendermaßen auf eine Infektion mit Circoviren oder Aviären Polyomaviren schließen lassen. Defekte, wie z. B. abgebrochene Steuerfedern, können auch haltungsbedingt vorkommen. In dieser Arbeit konnten keine der festgestellten Feder-, Schnabel und Krallendefekte eindeutig nur einer Infektion mit Circoviren zugeordnet werden. Die Defekte variierten zum Teil von Bestand zu Bestand und auch bei einzelnen Tieren. Häufig waren Ektoparasiten vorhanden, z. B. Räudemilben (*Knemidokoptes pilae*) oder Federmilben. Da PBFD ganz oben auf der Differentialdiagnostikliste für Befiederungsstörungen steht, wurden Vögel mit einem Teil- oder Totalverlust des Großgefieders, manchmal auch des Kleingefieders, immer in die Untersuchung mit einbezogen. Ungeachtet dessen waren auch subklinische Infektionen vorhanden, bei denen BFDV-positive Psittaziden keinerlei Veränderungen am Federkleid aufwiesen. Positive Raten von klinisch unauffälligen Tieren schwanken beim Vergleich von verschiedenen Veröffentlichungen

deutlich – z. B. waren bei einer Studie in Taiwan 24 %, in Deutschland 39,2 %, in Australien 56,2 %, der klinisch unauffälligen Tiere positiv (Rahaus et al., 2003; Amery-Gale et al., 2017; Ho et al., 2017). Es muss natürlich bedacht werden, dass eine unterschiedliche Anzahl an Vögeln und auch diverse Spezies untersucht wurden.

Da das BFDV höchstwahrscheinlich eine Immunsuppression hervorruft, können Krankheitssymptome auch durch dadurch begünstigte Sekundärinfektionen verursacht werden und nicht ausschließlich von der Primärerkrankung PBFD herrühren. Daher müssen die klinischen Symptome immer auch unter diesem Aspekt ausgewertet werden (de Kloet und de Kloet, 2004). Zusammenhangstrennungen bei Federästen können z. B. auch durch Federmilbenfraß hervorgerufen werden (Sekundärerkrankung) und nicht nur durch eine virusbedingten Störung im Federfollikel während der Wachstumsphase bedingt sein. Hier sollten zusätzliche Parameter, eventuell aus klinischen Untersuchungen oder dem Blutbild, herangezogen werden (z. B. Leukopenie beim Graupapagei) oder andere Untersuchungen, wie z. B. eine PCR-Untersuchung für weitere Erreger, durchgeführt werden. Auch haltungsbedingte Schäden am Gefieder, dem Schnabel und den Krallen, also mechanische Faktoren, sollten mit bedacht werden.

Das in dieser Studie verwendete Gefiederprotokoll, das auf einem von van Zeeland et al. (2013) entwickelten Schema basiert, aber unter anderem durch Verwendung einer Zeichnung zur Dokumentation der Veränderungen vereinfacht wurde, erwies sich als geeignet, den primären Status des Gefieders und auch der Krallen und des Schnabelhorns beim Patienteneingang schnell und anschaulich zu dokumentieren. Verdrehte Federn, fehlendes Deckgefieder, kahle Stellen und andere Auffälligkeiten konnten präzise zugeordnet werden. Zusätzlich ist dieses Gefiederprotokoll für Verlaufskontrollen von Nutzen, z. B. bei der Verfolgung der Regeneration des Federkleides akut an PBFD erkrankter Jungtiere oder nach der Behandlung von Vögeln mit Ektoparasitika und bei der Überprüfung des Therapieerfolges von Federrupfern (van Zeeland et al., 2013). Insgesamt ist das Gefiederprotokoll als Dokumentationshilfe zur Ermittlung des Gefiederstatus gut anwendbar, ersetzt aus oben genannten Gründen jedoch nicht eine Virusdiagnostik.

#### **4. Artenspektrum der zusätzlich zu Wellensittichen als Circovirus-DNA-positiv identifizierten Papageien**

In der vorliegenden Studie wurden Circovirus-PCR-positive Wellensittiche aus

10 Beständen einbezogen. In den Beständen 1 und 2 wurde, wie mittels Sequenzierung bestätigt wurde, BFDV-DNA ausschließlich bei Wellensittichen nachgewiesen. Lediglich in drei Beständen wurden BFDV-Nachweise nicht nur bei Wellensittichen, sondern auch bei Vögeln anderer Papageienarten erzielt, und zwar bei 6 Agaporniden (*Agapornis* spp.) in Bestand 3, 2 Blaukrönchen (*Loriculus galgulus*) und 1 Blaustirnamazonen (*Amazona aestiva*) in Bestand 4, 1 Halsbandsittich (*Psittacula krameri*) und 1 Gelbbrustara (*Ara ararauna*) in Bestand 5. In diesen Beständen wurden Virussequenzen ermittelt, die hohe Übereinstimmungen mit bereits bekannten BFDV-Sequenzen aus der Gendatenbank (NCBI) zeigten.

In den restlichen Beständen war die Beurteilung bezüglich einer Infektion von Partnertieren mit BFDV nur mit gewissen Einschränkungen möglich. Im Bestand 6 wurden bei der Sequenzierung von PCR-Produkten hohe Übereinstimmungen mit Tauben-Circoviren (CoCV) gefunden. Dieser Befund ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Verunreinigung des Probenmaterials mit CoCV zurückzuführen. Dies könnte haltungsbedingt sein, da die Tiere in einer teilweise nach außen offenen Voliere untergebracht waren und somit Kontakt zu Wildvögeln und von ihnen ausgeschiedenen Erregern bestand. Das CoCV könnte durch Federstaub von Tauben aus der Umgebung eingetragen worden sein und somit zu einer Fremdverunreinigung beigetragen haben. Eine Laborkontamination wird als unwahrscheinlich angesehen, da bei der Untersuchung mitgeführte (Negativ-) Kontrollen dagegen sprechen. Circoviren werden im Allgemeinen als wirtsspezifisch angesehen. In der letzten Zeit wurden allerdings einige Arbeiten mit Nachweisen von eigentlich „wirtsfremden“ Circoviruspezies bei Vögeln publiziert (Amery-Gale et al., 2017; Circella et al., 2014; Sarker et al., 2015). Derzeit ist unklar und es kann an dieser Stelle nicht beurteilt werden, ob es sich hier tatsächlich um Nachweise eines erweiterten Wirtsspektrums handelt und ob Probenverunreinigungen sicher auszuschließen sind.

Im Bestand 7 wurden Circoviren bei anderen Vögeln des Bestandes nicht nachgewiesen. Im Bestand 8 waren mittels nested Breitspektrum PCR und im Bestand 9 mittels Duplex PCR nur sehr schwache Banden sichtbar, deren DNA-Gehalt den Erfahrungswerten nach für eine erfolgreiche Sequenzierung nicht ausreicht. Daher kann hier der Infektionsstatus der Partnervögel bezüglich der Virusart nicht eindeutig beurteilt werden. Im Bestand 10, bei dem in der nested Breitspektrum-PCR bei den Wellensittichen und dem Schwarzköpfchen schwache

Banden in erwarteter Größe erhalten wurden, wurde nur bei einem Mohrenkopfpapagei, einem erst kurze Zeit vor der Untersuchung in den Bestand aufgenommenen und daraufhin sehr schnell verstorbenen Jungtier, BFDV mittels Sequenzierung in Organproben bestätigt.

Auch wenn, wie bereits diskutiert wurde, ein negatives PCR-Ergebnis nur mit Einschränkungen eine Aussage zum Infektionsstatus der Vögel zulässt (die Tiere können nicht infiziert sein, alternativ kann bei einem infizierten Vogel die Virusmenge im untersuchten Probenmaterial unter der Nachweisgrenze der Tests liegen oder es können Virusstämme vorliegen, die mit diesen PCR-Methoden nicht aufgespürt werden), könnten sich die Ergebnisse der Studie bei einem Teil der Bestände durch die Existenz von Wirtsspezifität erklären lassen. Sie stützen zumindest die Auffassung, dass immerhin einige vorkommende Virusstämme nicht ohne weiteres von einer Vogelart (vom Wellensittich) auf eine andere übertragbar sind.

## **5. Phylogenetische Untersuchung**

Seit langem wird im wissenschaftlichen Schrifttum diskutiert, ob es BFDV-Varianten mit unterschiedlicher Wirtsspezies-Spezifität gibt. Dies wurde z. B. für Viren beim Wellensittich, Kakadu und Lori vermutet (Khalesi et al., 2005). Unterschiedliche Virusvarianten lassen sich anhand ihrer genomischen Nukleotidsequenz identifizieren und unterscheiden, so dass Sequenzierungen und anschließende phylogenetische Analysen Hinweise auf den Verwandtschaftsgrad der Viren geben können und unter Umständen auch Folgerungen zur Wirtsspezifität zulassen.

Bei den Circovirussequenzen aus dieser Studie wurde, basierend auf phylogenetischen Analysen eines 0,3 kb-großen Fragments des Replikase-Gens, eine circovirus-typisch hohe genetische Heterogenität festgestellt, und nach Anwendung einer Klassifizierung von Varsani et al. (2011), (siehe Abb. 19) ordnete sich ein Großteil der Virussequenzen der Wellensittiche aus Bestand 1, 2 und 4 in das Cluster N ein. Dieses Cluster enthält viele Virusstämme von Wellensittichen, so dass es relativ Wellensittich-spezifisch zu sein scheint. Jedoch ordnen sich auch ein Weißhaubenkakadu-Isolat (JX221025) aus Polen und die in der vorliegenden Studie erhaltenen Stämme der Blaukrönchen, der Blaustirnamazone und des Singsittichs aus Bestand 4 ein. Die positiven PCR-Produkte der Nicht-Wellensittiche aus Bestand 4

wurden allerdings aus Tupfer / Feder-Proben gewonnen, so dass eine Fremdkontamination nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann.

Virussequenzen von jeweils einem weiteren Wellensittich aus Bestand 2 und Bestand 4 sowie von einem Gelbbrustara aus Bestand 5 ordneten sich in das Cluster J ein. Bereits bekannte Isolate aus diesem Cluster stammen u. a. von einem Königssittich, Kongo-Graupapageien und Mohrenkopfpapageien, also von unterschiedlichen Papageienarten, aus dem europäischen Raum. Möglicherweise ist dieses Cluster also durch eine gemeinsame Geographie gekennzeichnet.

Alle Agaporniden und Wellensittiche aus Bestand 3, bis auf einen Vogel, ordneten sich in das Cluster K ein. In diesem Cluster befinden sich auch Isolate von einem Halsbandsittich aus Texas (USA), einem Rosenköpfchen aus Australien und einem nicht näher bestimmten Agaporniden aus Thailand. Da der Züchter von Bestand 3 Beziehungen nach Thailand pflegte, wäre eine Verwandtschaft der Isolate zu dem bereits bekannten Agaporniden-Isolat (FJ685985) aus Thailand am ehesten über Handelskontakte zu erklären.

3 Vögel, darin eingeschlossen ein Halsbandsittich aus Bestand 5 und jeweils ein Wellensittich aus Bestand 2 und 3, fielen in das am weitesten entfernte Cluster BCV. Dieses Cluster kann als eine Art untergeordnetes Cluster zu den bereits bekannten Wellensittich-Isolaten aus der Türkei, China, Japan und den Halsbandsittichen aus Polen angesehen werden.

Insgesamt gruppierten sich die erhaltenen Sequenzen aus dieser Studie zum Teil nach Wirt, zum Teil aber auch nach geographischer Herkunft, d.h. relativ bestandsspezifisch ein.

Ein Kennzeichen von Circoviren ist, wie bereits erwähnt, eine hohe genetische Heterogenität, die einer hohen Mutationsrate (Allan et al., 2012; Halami et al., 2008; Johne et al., 2006; Liao et al., 2015; Matczuk et al., 2015; Stenzel et al., 2015) dieser Viren mit Einzelstrang-DNA-Genom zugeschrieben wird. Evolutionäre genomische Veränderungen treten häufig durch Mutationen der Nucleotidsequenz der DNA auf. Unterschiedlichste Ursachen können hierfür in Frage kommen, wie z. B. Fehler während der Replikation, also bei der Aktivität der DNA-Polymerase, sogenannte Spontanmutationen, aber auch chemische Verbindungen wie z. B. alkylierende Agenzien oder physikalische Faktoren wie z. B. UV-Strahlung oder Röntgenstrahlung können Mutationen auslösen. Allgemein können Mutationstypen

bei der DNA-Variation durch Punktmutation (Basenaustausch), Deletion (Entfernung einer oder mehrerer Basen und daher bedingt Verschiebung des Leserasters), Insertion (Einfügen einer oder mehrerer Basen und daher Verschiebung des Leserasters) oder Inversion (Ausschneiden eines Basenabschnittes und umgekehrtes Einsetzen) einer Sequenz entstehen (Fries, 2000). Ein hoher Selektionsdruck, z. B. durch das Immunsystem des Wirtes kann eine hohe Mutationsrate des Virus bedingen.

Seit kurzem wird für die hohe genetische Diversität der Circoviren zusätzlich ein häufiges Vorkommen von Rekombinationen verantwortlich gemacht (Julian et al., 2013; Robino et al., 2014; Stenzel et al., 2014; Stenzel et al., 2018; Varsani et al., 2011). Rekombinationen, die durch den Austausch größerer Genomfragmente gekennzeichnet sind, können z. B. bei Koinfektionen mit unterschiedlichen Virusstämmen entstehen. Ähnliche Invasionswege, z. B. durch gemeinsam genutzte Nistmöglichkeiten und die dadurch bedingte zufällige Übertragung in einen neuen Wirt können dabei den selektiven Druck forcieren.

## **6. Zur Wirtsspezifität von BFDV**

Seit dem Importverbort von Papageien-Wildfängen in die EU im Jahr 2005 ist die Nachfrage nach hier nachgezüchteten Papageienvögeln europaweit gestiegen. Dies könnte u. a. ein Anreiz für Züchter gewesen sein, eine zunehmende Zahl verschiedener Psittazidenarten in ihren Beständen zu halten, wodurch möglicherweise ein Eintrag unterschiedlichster Circovirusstämme erfolgte und ein entsprechender Infektionsdruck zugenommen hat. Es stellte sich daher die Frage, ob BFDV von einer Papageienspezies auf die andere übertragbar ist.

Eine klassische Methode zur Untersuchung des Wirtsspektrums von Erregern stellen Infektionsversuche unter Verwendung von Virusmaterial aus einer Kultur dar. Bislang sind allerdings keine Zellkultursysteme für eine erfolgreiche Anzucht von BFDV bekannt, so dass eine direkte Beantwortung der Frage des Wirtsspektrums durch Infektionsversuche nicht möglich ist. In der vorliegenden Studie sollten daher zwei Ansätze zur Beantwortung der Übertragbarkeit verfolgt werden. Einerseits sollte in gemischten Beständen das Vorkommen einer Infektion mit BFDV bei unterschiedlichen Arten untersucht werden. Andererseits sollten die vorkommenden Viren genetisch charakterisiert werden, also mittels molekularepidemiologischer Untersuchungen das Wirtsspektrum und, daraus folgend, eine mögliche Übertragung

untersucht werden.

Bei Betrachtung der Bestände 1 bis 5, bei denen nicht nur PCR-Befunde, sondern auch zusätzlich partielle Rep-Gen-Sequenzen von BFDV vorlagen, ergab sich kein einheitliches Bild bezüglich der betroffenen Vogelarten und der nachgewiesenen Virusstämme. In Bestand 1, in dem Circovirus-Infektionen nur bei Wellensittichen, aber nicht bei den anderen gehaltenen Papageienarten nachgewiesen worden waren, gruppierten sich die mittels partieller Rep-Gen-Sequenz charakterisierten Viren alle in Cluster N nach Varsani et al. (2011) ein, also in ein Cluster, in dem primär Wellensittich-Circoviren zu finden sind. Hier stützen demnach sowohl die Untersuchungen zu den betroffenen Vogelarten als auch die phylogenetischen Untersuchungen die Auffassung, dass in diesem Bestand Viren mit einer gewissen Wirtsspezifität für Wellensittiche vorkamen.

In Bestand 2, auch hier war BFDV nur bei Wellensittichen nachgewiesen worden, ordneten sich die meisten charakterisierten Circoviren ebenfalls in das Cluster N ein. Zusätzlich war jeweils eine Circovirussequenz aus Bestand 2 in Cluster J, als ein Cluster, das auch Viren von anderen Papageien enthält, und in einem als Wellensittich-spezifisch angesehenen Cluster BCV zu finden. Hier waren Schwalbensittiche bereits seit längerer Zeit in einer direkt angrenzenden Voliere untergebracht, ohne dass bei ihnen eine Infektion nachgewiesen werden konnte. In diesem Bestand wurden also sehr unterschiedliche Circoviren nachgewiesen, die mehrere unterschiedliche Viruseinträge in den Bestand vermuten lassen. Viren des Clusters J können als wenig papageienart-spezifisch angesehen werden können, und wurden auch bereits bei Schwalbensittichen nachgewiesen (Sarker et al., 2013). Daher ist es unklar warum bei den Schwalbensittichen dieses Bestandes kein Circovirus nachweisbar war (siehe Abb. 19).

In Bestand 3, in dem BFDV-Sequenzen bei Wellensittichen und Agapomiden nachgewiesen wurden, gruppierten sich der Großteil der erhaltenen Circovirus-Sequenzen in Cluster K nach Varsani et al. (2011) ein. Interessanterweise wurden Circoviren dieses Clusters auch in der Vergangenheit schon bei Wellensittichen und Agaporniden nachgewiesen, zusätzlich aber auch bei einem Halsbandsittich und einem Blutbauchsittich (*Psephotus haematogaster*) (Varsani et al., 2011). Die Wellensittiche und Agaporniden von Bestand 3 waren zwar in unterschiedlichen Volieren, jedoch im selben Raum untergebracht, so dass eine wechselseitige

Übertragung durch räumliche Bedingungen sicherlich begünstigt wurde. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stützen daher die Auffassung, dass Viren dieses Clusters zumindest eine gewisse Präferenz für Wellensittiche und Agaporniden besitzen könnten. Im Bestand 3 wurde bei einem Wellensittich zusätzlich ein Virus diagnostiziert, das sich in das Wellensittich-Cluster BCV einordnete. Bemerkenswerterweise wurde dieses Virus in Bestand 3 nur bei einem Wellensittich, aber nicht bei den Agaporniden festgestellt.

In den Bestand 4 wurden mittels Sequenzierung charakterisierte BFDV außer bei Wellensittichen auch noch bei mehreren anderen Papageienarten nachgewiesen, und zwar bei einer Blaustirnamazone, einem Singsittich und bei Blaukrönchen. Diese Viren ordneten sich alle in Cluster N nach Varsani et al. (2011) ein, also in ein Cluster, das bislang primär Viren aus Wellensittichen enthielt. Viren dieses Clusters wurden auch in der vorliegenden Studie in den Beständen 1 und 2 lediglich bei Wellensittichen nachgewiesen und nicht bei den anderen Papageienarten der beiden Bestände. Es ist daher unklar, wie die Ergebnisse aus Bestand 4 zu erklären sind. Ein Virus aus einem Wellensittich dieses Bestandes ordnete sich basierend auf der partiellen Rep-Gen-Sequenz in das möglicherweise wenig wirtsspezifische Cluster J ein.

Bei Bestand 5 war ein Virus von einem Gelbbrustara ebenfalls in diesem Cluster J, als in einer als gering wirtsspezifisch angesehenen Gruppierung, zu finden, während sich ein Virus eines Halsbandsittichs in Cluster BCV fand, also in einem Cluster, das eigentlich als Wellensittich-spezifisch betrachtet wurde.

Aus den Ergebnissen dieser Studie lässt sich also insgesamt folgern, dass entsprechend der großen Heterogenität der bei Papageien vorkommenden Circoviren auch eine große Breite an biologischen Eigenschaften vorkommt, die auch die Wirtsspezifität betreffen. Für einige genetische Cluster der Viren ergaben sich Anzeichen einer relativ stark ausgeprägten Spezifität für ein begrenztes Spektrum an Papageienarten. Dies stützt die Auffassung von Bassami et al. (2001), Das et al. (2016), Ogawa et al. (2005), Ritchie et al. (2003), Sarker et al. (2013), Shaerer et al. (2008), Todd et al. (2004) und Varsani et al. (2011), die eine Wirtsspezifität einzelner Virusstämme vermuteten. Andere Virusgruppen wurden in der vorliegenden Studie jedoch bei mehreren Arten nachgewiesen, waren also eher gering wirtsspezifisch. Dieser Befund bestätigte somit Ergebnisse früherer Studien,

bei denen Viren des gleichen Clusters ebenfalls bei einem breiten Spektrum von Papageienarten diagnostiziert worden waren (Varsani et al., 2011).

Die Ergebnisse für die Bestände 4 und 5 und auch für die Schwalbensittiche aus Bestand 2 lassen sich aktuell nicht in dieses Konzept, einer je nach genetischem Cluster mehr oder weniger ausgeprägten Wirtsspezifität, einordnen. Allerdings beruhen die phylogenetischen Analysen in der vorliegenden Studie auf einem relativ kleinen Teil des Circovirusgenoms. Auch wenn partielle Rep-Gen-Sequenzen in früheren Untersuchungen über Zebrafinken-Circoviren sehr ähnliche Verwandtschaftsbeziehungen ergeben haben wie Vollgenomanalysen (Rinder et al., 2017), sind sicherlich zumindest in Einzelfällen auch diskrepante Ergebnisse denkbar. Circoviren besitzen, wie bereits erwähnt, eine hohe Mutationsrate (Allan et al., 2012; Halami et al., 2008; Johne et al., 2006; Liao et al., 2015; Matczuk et al., 2015; Stenzel et al., 2015), verändern sich also sehr rasch in ihrem Genom und damit verbunden auch in ihren phänotypischen Merkmalen. In neueren Studien wurde zudem gezeigt, dass auch Rekombinationen, also der Austausch von größeren Genomfragmenten zwischen Viren, häufig vorkommen (Julian et al., 2013, Sarker et al., 2015), die sehr rasch zu einer großen Veränderung des Genoms führen und für die Entstehung von Viren mit neuen Eigenschaften eine hohe Relevanz besitzen. Es wäre daher denkbar, dass die Viren aus den Beständen 4 und 5 Rekombinanten mit relativ neuen Eigenschaften auch bezüglich der Wirtsspezifität darstellen und sich anhand ihrer partiellen Rep-Gen-Sequenz nicht korrekt einordnen lassen. Für die Detektion von Rekombinationen sind bei Circoviren Vollgenomsequenzen erforderlich (Peters et al., 2014), die in der vorliegenden Studie nicht ermittelt wurden, so dass diese Vermutung nicht überprüft werden kann.

Bei BFDV können Rekombinationen dann auftreten, wenn Koinfektionen mit genetisch unterschiedlichen Viren im selben Wirt vorkommen. In der vorliegenden Studie wurde dies zwar nicht untersucht, es wurden aber zumindest innerhalb von Beständen das Vorliegen von genetisch sehr unterschiedlichen Circoviren, also von Viren unterschiedlicher Stamm-Cluster, nachgewiesen. In der Literatur gibt es jedoch Belege von Koinfektionen mit unterschiedlichen Virusstämmen. Bei einem Ausbruch der Pbfd in einem Goldbauchsittich-Bestand (*Neophema chrysogaster*) konnten in einem einzigen Individuum 7 genetische Varianten des Virus detektiert werden (Sarker et al., 2014; Amery-Gale, 2017). Besonders bei bereits immunsupprimierten Tieren scheint auch eine Rekombination zwischen BFD-Viren unterschiedlicher

Wirtsspezifität denkbar (Julian et al., 2013; Sarker et al., 2014).

Bei freilebenden Papageien könnte ein Zusammenkommen genetisch unterschiedlicher Viren mit der Folge von Rekombinationen und einem sich daraus ergebenden breiteren Wirtsspektrum z. B. durch immer rarer werdende Nistplatzmöglichkeiten forciert werden, da das Virus in der Umwelt und damit auch in Nestern äußerst persistent ist (Peters et al., 2014; Sarker et al., 2014; Australian Government, Department of the Environment, 2015). Ein möglicher Wirtswechsel wurde bei einem Orangehaubenkakadu beschrieben, der in einem Nachzuchtprogramm mit strenger Quarantäne und Hygienemaßnahmen und mit nur sehr limitiertem Kontakt zu anderen Psittaziden gehalten wurde und bei dem ein Virusstamm nachgewiesen wurde, der sich hauptsächlich wildlebenden Corellas zuordnen ließ. Die wahrscheinlich einzige Möglichkeit einer Infektion bestand in einer Übertragung durch wildlebende Vögel, die über die Voliere flogen (Sarker et al., 2014).

Grundsätzlich muss beim Vergleich von gesammelten Daten und bei der Bewertung von Studien immer berücksichtigt werden, dass oft unterschiedliches Probenmaterial (z. B. Kot, Kloakentupfer, Feder, Blut) und z. T. andere Entnahmestellen (Kotproben aus Voliere oder vom abgegrenzten Einzeltier direkt) oder unterschiedliche Untersuchungsmethoden (verschiedene PCR-Methoden, ELISA, HAH, usw.) gewählt wurden. Unterschiede können einen großen Einfluss auf die Interpretation der Ergebnisse haben (Fogell et al., 2016).

## **7. Schlussfolgerungen für die Praxis**

Die Schnabel- und Federkrankheit stellt eine wichtige Erkrankung der Papageienvögel dar, und da derzeit weder eine ätiologische Therapie noch eine Impfung existieren, kommen der Unterbindung einer Übertragung von Vogel zu Vogel sowie der Verhinderung einer Einschleppung in Bestände durch Einhaltung einer Quarantäne und mit Testen von Neuzugängen eine entscheidende Bedeutung zu. Selbst wenn ein Impfstoff entwickelt werden könnte, müsste er sowohl für Tiere in menschlicher Obhut, als auch bei freilebenden Populationen regelmäßig und praktikabel verabreicht werden können, so dass Nachkommen auch mittels Antikörpern geschützt wären (Australian Government, Department of Sustainability, Environment, Water, Population and Communities 2012). Untersuchungen von klinischem Material mit molekularbiologischen Methoden wie PCR, werden

mittlerweile auch in der Ziervogelmedizin standardmäßig zur Diagnose dieser Virusinfektion eingesetzt. Wie in der vorliegenden Untersuchung deutlich wurde, kann für einzelne Stämme ein gewisses Maß an Wirtsspezifität vermutet werden, so dass in Beständen mit Haltung unterschiedlicher Papageienarten möglicherweise eine Übertragung zwischen verschiedenen Vogelarten eingeschränkt ist. Aktuell liegen aber nur wenige Informationen dazu vor, so dass momentan der Grad der Wirtsspezifität eines Virusstammes anhand seiner genetischen Eigenschaften nicht sicher vorhergesagt werden kann. Zudem wurden in der letzten Zeit zunehmend Rekombinationen zwischen unterschiedlichen Viren nachgewiesen (Julian et al., 2013, Sarker et al., 2015), und die Eigenschaften der Rekombinanten unterscheiden sich möglicherweise auch in Bezug auf die Wirtsspezifität der Elternviren. Die Verhinderung der Einschleppung in Bestände ist daher als wichtigste Komponente der Bekämpfung anzusehen.

Bei Circoviren stellt die Diagnostik aber aufgrund ihrer hohen genetischen Heterogenität eine große Herausforderung dar. Aktuell existiert kein PCR-Protokoll, das die ganze Breite der genetischen Varianten der BFDV nachweisen kann, und in der vorliegenden Untersuchung wurden zwei unterschiedliche PCR-Protokolle zur Erhöhung der Sensitivität der Diagnostik eingesetzt. Mit der verwendeten nested Breitspektrum-PCR nach Halami et al. (2008) wurden dabei auch BFDV-Infektionen festgestellt, die nicht mit der Duplex-PCR (Ogawa et al., 2008) detektiert werden konnten (siehe Tab. 18). Ein Einsatz von mehreren unterschiedlichen PCR-Tests ist daher zu empfehlen. Da die PCR nach Halami et al. (2008) aber nicht nur DNA von BFDV amplifiziert, ist als Bestätigungsreaktion eine Sequenzierung der Produkte dieses Protokolls von hoher Wichtigkeit.

Eine weitere Herausforderung in der Diagnostik besteht in der hohen Tenazität der Circoviren in der Umwelt und darin, dass das Virus je nach Infektionsstadium in unterschiedlichen klinischen Materialien am besten nachweisbar ist. So besteht bei lebenden Vögeln und Untersuchungen von Federn, unter Umständen aber auch von Kloakentupfern, ein Fremdkontaminationsrisiko durch in der Umwelt vorhandene Viren. Die Sequenzierung von PCR-Produkten bei Breitspektrum-PCRs kann hier unter Umständen bei der Interpretation der Ergebnisse hilfreich sein. Blut ist bei der Betrachtung dieses Risikos sicher als ein günstigeres Material anzusehen. Im Infektionsverlauf liegt vermutlich aber nur relativ kurzzeitig eine Virämie vor und eine Blutentnahme stellt insbesondere bei kleinen erkrankten Vögeln eine invasive

Technik mit Risiken dar.

Eine kombinierte Untersuchung von Federn, Kloakentupfern und Blut ist für die Diagnose von Infektionen mit BFDV sicherlich zu empfehlen, insbesondere bei Tieren, die keine Symptome zeigen und im Rahmen von Eingangsuntersuchungen vor der Eingliederung in Bestände getestet werden sollen. Falls eine Blutentnahme nicht durchgeführt werden soll oder kann, stellen bei negativen Testergebnissen wiederholte Untersuchungen von Federn oder Kloakentupfer, eventuell Faeces, eine gute Möglichkeit zur Erhöhung der Sicherheit der Infektionsdiagnostik mittels PCR dar (Hulbert et al., 2015). Bei verstorbenen Tieren ist die Untersuchung von Organproben empfehlenswert.

Serologische Untersuchungen, die aktuell nur von wenigen Speziallaboren angeboten werden und in der vorliegenden Studie nicht durchgeführt wurden, wie z. B. Haemagglutinations-Test (HA) und Haemagglutinations-Inhibitions-Test (HI) oder ELISA, sind möglicherweise hilfreich, um den PBFD-Status eines Tieres besser zu verstehen (Australian Government, Department of the Environment and Heritage, 2006). Ob ein Nachweis von Antikörpern für eine Prognose des Krankheitsverlaufs des Einzeltieres hilfreich ist, ist derzeit noch unklar.

Solange die Wirtsspezifität noch nicht eindeutig geklärt ist, sollten Zuchtanlagen für Nachzuchtprogramme vom Aussterben bedrohter Psittazidenarten besondere Maßnahmen ergreifen. Es sollte auf äußerste Hygiene geachtet werden, da diese ein Virusreservoir und die Quelle von Krankheitsverbreitung sein können (Mora-Chavarría et al., 2017). Gerade in Zuchtanlagen besteht eine hohe Dichte an Jungtieren, welche besonders für PBFD empfänglich sind (Bert et al., 2005). Voneinander unabhängige Zuchtanlagen für vom Aussterben bedrohte Spezies, die räumlich so weit wie möglich voneinander getrennt sind (auch kein Personalaustausch), bieten daher eine größtmögliche Sicherheit den Genpool langfristig aufrecht erhalten zu können (Raidal et al., 2015). Die Auswilderung subklinisch erkrankter Tiere und dadurch bedingt eine Einschleppung der Circoviren in die Wildpopulation stehen hier dem Verlust der genetischen Diversität in der freilebenden Population gegenüber.

Generell sollte die gemeinsame Haltung positiver Tiere in Beständen mit unterschiedlichen Psittazidenspezies möglichst vermieden werden, da die Frage der Wirtsspezifität der Viren noch unklar ist und bei hohem Infektionsdruck und

---

gleichzeitigem Vorkommen verschiedener Virusstämme das Risiko von Rekombinationen bei den Viren erhöht wird. Infolge dessen könnten Viren mit neuen Eigenschaften entstehen. In positiven Beständen und auch in Tierarztpraxen und Kliniken muss unbedingt ein striktes Hygienemanagement mit geeigneten Räumlichkeiten und wirksamen Desinfektionsmitteln eingehalten werden. Auch Ektoparasiten, als mögliche Vektoren, sollten bekämpft werden. Nur so können weitere Verschleppungen eines hoch infektiösen Virus vermieden werden.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Infektionen mit dem Psittacine Beak and Feather Disease Virus führen weltweit zu massiven Verlusten bei Psittaziden-Beständen in freier Wildbahn, aber auch bei Hobby- und Zuchtbeständen in menschlicher Obhut. Bei der Bekämpfung der Erkrankung besitzen Kenntnisse über mögliche Infektketten eine große Bedeutung. Da die Übertragbarkeit zwischen unterschiedlichen Papageienarten, dieses genetisch sehr heterogenen Virus noch nicht eindeutig geklärt ist, sollten in Beständen mit bekanntem Virusvorkommen bei Wellensittichen, möglichst viele Papageienvögel anderer Arten untersucht werden, um Übertragungswege und epidemiologische Zusammenhänge besser verstehen zu können.

Im Rahmen dieser Studie wurden in einem ersten Schritt Wellensittiche auf das Vorhandensein einer Infektion mit BFDV mittels zwei verschiedener PCR-Methoden überprüft. Bei positiv detektierten Vögeln wurde dann eine sehr genaue klinische Untersuchung, inklusive der Anfertigung eines Gefiederprotokolls, durchgeführt. Im zweiten Schritt wurden diejenigen Wellensittiche selektiert, die mit weiteren Psittaziden-Spezies zusammen in einem Bestand gehalten wurden. Aus den so ausgewählten 10 Beständen wurden möglichst viele Psittaziden unterschiedlicher Arten klinisch untersucht und Probenmaterial in Form von Kloakentupfern, Federn, wenn möglich Blut und, bei verstorbenen Tieren in Form von Organen, entnommen. Mittels anschließender PCR-Untersuchung wurden BFDV positive Tiere identifiziert. Die nachgewiesenen Viren wurden durch Sequenzierung einer Region des Rep-Gens charakterisiert und molekularepidemiologische Untersuchungen zur Aufklärung der Infektketten durchgeführt.

In den einbezogenen 10 Beständen wurden mittels PCR Vögel eines breiten Artenspektrums an Papageien als positiv für eine Infektion beurteilt. Bei betroffenen Papageien wurden massive Gefiederveränderungen (Federverlust, Depigmentierungen, persistierende Federscheiden, verdrehte Federn u. a.) dokumentiert und häufig ein gleichzeitiger starker Befall mit Ektoparasiten festgestellt, was auf eine vorliegende Immunsuppression hindeutet. Sequenzierungen von PCR-Produkten einer Größe von 0,3 kb wurden bei 6 Beständen erfolgreich durchgeführt, dabei wurde BFDV-DNA in Bestand 1 und 2 ausschließlich bei Wellensittichen nachgewiesen. In vier Beständen wurden BFDV-Nachweise

zusätzlich auch bei Vögeln anderer Papageienarten erzielt, und zwar bei 6 Agaporniden (*Agapornis* spp.) in Bestand 3, 2 Blaukrönchen (*Loriculus galgulus*) und 1 Blaustirnamazone (*Amazona aestiva*) in Bestand 4, 1 Halsbandsittich (*Psittacula krameri*) und 1 Gelbbrustara (*Ara ararauna*) in Bestand 5 sowie einem Mohrenkopfpapagei (*Poicephalus senegalus*) in Bestand 10.

In den meisten Beständen wurden unterschiedliche genetische Varianten des BFDV nachgewiesen. In phylogenetischen Analysen, die auf einem Fragment des Replication-associated-protein-Gens basierten, gruppieren sich die Viren der vorliegenden Studie in unterschiedliche bereits bekannte genetische Cluster ein, für die eine unterschiedlich stark ausgeprägte Wirtsspezifität anhand der Herkunft der Viren des Clusters postuliert wurde. Einzelne genetische Stammvarianten der vorliegenden Studie zeigten ein enges, nur auf Wellensittiche beschränktes Vorkommen, während für andere Varianten ein mehrere Vogelarten umfassendes breiteres Wirtsspektrum nachgewiesen wurde. In den meisten, aber nicht in allen Fällen entsprach dabei das ermittelte Wirtsverbreitungsmuster der Virusvarianten in den einzelnen Beständen, den Wirtseigenschaften des genetischen Clusters, in das sie sich einordneten.

In der vorliegenden Studie ergaben sich somit Hinweise, dass sich die Breite des Wirtsspektrums und damit die Übertragbarkeit zwischen unterschiedlichen Vogelarten bei einzelnen Virusvarianten unterscheiden, dass also keine generelle Aussage zur Übertragbarkeit gemacht werden kann. Mittels phylogenetischer Analyse des Rep-Gen-Segmentes konnte das Wirtsverhalten der Viren nicht in jedem Fall erklärt werden. Ob genetische Rekombinationen, die vermutlich auch bei Circoviren eine große Rolle spielen, eine Erklärung auch für diese Fälle liefern können, müssen zukünftige Vollgenomanalysen zeigen. In Anbetracht der hohen Mutationsrate der Circoviren und der letztendlich nicht für jeden Virusstamm gesicherten Wirtsspezifität, ist es empfehlenswert BFDV-infizierte Papageien auch differenter Psittazidenspezies nicht zusammen zu halten.

## VII. SUMMARY

### **Circovirus infections in budgerigars:**

#### **Clinical and molecular epidemiological investigations**

Infections of Psittacine Beak and Feather Disease Virus (BFDV) can cause extensive losses in psittaciform populations in the wild, but also in hobby and breeding populations in human custody. Knowledge of possible infection chains is of great importance in combating the disease. Since the infectiousness of strains of this genetically very heterogeneous virus for various parrot species is still unclear, the aim of this investigation was to elucidate transmission pathways and epidemiological relationships in flocks where BFDV infections had been detected in budgerigars living together with other parrot species.

In a first step, budgerigars were tested for the presence of BFDV infection using two different PCR methods. A very precise clinical examination was carried out on positively detected birds and a detailed feather score protocol was applied. In the second step 10 aviaries were selected where infected budgerigars were kept together with other psittaciform species in a flock. Birds of these flocks belonging to as many different species as possible were clinically examined, and diagnostic samples including cloacal swabs, feathers, and if possible blood, as well as in case of deceased animals, organs, were collected. BFDV positive animals were identified by subsequent PCR examination. The detected viruses were characterized by sequencing a region of the Rep gene and molecular epidemiological investigations were carried out to elucidate possible infection chains.

A broad range of parrot species was evaluated as positive for infection by PCR in the 10 flocks included in this study. In the affected parrots, extensive disorders of the plumage (loss of feathers, depigmentation, persistent feather sheaths, twisted feathers, etc.) were documented. Heavy co-infestations with ectoparasites commonly occurred suggesting immunosuppression of the birds. Sequencing of PCR products of a size of 0.3 kb was successfully carried out in viruses of six flocks. In aviaries 1 and 2, DNA of BFDV was detected only in budgerigars. In four other aviaries, evidence of BFDV infections was also obtained in birds of other parrot species, including six lovebirds (*Agapornis* spp.) in stock 3, two Blue-crowned hanging-parrots (*Loriculus galgulus*) and one Blue-fronted amazon (*Amazona aestiva*) in

stock 4, one Ring-necked parakeet (*Psittacula krameri*) and one Blue-and-yellow macaw (*Ara ararauna*) in stock 5 as well as one Senegal parrot (*Poicephalus senegalus*) in stock 10.

Various genetic variants of BFDV were identified to co-occur in most stocks. In phylogenetic analyses based on a fragment of the replication-associated protein gene, the viruses of the present study grouped into different known genetic clusters for which a different degree of host specificity was postulated based on the origin of the viruses of the clusters. Several genetic strain variants of the present study showed a narrow host range limited to budgerigars, while other variants revealed a broader host spectrum comprising several bird species. In most, but not all cases, the determined host distribution pattern of the virus variants in the individual populations corresponded well to the host characteristics of the genetic cluster into which they were classified.

It can thus be concluded from the results of the present study that the host range and thus the transmissibility between different bird species differs among individual virus variants, and at present, no general statement on transmissibility can be made. The host behavior of the viruses could not always be explained based on the phylogenetic analysis of the Rep gene segment. Future full genome analyses will have to show whether genetic recombination which probably also play a major role in circoviruses, can also provide an explanation for these cases. In view of the high mutation rate of circoviruses and the fact, that host range cannot be predicted with high certainty for every virus strain, it is recommended not to keep BFDV-infected parrots together with individuals of different psittaciform species.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

**Albertyn J, Tajbhai KM, Bragg RR.** Psittacine beak and feather disease virus in budgerigars and ring-neck parakeets in South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 2004; 71(1): 29-34

**Allan G, Krakowka S, Ellis J, Charreyre C.** Discovery and evolving history of two genetically related but phenotypically different viruses, porcine circoviruses 1 and 2. *Virus Research* 2012; 164(1-2): 4-9

**Amery-Gale J, Marends MS, Owens J, Eden PA, Browning GF, Devlin JM.** A high prevalence of beak and feather disease virus in non-psittacine Australian birds. *Journal of Medical Microbiology* 2017; 66: 1005-1013

**Araújo AV, Andery DA, Ferreira Jr. FC, Ortiz MC, Marques MVR, Marin SY, Vilela DAR, Resende JS, Resende M, Donatti RV, Martins NRS.** Molecular Diagnosis of Beak and Feather Disease in Native Brazilian Psittacines. *Brazilian Journal of Poultry Science* 2015; 17(4): 451-458

**Australien Government, Department of the Environment (2015).** Psittacine Beak and Feather Disease and other identified Threats to Australian threatened Parrots. <http://www.environment.gov.au/system/files/resources/9b85a93b-00c1-43d2-9e4f-bb6279e956e6/files/beak-feather-disease-and-other-threats-australian-threatened-parrots.pdf>, 2015; 1-61; letzter Zugriff am 26.03.2018

**Australian Government, Department of the Environment and Heritage (2006).** Hygiene Protocols for the Prevention and Control of Diseases (Particularly Beak and Feather Disease) in Australian Birds. <http://www.environment.gov.au/system/files/resources/9349e95b-85ec-4c40-a457-1a9fdb76642/files/hygiene-protocols-all.pdf>; letzter Zugriff am 26.03.2018

**Australian Government, Department of Sustainability, Environment, Water, Population and Communities (2012).** Review of the Threat Abatement Plan for Psittacine Beak and Feather Disease Affecting Endangered Psittacine Species (2005). <http://www.environment.gov.au/system/files/resources/5764cda0-5e94-48c7-8841-49b09ff7398c/files/tap-review-beak-and-feather.pdf>; letzter Zugriff am 26.03.2018

- Baker JR.** Survey of feather diseases of exhibition budgerigars in the United Kingdom. *The Veterinary Record* 1996; 139: 590-594
- Baron HR, Howe L, Varsani A, Doneley RJ.** Disease screening of three breeding populations of adult exhibition budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) in New Zealand reveals a high prevalence of a novel polyomavirus and avian malaria infection. *Avian Diseases* 2014; 58(1): 111-117
- Bassami MR, Berryman D, Wilcox GE, Raidal SR.** Psittacine Beak and Feather Disease Virus Nucleotide Sequence Analysis and Its Relationship to Porcine Circovirus, Plant Circoviruses, and Chicken Anaemia Virus. *Virology* 1998; 249(2): 453-459
- Bassami MR, Ypelaar I, Berryman D, Wilcox GE, Raidal SR.** Genetic diversity of beak and feather disease virus detected in psittacine species in Australia. *Virology* 2001; 279(2): 392-400
- Bert E, Tomassone L, Peccati C, Navarrete MG, Sola SC.** Detection of beak and feather disease virus (BFDV) and avian polyomavirus (APV) DNA in psittacine birds in Italy. *Journal of Veterinary Medicine Series B-infectious Diseases and Veterinary Public Health* 2005; 52(2): 64-68
- Biagini P, Bendinelli M, Hino S, Kakkola L, Mankertz A, Niel C, Okamoto H, Raidal S, Teo CG, Todd D.** *Circoviridae*. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz E (eds) *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier/Academic Press, London 2011, 343-349
- Biagini P, Breitbart M, Delwart E, Segales J, Todd D, Varsani A.** Restructuring and expansion of the family *Circoviridae*. Proposal for the International Committee on Taxonomy of Viruses. 2013. 005a-eV. [http://talk.ictvonline.org/files/proposals/taxonomy\\_proposals\\_vertibrate1/m/vert01/4593.aspx](http://talk.ictvonline.org/files/proposals/taxonomy_proposals_vertibrate1/m/vert01/4593.aspx); letzter Zugriff am 01.02.2017
- Bonne N, Shearer P, Sharp M, Clark P, Raidal S.** Assessment of recombinant beak and feather disease virus capsid protein as a vaccine for psittacine beak and feather disease. *Journal of General Virology* 2009; 90: 640-647
- Breitbart M, Delwart E, Rosario K, Segalés J, Varsani A, and ICTV Report Consortium.** ICTV Virus Taxonomy: *Circoviridae*. *Journal of General Virology* 2017, 98: 1997-1998

- Burmeister A-K.** Die Beziehung von Menschen zu ihren Vögeln in der Heimtierhaltung - Eine empirisch-tierärztliche Studie unter Entwicklung einer psychometrischen Skala der Mensch-Vogel-Beziehung. Dissertationsschrift, Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München; 2017
- Cerníková L, Vitásková E, Nagy A.** Development and evaluation of TaqMan real-time PCR assay for detection of beak and feather disease virus. *Journal of Virological Methods* 2017; 244: 55-60
- Circella E, Legretto M, Pugliese N, Caroli A, Bozzo G, Accogli G, Lavazza A, Camarda A.** Psittacine beak and feather disease-like illness in Gouldian finches (*Chloebia gouldiae*). *Avian Diseases* 2014; 58(3): 482-487
- Das S, Sarker S, Peters A, Ghorashi SA, Phalen D, Forwood JK, Raidal SR.** Evolution of circoviruses in lorikeets lags behind its hosts. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2016; 100: 281-291
- De Kloet E, de Kloet SR.** Analysis of the beak and feather disease viral genome indicates the existence of several genotypes which have a complex psittacine host specificity. *Archives of Virology* 2004; 149(12): 2393-2412
- Dolz G, Sheleby-Elías J, Romero-Zuñiga JJ, Vargas-Leitón B, Gutiérrez-Espeleta G, Madriz-Ordeñana K.** Prevalence of Psittacine Beak and Feather Disease Virus and Avian Polyomavirus in Captivity Psittacines from Costa Rica. *Open Journal of Veterinary Medicine* 2013; 3: 240-245
- Doneley RJ.** Acute beak and feather disease in juvenile African Grey parrots - an uncommon presentation of a common disease. *Australian Veterinary Journal* 2003; 81(4): 206-207
- Dovč A, Jereb G, Krapež U, Gregurić-Gračner G, Pintarič Š, Slavec B, Knific RL, Kastelic M, Kvapil P, Mićunović J, Vadnjal S, Ocepek M, Zadravec M, Zorman-Rojs O.** Occurrence of Bacterial and Viral Pathogens in Common and Noninvasive Diagnostic Sampling from Parrots and Racing Pigeons in Slovenia. *Avian Diseases* 2016; 60(2): 487-492
- Eastwood JR, Berg ML, Ribot RF, Raidal SR, Buchanan KL, Walder KR, Bennett AT.** Phylogenetic analysis of beak and feather disease virus across a host ring-species complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2014; 111(39): 14153-14158

**Eda Altan, Ebru Eravci, Utku Y. Cizmecigil, Esma Yildar, Ozge Aydin, Nuri Turan, Serhat Ozsoy, Kaan B. Tekelioglu, Tugba Kurt, Kubra Gerbaga Ozsemir, Erbulent Altan, Huseyin Yilmaz.** Detection and phylogeny of beak and feather disease virus (BFDV) and avian polyomavirus (APV) in psittacine pet birds in turkey. *Journal of Exotic Pet Medicine* 2016; 25(4): 280-287

**Felsenstein J.** Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 1985; 39: 783-791

**Fogell DJ, Martin RO, Groombridge JJ.** Beak and feather disease virus in wild and captive parrots: an analysis of geographic and taxonomic distribution and methodological trends. *Archives of Virology* 2016; 161(8): 2059-2074

**Fries R.** DNA-Variation – Polymorphismus – Genetische Variation. 18. Hülsenberger Gespräche 2000, Weimar, 21. bis 32. Juni 2000. Schriftenreihe der H. Wilhelm Schaumann Stiftung, Hamburg; 35-43

**Gerlach H.** Viruses. In: Ritchie BW, Harrison GJ, Harrison LR: *Avian Medicine: Principles and application* 1994; 862-948

**Ha HJ, Alley MR, Cahill JI, Howe L, Gartrell BD.** The prevalence of psittacine beak and feather disease virus infection in native parrots in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal* 2009; 57(1): 50-52

**Hakimuddina F, Abidia F, Jafer O, Li C, Wernery U, Hebel CH, Khazanehdari K.** Incidence and detection of beak and feather disease virus in psittacine birds in the UAE. *Biomolecular Detection and Quantification* 2016; 6: 27-32

**Halami MY, Nieper H, Müller H, Johne R.** Detection of a novel circovirus in mute swans (*Cygnus olor*) by using nested broad-spectrum PCR. *Virus Research* 2008; 132: 208-212

**Harkins GW, Martin DP, Christoffels A, Varsani A.** Towards inferring the global movement of beak and feather disease virus. *Virology* 2014; 450-451: 24-33

**Heath L, Martin DP, Warburton L, Perrin M, Horsfield W, Kingsley C, Rybicki EP, Williamson AL.** Evidence of unique genotypes of beak and feather disease virus in southern Africa. *Journal of Virology* 2004; 78(17): 9277-9284

- Heath L, Williamson AL, Rybicki EP.** The Capsid Protein of Beak and Feather Disease Virus Binds to the Viral DNA and Is Responsible for Transporting the Replication-Associated Protein into the Nucleus. *Journal of Virology* 2006; 80(14): 7219-7225
- Henriques AM, Fagulha T, Duarte M, Ramos F, Barros S, Luís T, Bernardino R, Fevereiro M.** Phylogenetic analysis of six isolates of beak and feather disease virus from African grey parrots in Portugal. *Avian Diseases* 2010; 54(3): 1066-1071
- Herder V, König A, Seehusen F, Wohlsein P.** Avian polyomavirus infection of a fledgling budgerigar (*Melopsittacus undulatus*) and differential diagnoses of viral inclusions in psittacine birds-case report and mini-review. *Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift* 2011; 124(5-6): 209-216
- Hess M, Scope A, Heinz U.** Comparative sensitivity of polymerase chain reaction diagnosis of psittacine beak and feather disease on feather samples, cloacal swabs and blood from budgerigars (*Melopsittacus undulates*, Shaw 18005). *Avian Pathology* 2004; 33(5): 477-481
- Hino S, Prasetyo A A.** Relationship of Torque Teno Virus to Chicken Anaemia Virus. *Current topics in microbiology and immunology* 2009; 331: 117-130
- Ho CF, Huang SW, Chan KW, Wu JS, Chang SP, Wang CY.** Development of an antigen-capture ELISA for beak and feather disease virus. *Archives of Virology* 2018; 163(1): 145-151
- Hochleithner M.** No therapy for feather duster budgerigars. *Journal of the Association of Avian Veterinarians* 1993; 7(2): 98
- Hsu CM, Ko CY, Tsaia HJ.** Detection and sequence analysis of avian polyomavirus and psittacine beak and feather disease virus from psittacine birds in Taiwan. *Avian Diseases* 2006; 50(3): 348-353
- Huang SW, Liu HP, Chen JK, Shien YW, Wong ML, Wang CY.** Dual ATPase and GTPase activity of the replication-associated protein (Rep) of beak and feather disease virus. *Virus Research* 2016; 2(213): 149-161

**Hulbert CL, Chamings A, Hewson KA, Steer PA, Gosbell M, Noormohammadi AH.** Survey of captive parrot populations around Port Phillip Bay, Victoria, Australia, for psittacine beak and feather disease virus, avian polyomavirus and psittacine adenovirus. *Australian Veterinary Journal* 2015; 93(8): 287-292

**Industrieverband Heimtierbedarf (IVH) e.V., Zentralverband Zoologischer Fachbetriebe Deutschlands e.V., Düsseldorf/Wiesbaden.** Befragung von Heimtierbesitzern, Detailauswertung Ziervogelhaltung. SKOPOS Institut für Markt - und Kommunikationsforschung GmbH & Co. KG, Hürth 2013

**Industrieverband Heimtierbedarf (IVH) e.V., Zentralverband Zoologischer Fachbetriebe Deutschlands e.V., Düsseldorf/Wiesbaden.** Der Deutsche Heimtiermarkt. Umsatzdaten 2016. [https://www.zzf.de/fileadmin/files/ZZF/Marktdaten/ZZF\\_IVH\\_Der\\_Deutsche\\_Heimtiermarkt\\_2016\\_A4.pdf](https://www.zzf.de/fileadmin/files/ZZF/Marktdaten/ZZF_IVH_Der_Deutsche_Heimtiermarkt_2016_A4.pdf) und IVH; zuletzt abgerufen am 24.03.2018

**Jackson B, Harvey C, Galbraith J, Robertson M, Warren K, Holyoake C, Julian L, Varsani A.** Clinical beak and feather disease virus infection in wild juvenile eastern rosellas of New Zealand; biosecurity implications for wildlife care facilities. *New Zealand Veterinary Journal* 2014; 62(5): 297-301

**Johne R, Müller H, Rector A, van Ranst M, Stevens H.** Rolling-circle amplification of viral DNA genomes using phi29 polymerase. *Trends in Microbiology* 2009; 17(5): 205-211

**Johne R, Raue R, Grund C, Kaleta EF, Müller H.** Recombinant expression of a truncated capsid protein of beak and feather disease virus and its application in serological tests. *Avian Pathology* 2004; 33(3): 328-336

**Julian L, Piasecki T, Chrzastek K, Walters M, Muhire B, Harkins GW, Martin DP, Varsani A.** Extensive recombination detected among beak and feather disease virus isolates from breeding facilities in Poland. *Journal of General Virology* 2013; 94(5): 1086-1095

**Julian L, Lorenzo A, Chenuet JP, Bonzon M, Marchal C, Vignon L, Collings DA, Walters M, Jackson B, Varsani A.** Evidence of multiple introductions of beak and feather disease virus into the Pacific islands of Nouvelle-Calédonie (New Caledonia). *Journal of General Virology* 2012; 93(11): 2466-2472

**Katoh H, Ohya K, Ise K, Fukushi H.** Development of novel real-time PCR assays for detecting DNA virus infections in psittaciform birds. *Journal of Virological Methods* 2008; 154: 92-98

**Katoh H, Ohya K, Ise K, Fukushi H.** Genetic Analysis of Beak and Feather Disease Virus Derived from a Cockatiel (*Nymphicus hollandicus*) in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 2010; 72(5): 631-634

**Khalesi B, Bonne N, Stewart M, Sharp M, Raidal S.** A comparison of haemagglutination, haemagglutination inhibition and PCR for the detection of psittacine beak and feather disease virus infection and a comparison of isolates obtained from lorriids. *Journal of General Virology* 2005; 86(11): 3039-3046

**Köhler B.** Untersuchung zum Erregernachweis der Schnabel- und Federkrankheit (psittacine beak and feather disease) und der Wellensittichnestlingserkrankung (budgerigar fledling disease) bei Vertretern der Ordnung Psittaciformes. Dissertationsschrift, Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München; 2009

**König HE, Reese S, Mülling C, Korbel R.** Common integument (integumentum commune). In: König HE, Korbel R, Liebich H-G (Hrsg): *Avian anatomy. Textbook and Colour Atlas*. 5M Publishing Sheffield, Großbritannien, 2. Auflage 2016, 249-262

**Kondiah K, Albertyn J, Bragg RR.** Beak and feather disease virus haemagglutinating activity using erythrocytes from African Grey parrots and Brown-headed parrots. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 2005; 72(3): 263-265

**Kondiah K, Albertyn J, Bragg RR.** Genetic diversity of the Rep gene of beak and feather disease virus in South Africa. *Archives of Virology* 2006; 151: 2539-2545

**Korbel R.** Borna-, Circo-, Polyomavirusinfektionen & Co: Wichtige Virusinfektionen beim Vogelpatienten. *Tagungsbericht 17. PET-VET, Karlsruhe*, 2015: 22-28

**Krautwald-Junghanns M-E.** Erkrankungen von Gefieder und Haut. In: Kaleta EF, Krautwald-Junghanns M-E (eds). *Kompodium der Ziervogelkrankheiten*. Hannover: Schlütersche GmbH und Co. KG, 3. überarbeitete Auflage 2007, 123-136

- Kummerfeld N.** Skin disease of unknown aetiology (“EMA syndrome”) in budgerigars and lovebirds. *Kleintierpraxis* 1980. 25(4): 235-240, 242
- Kundu S, Faulkes CG, Greenwood AG, Jones CG, Kaiser P, Lyne OD, Black SA, Chowrimootoo A, Groombridge JJ.** Tracking viral evolution during a disease outbreak: the rapid and complete selective sweep of a circovirus in the endangered Echo parakeet. *Journal of Virology* 2012; 86(9): 5221-5229
- Latimer KS, Rakich PM, Steffens WL, Kircher IM, Ritchie BW, Niagro FD, Lukert PD.** A novel DNA virus associated with feather inclusions in psittacine beak and feather disease. *Veterinary Pathology* 1991; 28: 300-304
- Latimer KS, Rakich PM, Kircher IM, Ritchie BW, Niagro FD, Steffens WL, Lukert PD.** Extracutaneous viral inclusions in psittacine beak and feather disease. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1990; 2: 204-207
- Li L, Kapoor A, Slikas B, Bamidele OS, Wang C, Shaukat S, Masroor MA, Wilson ML, Ndjanga J-B N, Peeters M, Gross-Camp ND, Muller MN, Hahn BH, Wolfe ND, Triki H, Bartkus J, Zaidi SZ, Delwart E.** Multiple Diverse Circoviruses Infect Farm Animals and Are Commonly Found in Human and Chimpanzee. *Journal of Virology* 2010; 84(4): 1674-1682
- Liao PC, Wang KK, Tsai SS, Liu HJ, Huang BH, Chuang KP.** Recurrent positive selection and heterogeneous codon usage bias events leading to coexistence of divergent pigeon circoviruses. *Journal of General Virology* 2015; 96(8): 2262-2273
- Lothrop CD Jr, Loomis MR, Olsen JH.** Thyrotropin stimulation test for the evaluation of thyroid function in psittacine birds. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1985; 186(1): 47-48
- Lumeij JT, Hommers CJ.** Foraging ‘enrichment’ as treatment for pterotillomania. *Applied Animal Behaviour Science* 2008; 111: 85-94
- Markowski M, Kaliński A, Skwarska J, Wawrzyniak J, Bańbura M, Markowski J, Zieliński P, Bańbura J.** Avian Feathers as Bioindicators of the Exposure to Heavy Metal Contamination of Food. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 2013; 91(3): 302-305

**Massaro M, Ortiz-Catedral L, Julian L, Galbraith JA, Kurenbach B, Kearvell J, Kemp J, van Hal J, Elkington S, Taylor G, Greene T, van de Wetering J, van de Wetering M, Pryde M, Dilks P, Heber S, Steeves TE, Walters M, Shaw S, Potter J, Farrant M, Brunton DH, Hauber M, Jackson B, Bell P, Moorhouse R, McInnes K, Varsani A.** Molecular characterisation of beak and feather disease virus (BFDV) in New Zealand and its implications for managing an infectious disease. *Archives of Virology* 2012; 157(9): 1651-1663

**Matczuk AK, Krawiec M, Wieliczko A.** A new duck circovirus sequence, detected in velvet scoter (*Melanitta fusca*) supports great diversity among this species of virus. *Virology Journal* 2015; 12: 121, doi: 10.1186/s12985-015-0352-y

**Mora-Chavarría E, Umaña-Castro R, Abou-Madi N, Solano-González S, Retamosa-Izaguirre M, Jiménez-Soto M, Blanco-Peña K.** Health assessment of captive psittacine species in prerelease programs at Costa Rican rescue centers. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 2017, 48(4): 1135-1145

**Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ.** Circoviridae. In: *Veterinary Virology 3<sup>rd</sup> Edition*. Academic Press. San Diego, USA 1999; 359

**Ogawa H, Katoh H, Sanada N, Sanada Y, Ohya K, Yamaguchi T, Fukushi H.** A novel genotype of beak and feather disease virus in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Virus Genes* 2010; 41(2): 231-235

**Ogawa H, Yamaguchi T, Fukushi H.** Duplex shuttle PCR for differential diagnosis of budgerigar fledgling disease and psittacine beak and feather disease. *Medical Microbiology and Immunology* 2005; 49(3): 227-237

**Ogawa H, Chahota R, Ohya K, Yamaguchi T, Fukushi H.** Relatedness between host species and genotype of beak and feather disease virus suggesting possible interspecies cross infection during bird trade. *Journal of Veterinary Medical Science* 2013; 75(4): 503-507

**Oglesbee BL.** Hypothyroidism in a scarlet macaw. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1992; 201(10): 1599-1601

**Olsen G, Speer B.** Laboratory reporting accuracy of polymerase chain reaction testing for psittacine beak and feather disease virus. *Journal of Avian Medicine and Surgery* 2009; 23(3): 194-198

**Ortiz-Catedral L, Kurenbach B, Massaro M, McInnes K, Brunton DH, Hauber ME, Martin DP, Varsani A.** A new isolate of beak and feather disease virus from endemic wild red-fronted parakeets (*Cyanoramphus novaezelandiae*) in New Zealand. *Archives of Virology* 2010; 155(4): 613-620

**Oser GD, von Rautenfeld B.** Langfedrigkeit als Anomalie beim Wellensittich. *Praktischer Tierarzt* 1977; 58: 552

**Pass DA, Perry RA.** The pathology of psittacine beak and feather disease. *Australian Veterinary Journal* 1984; 61: 69-74

**Patterson EI, Swarbrick CMD, Roman N, Forwood JK, Raidal SR.** Differential expression of two isolates of beak and feather disease virus capsid protein in *Escherichia coli*. *Journal of Virological Methods*. 2013; 189(1): 118-124

**Peighambari SM, Razmyar J, Dezfoulian O, Bassami MR, Zamani A.** Psittacine beak and feather disease in iran, molecular and histopathological detection. *Journal of Veterinary Research* 2008; 63(2): 37-41

**Peters A, Patterson EI, Baker BG, Holdsworth M, Sarker S, Ghorashi SA, Raidal SR.** Evidence of psittacine beak and feather disease virus spillover into wild critically endangered Orange-bellied Parrots (*Neophema chrysogaster*). *Journal of Wildlife Diseases* 2014; 50(2): 288-296

**Phalen DN.** Implications of Viruses in Clinical Disorders. In: *Clinical Avian Medicine - Volume II, Chapter 32*. Harrison GJ, Lightfoot TL. Florida: Spix Publishing, 2006, 721-745

**Portas T, Jackson B, Das S, Shamsi S, Raidal SR.** Beak and feather disease virus carriage by *Knemidocoptes pilae* in a sulphur-crested cockatoo (*Cacatua galerita*). *Australian Veterinary Journal* 2017; 95(12): 486-489

**Rahaus M, Desloges N, Probst S, Loebbert B, Lantermann W, Wolff MH.** Detection of beak and feather disease virus DNA in embryonated eggs of psittacine birds. *Veterinarni Medicina* 2008; 53: 53-58

**Rahaus M, Wolff MA.** Psittacine Beak and Feather Disease: a First Survey of the Distribution of Beak and Feather Disease Virus Inside the Population of Captive Psittacine Birds in Germany. *Journal of Veterinary Medicine* 2003; 50(8): 368-371

**Raidal SR, Sabinc M, Cross GM.** Laboratory diagnosis of psittacine beak and feather disease by haemagglutination and haemagglutination inhibition. *Australian Veterinary Journal* 1993; 70(4): 133-137

**Raidal S.R. & Cross GM.** The haemagglutination spectrum of psittacine beak and feather disease virus. *Avian Pathology* 1994; 23(4): 621-630

**Raidal SR, Sarker S, Peters A.** Review of psittacine beak and feather disease and its effect on Australian endangered species. *Australian Veterinary Journal* 2015; 93(12): 466-70

**Ramis A, Latimer KS, Gibert X, Campagnoli R.** A concurrent outbreak of psittacine beak and feather disease virus and avian polyomavirus infection in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Avian Pathology* 1998; 27(1): 43-50

**Raue R, Johne R, Crosta L, Bürkle M, Gerlach H, Müller H.** Nucleotide sequence analysis of a C1 gene fragment of psittacine beak and feather disease virus amplified by real-time polymerase chain reaction indicates a possible existence of genotypes. *Avian Pathology* 2004; 33(1): 41-50

**Regnard GL, Boyes RS, Martin RO, Hitzeroth II, Rybicki EP.** Beak and feather disease virus: correlation between viral load and clinical signs in wild Cape parrots (*Poicephalus robustus*) in South Africa. *Archives of Virology* 2015; 160(1): 339-344

**Rinder M, Schmitz A, Peschel A, Korbel R.** Complete genome sequence of a novel circovirus from zebra finch. *Genome Announcements* 2015; 3(3): e00560-15. doi:10.1128/genomeA.00560-15

**Rinder M, Schmitz A, Peschel A, Wörle B, Gerlach H, Korbel R.** Molecular characterization of a recently identified circovirus in zebra finches (*Taeniopygia guttata*) associated with immunosuppression and opportunistic infections. *Avian Pathology* 2017; 46(1): 106-116

**Ritchie PA, Anderson IL, Lambert DM.** Evidence for specificity of psittacine beak and feather disease viruses among avian hosts. *Virology* 2003; 306(1): 109-115

**Ritchie BW, Niagro FD, Lukert PD, Steffens WL, Latimer KS.** Characterization of a new virus from cockatoos with psittacine beak and feather disease. *Virology* 1989; 171(1): 83-88

**Ritchie BW, Niagro FD, Latimer KS, Lukert PD, Steffens WL, Rakich PM, Pritchard N.** Ultrastructural, protein composition, and antigenic comparison of psittacine beak and feather disease virus purified from four genera of psittacine birds. *Journal of Wildlife Diseases* 1990; 26(2): 196-203

**Robino P, Grego E, Rossi G, Bert E, Tramuta C, Stella MC, Bertoni P, Nebbia P.** Molecular analysis and associated pathology of beak and feather disease virus isolated in Italy from young Congo African grey parrots (*Psittacus erithacus*) with an "atypical peracute form" of the disease. *Avian Pathology* 2014; 43(4): 333-344

**Royer RL, Nawagitgul P, Halbur PG, Paul S.** Susceptibility of porcine circovirus type 2 to commercial and laboratory disinfectants. *Journal of Swine Health and Production* 2001; 9(6): 281-284

**Saitou N. and Nei M.** The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 1987; 4: 406-425

**Sanada N, Sanada Y.** The sensitivities of various erythrocytes in a haemagglutination assay for the detection of psittacine beak and feather disease virus. *Journal of Veterinary Medicine Series B-infectious Diseases and Veterinary Public Health* 2000; 47(6): 441-443

**Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1977; 74(12): 5463-5467

**Sariya L, Promphiram P, Chocharine W, Tungsudjai S, Phonarkngean R, Rattanakorn P, Chaichoun K.** Genetic Analysis of Beak and Feather Disease Viruses Isolated from Psittacines Bird in Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 2011; 42(4): 851-858

**Sarker S, Forwood JK, Ghorashi SA, Peters A, Raidal SR.** Beak and feather disease virus genotypes in Australian parrots reveal flexible host-switching. *Australian Veterinary Journal* 2015; 93(12): 471-475

**Sarker S, Ghorashi SA, Forwood JK, Bent SJ, Peters A, Raidal SR.** Phylogeny of beak and feather disease virus in cockatoos demonstrates host generalism and multiple-variant infections within Psittaciformes. *Virology* 2014; 460-461: 72-82

**Sarker S, Ghorashi SA, Forwood JK, Raidal SR.** Rapid genotyping of beak and feather disease virus using high-resolution DNA melt curve analysis. *Journal of Virological Methods* 2014; 208: 47-55

**Sarker S, Ghorashi SA, Forwood JK, Raidal SR.** Whole-Genome Sequences of Two Beak and Feather Disease Viruses in the Endangered Swift Parrot (*Lathamus discolor*). *Genome Announcements* 2013; 1(6): e00842-13, doi:10.1128/genomeA.00842-13

**Sarker S, Ghorashi SA, Swarbrick CMD, Khandokar YB, Himiari Z, Forwood JK, Raidal SR.** An efficient approach for recombinant expression and purification of the viral capsid protein from beak and feather disease virus (BFDV) in *Escherichia coli*. *Journal of Virological Methods* 2015; 215-216: 1-8

**Sarker S, Moylan KG, Ghorashi SA, Forwood JK, Peters A, Raidal SR.** Evidence of a deep viral host switch event with beak and feather disease virus infection in rainbow bee-eaters (*Merops ornatus*). *Scientific Reports* 2015; 28(5): 14511, doi: 10.1038/srep14511

**Sarker S, Patterson EI, Peters A, Baker GB, Forwood JK, Ghorashi SA, Holdsworth M, Baker R, Murray N, Raidal SR.** Mutability Dynamics of an Emergent Single Stranded DNA Virus in a Naive Host. *PLoS One* 2014; 9(1): e85370, doi: 10.1371/journal.pone.0085370 eCollection 2014

**Schoemaker NJ, Dorrestein GM, Latimer KS, Lumeij JT, Kik MJ, van der Hage MH, Campagnoli RP.** Severe leukopenia and liver necrosis in young African grey parrots (*Psittacus erithacus erithacus*) infected with psittacine circovirus. *Avian Diseases* 2000; 44(2): 470-478

**Schütz S.** Retrospektive Analyse der Sektions- und Labor-Protokolle zu 1.637 untersuchten Vögeln der Ordnung Psittaciformes der Jahre 1997-2003. Dissertationsschrift, Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen; 2011

**Scope A.** Erkrankungen von Gefieder und Haut. In: Kaleta EF, Krautwald-Junghanns M-E (eds). *Kompendium der Ziervogelkrankheiten*. Hannover: Schlütersche GmbH und Co. KG, 3. überarbeitete Auflage 2007: 171-174

- Shearer PL, Bonne N, Clark P, Sharp M, Raidal SR.** Beak and feather disease virus infection in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*). *Avian Pathology* 2008; 37(1): 75-81
- Shearer PL, Sharp M, Bonne N, Clark P, Raidal SR.** A quantitative, real-time polymerase chain reaction assay for beak and feather disease virus. *Journal of Virological Methods* 2009; 159: 98-104
- Shearer PL, Sharp M, Bonne N, Clark P, Raidal SR.** A blocking ELISA for the detection of antibodies to psittacine beak and feather disease virus (BFDV). *Journal of Virological Methods* 2009; 158(1-2): 136-140
- Stanford M.** Interferon treatment of circovirus infection in grey parrots (*Psittacus erithacus*). *Veterinary Record* 2004; 154(14): 435-436
- Stenzel T, Dziejulska D, Muhire BM, Hartnady P, Kraberger S, Martin DP, Varsani A.** Recombinant Goose Circoviruses Circulating in Domesticated and Wild Geese in Poland. *Viruses* 2018; 10(3): 107, doi: 10.3390/v10030107
- Stenzel T, Farkas K, Varsani A.** Genome sequence of a diverse goose circovirus recovered from greylag goose. *Genome Announcements* 2015; 3(4): e00767-15, doi: 10.1128/genomeA.00767-15
- Stenzel T, Piasecki T, Chrzastek K, Julian L, Muhire BM, Golden M, Martin DP, Varsani A.** Pigeon circoviruses display patterns of recombination, genomic secondary structure and selection similar to those of beak and feather disease viruses. *Journal of General Virology* 2014; 95: 1338–1351
- Stewart ME, Bonne N, Shearer P, Khalesi B, Sharp M, Raidal S.** Baculovirus expression of beak and feather disease virus (BFDV) capsid protein capable of self-assembly and haemagglutination. *Journal of Virological Methods* 2007; 141(2): 181-187
- Tamura K., Nei M., Kumar S.** Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 2004; 101:11030-11035
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 2013; 30: 2725-2729

**Tarján ZL, Péntes JJ, Tóth RP, Benkő M.** First detection of circovirus-like sequences in amphibians and novel putative circoviruses in fishes. *Acta Veterinaria Hungarica* 2014; 62(1): 134-144

**Thumann H.** Erfahrungen mit der "Französische Mauser" bei Wellensittichen. *Geflügel-Börse* 1983; Blatt 1-9

**Todd D.** Avian circovirus diseases: lessons for the study of PMWS. *Veterinary Microbiology* 2004; 98: 169-174

**Todd D.** Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review. *Avian Pathology* 2000; 29: 373-394

**Tomasek O, Tukac V.** Psittacine circovirus infection in parakeets of the genus *Eunymphicus* and treatment with beta-(1,3/1,6)-D-glucan. *Avian Diseases* 2007; 51(4): 989-991

**Trinka K, Wenisch S, Leiser R, Gravendyck M, Kaleta EF.** Psittacine beak and feather disease infected cells show a pattern of apoptosis in psittacine skin. *Avian Pathology* 1998; 27: 555-561

**van Zeeland YR, Bergers MJ, van der Valk L, Schoemaker NJ, Lumeij JT.** Evaluation of a novel feather scoring system for monitoring feather damaging behaviour in parrots. *Veterinary Journal* 2013; 196(2): 247-252

**van Zeeland YR, Schoemaker NJ.** Plumage disorders in psittacine birds - part 2: feather damaging behaviour. *European Journal of Companion Animal Practice* 2014; 24(2): 24-36

**Varsani A, de Villiers GK, Regnard GL, Bragg RR, Kondiah K, Hitzeroth II, Rybicki EP.** A unique isolate of beak and feather disease virus isolated from budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) in South Africa. *Archives of Virology* 2010; 155(3): 435-439

**Varsani A, Regnard GL, Bragg R, Hitzeroth II, Rybicki EP.** Global genetic diversity and geographical and host-species distribution of beak and feather disease virus isolates. *Journal of General Virology* 2011; 92: 752-767

**Welch J, Bienek C, Gomperts E, Simmonds P.** Resistance of porcine circovirus and chicken anemia virus to virus inactivation procedures used for blood products. *Transfusion* 2006; 46: 1951-1958

**Woods LW, Latimer KS.** Circovirus infection of pigeons and other avian species. In: Saif YM (ed). Diseases of Poultry, 11<sup>th</sup> Ed., Iowa State Press, Iowa, USA 2003, 202-211

**Ypelaar I, Bassami MR, Wilcox GE, Raidal SR.** A universal polymerase chain reaction for the detection of psittacine beak and feather disease virus. *Veterinary Microbiology* 1999; 68 (1-2): 141-148

**Zhuang Q, Chen J, Mushtaq MH, Chen J, Liu S, Hou G, Li J, Huang B, Jiang W.** Prevalence and genetic characterization of avian polyomavirus and psittacine beak and feather disease virus isolated from budgerigars in Mainland China. *Archives of Virology* 2012; 157(1): 53-61

## IX. ANHANG

### 1. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Schematische Gefiedereinteilung beim Wellensittich nach allgemeinen anatomischen Kenntnissen.....	<b>5</b>
<b>Tabelle 2:</b> Differentialdiagnostik von Befiederungsstörungen bei Psittaziden .....	<b>8</b>
<b>Tabelle 3:</b> Taxonomie der Familie Circoviridae (Rosario et al., 2017) .....	<b>18</b>
<b>Tabelle 4:</b> Übersicht der getesteten Tiere und des Probenmaterials aus Bestand 1 .....	<b>35</b>
<b>Tabelle 5:</b> Übersicht der getesteten Tiere und des Probenmaterials aus Bestand 2 .....	<b>36</b>
<b>Tabelle 6:</b> Übersicht der getesteten Tiere und des Probenmaterials aus Bestand 3 .....	<b>37</b>
<b>Tabelle 7:</b> Übersicht der getesteten Tiere und des Probenmaterials aus Bestand 4 .....	<b>37</b>
<b>Tabelle 8:</b> Übersicht der getesteten Tiere und des Probenmaterials aus Bestand 5 .....	<b>38</b>
<b>Tabelle 9:</b> Übersicht der getesteten Tiere und des Probenmaterials aus Bestand 6 .....	<b>39</b>
<b>Tabelle 10:</b> Übersicht der getesteten Tiere und des Probenmaterials aus Bestand 7 ...	<b>39</b>
<b>Tabelle 11:</b> Übersicht der getesteten Tiere und des Probenmaterials aus Bestand 8 ...	<b>40</b>
<b>Tabelle 12:</b> Übersicht der getesteten Tiere und des Probenmaterials aus Bestand 9 ...	<b>40</b>
<b>Tabelle 13:</b> Übersicht der getesteten Tiere und des Probenmaterials aus Bestand 10 .....	<b>41</b>
<b>Tabelle 14:</b> Datenerhebung Gefiederprotokoll .....	<b>44</b>
<b>Tabelle 15:</b> Primer-Sequenzen der Duplex-PCR nach Ogawa et al. (2005).....	<b>48</b>
<b>Tabelle 16:</b> Primer-Sequenzen für nested Breitspektrum-PCR nach Halami et al. (2008) .....	<b>48</b>
<b>Tabelle 17:</b> Tabellarische Übersicht der angefertigten Gefiederprotokolle von den Vögeln aus Bestand 1 mit Auffälligkeiten im Gefieder (Summe der Tiere mit	

---

Abnutzung und / oder Bruchschaden < 50 % und > 50 %), aufgeteilt in Handschwingen Armschwingen, Steuerfedern, Deckfedern und zusätzliche Beurteilung, Auffälligkeiten von Schnabel (nur brüchig) und Krallen (brüchig und lang) .....	<b>53</b>
<b>Tabelle 18:</b> Gegenüberstellung Duplex-PCR und nested Breitspektrum PCR.....	<b>54</b>
<b>Tabelle 19:</b> BFDV-Übereinstimmungen in der GenBank (NCBI), Bestand 1 .....	<b>55</b>
<b>Tabelle 20:</b> BFDV-Übereinstimmungen in der GenBank (NCBI), Bestand 2 .....	<b>56</b>
<b>Tabelle 21:</b> BFDV-Übereinstimmungen in der GenBank (NCBI), Bestand 3 .....	<b>57</b>
<b>Tabelle 22:</b> BFDV-Übereinstimmungen in der GenBank (NCBI), Bestand 4 .....	<b>58</b>
<b>Tabelle 23:</b> BFDV-Übereinstimmungen in der GenBank (NCBI), Bestand 5 .....	<b>59</b>
<b>Tabelle 24:</b> BFDV-Übereinstimmungen in der GenBank (NCBI), Bestand 10 .....	<b>62</b>
<b>Tabelle 25:</b> Übersicht der in die phylogenetische Analyse einbezogenen BFDV- Virusstämme aus der GenBank (NCBI), sowie zusätzlich verwendete Referenz- Sequenzen von Psittaziden.....	<b>63</b>

## 2. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Zwei männliche Wellensittiche in einer Mischform aus „Farben- und Schauwellensittich“, links in „Normal Dunkelblau“, rechts in „Normal Hellgrün“ ....	<b>4</b>
<b>Abbildung 2:</b> Schematische Darstellung des Federaufbaus, hergeleitet aus allgemein bekannten anatomischen Strukturen.....	<b>6</b>
<b>Abbildung 3:</b> Kongo-Graupapagei ( <i>Psittacus erithacus</i> ) mit einer nachgewiesenen BFDV-Infektion und rötlichen Verfärbungen im Bereich des dorsalen Deckgefieders, post mortem .....	<b>7</b>
<b>Abbildung 4:</b> Wellensittiche mit Knemidokoptesbefall. Bohrgänge am Oberschnabel (oben links und oben rechts). Massive, schwammartige Veränderung der Wachshaut und der umliegenden Haut mit Hyperkeratose (oben rechts). Kalkbeinräude hervorgerufen durch Epithelproliferation und Bohrgänge der Milben (unten).....	<b>10</b>
<b>Abbildung 5:</b> Massiver Federmilbenbefall an Arm- und Handschwingen eines Wellensittichs .....	<b>11</b>
<b>Abbildung 6:</b> Durch BFDV chronisch erkrankter Wellensittich, umgangssprachlich auch als „Renner oder Hopper“ bezeichnet.....	<b>12</b>
<b>Abbildung 7:</b> Wellensittich mit multiplen Federbalgzysten (oben). Wellensittich mit Flügelspizentumor (unten links). Wellensittich mit Bürzeldrüsentumor, post mortem (unten rechts) .....	<b>14</b>
<b>Abbildung 8:</b> Juveniler Wellensittich „feather duster“, post mortem.....	<b>17</b>
<b>Abbildung 9:</b> Schwungfedern eines Wellensittichs mit Grimalen, sog. „Hungermalen“, und Einblutungen in den Federschäften; Federschäfte haben z. T. auf Höhe der Grimale auch strukturelle Veränderungen / Linien, welche Sollbruchstellen darstellen können.....	<b>22</b>
<b>Abbildung 10:</b> Zu locker sitzende Federn mit verdickten und persistierenden Blutkielen und persistierende Federscheiden (oben links und rechts, unten links und rechts).....	<b>24</b>
<b>Abbildung 11:</b> Verdrehte Schwanzfeder (oben). Renner mit massiver Schnabeldeformation, fehlenden Steuerfedern und Gefiederschäden an Schwung- und Deckfedern (unten links). Renner mit Großgefiederschaden (unten rechts).....	<b>25</b>
<b>Abbildung 12:</b> Persistierende Federscheiden und brüchiges Schnabelhorn bei einem männlichen Wellensittich, post mortem.....	<b>26</b>
<b>Abbildung 13:</b> Juveniler Wellensittich mit „feather duster syndrome“ .....	<b>36</b>
<b>Abbildung 14:</b> Agapornide mit Oberschnabelfraktur, EMA-Komplex und	

Befiederungsstörung, post mortem .....	37
<b>Abbildung 15:</b> Links Gelbbrustara mit Befiederungsstörung, brüchigem Schnabelhorn und übermäßigem Krallenwachstum und rechts Halsbandsittich mit Befiederungsstörung.....	38
<b>Abbildung 16:</b> Zwei männliche Wellensittiche und ein Pärchen Katharinasittiche des Bestandes 9 .....	41
<b>Abbildung 17:</b> Gefiederprotokoll (Schematische Abbildung des Wellensittichgefieders).....	43
<b>Abbildung 18:</b> Von links nach rechts, Beurteilungsvorlage Schnabelhorn am Beispiel Wellensittich: o. b. B.; ggr. brüchig; mgr. brüchig; hgr. brüchig .....	43
<b>Abbildung 19:</b> Phylogenetische Analyse basierend auf partiellen Rep-Gen-Sequenzen mit insgesamt 29 Circovirusisolaten aus 5 Beständen der vorliegenden Studie unter Einbeziehung von 52 bereits veröffentlichten Sequenzen von Isolaten aus der GenBank. Die Bezeichnung der in dieser Studie untersuchten Vögel umfasst die Bestandsnummer, die Spezies (so genau wie möglich) inklusive der Identifikationsnummer im jeweiligen Bestand, das Probenmaterial und das Land, in dem die Probe gezogen und untersucht wurde. Angaben zu Sequenzen der GenBank (NCBI) oder der Literatur umfassen die „accession number“, die Species und das Land der Beprobung, bzw. Analyse. Die Clustereinteilung mit Buchstaben auf der rechten Seite entspricht der Einteilung von bereits klassifizierten Vollgenomisolaten in der Publikation von Varsani et al. (2011).....	65

## **X. DANKSAGUNG**

Abschließend möchte ich mich recht herzlich bei Allen bedanken, die beim Entstehen dieser Arbeit mitgewirkt haben:

Ein besonderer Dank gilt auch Frau PD Dr. Rinder für die Überlassung des Themas der Dissertation, der Hilfestellung und Korrektur, zu jeder Tages- und Nachtzeit.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Korbel für die Doktorandenstelle und die Überlassung eines Arbeitsplatzes für die Durchführung der Dissertation.

Besonderer Dank gilt meiner Mama und meinen Großeltern für die moralische und finanzielle Unterstützung und das Gassigehen mit meiner Bella.

Vielen Dank den Mitarbeiterinnen der Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische, für die Hilfe und Unterstützung, auch moralischer Art und auch über die Arbeitszeit hinaus - v. a. Lisa Koch, Kerstin Blüthgen, Martina Rzepka, Stefanie Schauer, Stephanie Schleuter und Andrea Liepert.

Danke auch an meine lieben Freundinnen und Freunde für Eure moralische Unterstützung, Matina Raisch, Rimma Martin, Hanna-Maria Lubach, Simone Limmer, Alexandra Festl und Andreas Westphal.

Zum Schluss möchte ich mich noch bei meinem verstorbenen Vater bedanken, der zu Lebzeiten immer an mich geglaubt hat und mir beigebracht hat wie wichtig es ist, genau hinzusehen, Mitgefühl mit anderen Geschöpfen zu haben, Verantwortung zu übernehmen, Gefühle zu zeigen, niemals aufzugeben, immer nach vorne zu schauen und an sich zu glauben - denn Alles ist möglich!

(Papa und Thomas, Ihr seid stets in meinem Herzen!)