

Newcastle Krankheit (ND) bei Puten und ihre Prävention durch  
Impfung mit einer attenuierten ND-Vakzine

von Matthias Florian Schwarz

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

Newcastle Krankheit (ND) bei Puten und ihre Prävention durch  
Impfung mit einer attenuierten ND-Vakzine

von Matthias Florian Schwarz

aus Mutlangen

München 2018



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

Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische

Arbeit eingereicht über:  
Univ.-Prof. Dr. Rüdiger T. Korbel

Angefertigt am Institut für Virusdiagnostik des  
Friedrich-Loeffler-Instituts, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit,  
Greifswald-Insel Riems unter Leitung von:

Priv.-Doz. Dr. Christian H. Grund



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

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

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Rüdiger T. Korbel

**Korreferent/en:** Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

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



Für meine Familie



**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Die Pute (Meleagris gallopavo LINNAEUS f. domestica) .....</b>	<b>3</b>
1.1.	Abstammung und Bedeutung .....	3
1.2.	Haltung .....	4
1.2.1.	Haltungsformen .....	4
1.2.2.	Tierschutz bei der Putenhaltung .....	5
1.2.3.	ND-Impfung bei der Putenhaltung .....	5
<b>2.</b>	<b>Die Newcastle Krankheit .....</b>	<b>6</b>
2.1.	Historie und Ausbrüche der Newcastle Krankheit .....	6
2.2.	Vorkommen und Übertragung .....	8
2.3.	Gesetzliche Regelungen .....	8
2.4.	Beschreibung der Erkrankung .....	9
2.4.1.	Pathotypisierung und ihre Klinik .....	10
2.4.2.	Virulenzdeterminanten .....	11
2.5.	Newcastle Krankheit bei der Pute .....	12
2.5.1.	Klinik bei der Pute .....	12
2.5.2.	Pathologie bei der Pute .....	13
2.5.3.	Histologie bei der Pute .....	13
2.6.	Diagnose von NDV .....	13
2.6.1.	Virusisolierung .....	14
2.6.2.	Serologischer Nachweis .....	15
2.7.	Differentialdiagnosen der Newcastle Krankheit .....	16
2.8.	Erkrankung beim Menschen .....	16
<b>3.</b>	<b>Das Newcastle Disease Virus .....</b>	<b>17</b>
3.1.	Taxonomie .....	17
3.2.	Klassifizierung .....	17
3.3.	Virusstruktur .....	18
3.4.	Virusgenom .....	19
3.5.	Infektion und Virusreplikation .....	20
<b>4.</b>	<b>Schutz gegen die Newcastle Krankheit .....</b>	<b>22</b>
4.1.	Impfung gegen die Newcastle Krankheit .....	22

4.1.1.	ND-Impfung bei der Pute .....	23
4.1.2.	Ziele der ND-Impfung.....	24
4.1.3.	ND-Impferfolg und postvakzinale Komplikationen.....	25
4.1.4.	Impfstoffe .....	25
4.1.4.1.	Lebendimpfstoffe gegen die Newcastle Krankheit .....	25
4.1.4.2.	Inaktivierte Impfstoffe gegen die Newcastle Krankheit.....	26
4.1.4.3.	Kombinationsimpfstoffe gegen die Newcastle Krankheit.....	26
4.2.	Immunität gegen die Newcastle Krankheit .....	27
4.2.1.	Immunsystem des Geflügels .....	27
4.2.2.	Maternale Immunität des Geflügels .....	28
4.3.	Angeborene Immunität gegen ND .....	29
4.4.	Zellvermittelte Immunitätsmechanismen gegen das NDV .....	29
4.5.	Humorale Immunität gegen das NDV .....	30
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>35</b>
<b>1.</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>35</b>
<b>2.</b>	<b>Material .....</b>	<b>35</b>
2.1.	Puten.....	35
2.2.	Newcastle Disease Virusstämme.....	35
2.3.	Newcastle Disease Impfstoff.....	36
2.4.	Infektions- und Impfpläne der Tierversuche .....	36
2.5.	Stamm- und Gebrauchslösungen.....	38
2.6.	Zellkulturen und Erythrozytensuspensionen .....	40
2.6.1.	LMH-Zellen.....	40
2.6.2.	Erythrozytensuspension.....	40
2.7.	Material für die Versuche mit Puten .....	40
<b>3.</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>41</b>
3.1.	RNS-Aufarbeitung aus Tupferproben .....	41
3.2.	RNS-Aufarbeitung aus Organproben .....	41
3.3.	NP-RTqPCR.....	42
3.4.	Serumgewinnung und -bearbeitung.....	42
3.5.	Hämagglutinations-Hemmungstest .....	43
3.6.	Infektion von LMH-Zellen.....	43
3.6.1.	Infektiosität Tupferproben.....	44

---

3.6.2.	Rücktitration Impfvirus/Infektionsvirus.....	44
3.7.	Klinischer Score (c.s.) und Klinischer Index (c.i.).....	44
3.8.	Tötung der Versuchstiere .....	45
3.9.	Auswertung der statistischen Analyse der Ergebnisse .....	45
<b>4.</b>	<b>Tierversuche.....</b>	<b>45</b>
4.1.	Tierversuch 1: Empfänglichkeit juveniler und adulter Puten auf eine Newcastle Disease Virus Infektion.....	46
4.2.	Tierversuch 2: Bestimmung des optimalen Impfzeitpunktes und der notwendigen/geeigneten Impfstoffdosis .....	47
4.3.	Tierversuch 3: Bestimmung des Einsetzens und der Dauer der Immunität nach einfacher Impfstoffgabe .....	48
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>49</b>
<b>1.</b>	<b>Empfänglichkeit juveniler und adulter Puten auf eine Newcastle Disease Virus Infektion.....</b>	<b>49</b>
1.1.	Infektionsverlauf in juvenilen Puten .....	49
1.1.1.	Klinische Manifestation .....	49
1.1.2.	Antikörperantwort .....	53
1.1.3.	Virusausscheidung.....	55
1.1.4.	Virale Organbelastung.....	57
1.2.	Infektionsverlauf in adulten Puten .....	59
1.2.1.	Klinische Manifestation .....	59
1.2.2.	Antikörperantwort .....	62
1.2.3.	Virusausscheidung.....	63
<b>2.</b>	<b>Tierversuch 2: Bestimmung des optimalen Impfzeitpunktes und der notwendigen/geeigneten Impfstoffdosis.....</b>	<b>65</b>
2.1.	ND-Immunisierung .....	66
2.1.1.	Virusausscheidung.....	66
2.1.2.	Antikörperantwort .....	69
2.2.	NDV-Belastungsinfektion .....	70
2.2.1.	Klinische Manifestation .....	70
2.2.2.	Virusausscheidung.....	73
2.2.3.	Antikörperantwort .....	75
2.3.	Virale Organbelastung.....	78

---

<b>3.</b>	<b>Tierversuch 3: Bestimmung des Einsetzens und der Dauer der Immunität nach einfacher Impfstoffgabe.....</b>	<b>80</b>
3.1.	Serologische Untersuchungen vor der ND-Immunsierung .....	80
3.2.	ND-Immunsierung .....	81
3.2.1.	Virusausscheidung.....	81
3.2.2.	Antikörperantwort .....	82
3.3.	ND-Belastungsinfektion.....	83
3.3.1.	Klinische Manifestation .....	83
3.3.1.1.	Nicht geimpfte Kontrollgruppen .....	83
3.3.1.2.	Geimpfte Puten.....	84
3.3.2.	Virusausscheidung.....	90
3.3.3.	Antikörperantwort .....	92
3.4.	Virale Organbelastung.....	95
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>97</b>
<b>1.</b>	<b>Empfänglichkeit juveniler und adulter Puten auf eine Newcastle Disease Virus Infektion.....</b>	<b>97</b>
<b>2.</b>	<b>Bestimmung des optimalen Impfzeitpunktes und der notwendigen/geeigneten Impfstoffdosis .....</b>	<b>101</b>
<b>3.</b>	<b>Bestimmung des Einsetzens und der Dauer der Immunität nach einfacher Impfstoffgabe.....</b>	<b>106</b>
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>111</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>113</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>115</b>
<b>IX.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>133</b>
<b>1.</b>	<b>Tabellen .....</b>	<b>133</b>
<b>2.</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>140</b>
<b>3.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>141</b>
<b>X.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>143</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

Abb.	Abbildung	L	Large-Protein
APMV-1	Aviäres Paramyxovirus-1	LAH	Lohmann Animal Health
AS	Aminosäure	log	Logarithmus
c.i.	Clinical index	LT	Lebenstag
c.s.	Clinical score	LW	Lebenswoche
cpe	Cytopathogener Effekt	M	Matrix-Protein
Ct.	Critical Threshold	MDA	Maternal Derived Antibodies
dpc	Days post challenge	MDT	Mean death time
dpi	Days post infection	Mg	Magnesium
dpv	Days post vaccination	m <sup>2</sup>	Quadratmeter
EID	Eiinfektiöse Dosis	min	Minuten
ELISA	Enzym-Linked Immunosorbent Assay	ml	Milliliter
EU	Europäische Union	mm	Millimeter
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft	µl	Mikroliter
F	Fusions-Protein	NaCl	Natrium Chlorid
FKS	Fetales Kälberserum	ND	Newcastle Disease
GEQ	Genom equivalent	NDV	Newcastle Disease Virus
h	Stunde	nm	Nanometer
HA	Hämagglutinationstest	NP	Nucleo-Protein
HAH	Hämagglutinations- Hemmungstest	nt	Nukleotide
HAU	Hämagglutinierende Einheit	OIE	World Organisation for Animal Health
HN	Hämagglutinin- Neuraminidase	o.n.	Oculo-nasal
i.m.	Intramuskulär	PBS	Phosphate buffer sialine
IBDV	Infektiöse Bursitis Disease Virus	pc	Post challenge
ICPI	Intracerebraler Pathogenitätsindex	pi	Post infection
IFN	Interferon	pv	Post vaccination
Ig	Immunglobulin	PPMV-1	Pigeon Paramyxovirus-1
IVPI	Intravenöser Pathogenitätsindex	RIC	RNS interne Kontrolle
kg	Kilogramm	RNS	Ribonukleinsäure
KID	Kulturinfektiöse Dosis	RNP	Ribonukleoprotein-Komplex

---

rpm	Rounds per minute	ssRNS	Single stranded RNS
RT-PCR	Reverse-Transkription Polymerasekettenreaktion	Tbl.	Tabelle
RTqPCR	Reverse-Transkription quantitative Polymerasekettenreaktion	TLR	Toll-Like-Receptors
SD	Standard derivation	VNT	Virusneutralisationstest
sec	Sekunde	ZNS	Zentrales Nervensystem
SPF	Spezifisch pathogenfrei		

## I. EINLEITUNG

Virale Infektionen können weltweit in Geflügelbeständen zu hohen wirtschaftlichen Verlusten führen. Zu einer der bedeutendsten Erkrankungen gehört die Newcastle Krankheit (atypische Geflügelpest). Durch eine schnelle Ausbreitung der Erreger und die hohe Pathogenität ist sie international durch die Weltgesundheitsorganisation für Tiere (OIE) sowie auf EU-Ebene gesetzlich geregelt. In Deutschland sind die staatlichen Maßnahmen durch die Geflügelpest-Verordnung spezifiziert. Bei der Newcastle Krankheit sehen die Maßnahmen in Deutschland eine generelle Impfpflicht von Hühnern und Puten vor. Zum Einsatz kommen neben Inaktivimpfstoffen insbesondere schwach virulente Lebendvakzine die sich für eine Massenapplikation eignen. Um Impfkomplicationen weiter zu reduzieren wurden ausgehend von natürlich auftretenden niedrig pathogenen Varianten des Newcastle Krankheit Virus (NDV) klonale Abkömmlinge selektiert, die bei erhaltener Immunogenität in ihrer Virulenz abgeschwächt sind. Während für Hühner eine Vielzahl dieser neuen Impfstoffe entwickelt wurden und kommerziell erhältlich sind, fehlen derartige Produkte für die Pute.

Ziel dieser Arbeit war es die Wirksamkeit eines in der Virulenz reduzierten und bereits für Hühner als ND-Impfstoff (AviPro ND C131, LAH) zugelassenen Stammes für Puten zu überprüfen. Dazu wurde ein ND-Belastungsmodell für Puten etabliert, das die Empfänglichkeit von Puten unterschiedlicher Altersklassen auf eine ND-Infektion in Anwesenheit von maternalen Antikörpern berücksichtigt. Neben dem im Europäischen Arzneibuch vorgesehenen Standard NDV-Stamm aus dem Jahr 1956 (NDV Herts Weybridge 33/56, Pharmakopöe 6.0; 01/2008:0450) sollte ein Virus der aktuell zirkulierenden Genotyp VII (NDV chicken/middle east/R1468/2012) vergleichend als Belastungsvirus untersucht werden.

Untersuchungen zur Bestimmung des optimalen Impfzeitpunktes sowie Eintritt und Dauer einer durch den ND-Lebendimpfstoff induzierten Immunität sollen die Grundlage schaffen die Schutzwirkung des erprobten Impfstoffes einzuschätzen. Über die reine klinische Beurteilung eines Impfschutzes hinaus dient die Erfassung der Virusausscheidung und Antikörperreaktion nach Impfung und Belastungsinfektion die Erreger-Wirts-Interaktion zu untersuchen. Die erarbeiteten Referenzwerte stehen zukünftig für die Beurteilung einer ND-Impfung bei Puten zur Verfügung bzw. können zur Verbesserung des Impfmanagements von Putenherden herangezogen werden.



## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Die Pute (*Meleagris gallopavo* LINNAEUS f. *domestica*)

#### 1.1. Abstammung und Bedeutung

Die heute in Europa gehaltene Mastpute trägt ihren Ursprung in durch Indianer domestizierte Putenstämme. Die Wildform (*Meleagris gallopavo*) war in Großteilen der USA und Mexiko beheimatet. Wildputen gelten als extrem anpassungsfähig, sind alles fressende Tagtiere und verbringen die Nacht meist in der Krone spezieller Schlafbäume (BMVEL, 2002a). Der genaue Zeitpunkt der Domestikation ist allerdings nicht eindeutig bestimmbar (BENECKE, 1954). Angenommen wird, dass indianische Ureinwohner in der Zeit um 400 v. Chr. die Stammform unserer Truthühner domestizierten. Als Stammform gilt die mexikanische Unterart des Wildtruthuhns „*Meleagris gallopavo mexicana*“ (RAETHEL, 1991). Die ersten Tiere gelangten bald nach der Entdeckung Amerikas durch spanische Seefahrer am Ende des 15. Jahrhunderts nach Europa. Primär erfolgte die Zucht und Selektion in England, von wo aus die ersten europäischen Auswanderer sie an die Ostküste Neuenglands „Narragansett Bay“ in Rhode Island, USA verbrachten. Dort fanden zwischen 1930 und 1940 die ersten bedeutungsvollen Kreuzungsversuche statt (HAFEZ, 1999).

Die Pute ist dabei durch ihre unterschiedliche phylogenetische Entwicklung nur bedingt mit dem Haushuhn (*Gallus gallus*) verwandt. Dies zeigen die unterschiedlichen Krankheitsspektren beider Spezies (GÜNTHER, 2011). Innerhalb der Ordnung der Hühnervögel (*Galliformes*) wird das Haushuhn und die Pute dabei in die Familie der Fasanenartigen (*Phasianidae*) eingeteilt. Anders als das Haushuhn mit der Abstammung vom Bankivahuhn (Gattung: Kammhühner) zählen die Truthühner zu einer eigenen Unterfamilie der *Meleagridinae* (WELTMORE, 1960; CROWE, BOWIE & BLOOMER et al., 2006). Neuweltliche Truthühner sind nahe mit den altweltlichen Phasianiden verwandt, unterscheiden sich jedoch von ihnen durch eine große Zahl anatomischer und anderer Eigenschaften (RAETHEL, 1991).

In Deutschland hat die Putenhaltung nach der Hähnchenmast für die Geflügelwirtschaft eine große Bedeutung. So werden in der Bundesrepublik jährlich über 37 Millionen Mastputen geschlachtet. Dabei ist die Produktion innerhalb der letzten Jahre ständig gestiegen. So erhöhte sich die Produktion des Putenfleisches von 384.761,7 Tonnen im Jahre 2005 um 21% auf 465.248,4 Tonnen im Jahre 2014. Der Bedarf an Putenfleisch ist dabei in den letzten zehn

Jahren (2005-2014) auf fast 1 Millionen Tonnen gestiegen und liegt in Deutschland bei einem Pro-Kopf-Verbrauch von rund 6 kg/Person (EU-Durchschnitt rund 3,5 kg/Person) (STATISTISCHES BUNDESAMT, Wiesbaden, 2015).

## **1.2. Haltung**

Heute werden Puten weltweit als Wirtschaftsgeflügel gehalten, wobei die verschiedenen Betriebe spezialisiert sind in Basiszucht, Vermehrung, Mast und Schlachtung. Die Tiere werden dabei normalerweise ab der achten Lebenswoche getrennt nach Geschlecht gehalten (FELDHAUS & SIEVERDING, 2001). Bei der Masthaltung werden die Putenhennen meist bis zu einem Alter von 16 Wochen und einem Schlachtgewicht von ca. 9-10kg (Lebendgewicht bis zu 52kg/m<sup>2</sup>), die Putenhähne bis zu einem Alter von 21-22 Wochen und einem Gewicht von 18-20kg (Lebendgewicht bis zu 58kg/m<sup>2</sup>) gehalten.

### **1.2.1. Haltungsformen**

Bei den unterschiedlichen Mastverfahren in Bodenhaltung werden die Puten in Stallhaltung und konventioneller Putenmast oder in Auslaufhaltung und ökologischer Putenmast gehalten. Hauptsächlich wird in Deutschland die konventionelle Putenmast betrieben (HAFEZ, 1996). Es werden Mastformen wie das Rein-Raus-Verfahren, das Rotationsverfahren und das besonders ökonomische Verfahren des sog. 13-Wochen-Rhythmus mit vier Mastdurchgängen im Jahr praktiziert (KLEMM, 2004). Steht für die Mast nur ein Stall zur Verfügung wird das Rein-Raus-Verfahren durchgeführt. Hähne und Hennen werden hier gemeinsam eingestallt. Nach der Schlachtung der Hennen in der 15.-17. Lebenswoche steht der gesamte Stall der Hahnenmast zur Verfügung (22.-24. Lebenswoche). Im Rotationsverfahren erfolgt ebenfalls eine gemeinsame Einstallung von Hennen und Hähnen, wobei die Hähne nach fünf bis sechs Wochen in einen separaten Hahnenstall umgestallt werden. Die Schlachtungen erfolgen wie beim Rein-Raus-Verfahren. Somit kann der Hennenstall für eine Einstallung der Küken frühzeitig genutzt werden. Bei der Haltungsform des 13-Wochen-Rhythmus erfolgt auch eine gemeinsame Einstallung. Eine Umstallung der Hennen erfolgt nach vier bis fünf Wochen in den Maststall. Die Hähne verbleiben bis zur 11. Lebenswoche im Aufzuchtstall und werden dann in den inzwischen leeren Maststall umgesetzt. Eine Neubelegung erfolgt nach 13 Wochen.

Die Sterblichkeitsrate während der Mast ist geschlechtsabhängig. Sie liegt bei Putenhähnen mit 8-12% höher als bei -hühnern mit 3-5%. Über mehrere Mastdurchgänge bestehen Schwankungen in der Jahreszeit und des Gesundheitszustandes der angelieferten Küken (BUND NRW, 2014).

### **1.2.2. Tierschutz bei der Putenhaltung**

In Deutschland existieren keine rechtsverbindlichen Vorgaben mit klar definierten Mindeststandards zur Putenhaltung. Als wichtige Rechtsgrundlage gelten das Tierschutzgesetz sowie die grundsätzlichen Ausführungen des Bundesverfassungsgerichts in seinem Urteil zur Haltung von Legehennen in Käfigen. Als Empfehlung des Europarates zur Putenhaltung gilt das Europäische Übereinkommen zum Schutz von Tieren in landwirtschaftlichen Tierhaltungen die Empfehlung in Bezug auf Puten (*Meleagris gallopavo* ssp.) (BMVEL, 2002b). Unter Beachtung dieser Empfehlungen dienen die bundeseinheitlichen Eckwerte für eine freiwillige Vereinbarung zur Haltung von Mastputen. Diese beschreiben z.B. die Anforderungen des Halters (Sachkunde), der Stallung und Ausstattung (z.B. Beleuchtung, Belüftung, Beschäftigungsmaterial), die tierärztliche Bestandsbetreuung, den Umgang mit kranken Tieren und die Besatzdichte. Bei dem Einhalten von optimalem Management und bestimmten Zusatzanforderungen können Hennen bis zu 52kg und Hähne bis zu 58kg Lebendgewicht/m<sup>2</sup> nutzbarer Stallgrundfläche gehalten werden.

### **1.2.3. ND-Impfung bei der Putenhaltung**

Die Entwicklung von Impfstoffen und Impfplänen gegen die Newcastle Krankheit für Geflügel wurde mit der Intensivhaltung und dem Schutz der Tiere immer wichtiger. In Deutschland besteht daher seit dem Jahre 1995 eine generelle Impfpflicht für Hühner und Puten (Geflügelpest-Verordnung).

Für die ND-Impfung bei der Pute ist es wichtig auf das Zusammenspiel zwischen Art, Dosis und Applikation des Impfvirus und des Immunstatus in Abhängigkeit des Alters der Puten/Impflinge zu achten. Die Impfung soll eine immunologische Antwort gegen das Impfvirus induzieren ohne selbst eine Erkrankung auszulösen. Dazu stehen Lebend- und Inaktivatimpfstoffe zur Verfügung, von denen Inaktivatimpfstoffe als Einzel- oder in Kombinations- mit anderen Erregern verabreicht werden.

Auf die Beschreibung der ND-Impfungen und das Immunsystem der Pute wird ausführlich im Punkt 4 dieses Kapitels eingegangen, so dass an dieser Stelle darauf verwiesen wird.

## 2. Die Newcastle Krankheit

### 2.1. Historie und Ausbrüche der Newcastle Krankheit

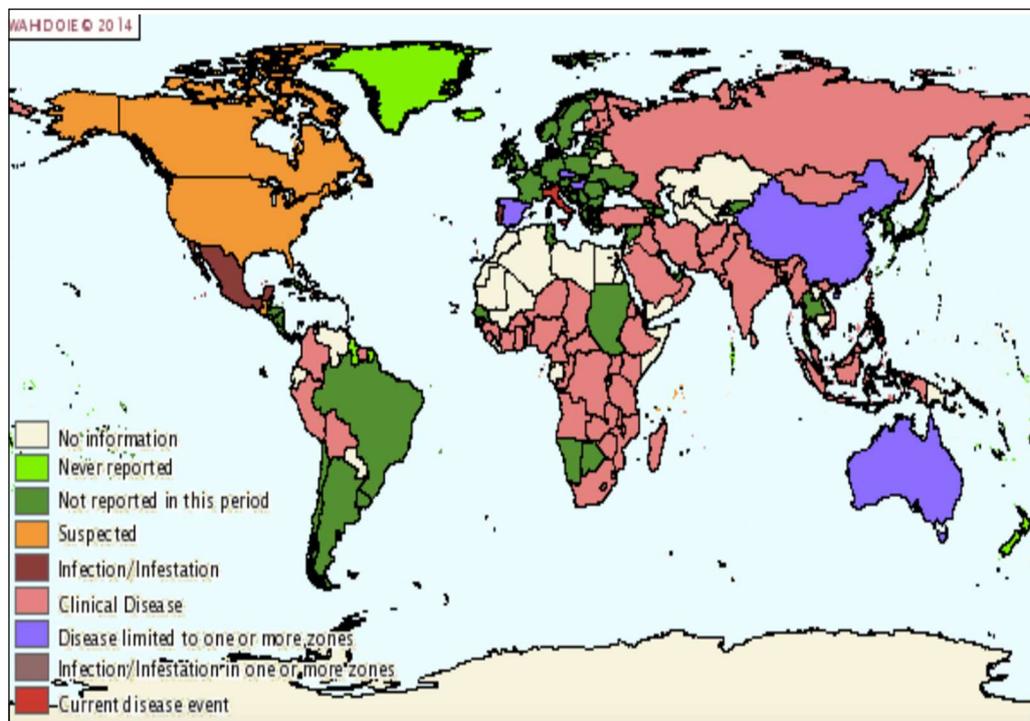
Die Erkrankung Newcastle (Syn: Atypische Geflügelpest, Newcastle Krankheit, Pseudo-Geflügelpest, Asiatische Geflügelpest, Pseudo-Vogelpest, Doylesche Krankheit) wird durch das Newcastle Disease Virus (APMV-1) verursacht. Das Virus wurde erstmals 1926 in Newcastle upon Tyne (England) und auf der Insel Java (heutiges Indonesien) nachgewiesen (KRANEVELD, 1926; DOYLE, 1927). Jedoch wurden bereits im Anfang des 20. Jahrhunderts ähnliche Ausbrüche der Erkrankung in Korea und Schottland beobachtet (MACPHERSON, 1956; ALEXANDER, 2001).

In Betrachtung durch HANSON (1972) werden drei Hypothesen aufgeführt, die das plötzliche Auftreten von ND vor allem in Südost-Asien erklären: 1.) Es ist möglich, dass ND in Südost-Asien bereits endemisch war und nach der Kommerzialisierung des Geflügelhandels ein Problem wurde, 2.) ND trat in freilebenden Vögeln des tropischen Regenwaldes ohne Erkrankung auf und dann durch den Menschen in Geflügelbestände verschleppt. Durch die Übertragung wurde ein Wirtswechsel herbeigeführt oder 3.) Der Ursprung liegt in einer Virusmutation, die von niedrigpathogen in hochpathogene Viren wechselte.

Die erste Panzootie von Newcastle Disease breitete sich langsam aus und benötigte ca. 16 Jahre um ebenfalls in anderen Gebieten aufzutreten (ALEXANDER et al., 2004). Im Gegensatz dazu benötigte die zweite Panzootie, nach Erstauftreten Ende der 1960er, gerade mal vier Jahre um sich weltweit auszudehnen (HANSON, 1972). Als Grund für die rasante weltweite Ausbreitung wird in dem erstarkten Handelsaufkommens von Fleisch- und Geflügelprodukten gesehen, das während des 2. Weltkrieges stark gehemmt war. Schlachtkörper und Schlachtabfälle sind als bedeutend für die Verbreitung beschrieben (DOBSON & SIMMINS, 1951; BROWN, 1965). Der Beginn der dritten Panzootie ist unklar. Jedoch wird ein Zusammenhang mit dem Einfluss der zweiten Panzootie auf die Geflügelwirtschaft und der allgemeinen Entwicklung und dem Gebrauch von ND-Impfstoffen und -Impfplänen, vor allem der der Lebendimpfstoffe, Mitte bis Ende der 70er Jahre gesehen. Der universelle Einsatz von Impfstoffen schützte zwar die geimpften Geflügelbestände (wie z.B. in Großbritannien und weiten Teilen Europas), jedoch wurde auch eine Adaption und Replikation der Virusstämme gefördert, was zu weiteren Ausbrüchen führte (ALEXANDER et al., 2012). Die Stämme der dritten Panzootie werden dabei dem Genotyp VI mit ihrem Ursprung im Mittleren Osten zugerechnet (LOMNICZI et al., 1998). Eine weitere vierte Panzootie trat in den 80er Jahren auf. Diesmal waren Tauben (*Columba livia*) betroffen.

Retrospektiv deuten Berichte darauf das ND bei Tauben im Mittleren Osten Ende der 70er Jahre auftrat (KALETA et al., 1985; ALEXANDER, 2001). Im Jahre 1981 erreichte das PPMV-1 benannte Virus Europa (BIANCIFIORI & FIORONI, 1983) und war bis 1985 weltweit verbreitet. Ebenfalls kam es vor, das importierte Vögel Wirtschaftsgeflügel bei Kontakt infiziert haben (KINDE et al., 2005).

Die verwendeten Lebendimpfstämme der letzten Jahre zählen dabei zu den Genotypen I und II wohingegen die in letzter Zeit aufgetretene Ausbrüche durch die Genotypen V (USA) (PEDERSEN et al., 2004), Genotyp IV (Europa, Asien) und Genotyp VII ausgelöst wurden. Dabei wird der Genotyp VII nochmals in mehrere Subtypen (a – h) differenziert. Der Genotyp VIIa umfasst alle Isolate, die sich in den 1990er Jahren vom Fernen Osten ausgehend nach Europa und Asien, bzw. der Genotyp VIIb nach Südafrika verbreiteten (ALDOUS et al., 2003). Die Genotypen VIIc, VIId und VIIe wurden in China, Kasachstan und Südafrika isoliert (WANG et al., 2006; BOGOYAVLENSKI et al., 2009). Die Subgenotypen VIIf, VIIg und VIIh beinhalten Isolate aus Afrika (SNOECK et al., 2009).



**Abbildung 1: Geographisches Verteilungsmuster der gemeldeten ND-Fälle (2014);**

**Quelle: OIE, 2014. ([http://www.oie.int/wahis\\_2/resource/maps/tmp/5305d06e\\_274c\\_7.png](http://www.oie.int/wahis_2/resource/maps/tmp/5305d06e_274c_7.png))**

## 2.2. Vorkommen und Übertragung

Das NDV zeigt ein breites Wirtsspektrum und kann über 240 Vogelarten infizieren, die sich über direkten Kontakt zwischen infizierten und toten Vögeln anstecken können (KALETA & BALDAUF, 1988). Neben Nutz- und Wildgeflügel sind ebenfalls exotische Ziervögel durch eine Newcastle Krankheit Infektion betroffen. Der klinische Verlauf kann allerdings stark von der betroffenen Spezies abhängen (ALEXANDER D.J. & SENNE, 2008).

Die Ausscheidung von infektiösem Virus erfolgt über Kot, aber auch in Nasen-, Pharynx- und konjunktivalen Sekreten ist der Virusgehalt hoch. Die Übertragung erfolgt in der Regel auf direktem oro-fäkalem Weg, eine aerogene Transmission ist ebenfalls in Betracht zu ziehen. Über Futter und Tränkewasser aber auch durch Einrichtungsgegenstände wird das Virus nicht nur innerhalb eines Bestandes übertragen sondern auch zwischen verschiedenen Stallungen (CHARLTON, 2000). Untersuchungen mit virulenten NDV zeigen bei Puten eine virale Ausscheidung bis zu zwei Tagen vor ihrem Tod (ALDOUS et al., 2010). Die Erregerübertragung durch menschliches Handeln und durch unbelebte Vektoren wird nach mehreren Autoren die größte Bedeutung zugeordnet (JUNGHERR & TERREL, 1946; DEIBEL et al., 1985; GOHM, 1999; ALEXANDER, 2003).

## 2.3. Gesetzliche Regelungen

Zum Schutz gegen die Geflügelpest und die Newcastle Krankheit gilt in Deutschland die Geflügelpest-Verordnung. Geflügel im Sinne der Verordnung sind Enten, Gänse, Fasanen, Hühner, Laufvögel, Perlhühner, Rebhühner, Tauben, Truthühner und Wachteln, die zur Zucht oder zur Erzeugung von Fleisch oder Konsumeiern oder zur Aufstockung des Wildbestandes gehalten werden (GEFLÜGELPEST-VERORDNUNG). In Deutschland besteht nach der Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpest und die Newcastle Krankheit vom 20. Dezember 2005 eine Impfpflicht, die durch den Tierarzt durchzuführen ist. Durch die wiederholenden Impfungen soll im gesamten Bestand eine ausreichende Immunität gegen die Newcastle Krankheit aufgebaut werden. Die Verantwortung zur Beauftragung und Dokumentation liegt dabei beim Besitzer des Bestandes.

Über die Kriterien für Impfstoffe für Routineimpfungen gegen die Newcastle Krankheit gilt die Richtlinie 93/152/EWG der Kommission der europäischen Gemeinschaften. Nach der Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen (TierSeuchAnzV) gilt die Newcastle Krankheit als anzeigepflichtige Tierseuche und steht unter amtlicher Überwachung (TierSeuchAnzV, Ausfertigungsdatum: 23.05.1991). Im Falle eines Ausbruchs sind Prophylaxemaßnahmen, das Hygienemanagement und diverse Schutzmassregeln im

Europäischen Wirtschaftsraum nach der Richtlinie 92/66/EWG, sowie auf nationaler Ebene in der Geflügelpest-Verordnung festgelegt.

Der Ausbruch der Newcastle Krankheit liegt vor, wenn er

- 1.) durch virologische Untersuchungen nach der Richtlinie 92/66/EWG oder
- 2.) im Falle von Sekundärausbrüchen durch klinische und pathologische-anatomische Untersuchungen nachgewiesen wird.

Tritt die Newcastle Krankheit auf sind spezielle Quarantänemaßnahmen und ein Verbringen von Geflügel aus und zu dem Seuchenbetrieb untersagt. Nach einer amtlichen Bestätigung der Erkrankung werden eine unverzügliche Tötung des gesamten Geflügels im Betrieb und eine unschädliche Beseitigung verendeter und getöteter Tiere und aller vorhandenen Eier unter Vermeidung einer Virusweiterverbreitung durchgeführt.

Wurde in einem Geflügelbestand ohne klinische Symptome der Newcastle Krankheit ein NDV-Stamm mit einem Intrazerebralen Pathogenitätsindex von mehr als 0,7 und weniger als 1,2 isoliert und der Zuteilung eines Referenzlabors zu einem attenuierten Lebendimpfstoff gegen ND diagnostiziert so kann der Betrieb 30 Tage unter amtliche Überwachung gestellt werden.

Aufgrund der großen wirtschaftlichen Bedeutung der Newcastle Krankheit ist die Erkrankung bei der Organisation Internationale des Épizooties (OIE) als anzeigepflichtige Tierseuche geführt. Im Falle eines Ausbruchs bedarf es einer Meldung an die OIE sowie aktuellen monatlichen Meldungen an die Länder bezüglich des Seuchenstatus.

Wissenschaftliche Arbeiten mit der Newcastle Krankheit müssen in Laboren der Biologischen Sicherheitsstufe 2 (BSL2) oder höher durchgeführt werden. Die Staaten ohne Zugang zu solchen Laboren sollten ihre Proben zu einem OIE Referenzlabor senden (OIE, 2012).

#### **2.4. Beschreibung der Erkrankung**

Nach einer Infektion mit APMV-1 sind die klinischen Krankheitsverläufe bei Vögeln sehr variabel. Neben subklinischen Krankheitsverläufen treten je nach Pathogenität des Erregers unterschiedliche Krankheitszeichen auf und die Mortalitätsrate kann bis zu 100% erreichen (SUSTA et al., 2011). Typischerweise treten die Krankheitszeichen zwischen drei und sechs Tagen in Abhängigkeit der verschiedenen infizierten Wirten, dem Immunstatus des Wirts, der Menge an virulenten NDV und der Umweltbedingungen nach der Infektion auf. Es können dabei nicht spezifische Krankheitszeichen wie Niedergeschlagenheit, ein aufgeplustertes

Federkleid, Schnabelatmung, Hyperthermie, Anorexie und ein tödlicher Verlauf der Erkrankung auftreten (ALEXANDER D.J. & SENNE, 2008).

#### **2.4.1. Pathotypisierung und ihre Klinik**

Nach dem klinischem Bild und dem Krankheitsverlauf bei infizierten Hühnern werden Newcastle Disease Viren in fünf Pathotypen eingeteilt (ALEXANDER D.J. & SENNE, 2008):

1. Viscerotrop velogen: hoch pathogene Form, häufig mit hämorrhagischen Läsionen im Darm-Trakt
2. Neurotrop velogen: hohe Mortalitätsraten begleitet mit respiratorischen und nervalen Störungen
3. Mesogen: niedrige Mortalitätsraten mit respiratorischen Störungen und vereinzelt nervale Störungen
4. Lentogen: milde oder subklinische Infektionen
5. Asymptomatisch: üblicherweise mit einer subklinischen Darminfektion

Die klinischen Auffälligkeiten werden durch KAURA und IYER (1937) anhand des Krankheitsverlaufes zusammengefasst. Sie unterscheiden zwischen perakuten, akuten und chronischen Krankheitsgeschehen. Bei einem perakuten Verlauf einer Newcastle Krankheit sterben die Hühner unvermittelt und plötzlich, ohne vorher jegliche Symptome der Erkrankung zu zeigen. Ein akuter Krankheitsverlauf dauert zwei, maximal drei Tage. Nach IYER (1943) stellen akute Verläufe den häufigsten Krankheitsverlauf dar und dauern drei bis fünf Tage. Die akut erkrankten Tiere zeigen typische Symptome wie Fieber, gelb-weißlichen Durchfall und eine angestrengte Atmung bei geöffnetem Schnabel (IYER, 1943). Chronische Krankheitsverläufe weisen nervale Auffälligkeiten, wie Zuckungen mit dem Kopf, Lahmheit oder Lähmungen von den Beinen und Flügeln auf (KAURA & IYER 1937; IYER, 1943).

Hohe Mortalitätsraten mit wenig oder sogar ausbleibenden klinischen Symptomen treten bei der viszerotropen Form der Newcastle Krankheit auf. Bei voll empfänglichen Hühnern kann die Mortalität bis zu 100% erreichen. Bei der neurotropen velogenen Form der Newcastle Krankheit variiert die Mortalität je nach Alter der Vögel. Junge Vögel weisen eine Mortalität von 90%, adulte Vögel von 50% auf (SUSTA et al., 2011). Niedrigere Mortalitätsraten, ebenfalls in Abhängigkeit des Alters werden bei mesogenen ND-Stämmen beschrieben. Bei einer lentogenen NDV-Infektion bleibt normalerweise eine Erkrankung bei adulten Vögeln aus (BEARD & HANSON, 1984).

### 2.4.2. Virulenzdeterminanten

Die Virulenz von NDV wird mittels Intracerebralen Pathogenitätsindex (ICPI) in Eintagsküken bestimmt (OIE, 2012; EU- Richtlinie 92/66/EWG). Durch Klassifizierung des klinischen Verlaufes über einen Zeitraum von acht Tagen nach der Infektion werden Viren mit geringer Pathogenität als lentogen (ICPI <0,7) typisiert und unterliegen keinen gesetzlichen Maßregelungen. Bei den virulenten Viren wird zwischen intermediärer Pathogenität (mesogen; ICPI 0,7-1,5) und ausgeprägter Pathogenität (velogen; ICPI >1,5) unterschieden. Beide Pathotypen werden durch gesetzliche Maßnahmen veterinärhygienisch gemäßregelt. Die Virulenz der verschiedenen Pathotypen kann ebenfalls durch Bestimmung der Absterbezeit von inokulierten embryonierten Hühnereiern (Mean Death Time, MDT) (HANSON & BRANDLY, 1955) und durch Bestimmung eines Intravenösen Pathogenitätsindex (IVPI) in sechs Wochen alten Hühnerküken (ALEXANDER, 1988) ermittelt werden. Diese Verfahren werden jedoch für eine rechtlich relevante Pathotypisierung nicht herangezogen.

Als Hauptdeterminante für die Virulenz von NDV gilt ein Erkennungsmuster für zelluläre Proteasen im viralen Fusions-Protein. Um eine Fusion der Virushülle mit der Wirtszellmembran zu vermitteln und damit die Infektion der Zielzelle zu ermöglichen ist eine Spaltung des F0-Vorläufermoleküls in das F1- und F2-Protein notwendig (NAGAI et al., 1976; DE LEEUW et al., 2005). Ohne diese Spaltung sind neu entstehende Tochtervirionen nicht infektiös und die Infektion kann sich nicht ausbreiten.

Lentogene Stämme sind für diese Aktivierung des F0-Proteines auf trypsinähnliche Proteasen angewiesen und daher bei der Replikation auf den Respirations- und Intestinaltrakt beschränkt. Sie weisen ein monobasisches Aminosäuremuster an der F-Spaltstelle ( $^{112}\text{G}/\text{E}-\text{K}/\text{R}-\text{Q}-\text{G}/\text{E}-\text{R}\downarrow\text{L}^{117}$ ) auf und werden im Respirations- und Intestinaltrakt extrazellulär gespalten (DORTMANS et al., 2011). Virulente Stämme (meso- und velogen) weisen im Bereich der Spaltstelle des F0-Proteines multibasische Aminosäuren an den Positionen 113, 115 und 116 auf und zusätzlich Phenylalanin an der Position 117 ( $^{112}\text{G}-\text{R}-\text{Q}/\text{K}-\text{K}-\text{R}\downarrow\text{F}^{117}$ ) auf (ALEXANDER et al., 2004). Diese Spaltung kann intrazellulär erfolgen. Dieses Erkennungsmuster wird durch ubiquitär vorkommende Proteasen der Furinfamilie erkannt und gespalten. Daher verbreiten sich virulente Viren in allen Geweben und können systemische Erkrankungen auslösen (NAGAI et al., 1976; CHOPPIN & SCHEID, 1980; OGASAWARA et al., 1992). Die Trypsinabhängigkeit der Replikation von NDV ist ebenfalls nach einer Infektion verschiedener Zelllinien zu beobachten (ROTT, 1985; ROTT & KLENK, 1988).

## 2.5. Newcastle Krankheit bei der Pute

Puten sind empfänglich für eine NDV-Infektion und zeigen die typischen Krankheitsanzeichen. Im Vergleich zu infizierten Hühnern weisen Puten allerdings einen milderen und verzögerten Krankheitsverlauf auf (BOX et al., 1970; ALEXANDER et al., 1999).

Neben der Erregervirulenz ist die Erkrankung bei Puten abhängig von der Empfänglichkeit des Wirtes (z.B. Immunstatus und Alter), dem Übertragungsweg, der Virusdosis und der Art einer möglich durchgeführten Schutzimpfung (WAKAMATSU et al., 2006). Bereits ab der vierten Lebenswoche wird eine Altersresistenz ausgebildet (LANCASTER, 1964). So zeigen früher durchgeführte Impf- und Infektionsstudien der Newcastle Krankheit verschiedene klinische Verläufe.

### 2.5.1. Klinik bei der Pute

Das klinische Bild der Newcastle Krankheit bei Puten entspricht qualitativ dem bei Hühnern anzutreffenden klinischen Zeichen, wobei meist ein milderer Verlauf und längere Inkubationszeiten bei der Pute zu beobachten sind (BEAUDETTE, 1943). Dabei gilt als klassisches klinisches Zeichen die Dyspnoe, die selbst nach intracerebralen Infektionen von 6 wöchigen Puten mit einem mesogenen NDV-Stamm (MK-107) beobachtet wurde (RAGGI et al., 1966). Weiterhin kommt es in Folge der Erkrankung zu Störungen des ZNS mit Opistotonus oder Torticollis sowie Lähmungen der Extremitäten. Zudem sind reduzierte Befruchtungs- und Schlupfraten zu beobachten (GALE et al., 1961). Diese Beobachtungen können durch experimentelle Infektionen von spezifiziert pathogenfreien Puten (SPF) reproduziert werden: Nach Infektion von drei Wochen alten SPF-Puten mit velogen-viscerotropen NDV traten Krankheitsanzeichen ab dem zweiten Tag nach Infektion auf und die Tiere sterben bis zum fünften Tag nach Infektion. Erkrankte Puten zeigten gehäuft Niedergeschlagenheit, blutigen Durchfall, Nasenausfluss und Inkoordination (WAKAMATSU et al., 2006). Bei älteren SPF-Tieren ist der Krankheitsverlauf verzögert. So verzögerte sich die Sterblichkeit bei SPF-Puten, die in der sechsten Lebenswoche mit einem velogen-viscerotropen NDV infiziert wurden bis zum siebten Tag nach Infektion. Die Tiere zeigten ebenfalls Körperzittern, Dyspnoe und Inkoordinationen. Bei Infektion mit velogen-neurotropen Stämmen kann es zum Festliegen der Puten mit unkontrollierten Bewegungen von Kopf, Flügeln und Beinen kommen (PIACENTI et al., 2006).

ABUL-AZIZ und ARP (1983a, 1983b) zeigen, dass erwachsene Puten nach einer natürlichen Infektion mit lentogenen NDV keine klinischen Zeichen aufweisen. Experimentelle

Infektionen bei Küken weisen allerdings nach aerogener oder konjunkivaler Virusübertragung Schäden an den Epithelien des oberen Respirationstraktes und somit eine klinische Ausprägung auf (ABUL-AZIZ & ARP, 1983a und 1983b). Dahingegen blieben bei experimentellen Infektionen mit einem Hitchner B1-Stamm (BENGELSDORFF, 1974b; YADIN, 1976) und einem V4- (WESTBURY, 1981) klinische Symptome bei Küken aus.

### **2.5.2. Pathologie bei der Pute**

Bei infizierten Puten treten nach einer Newcastle Krankheit Infektion in unterschiedlichen Ausprägungen Milznekrosen mit oder ohne Splenomegalie, multifokale Blutungen und Ulzerationen im Magen-Darm-Trakt mit Pankreasnekrose und multifokale Blutungen in Trachea verbunden mit Nekrose der laryngealen Tonsillen auf (PIACENTI et al., 2006; WAKAMATSU et al., 2006).

### **2.5.3. Histologie bei der Pute**

Hauptsächlich treten lymphoide Abbau, Nekrosen und Ulzerationen des Darms nach einer ND-Infektion auf. Nach Infektionen können lymphoide Infiltrationen in den Augenlidern, Entzündungsreaktionen in den Luftsäcken, Trachea, Ösophagus, Magen und Pankreas auftreten. Lymphoide Abbau in Milz, Bursa, Thymus und Cäcal-Tonsillen sind zu beobachten (PIACENTI et al., 2006; WAKAMATSU et al., 2006).

PIACENTI et al. (2006) zeigt, dass die histologischen Untersuchungsergebnisse nach einer lentogenen Infektion minimal und nicht spezifisch sind. Somit ist es nicht ratsam sie für die Routinediagnostik der pathologischen Untersuchungen anzuwenden.

## **2.6. Diagnose von NDV**

Die Diagnostik der Newcastle Krankheit ist darauf ausgerichtet eine Infektion mit virulentem NDV gemäß den international bindenden Definitionen festzustellen. Gemäß der Definition der Europäischen Union (92/66/EWG) liegt ein Ausbruch durch das APMV-1 erst bei einem Intracerebralen Pathogenitätsindex (ICPI) bei Eintagsküken von über 0,7 vor.

Demgegenüber berücksichtigt die OIE bereits die molekularen Grundlagen der Virulenz: ND wird definiert als eine hoch kontagiöse Infektionserkrankung bei Geflügel, ausgelöst durch das NDV oder APMV-1, das entweder a) einen Intracerebralen Pathogenitätsindex in Eintagsküken (*Gallus gallus*) von  $\geq 0,7$  aufweist oder b) am C-Terminus des F2-Proteins mehrere basische Aminosäuren und Phenylalanin am Rest 117, welches der N-Terminus des F1-Proteins darstellt, aufweist. Mehrere basische Aminosäuren bedeuten dabei mindestens 3 Arginin- oder Lysinreste zwischen den Resten 113 und 116 (OIE, 2012). Sowohl für die EU

als auch bei der OIE sind standardisierte Methoden festgelegt („Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals; Chapter 2.3.14., Newcastle Disease 2008“; 92/66/EWG).

Die Diagnose einer Newcastle Krankheit erfordert dementsprechend einen direkten Erregernachweis und die labordiagnostische Typisierung der Viren als niedrig- oder hochvirulente Pathotypen (ALEXANDER, 2000). Klassisch erfolgt eine Erregeranzucht und anschließend eine Identifikation mittels APMV-1-spezifischer Referenzseren im Hämagglutinations-Hemmungstest (HAH) (OIE, 2012). Ein nachgewiesenes APMV-1 ist dann mittels ICPI bzw. durch die Bestimmung der Aminosäuresequenz im Bereich der proteolytischen Spaltstelle des F-Proteins zu pathotypisieren. Dabei ist für die EU der ICPI bindend, während für die OIE bereits der positive molekulare Nachweis einer multibasischen Spaltstelle des F-Proteins für die Diagnose eines virulenten NDV ausreicht.

Ebenfalls sind rRT-PCR/RT-PCR-Systeme verfügbar, die NDV-spezifische Genomabschnitte detektieren. Die Unterscheidung zwischen niedrig und hochpathogenen APMV-1 kann durch Sequenzierung erfolgen (MILLER et al., 2010).

Nach der positiven Diagnose in einem Bestand sind die staatlichen Bekämpfungsmaßnahmen nach der Geflügelpest-Verordnung anzuwenden.

### **2.6.1. Virusisolierung**

Orale, tracheale und kloakale Tupferproben werden zur Virusisolierung am lebenden und toten Tier verwendet. Die Tupfer sollten dabei nach der Probennahme in ein steriles Behältnis mit sterilem Phosphatpuffer (PBS) mit Antibiotikazusatz überführt werden und während des Transports (4°C) und der Aufbewahrung (-20°C) gekühlt werden. Ebenfalls kann eine Virusisolierung aus Organen (Lunge, Niere, Darm, Zäkaltonsillen, Milz, Gehirn, Leber, und Herz) von erkrankten euthanasierter oder verendeter Tieren erfolgen. Dabei werden embryonierte Eier am neunten bis elften Tag mit 0,2ml der Probensuspension beimpft und weiter inkubiert (35-37°C; 4-7 Tage) (ALEXANDER D.J. & SENNE, 2008). Nach Aufbewahrung der Eier im Kühlschrank (4°C; 4h), zum Abtöten der nicht gestorbenen Embryonen und kühlem Lagern der infizierten Eier wird mit der gewonnenen Allantoisflüssigkeit ein Hämagglutinationstest zur Titerbestimmung durchgeführt (ALEXANDER, 2000; ALEXANDER et al., 2004).

APMV-1 repliziert ebenfalls in einer Vielfalt von aviären und nicht aviären Zellkulturen, wie z.B. Hühnerembryoleberzellen (CEL), -nierenzellen (CEK), Hühnerembryofibroblasten

(CEF) und Afrikanischen-Green-Monkey-Nierenzellen (Vero), QM5- und CER-Zellen (TERREGINO & CAPUA, 2009). Nach einer Infektion der Zellkulturen ist das virale Wachstum durch Auseinanderreißen des Monolayers von einem sichtbaren zytopathogenen Effekts (cpe) und Synzytia-Bildung oder auch Plaquebildung begleitet.

Eine effektive Virusreplikation in Hühnerembryozellen ist abhängig vom Gehalt von  $Mg^{2+}$ -Ionen und Diethylaminoethylendextran oder Trypsin im Zellkulturmedium (CATTOLI et al., 2011). Newcastle Disease Viren geringer Virulenz benötigen den Zusatz von exogenem Trypsin um sich von Zelle zu Zelle auszubreiten und Synzytien in Zellkulturen zu formen, virulente Stämme benötigen diesen Zusatz nicht (HANSON, 1975; ROTT & KLENK, 1988).

### **2.6.2. Serologischer Nachweis**

Durch die relativ unspezifischen klinischen und pathologisch-anatomischen Befunde, anhand deren keine eindeutige Diagnose für die Newcastle Krankheit gestellt werden konnte, wurde die Entwicklung sicherer und effizienterer Nachweismethoden notwendig (HARTWIGK & HILBRECHT, 1953). Die serologischen Verfahren erfolgen üblicherweise durch die Untersuchung von Blutserum und dienen dem Antikörpernachweis (OIE, 2012). Für die Diagnostik können ebenfalls die Zerebrospinalflüssigkeit (ARX, 1986) und Dotterproben (DORN et al., 1973) verwendet werden. Der Hämagglutinations-Hemmungstest (HAH), der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) und der Virusneutralisationstest (VNT) haben sich weitgehend für die Diagnostik, Überwachung von SPF-Herden und für Impfkontrollen durchgesetzt. Die Diagnostik wird durch einen indirekten Erregernachweis mit dem HA, HAH, und VNT durchgeführt.

Der Hämagglutinations-Hemmungstest basiert auf die normalerweise durch Newcastle Disease Virus-Oberflächenproteine verursachte Erythrozyten-Agglutination. Die Neutralisation der Antigene durch die ND-Antikörper in den verdünnten Seren wird gezeigt durch die Hemmung der Agglutination und zeigt somit den Antikörpergehalt (HAH-Titer,  $\log_2$ ) im Probenblut (OIE, 2012; Chapter 2.3.14. Newcastle Disease).

Der Nachweis spezifischer Antikörper kann durch verschiedene ELISA-Kits erfolgen. Der quantitative oder qualitative Antikörpernachweis erfolgt dabei über eine Kopplung der Antikörper auf einer beschichteten Mikrotiterplatte in Reaktion mit zusätzlichen Antikörpern und Enzymen und der anschließenden photometrischen Messung. ELISAs können schnell und mit einer hohen Sensitivität und Spezifität durchgeführt werden und weisen eine Korrelation zu HAH-Titern auf (BROWN et al., 1990). Jedoch ergeben sich bei der Verwendung hohe Materialkosten und es müssen tierartsspezifische Kits verwendet werden.

Durch die Neutralisation der Infektiosität der NDV durch Antikörper, die gegen die HN- und F-Proteine gerichtet sind kann der Gehalt von virusneutralisierenden Antikörpern durch den Virusneutralisationstest bestimmt werden. Mit konstanter Serumverdünnung und in log<sub>10</sub>-Stufen steigenden Virusverdünnungen (alpha-Methode) oder mit konstanter Virusmenge und in log<sub>2</sub>-Stufen steigenden Serumverdünnungen (beta-Methode) in Hühnerembryofibroblasten (HEF) können die Antikörpertiter gemessen werden (KALETA, 1992). Das Absterben der Embryonen bzw. das Auftreten eines zytopathogenen Effekts (cpe) in den Zellkulturen gilt als Kriterium für Infektiosität.

### **2.7. Differentialdiagnosen der Newcastle Krankheit**

Die Manifestation der Newcastle Krankheit besteht vor allem im ZNS, Urogenitalsystem, im Atmungs- und Verdauungstrakt. Differentialdiagnostisch kommen dadurch viele weitere Erkrankungen in Frage. Hohe Verlustraten in den Beständen können jedoch auch technische und bauliche Mängel (Ausfall von Luft-, Wasser- oder Futterversorgung) sowie verschiedene Vergiftungen zugrunde liegen (KALETA, 1992).

Zu den Differentialdiagnosen gehören dadurch Erkrankungen wie die Klassische Geflügelpest (WERNER, 1998; SWAYNE, 2008), eine Paramyxovirus Typ 3-Infektion, die Infektiöse Laryngotracheitis (LT), die Mareksche Krankheit (MK), Geflügelpocken, die Geflügelcholera, die Chlamydiose (Psittakose/Ornithose), die Salmonellose, die Yersiniose, die Borreliose, intestinale Parasitosen und mehrere Vergiftungen (KALETA, 1992).

### **2.8. Erkrankung beim Menschen**

Die meisten Infektionen wurden bei Laborunfällen beobachtet bei denen unachtsam mit infiziertem Material oder Vögeln umgegangen wurde. Ebenfalls beim direkten Augenkontakt bei der Sprayvaksinierung (UTTERBACK & SCHWARTZ, 1973; BURRIDGE et al., 1975; JORGENSEN et al., 2000). NDV gilt als Zoonoseerreger und kann beim Menschen nach Kontakt mit hohen Virusmengen Tränenfluss, Augenlidödem, subkonjunktivale Blutungen, granulierende Konjunktividen oder grippeähnliche Symptome auslösen (CHANG, 1981; ALEXANDER, 2003; SWAYNE & KING, 2003). Die Erkrankung gilt als mild und heilt schnell ab. Die Virusreplikation bleibt auf die Schleimhäute der Augen begrenzt und die Hornhaut ist dabei nicht betroffen (LIPPMANN, 1952; HALES & OSTLER, 1973; KNORR & WEBER, 1992).

### **3. Das Newcastle Disease Virus**

#### **3.1. Taxonomie**

Das Newcastle Disease Virus oder auch Aviäre Paramyxovirus 1 (APMV-1) wird in der Ordnung der Mononegavirales und in die Familie der Paramyxoviridae eingeordnet (MAYO, 2002; FAUQUET & FARGETTE, 2005). Innerhalb der Unterfamilie Paramyxovirinae und Genus Avulavirus werden elf verschiedene APMV-Subtypen (BRIAND et al., 2012) des APMV-1 unterschieden (TUMOVA et al., 1979; KIM et al., 2011). Bedeutend als Krankheitserreger ist jedoch lediglich APMV-1 als Erreger der Newcastle Krankheit (BRIAND et al., 2012), die weltweit vorkommt und enorme wirtschaftliche Schäden in der Geflügelindustrie auslösen kann (LANCASTER, 1976; SPRADBOW, 1988).

#### **3.2. Klassifizierung**

Basierend auf phylogenetischen Untersuchungen lassen sich Viren des APMV- Subtyps 1 weiter differenzieren. Dabei sind zwei unterschiedliche Klassifizierungssysteme beschrieben (ALDOUS et al., 2003; KIM et al., 2007a; MILLER et al., 2010).

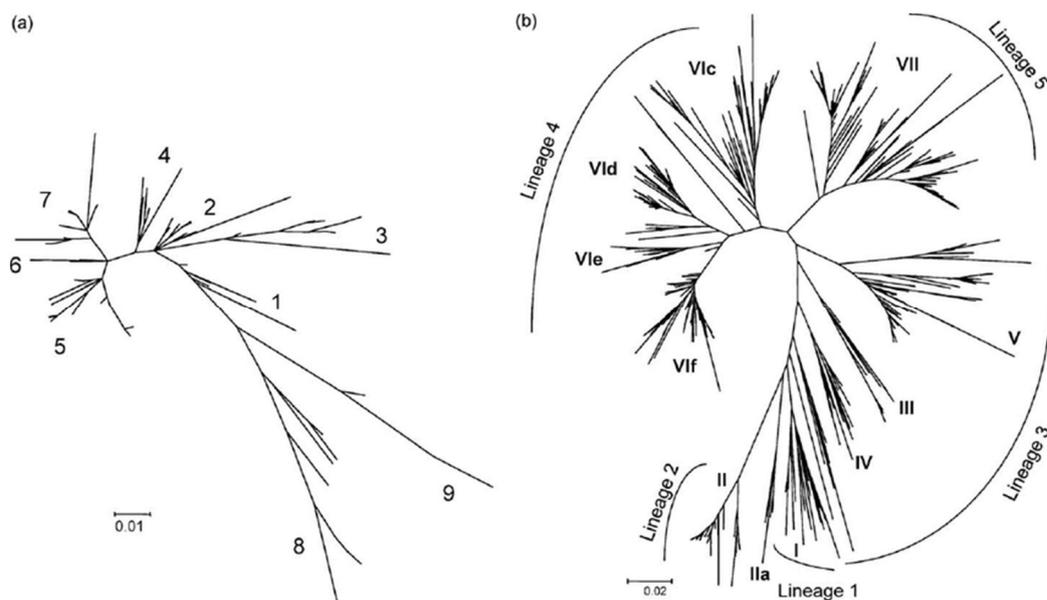
Das ursprüngliche System nach BALLAGI-PORDANY et al. (1996) unterteilt APMV-Subtypen in Klasse I und Klasse II. Das Genom der Klasse I-Viren besteht aus 15198 Nukleotiden (nt), das von Klasse II-Viren aus 15186 oder 15192 Nukleotiden (nt) (CZEGLEDI et al., 2006). Die Klassen werden weiterhin in Genotypen unterteilt, dabei wird die Klasse I in 9 und die Klasse II mittlerweile in 15 Genotypen unterschieden (BALLAGI-PORDANY et al., 1996; CZEGLEDI et al., 2006; KIM et al., 2007b; MILLER et al., 2010; DIEL et al., 2012).

APMV-1 der Klasse I weisen eine geringe Virulenz auf, sind weltweit verbreitet und wurden aus Vögeln von amerikanischen Geflügelmärkten, Hausgeflügel und wildlebenden Wassergeflügel isoliert. Die Viren der Klasse II können ebenfalls aus wildlebendem Wassergeflügel, Geflügel und als Haustier gehaltenen Vögeln isoliert werden. Dabei präsentieren die Genotypen I-IV und IX die „frühen“ Stämme, die zwischen 1930 und 1960 identifiziert wurden mit der kürzeren Genomlänge. In den Genotypen V-VIII und X mit der mittleren Genomlänge vereinigen die „späteren“, nach 1960, identifizierten Viren (MILLER et al., 2010). Die Genotypen III-IX und XI-XVI gelten alle als virulent, der Genotyp X als niedrig virulent (MILLER et al., 2011; DIEL et al., 2012).

Eine besondere Gruppe stellen in Tauben zirkulierende APMV-1 Viren der Klasse II; Genotyp VIb dar, die als sogenannter Taubentyp (PPMV-1; pigeon paramyxovirus-1)

zusammengefasst werden. Diese Viren sind Ende der 1970er Jahre bei Tauben aufgetreten. Die PPMV-1 Infektion tritt heute weltweit endemisch in dieser Spezies auf (ALEXANDER et al., 2004; SAIF et al., 2008).

Ein System nach Aldous et al. teilt NDV in sechs genetischen Hauptlinien (Lineage 1-6) und 13 Unterlinien (z.B. Sublineages 3a-d, 5a-e) ein, wobei später eine weitere Haupt- (Lineage 7) und 7 Unterlinien hinzugefügt wurden (ALDOUS et al., 2003; SNOECK et al., 2009; DIEL et al., 2012).



**Abbildung 2: Phylogenetische Stammbäume der NDV unter Verwendung der Neighbor Joining Methode.**

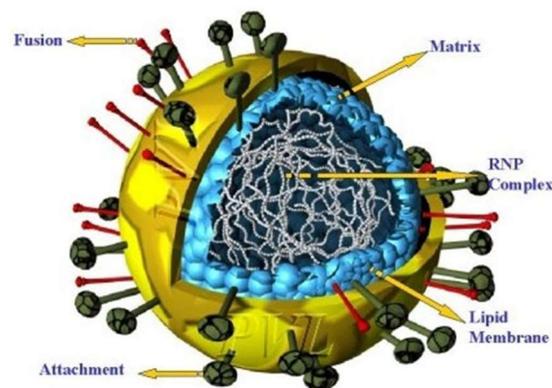
Darstellung der (a) Klasse I- (n=216) und (b) der Klasse II-Viren (n=956) (MILLER et al., 2010).

### 3.3. Virusstruktur

APMV-Viruspartikel besitzen eine pleomorphe Gestalt mit einem Durchmesser von etwa 150-300 nm. Die virale Hülle besteht aus einer Lipiddoppelschicht, die sich von der Plasmamembran einer infizierten Wirtszelle ableitet. Vor dem Abschnüren des Virions von der Wirtszelle werden ungleichmäßig die Fusions (F)- und Hämagglutinin-Neuraminidase (HN)-Proteine in die Plasmamembran eingelagert und ragen aus ihrer Oberfläche. Die virale Hülle ist von innen mit dem Matrix (M)-Protein ausgekleidet, das mit der Virushülle, der zytoplasmatischen Domäne der Oberflächenproteine HN und F und mit dem

Nukleokapsidprotein (NP) interagiert. Das NP umschließt helikal das virale Genom einer einsträngigen RNS und bildet gemeinsam mit dem Phospho (P)-, dem RNS-abhängigen Polymerase Large (L)-Protein den Ribonukleoproteinkomplex (RNP), die kleinste infektiöse Einheit des Virus (MODROW. S et al., 2010).

Dieser Komplex ist als linksgängige Helix mit einem Durchmesser von 14-17 nm aufgebaut, die in ihrem Inneren einen Hohlzylinder mit ca. 5 nm im Durchmesser ausbildet. Mit der RNS assoziiert sind 2400-2800 Einheiten des NP-Proteins (MODROW. S et al., 2010).



**Abbildung 3: Dreidimensionale schematische Darstellung eines Paramyxovirus.**

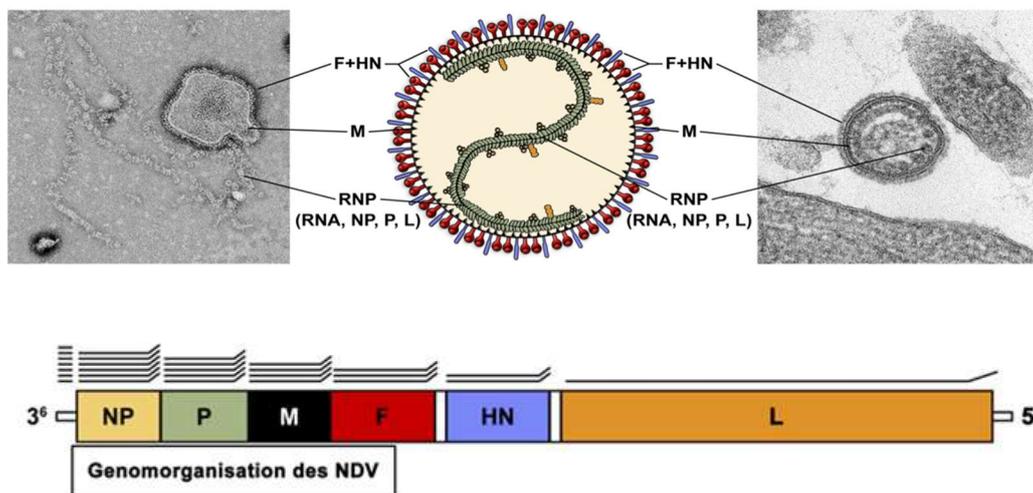
(University of Warwick, Pneumovirus Laboratory, UK).

### 3.4. Virusgenom

Das RNS-Genom besteht aus sechs Hauptgenen, die die Strukturproteine in der Reihenfolge von 3'-NP-P-M-F-HN-L-5' (CHAMBERS et al., 1986; WILDE et al., 1986) und zwei Nicht-Strukturproteine V und W kodiert (STEWART et al., 1993). Es besteht aus einer nichtsegmentierten, linearen, helikalen Einzelstrang-RNS mit negativer Polarität (REGENMORTELL et al., 2000). Man spricht dadurch auch vom sog. Minusstrang ssRNS-Genom (BRAUN & BARTENSCHLAGER, 2002; EASTON & PRINGLE, 2012; WANG et al., 2012). Durch die Negativstrangorientierung des Genoms wirkt die einzelsträngige RNS nicht als mRNA und ist, im Gegensatz zur RNS der Plusstrang-RNS-Viren, alleine nicht infektiös. Erst durch dessen neugebildeten komplementären RNS-Strang (mRNA). Für die Virusreplikation in der Wirtszelle greifen Minusstrangviren auf ihre, im Nukleokapsid enthaltene, RNS-abhängige RNS-Polymerase zurück (BRAUN & BARTENSCHLAGER, 2002).

In einem Komplex mit Proteinen (NP-, P- und L-Protein) liegt das Genom als Nukleokapsid vor. Eine hohe Proteinbeladung schützt das Genom vor einer Zerstörung mit Nukleasen und verleiht zusätzlich die nötige Flexibilität (MODROW. S et al., 2010).

Eine als *Leader* bezeichnete Sequenzfolge (52-54 Basen) befindet sich am 3'-Ende des Genoms, die transkribiert, jedoch nicht für Aminosäuren codiert wird. Am 5'-Ende des Genoms befindet sich der *Trailer*, ein nicht transkribierter Bereich von 40-44 Basen. Für die Bildung neuer Genomstränge und zur Verpackung der RNS-Moleküle liegen hier die *cis*-aktiven Initiationssignale für den Start der Polymerasereaktion (MODROW. S et al., 2010).



**Abbildung 4: Newcastle Disease Virus und Genomaufbau.**

Elektronenmikroskopische Aufnahmen und schematische Darstellung des NDV-Partikels und Genomaufbaus (FLI, 2006, elektronenmikroskopische Darstellung nach Granzow, schematische Darstellung nach M. Jörn).

### 3.5. Infektion und Virusreplikation

Die Infektion einer Wirtszelle erfolgt durch die Bindung des Virions des viralen Oberflächenproteins Hämagglutinin-Neuraminidase (HN) an sialinsäurehaltige Rezeptoren der Zelloberfläche. Dadurch ausgelöste Konformationsänderung des zweiten Oberflächenproteins, dem F-Protein, führt bei neutralem pH-Wert (MARSH & HELENUS, 1989; COUCEIRO et al., 1995; LAMB et al., 2005), zur Verschmelzung der Virus- mit der Plasmamembran. Vermittelt wird die Fusion durch eine Interaktion einer stark hydrophoben

Sequenzfolge am N-terminalen Ende eines C-terminalen Teilstückes des Fusionsproteins (F1-Protein) mit der Wirtsplasmamembran. Das C-terminale Ende des F1-Proteins bleibt dabei mit seinem transmembranen Anker mit der Virusmembran assoziiert. Nach dieser Membranverschmelzung gelangt das Nukleokapsid in das Zellinnere (LAMB & PARKS, 2007; FLINT et al., 2009). Bisher unbekannt ist der Mechanismus, welcher das Nukleokapsid vom unterhalb der Membran gelegenen M-Protein trennt und dann das Nukleokapsid ins Zellzytoplasma entlässt (YUSOFF & TAN, 2001).

Die Virusreplikation findet im Zytoplasma statt und startet mit einer sequentiell fortlaufenden Transkription der Virus-RNS zu mRNA. Das Capping, die Methylierung und die Polyadenylierung dieser m-RNAs, die als Template für die Translation der viralen Proteine dienen, erfolgt durch die virale RNS-abhängige RNS-Polymerase (LAMB & PARKS, 2007).

Die Translation der viralen Proteine NP, P und L findet am rauen endoplasmatischen Retikulum statt und bilden zusammen mit der neu synthetisierten viralen RNS die RNPs. Die Glykosylierung der Proteine HN und F und die Spaltung des F0-Vorläuferproteins (inaktiv) in seine Untereinheiten F1 und F2 (aktiv) erfolgt im Golgi-Apparat. Die Proteine werden an die Zelloberfläche transportiert wo der Zusammenbau und die Knospung neuer Viruspartikel stattfinden. Die Neuraminidase-Aktivität des HN-Proteins erleichtert das Ablösen des Virus von der Zelle und entfernt Sialinsäure-Rückstände von den neugebildeten Viruspartikeln um eine Selbstverklumpung zu verhindern (LALIBERTE et al., 2006; LAMB & PARKS, 2007).

Als Vorlage für die Synthese neuer Virusgenome dient zunächst ein aus dem RNP-Komplex gebildetes positiv-strängiges Antigenom (LAMB & PARKS, 2007), welches im Wandel als Vorlage für die Synthese der minus-strängigen Genom-RNS dient (HARRISON et al., 2010).

Die Genomlängen verschiedener ND-Viren unterliegen der „rule of six“ (PHILLIPS et al., 1998; PEETERS et al., 2000). Darunter versteht man, dass die Genomlängen einem Vielfachen von sechs Nukleotiden entsprechen müssen um die Replikation bei verschiedenen Vertretern der Virusfamilie (Paramyxoviridae) zu gewährleisten (CALAIN & ROUX, 1993; KOLAKOFSKY et al., 1998).

## **4. Schutz gegen die Newcastle Krankheit**

### **4.1. Impfung gegen die Newcastle Krankheit**

Die Schutzimpfung gegen die Newcastle Krankheit bei Hühnern zählt zu einer der ersten Schutzimpfungen bei landwirtschaftlichen Nutztieren. TRAUB (1943) entwickelte eine NDV-Adsorbatvakzine (Virus-Tot-Impfstoff), die erfolgreich gegen eine spezifische Tierseuche landesweit angewandt wurde.

Im Laufe der Zeit und durch weiteres Auftreten der ND mit unterschiedlichen Stämmen wurden Impfungen mit verschiedenen Impfstoffen durchgeführt. Die Anfänge der ND-Impfung lagen dabei in inaktivierten infektiösen Stämmen, welche Schutz für Hühner boten (SEAL et al., 2000; SAIF et al., 2008). Diese inaktivierten Impfstoffe waren jedoch nicht suffizient genug und mit dem Einfluss der zweiten Panzootie auf die Geflügelwirtschaft wurden neue Impfstoffe und –pläne entwickelt. Dadurch wurde der Gebrauch von Lebendimpfstoffen notwendig und unerlässlich. Wobei durch ihre Anwendung vermutlich die dritte Panzootie ausgelöst wurde. Sie schützten zwar die Geflügelbestände, jedoch brach die Erkrankung durch Adaption und Replikation der Virusstämme aus (ALEXANDER et al., 2012). Aus mesogenen Stämmen wie Roakin (BEAUDETTE et al., 1949) oder milderen Stämmen wie Hitchner B1 (HITCHNER & JOHNSON, 1948; HITCHNER, 1975) und LaSota (GOLDHAFT, 1980) wurden Lebendimpfstoffe entwickelt die bis heute ihre Anwendung finden (OIE, 2012).

Der hohe Besatz in Geflügelställen und die intensive Geflügelhaltung kommen nicht ohne gesetzlich vorgeschriebene und kontrollierte Schutzimpfungen gegen die Newcastle Krankheit aus.

In Deutschland ist der Umgang mit veterinärmedizinischen Impfstoffen durch das Tierseuchengesetz und der darauf basierenden Tierimpfstoff-Verordnung geregelt. Die Zulassung und die Prüfung dieser Impfstoffe unterliegt der TierImpfStV in der Bekanntmachung der Fassung vom 24. Oktober 2006. Für die methodische Prüfung der Impfstoffe gelten Formvorgaben aus dem Europäischen Arzneibuch (European Pharmacopoeia) und dem Deutschen Arzneibuch 10 (DAB10).

Staatliche Richtlinien für Herstellung der verschiedenen ND-Impfstoffe werden dabei über die Richtlinie 93/152/EWG (Entscheidung der Kommission vom 8. Februar 1993 über die Kriterien für Impfstoffe für Routineimpfungen gegen die Newcastle Krankheit) geregelt.

Die verarbeiteten Newcastle Disease Impfstoffe LaSota, Hitchner B1 und Villegas-Glisson/University of Georgia (VG/GA) werden der Klasse II, Genotyp II zugeteilt (PEROZO et al., 2008; MILLER et al., 2010). Dadurch, dass alle NDV zu einem Serotyp gehören, könnten jegliche NDV als Impfstamm benutzt werden. Studien dazu haben jedoch gezeigt, dass bei ähnlichem Impfstamm und Infektionsvirus der Wert an oropharyngealer viraler Ausscheidung und die Anzahl der virusausscheidenden geimpften Tiere abnimmt (MILLER et al., 2007; CHO et al., 2008; MILLER et al., 2009; XIAO et al., 2012).

#### **4.1.1. ND-Impfung bei der Pute**

Das Europäische Arzneibuch regelt die Zulassung eines ND-Impfstoffs je nach Impfvirus und Vogelart. Für die erfolgreiche Validierung eines ND-Lebendimpfstoffs bei Puten müssen 90% der geimpften Puten die darauffolgende Belastungsinfektion (virulentes APMV-1/i.m./21 Tage nach Infektion) gesund überleben und zusätzlich 90% der nicht geimpften Kontrollgruppe versterben bzw. schwer an der Newcastle Krankheit erkranken. Die Standards für einen ND-Lebendimpfstoff für Puten und andere Vogelarten sind im Europäischen Arzneibuch (European Pharmacopoeia 6.0-NEWCASTLE DISEASE VACCINE (LIVE) 01/2008:0450) beschrieben. Für die Immunisierung bei Puten gegen ND sind lediglich die Stämme LaSota und Clone 30 zugelassen (vgl. Tabelle 1). Bezüglich der Immunantwort und der Empfindlichkeit auf die Impfstoffe unterscheiden sich die Pute und das Haushuhn (*Gallus gallus*) deutlich. Puten reagieren dabei je nach Impfdosis und Applikationsweg im Vergleich zu Hühnern mit niedrigeren Antikörpertitern (GÜNTHER, 2011).

Die ND-Erstimpfung bei Puten wird normalerweise im Alter von ein bis fünf Tagen mit Lebendimpfstoffen durchgeführt. Die Zweit- und Drittimpfung mit einer inaktivierten Vakzine erfolgt anschließend in der zweiten und vierten Lebenswoche (GALLILI & BEN-NATHAN, 1998). Jedoch scheint die richtige Abstimmung des Impfzeitpunktes bei Puten ein wesentlicher Faktor für eine adäquate Schutzwirkung zu sein. So zeigen verschiedene durchgeführte Impfstudien mit Puten (mit und ohne maternale Antikörper) unterschiedliche Verläufe in der serologischen Auswertung und klinischen Beobachtung nach Belastungsinfektion (BENGELSDORFF, 1973 und 1974a; BOX et al., 1976; ALEXANDER et al., 1999). Eine Reifung des Immunsystems kann durch die Anwesenheit maternaler Antikörper, durch ein Abfangen der Impfvirus-Replikation, verhindert werden (SCHIJS et al., 2014). Eine Revakzination resultiert bei Puten mit höheren Antikörperwerten im Hämagglutinations-Hemmungstest und Virusneutralisationstest. Dabei kann der dritte Impfzeitpunkt bis zur 12.-13. Lebenswoche hinausgezögert werden (YADIN, 1976).

### **Empfohlener Impfplan bei Puten**

Zum Schutz der Putenbestände vor Erkrankungen und um eine Infektion zu verhindern wird folgender Impfzeitplan bei der Pute empfohlen (MSD, 2012).

<b>Alter</b>	<b>Impfung (alle lebend)</b>	<b>Applikation</b>
1. Woche	1. Turkey Rhinotracheitis	Trinkwasser/Spray
3. Woche	2. Turkey Rhinotracheitis	Trinkwasser
4. Woche	1. Newcastle Disease	Trinkwasser
8. Woche	3. Turkey Rhinotracheitis	Trinkwasser
9. Woche	2. Newcastle Disease	Trinkwasser
14. Woche	4. Turkey Rhinotracheitis (Hähne)	Trinkwasser
16. Woche	3. Newcastle Disease (Hähne)	Trinkwasser

#### **4.1.2. Ziele der ND-Impfung**

Zum Erreichen des gewünschten Impferfolgs sind die Einhaltung der vom Hersteller angegebenen sachgerechten Aufbewahrung, Impfstoffaufbereitung und –dosis und die ordnungsgemäße Applikation zu beachten (JUNGBÄCK & LEMKE, 1997). Ebenfalls muss vor Durchführung einer Schutzimpfung der Gesundheitszustand und somit die Impffähigkeit oder Impfwürdigkeit der Herde untersucht werden. Kriterien wie die epizootiologische Einheit, der allgemeine Gesundheitszustand, der Immunstatus, die Stresssituation, die Haltungs-, Ernährungs- und Fütterungshygiene der gesamten Herde stehen im Vordergrund. Manifest klinisch erkrankte Tiere bei schlechter Haltungshygiene sind nicht für die Durchführung einer Schutzimpfung würdig (REDMANN et al., 1992). Das Ziel einer Schutzimmunisierung besteht darin eine belastbare immunologische Antwort nach Applikation des Impfvirus zu induzieren ohne selbst eine Erkrankung auszulösen. Dabei sollten bei der Impfung gegen die Newcastle Krankheit neutralisierende Antikörper stimuliert werden, die gegen das virale Hämagglutinin- und das Fusions-Glykoprotein wirken. Ein Hämagglutinations-Hemmungstest-Titer ( $\log_2$ ) von  $\geq 4$  gilt dabei als schützend (OIE, 2012). Die Impfung induziert eine Immunantwort, die vor einer Erkrankung und Mortalität durch ND schützt, die virale Ausscheidung in die Umwelt verringert und die den Anteil der für eine Erkrankung notwendigen NDV erhöht (MARANGON & BUSANI, 2006; MILLER et al., 2009).

Die Herdenimmunität ist ein wichtiger Bestandteil für die Ausbreitung des Impfvirus innerhalb des Bestandes um einen langanhaltenden Schutz zu induzieren.

### **4.1.3. ND-Impferfolg und postvakzinale Komplikationen**

Zur Kontrolle einer Immunantwort nach durchgeführter ND-Impfung können als serologische Nachweismethoden der Hämagglutinations-Hemmungstest oder der Enzym-Linked Immunosorbent Assay verwendet werden (SIEGMANN & KALETA, 1973). Neutralisierende Antikörper gegen Newcastle Disease Viren schützen zwar vor einer klinischen Erkrankung, jedoch wird eine Infektion im Wirt mit Virusvermehrung und -ausscheidung nicht verhindert (REYNOLDS & MARAQA, 2000).

Als Komplikationen nach einer durchgeführten Impfung können eine Impferkrankung, ein Impfdurchbruch oder ein Impfschaden auftreten. Als Impferkrankung bezeichnet man dabei erregerspezifische Erkrankungen, die durch die vom Impfstoff enthaltenen vermehrungsfähigen, ungenügend oder nicht inaktivierten/abgetöteten Erreger oder ungenügend entgiftete Toxine verursacht werden. Impfdurchbrüche sind postvakzinale erregerspezifische Erkrankungen bei Impfungen, welche durch eine mangelnde oder ungenügende Wirksamkeit des Impfstoffs verursacht werden. Als Impfschaden werden letztlich postvakzinale Gesundheitsschäden eingeteilt, die nicht in Impferkrankung oder Impfdurchbruch eingeteilt werden und sind in Schäden zu Lasten des Impfstoffs und der Anwendungstechnik zu unterscheiden (MAYR et al., 1984).

### **4.1.4. Impfstoffe**

Gegen virale Infektionen zeigen durchgeführte Schutzimpfungen die Lösung zur Vermeidung der Erkrankung (SHARMA, 1999). Impfstoffe für Geflügel werden in Lebend- und Totimpfstoffe klassifiziert (BOX, 1984). Abhängig von Bestandsgröße, Haltungsbedingung, Impfstrategie und Art der Immunpräparate werden unterschiedliche Applikationsarten angewandt. Dabei werden grundsätzlich die Individual- von der Massenvakzination unterschieden. Inaktivierte und Lebendimpfstoffe gegen die Newcastle Krankheit induzieren eine lokale Immunität durch eine schleimhautinduzierte Immunantwort in der Trachea und im Darm (CHIMENO ZOTH et al., 2008). Durch die Verbreitung des Impfvirus unterhalb der Impflinge (an nicht oder nur suboptimal geimpfte Tiere) kann eine weitere Herdenimmunität ausgebildet werden (MARANGON & BUSANI, 2006). Das Ziel der Immunisierung der Herde liegt dabei in der Ausbildung in einem möglichst homogenen Antikörpertiters aller Tiere (ALLAN, 1975).

#### **4.1.4.1. Lebendimpfstoffe gegen die Newcastle Krankheit**

Die meisten Newcastle Krankheit Lebendimpfstoffe basieren auf lentogenen NDV-Stämmen wie zum Beispiel LaSota, Hitchner B1 und V4. Ebenfalls werden mesogene Viren (Roakin,

Mukteswar und Komarov) in zugelassenen Gebieten verwendet. Bei der Herstellung finden organische Stabilisatoren wie z.B. Laktose, Polypeptide und Puffer ihre Anwendung, die das Virus in lyophilisierter Form schützen. Die Aufbewahrung muss bei 4°C erfolgen um die Wirkung des Impfvirus nicht zu beeinträchtigen (GALLILI & BEN-NATHAN, 1998).

Nach der Richtlinie 93/152/EWG über die Kriterien für Impfstoffe für Routineimpfungen gegen die Newcastle Krankheit gelten nach Artikel 1 für attenuierte Lebendvakzine, die aus einem ND-Virusstamm hergestellt wurden für den Originalsaatvirus ein ICPI von 1.) > 0,4 bei Verabreichung von nicht weniger als  $10^7$  EID<sub>50</sub> oder 2.) > 0,5 bei Verabreichung von nicht weniger als  $10^8$  EID<sub>50</sub> an jeden Vogel (93/152/EWG).

Zur Herstellung von ND-Lebendimpfstoffen sind in Deutschland nur die NDV-Stämme Hitchner B1, LaSota, Ulster C2, Clone 30 und VG/GA zugelassen (vgl. Tabelle 1).

#### **4.1.4.2. Inaktivierte Impfstoffe gegen die Newcastle Krankheit**

Die Inaktivierung der Viren erfolgt durch die Zugabe von Formaldehyd oder die Behandlung mit  $\beta$ -Propiolacton in die Allantoisflüssigkeit. Die immunologische Wirkung des Impfvirus bleibt dabei erhalten. Für die intramuskuläre oder subkutane Verabreichung werden die inaktivierten Viren in eine Emulsion mit Mineral- oder pflanzlichem Öl gebracht.

Ebenfalls nach 93/152/EWG der Kommission des Europäischen Rates werden inaktivierte Vakzinen nach der Richtlinie aus ND-Virusstämmen hergestellt, dessen Originalsaatvirus bei Prüfung einen ICPI von > 0,7 bei Verabreichung nicht weniger als  $10^8$  EID<sub>50</sub> an jeden Vogel im ICPI Test aufweist (93/152/EWG).

Inaktivierte Impfstoffe werden meist in Legehennen und in Zuchtbetrieben verabreicht um langanhaltende hohe Antikörpertiter zu erreichen, die ebenfalls an die Nachzucht weitergegeben werden können (AL-GARIB et al., 2003b).

#### **4.1.4.3. Kombinationsimpfstoffe gegen die Newcastle Krankheit**

Eine Impfung gegen die Newcastle Krankheit kann auch durch die Benutzung von Kombinationsimpfstoffe durchgeführt werden. Die Impfstoffe enthalten zusätzlich weitere Antigene von unterschiedlichen Krankheiten. Durch ihre einmalige Applikation kann ein Schutz gegen mehrere Geflügelkrankheiten, wie zum Beispiel die Infektiöse Rhinotracheitis und Infektiöse Bursitis in Kombinations-Totimpfstoffen und die Infektiöse Bronchitis in Kombinat-Lebendimpfstoffen gleichzeitig aufgebaut werden (GALLILI & BEN-NATHAN, 1998).

## 4.2. Immunität gegen die Newcastle Krankheit

### 4.2.1. Immunsystem des Geflügels

Das Immunsystem hat die Aufgabe von außen wirkenden Mikroorganismen oder andere Noxen abzuwehren und den Organismus vor möglichen Erkrankungen und Schäden zu schützen. Die Abwehr erfolgt auf unterschiedliche Art sowohl über Barrieren der unspezifischen Abwehr als auch über Mechanismen der spezifischen Immunität. Es werden bei der Immunabwehr humorale, zellvermittelnde und lokale Immunmechanismen unterschieden. Zusätzlich wird das Immunsystem in angeborene und erworbene Immunität eingeteilt. Diese Systeme arbeiten ineinandergreifend miteinander (NEUMANN, U & KALETA, 1992).

Viele wichtige Erkenntnisse über das Immunsystem der Vögel ist über Untersuchungen und Versuche mit dem Haushuhn (*Gallus gallus domesticus*) bekannt. Große Unterschiede beim aviären Immunsystem zum Unterschied des Säugers zeigen Vögeln beim Vorhandensein zweier zentraler lymphatischer Organe, die dem Säuger fehlende Bursa Fabricii und des Thymus. Beide Organe stehen den Vögeln nur in bestimmten Entwicklungsphasen voll ausgebildet zur Verfügung und bilden sich nach Reifung und Prägung von Vorläufer-Stammzellen in antigenreaktive B-Lymphozyten in der Bursa-Fabricii und in T-Lymphozyten im Thymus zurück (NEUMANN, U & KALETA, 1992).

Die Immunität gegen ND wird durch eine Virusanheftung und –verbreitung von neutralisierenden Antikörpern, die gegen F- und HN-Proteine gerichtet sind, erreicht und infizierte Zellen werden durch natürlich Killerzellen (NK-Zellen) und zytotoxische T-Zellen abgetötet (AL-GARIB et al., 2003a).

Die Immunität gegen Infektionserkrankungen besteht bei Jungtieren bereits direkt nach dem Schlupf durch maternale Antikörper. So zeigen Küken mit maternalen Antikörpern einen Schutz gegen eine Infektion mit IBDV. Die maternalen Antikörper können jedoch ebenfalls eine Infektion mit Marek Disease Viren, Newcastle Disease Viren, Infektiöse Bronchitis Viren und Reoviren regulieren (CALNEK & SMITH, 1972; VAN DER HEIDE et al., 1976; DARBYSHIRE & PETERS, 1985).

Angeborene unspezifische Immunitätsmechanismen schützen das Geflügel vor äußeren Einflüssen und bevorstehenden Infektionen. Nach Eintritt der Infektionserreger in den Organismus findet ebenfalls eine zellvermittelte unspezifische Immunabwehr, eine humorale

Immunantwort (adaptive Immunantwort, erregerspezifisch) und allgemeine entzündliche Reaktionen statt.

Das Interferon-System (IFN) ist die erste Wirts-Reaktion auf eine Virusinfektion. Interferone können dabei die Virusreplikation hemmen und die Virusausbreitung kontrollieren. Dabei haben Paramyxoviren Mechanismen ausgebildet, die zum einen die INF-Produktion und zum anderen die INF-Signalantwort unterdrücken oder umgehen um der Immunantwort des angeborenen Immunsystems entgegen zu wirken (FONTANA et al., 2008; GOODBOURN & RANDALL, 2009; RAMACHANDRAN & HORVATH, 2009). Geflügel, das eine Infektion mit virulentem NDV überlebt hat baut eine anhaltende Immunität gegen zukünftige Infektionen mit NDV auf. Diese Immunität basiert auf 1.) zirkulierenden Antikörpern, 2.) sekretierten Antikörpern, die eine Immunität in den Schleimhäuten aufbauen und 3.) einer zellvermittelten Immunität (GRIMES, 2002).

#### **4.2.2. Maternale Immunität des Geflügels**

Die maternale humorale Immunität wird durch IgG (165-180 KD), als dominierendes Immunglobulin im Serum und in extravaskulären Körperflüssigkeiten (NEUMANN. U & KALETA, 1992) von immunen Elterntiere über den Dottersack und die Entwicklung im Ei auf das geschlüpfte Küken weitergegeben (HELLER et al., 1977). Während der Eibildung wird IgG aktiv vom Blut in den Dotter sezerniert (CUTTING & ROTH, 1973). Ab dem zwölften Tag der Embryonalentwicklung findet die Resorption des Dotter-IgGs in das Embryoblut statt. So dass IgG-Konzentrationen zum Zeitpunkt des Schlupfes nahezu den Werten der adulten Tiere entsprechen. IgA und IgM kommen bei Eintagsküken nur in geringen Mengen vor (KASPERS & GÖBEL, 2000). Humanes IgG und aviäres IgG weisen dabei physikochemische und immunologische Unterschiede auf. IgG induziert einen bedeutenden Schutz vor bakteriellen oder viralen Infektionskrankheiten bei jungen Küken (NEUMANN. U & KALETA, 1992). Maternale Antikörper haben in frischgeschlüpfen Küken nur eine geringe Halbwertszeit. Sie wird im Serum der geschlüpfen Küken auf drei bis sechs Tage abgeschätzt und damit übereinstimmend werden die maternalen Antikörper in einem Zeitraum von drei bis vier Wochen katabolisiert (Schijns et al., 2014).

Verschiedene Impfuntersuchungen bei Putenküken mit oder ohne maternaler Immunität haben gezeigt, dass die Interaktion maternaler Antikörper und Impfvirus die Ausbildung einer adäquaten Schutzwirkung verhindert (GLÜNDER et al., 2004). Zusätzlich wurde durch HODGINS et al. (1999) in keimfrei aufgezogenen Schweinen eine Interferenz zwischen maternalen Antikörpern und der Ausbildung einer effizienten Immunantwort durch eine

Hemmung von B- und T- Helferzellen, Antigenbearbeitung und Aktivierung von Suppressor-T-Zellen dargestellt.

Der Impferfolg ist abhängig vom Kükenalter und dem damit verbundenem Status der maternalen Antikörper der Impflinge. Durchgeführte aktive Schutzimpfungen bei jungen Küken können innerhalb dieser Zeitpunkte mit den hohen Werten von maternalen Antikörpern interferieren (GHARAIBEH & MAHMOUD, 2013). Deshalb sind Impfprogramme darauf ausgelegt die induzierte Schutzwirkung in vollem Ausmaß zu erreichen, ohne mit maternalen Antikörpern oder anderen Impfviren zu interferieren.

#### **4.3. Angeborene Immunität gegen ND**

Das angeborene Immunsystem umfasst Faktoren, die bereits vor Erstkontakt eines Krankheitserregers oder vor Beginn einer Infektion vorhanden sind. Dazu zählen physikalische und chemische Barrieren (Federn, Epithelien und Mukusproduktion), phagozytierende Zellen (Makrophagen und Natürliche Killerzellen), Komplement-Proteine und Entzündungsmediatoren und Zytokine. Diese Faktoren stehen nach einer Virusinfektion sofort zur Verfügung um das Viruswachstum und die –ausbreitung zu kontrollieren und zu hemmen (KAPCZYNSKI et al., 2013).

Die ersten Reaktionen des angeborenen Immunsystems werden durch Pattern Recognition Receptors (PRR) ausgelöst, die molekulare Marker (Pathogen-Associated Molecular Patterns; PAMP) von infektiösen Keimen erkennen. Diese Erkennung läuft entweder alleine oder über weitere PRRs (Toll-Like-Receptors; TLR; Nukleotide-Binding Oligomerization Domain Proteins; NOD oder RNS-Helikasen) zusammen ab, die intrazellulär die Aktivierung von Genen für pro-inflammatorische Zytokine, Anti-Apoptose-Faktoren und antimikrobielle Peptide auslösen. Viren werden durch Wirtsproteine wie TLR und NOD-Proteine erkannt und durch Interferone und Zytokine in der Ausbreitung und Replikation verhindert (KAPCZYNSKI et al., 2013).

RUE et al. (2011) zeigte die frühe Wirtsreaktion nach einer NDV-Infektion durch ein Isolat aus Kalifornien (CA02) bei Hühner. Dabei wurde eine frühe Reaktion in der Milz beobachtet mit einer antiviralen und pro-inflammatorischen Zytokin-Antwort. 48h nach Infektion wurden hohe Werte von INF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , verschiedene Zytokine und Chemokine gemessen.

#### **4.4. Zellvermittelte Immunitätsmechanismen gegen das NDV**

Die zellvermittelte Immunität gegen die Newcastle Krankheit gehört zur anpassungsfähigen Immunität die durch T-Lymphozyten (CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten)

vermittelt wird. Sie wird als bedeutender Faktor in der Abwehr von Hühnern gegen eine NDV-Infektion und in der Schutzwirkung einer NDV-Impfung gesehen (CANNON & RUSSELL, 1986; MARINO & HANSON, 1987; SHARMA, 1999). Bereits zwei bis drei Tage nach der ND-Infektion kann eine zellvermittelte Immunantwort bei Puten gemessen werden (GHUMMAN et al., 1976). T-Gedächtnis-, T-Helfer-, T-Suppressor- sowie T-Effektorzellen werden aus T-Zell-Populationen nach Antigenpräsentation auf körpereigenen Zellen zusammen mit Hilfe des Histokompatibilitäts-Komplex gebildet (SHARMA, 2003). Die zellvermittelte Immunität wird durch die humorale Immunantwort gegen NDV unterstützt. Was einen wichtigen Faktor für den Schutz gegen ND darstellt. Interleukin-4 verstärkt dabei die humorale Immunantwort (SAWANT et al., 2011).

#### **4.5. Humorale Immunität gegen das NDV**

Als Antwort des Immunsystems werden in Hühnern Antikörper wie IgA, IgY (aviäres IgG) und IgM gebildet (JEURISSEN et al., 2000). Nach ca. sechs Tagen können die Antikörper an der Infektionsstelle und im Blut nachgewiesen werden. Ein Höchstwert an Antikörpern besteht ca. 21-28h nach Infektion oder nach Impfung mit einem Lebendimpfstoff (ALGARIB et al., 2003a). Als humorale Erstantwort auf ein Antigen wird das Immunglobulin M produziert. Durch eine hohe Bindungsalenz werden ausgeprägte komplementbindende und agglutinierende Aktivitäten des IgM ermöglicht. Die maternale humorale Immunität wird durch IgG vermittelt. Immunglobuline A kommen im Serum, der Gallenflüssigkeit, der Darmspülflüssigkeit und vor allem auf den Schleimhäuten des Respirationstraktes und des Verdauungstraktes vor. Es verhindert dort das Anheften von pathogenen Keimen (SHARMA, 2003). Mit zunehmenden Konzentrationen der Immunglobuline im Serum und den Schleimhäuten erhöht sich die Überlebenschance für eine Belastungsinfektion. Dahingegen besteht jedoch immer noch ein Teilschutz bei sehr niedrigen bzw. nicht mehr nachweisbaren IgG-Werten (KALETA, 1992). Zum Nachweis und zur Bestimmung der Höhe der Antikörper können der Hämagglutinations-Hemmungstest, der Virusneutralisationstest oder der Enzym-Linked Immunosorbent Assay verwendet werden.

**Tabelle 1: In Deutschland zugelassene Geflügelimpfstoffe gegen die Newcastle Krankheit.**

Zugelassene Putenimpfstoffe sind blau hinterlegt (P.E.I., Bundesanzeiger-Veröffentlichung Nr. 407 vom 08.03.2015).

<u>Handelsname</u>	<u>Krankheit / Stoff- Indikations- gruppe</u>	<u>Zulassungs- inhaber</u>	<u>Zulassungs- nummer</u>	<u>Zulassungs- datum</u>	<u>Tierart</u>
Avinew	Newcastle Disease	Merial GmbH	PEI.V.02053.01 .1	05.03.2002	Huhn
AviPro ND C131	Newcastle Disease	Lohmann Animal Health GmbH & Co. KG	PEI.V.03159.01 .1	16.10.2006	Huhn
AviPro ND HB1	Newcastle Disease	Lohmann Animal Health GmbH	A11/79	10.03.1998	Huhn
AviPro ND LASOTA	Newcastle Disease	Lohmann Animal Health GmbH & Co. KG	200a/97	27.10.1998	Huhn, Pute
Gallimune 302 ND+IB+EDS	Newcastle Disease, Infektiöse Bronchitis, Egg Drop Syndrom	MERIAL GmbH	PEI.V.01042.01 .1	15.05.2000	Huhn
Gallimune 303 ND+IB+ART	Newcastle Disease, Infektiöse Bronchitis, Aviäre Rhinotracheitis	MERIAL GmbH	PEI.V.01041.01 .1	15.05.2000	Huhn
HatchPak Avinew	Newcastle Disease	Merial GmbH	PEI.V.03614.01 .1	27.05.2008	Huhn
Nobilis IB Multi+65ND+E DS	Infektiöse Bronchitis, Newcastle Disease, Egg Drop- Syndrome	Intervet Deutschland GmbH	206a/95	12.11.1998	Huhn
Nobilis IB Multi+ND	Infektiöse Bronchitis, Newcastle Disease	Intervet Deutschland GmbH	205a/95	29.04.1998	Huhn
Nobilis IB+G+ND	Infektiöse Bronchitis, Infektiöse Bursitis, Newcastle Disease	Intervet Deutschland GmbH	549a/93	04.11.1996	Huhn
Nobilis IB+ND	Infektiöse Bronchitis, Newcastle Disease	Intervet Deutschland GmbH	179a/96	02.01.1997	Huhn

<b><u>Handelsname</u></b>	<b><u>Krankheit / Stoff- Indikations- gruppe</u></b>	<b><u>Zulassungs- inhaber</u></b>	<b><u>Zulassungs- nummer</u></b>	<b><u>Zulassungs- datum</u></b>	<b><u>Tierart</u></b>
Nobilis IB+ND+EDS	Infektiöse Bronchitis, Newcastle Disease, Egg Drop-Syndrome	Intervet Deutschland GmbH	492a/93	04.11.1996	Huhn
Nobilis Ma5 + CLONE 30	Infektiöse Bronchitis, Newcastle Disease	Intervet Deutschland GmbH	190a/92	11.04.1996	Huhn
Nobilis ND + EDS 0,5	Newcastle Disease, Egg Drop- Syndrome	Intervet Deutschland GmbH	PEI.V.02861.01 .1	12.08.2003	Huhn
Nobilis ND C2	Newcastle Disease	Intervet Deutschland GmbH	PEI.V.03204.01 .1	02.05.2005	Huhn
Nobilis ND CLONE 30	Newcastle Disease	Intervet Deutschland GmbH	490a/93	21.07.1995	Huhn, Pute
Nobilis ND LaSota	Newcastle Disease	Intervet Deutschland GmbH	A170/79	12.06.1997	Huhn, Pute
Nobilis Newcavac	Newcastle Disease	Intervet Deutschland GmbH	PEI.V.02860.01 .1	12.08.2003	Huhn
Nobilis Reo+IB+G+ND	Reovirus- Infektion, Infektiöse Bronchitis, Infektiöse Bursitis, Newcastle Disease	Intervet Deutschland GmbH	91a/94	24.10.1996	Huhn
Nobilis RT+IB Multi+ G+ND	Aviäre Rhinotracheitis, Infektiöse Bronchitis, Infektiöse Bursitis, Newcastle Disease	Intervet Deutschland GmbH	PEI.V.00380.01 .1	08.07.1999	Huhn
Nobilis RT+IB Multi+ ND+EDS	Infektiöse Rhinotracheitis, Infektiöse Bronchitis, Newcastle Disease, Egg Drop- Syndrome	Intervet Deutschland GmbH	PEI.V.01030.01 .1	17.07.2000	Huhn
Poulvac ND Hitchner B1	Newcastle Disease	Zoetis Deutschland GmbH	PEI.V.00375.01 .1	22.04.1999	Huhn

<u>Handelsname</u>	<u>Krankheit / Stoff- Indikations- gruppe</u>	<u>Zulassungs- inhaber</u>	<u>Zulassungs- nummer</u>	<u>Zulassungs- datum</u>	<u>Tierart</u>
Poulvac NDW	Lebende Virusakzine zur aktiven Immunsierung von Hühner gegen die Newcastle Krankheit	Zoetis Deutschland GmbH	PEI.V.11749.01 .1	27.08.2014	Huhn
Trituren	Newcastle Disease, Paramyxovirose der Pute, Infektiöse Rhinotracheitis	MERIAL GmbH	38a/92	27.12.1994	Pute



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

#### **1. Zielsetzung**

Die folgenden genehmigten Tierversuche wurden durchgeführt um die Empfänglichkeit von Puten unterschiedlichen Alters auf NDV darzustellen. Des Weiteren sollte nach einer durchgeführten Schutzimpfung an unterschiedlich alten Putenküken mit verschiedenen Impfstoffkonzentrationen der optimale Impfzeitpunkt mit der geeigneten –dosis festgelegt werden. Im letzten Experimententeil wurden der Beginn und die Dauer der Immunität gegen eine durchgeführte Belastungsinfektion getestet. Dabei wurden die in den Vorversuchen erhobenen Ergebnisse eines geeigneten pathogenen Infektionsvirus, der beste Impfzeitpunkt mit einer geeigneten –dosis angewandt. Für die Ergebnisse dieser Zielsetzungen wurden die Virusausscheidung (Impf- / Infektionsviren), die serologischen Untersuchungen und der klinische Verlauf der Puten beobachtet.

#### **2. Material**

##### **2.1. Puten**

Für die Versuche wurden B.U.T. Big 6 Puten unterschiedlichen Alters (juvenil und adult) verwendet. Die juvenilen Tiere wurden dabei einen Tag nach dem Schlupf an das Friedrich-Loeffler-Institut (Insel Riems, Greifswald) gesendet. Die Einstellung der adulten Puten erfolgte ca. 2 Wochen vor dem jeweiligen Versuchsbeginn um den Tieren eine Eingewöhnungsphase in die neuen Räumlichkeiten zu gewährleisten. Die Einteilungen der Puten für die Versuche sind unter dem Punkt III.2.4. Infektions- und Impfpläne der Tierversuche beschrieben.

##### **2.2. Newcastle Disease Virusstämme**

Die Infektionen bei juvenilen und adulten Puten wurden mit den NDV-Stämmen Herts 33/56 (Weybridge 33/56) und R1468/12 (chicken/middle east/R1468/2012) im ersten Vorversuch durchgeführt. Nach der Impfung der Puten wurde als Infektionsvirus für die Belastungsinfektionen der im Europäischen Arzneibuch zur Überprüfung von Lebendimpfstoffen gegen die Newcastle Krankheit vorgeschriebene NDV-Stamm Herts 53/56 verwendet. Die entsprechende Kulturinfektiöse Dosis (KID<sub>50</sub>/ml) und Eiinfektiöse Dosis (EID<sub>50</sub>/ml) der ND-Viren sind in nachfolgender Tabelle 2 dargestellt. Die jeweiligen Belastungsinfektionen wurden mit unterschiedlichen Viruskonzentrationen durchgeführt. Die

Verdünnung der Stammviren erfolgte mit ZB12. Die Überprüfung der EID<sub>50</sub> der jeweiligen ND-Viren erfolgte durch eine Rücktitration auf LMH-Zellen.

**Tabelle 2: Newcastle Disease Viren – KID<sub>50</sub>/ml und EID<sub>50</sub>/ml.**

	<b>Herts 33/56</b>	<b>R1468/12</b>
KID <sub>50</sub> /ml	3,56 x 10 <sup>8</sup>	8,66 x 10 <sup>8</sup>
EID <sub>50</sub> /ml	1,8 x 10 <sup>9</sup>	3,4 x 10 <sup>9</sup>

### **2.3. Newcastle Disease Impfstoff**

Als Impfstoff wurde ein klonierter LaSota-Stamm (NDV Klasse II; Genotyp II, Klon 13-1) der Firma Lohmann Animal Health GmbH & Co. KG Cuxhaven (LAH) verwendet. Der Lebendimpfstoff AviPro ND C131 (Lyophilisat) wurde bis zur Verwendung bei 4°C gekühlt gelagert und kurz vor Gebrauch mit Aqua dest. aufgelöst. Die vorbereitete Suspension wurde bis zu den angewandten Impfstoffkonzentrationen verdünnt und den Versuchstieren oral verabreicht.

### **2.4. Infektions- und Impfpläne der Tierversuche**

Auf die Beschreibung der Tierversuche und die Gestaltung der Versuchskaskade wird ausführlich in Kapitel III.4. eingegangen, so dass an dieser Stelle darauf verwiesen wird.

Schematisch und tabellarisch aufgezeigt sind hier die 3 aufeinanderfolgenden Tierversuche (1-3) mit den Experimenten (i-vi) und den dazugehörigen Infektions- und Impfplänen im Anhang.



## 2.5. Stamm- und Gebrauchslösungen

Isotonische Kochsalzlösung **NaCl**, pH 7,2-7,4

Zellkulturmedium **ZB9h**; Anzuchtmedium

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 9,9g/l

Natriumhydrogencarbonat 0,86g/l

10% FBS (fetales Kälberserum)

pH 7,2

Zellkulturmedium **ZB12**; Erhaltungsmedium

**Hank's Salzlösung A** – Stammlösung

Natriumchlorid 160,0 g/l

Kaliumchlorid 8,0g/l

Magnesiumsulfat \* 7 H<sub>2</sub>O 2,0 g/l

Calciumchlorid \* 2 H<sub>2</sub>O 11,2 g/l

**Hank's Salzlösung B** – Stammlösung

Dextrose 20 g/l

Dinatriumhydrogenphosphat \* 2 H<sub>2</sub>O 1,2 g

Kaliumhydrogenphosphat 1,2 g

Hank's A- Stammlösung 37,5 ml/l

Hank's B- Stammlösung 37,5 ml/l

Natriumhydrogencarbonat 1,26 g/l

Lactalbuminhydrolysat 2,7g/l

Leibovitz 37,5 g/l

Phenolrot 0,4g/l

Reinstwasser 1000ml

pH 7,2

**ATV (Alsever's Trypsin-Versen-Lösung)**

Natriumchlorid 8,5g

Kaliumchlorid 0,4g

Dextrose 1,0g

Natriumhydrogencarbonat 0,58g

Trypsin (1:250) 0,5g

EDTA 0,2g

Reinstwasser auf 1l

pH 7,2, gelagert bis zur Verwendung bei -21°C; nach Anbruch bei 4°C

### **Antibiotika**

Baytril 10%, Bayer 1ml/100ml

Lincomycin 20% 0,5ml/100ml

Gentamicin 50 0,5ml/100ml

**Trypsin**, Bovine Pancreas, TPKC Treated, Enzyme, 2µg/ml

PBS (Phosphate Buffer Saline)

TBE (Tris Borate EDTA) Buffer

**Heparin** HEPARIN SODIUM 50mg/ml, Fa: Sigma-Aldrich

**Ethanol** ≥99,8 %Fa: Roth

**Isopropanol: 2-Propanol** Fa: Roth

**Isofluran CP®** zur Inhalation

### **NDV-NP-PCR**

nucleasefreies Wasser

AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents

-Q-Probe Mastermix

-RT Mix

Primer NDVnp-1066fw, 20pmol

- Sequenz: 5'-TGACAGYGACCAGATGAGCTT-3'

Primer NDVnp-1231rev, 20pmol

- Sequenz: 5'-CCTGAGCCTGAGCCTACTC-3'

NP-Sonde OLIGO1, 5pmol/µl-FAM

Negativ Kontrolle entspricht nuclease freiem Wasser

NP-Standard 10<sup>-5</sup> bis 10<sup>-10</sup>

Positiv Kontrolle NP-LaSota; Ct: 27-28,5

**NucleoSpin® 96 Virus Core Kit (MachereyNagel)****Tupfer RNA Extraktionskit: Qiagen-QIAamp® Viral RNA Mini Kit(50)****Organ RNA Extraktionskit: Qiagen- Mag Attract® Virus Mini M48 Kit(192)****2.6. Zellkulturen und Erythrozytensuspensionen****2.6.1. LMH-Zellen**

Zur Bestimmung der Kulturinfektiosen Dosis ( $KID_{50}/ml$ ) verwendeter Virusstämme und der Infektiosität in den gewonnenen Tupferproben wurden Zellen der Zelllinie LMH (Hepatomzellen, Leghornhuhn (KAWAGUCHI et al., 1987)) verwendet. Durch das Ablösen der LMH-Zellen mit ATV von den Kulturböden und Resuspension in Erhaltungsmedium wurde eine regelmäßige Vermehrung der Zelllinie durchgeführt. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 bis 1:4 in neue Zellkulturflaschen ( $25cm^2$ ; 10ml oder  $75cm^2$ ; 30ml) oder im Verhältnis von 1:2 auf Zellkulturgefäße (96 Loch-Platte; 100 $\mu$ l/Well) umgesetzt. ZB9h (10%FKS) und ZB12 als Erhaltungsmedium wurden bei der Vermehrung im Verhältnis 1:1 verwendet. Zur Infektion der Zellkulturgefäße, die zeitnah nach dem Umsetzen erfolgte, wurde ZB12 + 2 $\mu$ g/ml Trypsin verwendet. Kultiviert wurden die Zellen bei 37,5°C und 5,0% CO<sub>2</sub>.

**2.6.2. Erythrozytensuspension**

Wöchentlich frisch gewonnenes Hühnervollblut wurde mit Heparin (1:250) versetzt und gleich nach der Abnahme zentrifugiert (10min, 1500rpm), die Erythrozyten vom Blutplasma getrennt, mit ca. 35-40 ml NaCl gewaschen und anschließend wieder zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde drei mal wiederholt. Nach der Herstellung einer 1%igen Erythrozytenlösung mit NaCl wurde die Suspension zur Durchführung von Hämagglutinations-Hemmungstests innerhalb der nächsten vier Tage verwendet.

**2.7. Material für die Versuche mit Puten**

Die Stallungen der Puten wurden mit Beschäftigungsmaterial (Kunstrasen, Stofffetzen, Tücher und Schnüre) ausgestattet um die Tiere vor auftretendem Kannibalismus abzulenken. Zur besseren Beobachtung der Putengruppen und Festlegung der klinischen Einstufung (clinical score) wurden die Tiere mit Kartoffeln, Teigwaren, Salzgebäck oder Gemüse gefüttert. Die Raumtemperatur und Ausstattung der Stallungen mit Wärmelampen wurde dem Alter angepasst. Weitere Materialien für die Probennahme waren:

Blutabnahme:	Heparin-Monovetten Injektionsnadeln G20 und G22 Desinfektion
Tupferproben:	sterile Tupfer Eppendorfgefäß (2ml) + 1ml ZB12 (+Antibiotikazusatz)

### **3. Methoden**

#### **3.1. RNS-Aufarbeitung aus Tupferproben**

Zur Bestimmung der oralen und kloakalen Virusausscheidung bei Puten nach einer Newcastle Disease Impfung oder Infektion wurden den Tieren an festgelegten Tagen Tupferproben (je nach Tierversuch Einzel- oder Kombinationstupfer) aus Rachen/Choane und Kloake entnommen. Gleich nach der Probennahme wurden die Tupfer einzeln in 1ml Mediumsuspension (ZB12 + Baytril 10%) zur Aufarbeitung überführt. Die Weiterverarbeitung des Tupfermaterials erfolgte dabei immer zeitnah nach Probennahme. Nach Schütteln (IKA-VIBRAX-VXR; 20min; 2000rpm) und Zentrifugation (Firma Eppendorf centrifuge 5430R; 10min, 3000rpm) wurden 150µl in RAV1-Puffer (Macherey & Nagel, Düren) zur Extraktion und 100µl zur Messung der Infektiosität auf LMH-Zellen überführt. Tupferproben und extrahierte RNS wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -70°C gelagert.

#### **3.2. RNS-Aufarbeitung aus Organproben**

Während der Sektion der infizierten Puten wurden von unterschiedlichen Organen (Gehirn, Lunge, Duodenum, Pankreas und Niere) steril Proben entnommen. Die Organproben wurden in sterile 2ml-Eppendorfgefäße überführt. Bis zur Weiterverarbeitung erfolgte die Lagerung der Proben bei -70°C um eine Degeneration der RNS zu vermeiden. Zur Extraktion der viralen RNS aus den Organen wurde den Eppendorfgefäßen 1ml einer Mediumsuspension (ZB12 + Baytril 10% + Streptomycin + Gentamicin) und eine Stahlkugel im Durchschnitt von 5mm hinzugeführt. Anschließend wurde das Organgewebe mit Hilfe eines QuiShredder (Firma Quigaen, Hilden) bei 2 min und 30r/s mechanisch zerkleinert. Nach Überführen von 200µl Organsuspension in RV-Puffer erfolgte die Extraktion nach dem Protokoll von MagAttract® Virus Mini M48 Kit (192) (Firma Quiagen). Organsuspensionen und extrahierte RNS wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -70°C gelagert.

### 3.3. NP-RTqPCR

Nach der RNS-Extraktion aus Tupfer- und Organproben erfolgte der Nachweis NDV-spezifischer RNS mittels RTqPCR. 2,5µl RNS-Extraktion wurden mit 10µl Mastermix vermischt und mit folgendem Temperaturprofil mit einem Cycler der Firma BIORAD (CFX96™ Real-Time System) zur Reaktion gebracht. Nach jeder 8. Probe auf der 96-Loch-PCR-Platte wurden RNS interne Kontrollen (RIC) zur Kontrolle von Kontaminationen mitgeführt. Für den Ergebnisvergleich aller RTqPCR-Läufe enthielten alle PCR-Platten zusätzlich eine LaSota-NP Positiv Kontrolle (Ct. = 27-28,5), eine negativ Kontrolle (RNS freies Wasser) und eine NP-Standard-Verdünnungsreihe von  $10^{-5}$  bis  $10^{-10}$  aus der die Formel zur Berechnung der Genom Äquivalente (GEQ) der jeweiligen Probe pro Milliliter berechnet werden konnte. Für alle PCR-Läufe wurde ein Threshold von 800,00 festgelegt.

#### RTqPCR-Ansatz

Mastermix (pro Ansatz)

Nuclease freies Wasser	1,45 µl
Q-Probe Mastermix (AgPath-ID™)	6,25 µl
RT Mix (AgPath-ID™)	0,5 µl
Primer 1066 FW	0,5 µl
Primer 1231 Rev	0,5 µl
Sonde OLIGO1	0,8 µl

#### Temperaturprofil

Reverse Transkription	50°C, 30min
Aktivierung Taq Polymerase	95°C, 15min
Denaturierung	95°C, 30sec
Annealing	55°C, 30sec
Elongation	72°C, 30sec
42 Zyklen	

### 3.4. Serumgewinnung und -bearbeitung

Die verwendeten Blutproben wurden bei nicht infizierten und nicht geimpften Kontrollputen sowie geimpften und infizierten Puten an festgelegten Abständen und an den jeweiligen Versuchsenden als Vollblut gewonnen. Nach den Blutabnahmen erfolgte eine Zentrifugation (Firma Eppendorf, centrifuge 5810R; 10min, 3000rpm) und eine Überführung des

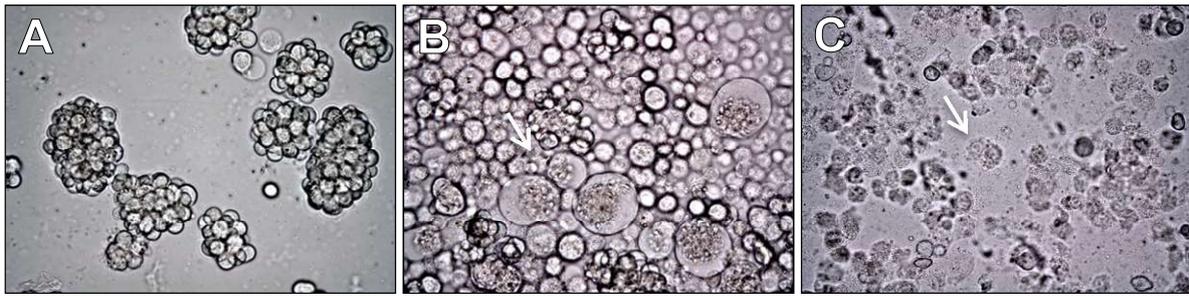
Überstandes in ein Eppendorfgefäß (2ml), eine Inaktivierung (Firma Eppendorf Thermomixer comfort; 30min, 56°C) und eine Lagerung bei -20°C bis zur Verwendung.

### **3.5. Hämagglutinations-Hemmungstest**

Die gewonnenen Blutseren wurden mit dem Hämagglutinations-Hemmungstest (HAH) nach den Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation (OIE, 2012) untersucht. Eingesetzte Antigene (NDV Herts 33/56, NDV R1468/12, einmalig im ersten Vorversuch Clone 30 und AviPro ND C131) wurden zuvor auf 4 hämagglutinierende Einheiten (HAU) mittels Hämagglutinationstest (HA) eingestellt. Für den HAH wurden 96-Loch-Mikrotiterplatten mit rundem Boden verwendet in die anstelle von PBS mit 25µl NaCl/Well vorpipetiert wurden. Anschließend wurden 25µl der Seren in das 1. Well gegeben und jeweils 25µl in die unteren fortfolgenden Wells überführt (log<sub>2</sub>-Verdünnung), zu jeder Serumverdünnung 25µl des voreingestellten Antigens hinzugefügt und vorsichtig geschüttelt. Nach 45 min Inkubation in der Abzugsbox wurde jedes Well mit 25µl einer 1% Erythrozytenlösung ergänzt und erneut leicht geschüttelt. Das Ablesen der Ergebnisse erfolgte 30 min später. Dabei galt die höchste Antiserumverdünnung, bei der die Agglutination gehemmt wurde als HAH-Titer (log<sub>2</sub>). Negativ- und Positivkontrollen wurden zum Vergleich und zur Kontrolle von Kontaminationen bei jedem Versuchsansatz mitgeführt. Putenseren ab einem HAH-Titer (log<sub>2</sub>) ≥3 wurden als positiv gewertet. Bei unspezifischen Reaktionen der Seren mit Hühnererythrozyten wurden die Proben erneut durch den HAH getestet jedoch zuvor vorbehandelt. Dies erfolgte durch das Mischen von 0,0025ml Serum und 0,0025ml einer 10% Erythrozytensuspension, 30 minütiger Inkubation bei 37°C, Zugabe von 0,05ml NaCl, erneutes Mischen und Absetzen lassen der Erythrozyten bei Raumtemperatur. Der entstandene Überstand entspricht einer 1:8 Serumverdünnung und wurde wie oben beschrieben neu getestet.

### **3.6. Infektion von LMH-Zellen**

Zur Messung der Infektiosität der Tupferproben und Bestimmung der EID<sub>50</sub>/ml verwendeter Impfstoff- und Infektionsviruskonzentrationen wurden LMH-Zellen mit den jeweiligen Proben infiziert und nach 72h Inkubation (35°C, 5,0% CO<sub>2</sub>) ausgewertet. Bei Auftreten eines zytopathogenen Effekts der LMH-Zellen wurde die Probe als positiv gewertet (vgl. Abbildung 6; B und C). Nach einer bakteriellen Besiedlung der entsprechenden Probe erfolgte eine erneute Infektion von frisch umgesetzten LMH-Zellen.



**Abbildung 6: Zytopathogener Effekt von NDV auf LMH-Zellen.**

**Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme.**

Dargestellt sind nicht infizierte LMH-Zellen die unter Zusatz von Trypsin kultiviert wurden (A). Nach Infektion bilden sich Riesenzellen (↑), die bereits 36 Stunden nach Infektion deutlich ausgeprägt sind (B; NDV Herts 33/56). Mit fortschreitender Zellzerstörung sind die Riesenzellen nur noch als Kernreste (↑) sichtbar (C; 40 h, NDV R1468/12).

### 3.6.1. Infektiosität Tupferproben

100µl Tupferprobe wurde mit 100µl ZB12 (Baytril 10% + Trypsin) 1:1 verdünnt und jeweils 50µl/Well auf eine vorbereitete 96-Loch-Zellplatte für einen 3er Ansatz übertragen. Proben, die nach 72h Inkubation bei mindestens 1 Well einen zytopathogenen Effekt (cpe) gezeigt haben wurden als positiv und somit infektiös gewertet. Bei jedem Probensatz wurde eine NDV-positiv Kontrolle auf der letzten Platte zum Vergleich der zytopathogenen Effekte mitgeführt.

### 3.6.2. Rücktitration Impfvirus/Infektionsvirus

Nach der Impfung oder Infektion der Versuchstiere wurden verwendete Viren zur Bestätigung der eingesetzten Dosis titriert und auf LMH-Zellen überführt. 25µl des Virus wurden mit 225µl ZB12 (+Trypsin) gemischt und im selben Verhältnis bis zu einer Verdünnungsstufe von  $10^{-10}$  verdünnt. 50µl der Verdünnungsstufen  $10^{-3}$  bis  $10^{-10}$  wurden im 4er Ansatz auf vorbereitete 96-Loch-Zellplatten überführt und nach 72h Inkubation ausgewertet.  $EID_{50}/ml$  der titrierten Viren wurden durch positiven cpe der jeweiligen Verdünnungsstufen berechnet.

### 3.7. Klinischer Score (c.s.) und Klinischer Index (c.i.)

Die Versuchsputen wurden täglich beobachtet und klinisch eingestuft. Dabei wurde ein Klinischer Score (clinical score; c.s.) verwendet, der den Krankheitszustand eines Tieres am jeweiligen Versuchstag beschreibt. Zur Einstufung zählten Scores von 0 = keine klinische Symptome, gesund; 1 = klinische Symptome, krank; 2 = schwer erkrankt, moribund und 3 =

tot. Zum Vergleich der Krankheitsverläufe unterschiedlicher Gruppen (Kontrollen, unterschiedliche Impfstoff-/Infektionsdosis) wurde aus der Summe der einzelnen clinical scores geteilt durch die Anzahl der Beobachtungszeiträume ein Klinischer Index (c.i.) für die jeweiligen Gruppen berechnet.

### **3.8. Tötung der Versuchstiere**

Juvenile Tiere wurden durch Kopfschlag betäubt und durch Blutentzug aus der V. jugularis getötet. Adulte und durch ihre Größe und Gewicht schwierig händelbare Puten wurden durch eine Inhalationsnarkose mittels Isofluran betäubt und ebenfalls durch Blutentzug getötet. Nach der Tötung wurden die Tiere in den Sektionsräumen seziiert, Organproben entnommen und pathologisch-anatomisch untersucht.

### **3.9. Auswertung der statistischen Analyse der Ergebnisse**

Die Daten aus den Tierversuchen wurden mit der Statistik-Software R (Version 2.14.0.) ausgewertet. Paarweise Vergleiche der klinischen Verläufe, viralen Ausscheidung des Impfvirus und der Infektionsviren und der serologischen Untersuchungen (HAH und  $\Delta$ HAH-Titer) wurden auf Signifikanz durch den paarweisen Wilcoxon-Test mit Bonferroni-Korrektur untersucht.

## **4. Tierversuche**

Die Impfungen und die Belastungsinfektionen wurden unter Biologischer Schutzstufe (BSL) 2 und 3 in den Stallungen des Friedrich-Loeffler-Instituts (Insel Riems, Greifswald) durchgeführt. Alle Tierexperimente standen unter den Vorschriften des Deutschen Tierschutzgesetzes und wurden mit der Tierversuchsantragsnummer LALLF M-V/TSD/7 221.3-2.2-024/13 geführt. Für alle tierexperimentale Teile war der Zugang zu den Tieren strikt für Pflege- und tierärztliches Personal limitiert. Als persönliche Schutzausrüstung trug das Personal zusätzlich Einmal-Untersuchungshandschuhe und eine Schutzbrille. Beim Verlassen der einzelnen Stallungen und des Gebäudes war eine Zwangsdusche (5min) angeordnet. Die Raumtemperaturen der verschiedenen Stallungen waren entsprechend der Putenaltersklassen und Gruppengrößen angepasst. Die Puten hatten jederzeit Zugang zu Tränken mit Trinkwasser und Futtertrögen, die täglich reichlich mit altersgerechtem Futter (ad libitum) gefüllt und kontrolliert wurden.

#### **4.1. Tierversuch 1: Empfänglichkeit juveniler und adulter Puten auf eine Newcastle Disease Virus Infektion**

Zur Testung der Empfänglichkeit eines pathogenen Newcastle Disease Belastungsvirus mit einer mindestens 90%iger Mortalitätsrate und die Ausprägung der Erkrankung bei relevanten Altersklassen wurden juvenile Puten im Alter von 28. Lebenstagen (Experiment i), 3 Wochen nach einer möglichen durchgeführten Immunisierung am 7. Lebenstag, und adulte Puten im Alter von 22 Lebenswochen (Experiment ii) am Ende einer möglichen Mastperiode infiziert. Für den Vergleich der Infektion wurden zwei verschiedene NDV-Genotypen (NDV Herts 33/56 und NDV R1468/12) mit unterschiedlichen Virusdosierungen und Applikationswegen (oculo-nasal und intramuskulär) verwendet.

Experiment i: Junge Puten (n=6) wurden in Käfige separiert. Die verschiedenen Gruppen (n=12) wurden entweder mit NDV Herts 33/56 oder NDV R1468/12 oculo-nasal oder intramuskulär mit unterschiedlichen Virusdosierungen ( $10^4$ ,  $10^5$  oder  $10^6$  EID<sub>50</sub>; 0,5 ml/Pute) am 28. Lebenstag infiziert.

Die Blutabnahmen für die serologischen Untersuchungen erfolgten am Tag der Belastungsinfektion und in wöchentlichen Abständen nach Infektion (7, 14 und 21 dpi) der juvenilen Puten. Die Testungen im HAH wurden mit dem jeweiligen homologen Antigen getestet. Tupferproben aus Choane und Kloake zur Messung der Virusausscheidung wurden an den Tagen 2, 4, 7, 10 und 14 nach Infektion genommen. Zur Testung der viralen Belastung von Lunge, Duodenum und Pankreas wurden bei den Putensektionen der juvenilen Tiere die Organe entnommen und durch die NDV-RTqPCR individuelle GEQ/ml der Organproben bestimmt.

Experiment ii: Adulte Puten (n=10/Gruppe) wurden in insgesamt 4 Gruppen in freier Bodenhaltung gehalten. Die Stallung war in 4 gleichgroße Abschnitte unterteilt wobei die unterschiedlichen Gruppen keine Verbindung untereinander hatten. Die Puten wurden intramuskulär mit NDV Herts 33/56 ( $10^4$ ,  $10^5$  oder  $10^6$  EID<sub>50</sub>; 0,5ml/Pute) oder NDV R1468/12 ( $10^6$  EID<sub>50</sub>; 0,5ml/Pute) in der 22. Lebenswoche infiziert.

Die Blutabnahmen erfolgten am Tag der Belastungsinfektion und in wöchentlichen Abständen nach Infektion (7, 14 und 21 dpi) bei den adulten Puten. Die Testungen im HAH wurden mit dem jeweiligen homologen Antigen getestet. Tupferproben aus Choane und Kloake wurden an den Tagen 2, 4, 7, 10, 14, 18 und 21 nach Infektion genommen. Zur Feststellung der Infektiosität wurden zusätzlich LMH-Zellen mit Tupfersuspension infiziert.

#### **4.2. Tierversuch 2: Bestimmung des optimalen Impfzeitpunktes und der notwendigen/geeigneten Impfstoffdosis**

Juvenile Puten unterschiedlichen Alters wurden zur Messung eines zuverlässigen Impfschutzes mit verschiedenen Impfstoffkonzentrationen oral immunisiert und 21 Tage nach Immunisierung mit einem ND-Infektionsvirus infiziert.

Experiment iii: Juvenile Puten wurden vor der Immunisierung am 7. Lebenstag in separierte Käfige untergebracht. 6 Gruppen wurden mit unterschiedlichen Dosierungen von AviPro ND C131 ( $I_7=10^7$ ,  $I_{2 \times 6}=2 \times 10^6$ ,  $I_6=10^6$ ,  $I_{5 \times 5}=5 \times 10^5$ ,  $I_5=10^5$  und  $I_4=10^4$  EID<sub>50</sub>; 0,5ml/Pute) oral immunisiert, die nicht immunisierte Kontrollgruppe (C; n=10) war ebenfalls gesondert untergebracht. 21 Tage nach der Immunisierung (28. Lebenstag) fand bei den immunisierten und nicht-immunisierten Kontrollgruppen die intramuskuläre Belastungsinfektion mit NDV Herts 33/56 oder NDV-Genotyp VII R1468/12 ( $10^6$  EID<sub>50</sub>; 0,5ml/Pute) statt.

Zum Vergleich der Experimente iii, iv und v werden in dieser Arbeit nur die Impfstoffkonzentrationen  $10^5$ ,  $10^6$  und  $10^7$  EID<sub>50</sub> und die Infektion mit NDV Herts 33/56 in den Ergebnissen beschrieben und gegenübergestellt.

Experiment iv und v: Diese Puten wurden ebenfalls in Bodenhaltung gehalten und an den 2 verschiedenen Immunisierungszeitpunkten (14. (iv) und 21. (v) Lebenstag) in 3 separate Gruppen (n=10 Puten) in Isolatoren untergebracht. Zur Immunisierung der jeweiligen Gruppen wurden orale Impfvirusdosierungen von  $10^5$ ,  $10^6$  und  $10^7$  EID<sub>50</sub> AviPro ND C131 (0,5ml/Pute) verwendet. 21 Tage nach Immunisierung erfolgte die Belastungsinfektion mit NDV Herts 33/56 ( $10^6$  EID<sub>50</sub>; 0,5ml/Pute) der jeweiligen Gruppen in gemeinsamer freien Bodenhaltung.

Für die serologische Untersuchung fanden die Blutabnahmen 21 Tage nach der Schutzimpfung sowie 7 und 14 Tage nach der Belastungsinfektion statt.

Kombinationstupferproben aus Choane und Kloake wurden an mehreren Tagen nach Immunisierung entnommen (7. LT (Experiment iii) =2, 4, 7 und 14 dpv; 14. und 21. LT (Experiment iv und v) =2, 4, 7, 10 und 14 dpv). Zur Untersuchung der Virusausscheidung nach der Belastungsinfektion wurden ebenfalls Kombinationstupfer aus Choane und Kloake entnommen. Die Probennahmen fanden zum jeweiligen Experimentaltail an verschiedenen Tagen nach Belastungsinfektion (2, 4, 7 und 10 dpc) statt. Zur Feststellung der Infektiosität wurden zusätzlich LMH-Zellen mit Tupfersuspension infiziert.

Allen moribund erkrankten und verstorbenen Puten der 2. und 3. Lebenswoche (Experiment iv und v) wurden Organe (Lunge, Niere, Duodenum, Pankreas, Gehirn) bei der Sektion entnommen und die virale Belastung (GEQ/ml) durch die RTqPCR gemessen. Für die Testung wurden jeweils die Organe eines Tieres in einem Probenansatz gepoolt.

#### **4.3. Tierversuch 3: Bestimmung des Einsetzens und der Dauer der Immunität nach einfacher Impfstoffgabe**

Zur Bestimmung des Einsetzens und der Dauer der Immunität nach oraler Impfung mit AviPro ND C131 wurden jungen Puten in Bodenhaltung getrennt in eine immunisierte (n=194) und eine nicht immunisierte Kontrollgruppe (n=94) innerhalb 2 Stallungen untergebracht (Experiment vi). Die Immunisierung fand am 21. Lebenstag mit einer Dosis/Pute ( $10^{6,3}$  EID<sub>50</sub>; 0,5ml) statt. An unterschiedlichen Zeitpunkten (1, 7, 14, 21, 35, 42 und 56 Tage nach Immunisierung) wurden 20 immunisierte und 10 nicht immunisierte Kontrolltiere wieder jeweils nach Gruppen räumlich abgesondert in 2 weiteren Stallungen pro Infektionszeitpunkt intramuskulär mit NDV Herts 33/56 ( $10^6$  EID<sub>50</sub>; 0,5ml/Pute) infiziert. 2 Tage nach der Belastungsinfektion wurden jeweils ein immunisiertes und ein nicht immunisiertes Sentineltier zu den 2 infizierten Gruppen (geimpfte und nicht geimpfte Kontrollgruppe) dazu gesetzt.

Um die Immunantwort auf die durchgeführte Belastungsinfektionen zu untersuchen wurden die Blutserumproben am Ende des Beobachtungszeitraums, also am Tag 14 (Gruppen 1, 7, 14 und 56 dpv) bzw. am Tag 21 nach Belastungsinfektion (Gruppen 21, 35, und 42 dpv) genommen und mit dem Hämagglutinations-Hemmungstest getestet. Als Antigen wurde der Impfstamm AviPro ND C131 verwendet. Zur Messung der viralen Replikation wurden 2, 4, 7 und 10 Tage nach Impfung und an 2, 4 und 7 Tage nach Belastungsinfektion Kombinationstupfer aus Choane und Kloake von immunisierten und nicht immunisierten Puten genommen. Die Tupfer wurden mit der NDV-RTqPCR ausgewertet und zusätzlich LMH-Zellen mit Tupfersuspension zur Feststellung der Infektiosität infiziert. Organe (Gehirn, Lunge, Duodenum und Pankreas) immunisierter und nicht immunisierter Puten wurden bei der Sektion entnommen und mittels NDV-RTqPCR untersucht.

## **IV. ERGEBNISSE**

### **1. Empfänglichkeit juveniler und adulter Puten auf eine Newcastle Disease Virus Infektion**

#### **1.1. Infektionsverlauf in juvenilen Puten**

In einem Vorversuch (Experiment i) mit juvenilen Puten (J) wurde die klinische Ausprägung der NDV-Infektion in 28 Tage alten Putenküken ermittelt. Der Zeitpunkt wurde gewählt um die klinische Manifestation drei Wochen nach einer potentiellen Impfung in der ersten Lebenswoche zu ermitteln. Vergleichend wurden ein klassischer NDV-Stamm aus den 50er Jahren (Herts 33/56) sowie ein aktuell zirkulierender NDV-Stamm (chicken/middle east/R1468/2012) getestet, die in drei verschiedenen Konzentrationen ( $10^4$  EID<sub>50</sub>=4,  $10^5$  EID<sub>50</sub>=5 und  $10^6$  EID<sub>50</sub>=6) jeweils oculo-nasal (o) und intramuskulär (m) verabreicht wurden. Blutproben die von 8 juvenilen Puten am Tag der Infektion (28. Lebenstag) abgenommen wurden wiesen im HAH keine NDV-spezifischen Antikörper auf. Sowohl mit dem Stamm Herts 33/56, R1468/12 als auch Clone30 als Antigen lagen die HAH-Titer ( $\log_2$ ) < 2.

##### **1.1.1. Klinische Manifestation**

Die ersten klinischen Krankheitszeichen nach Infektion mit dem Stamm NDV Herts 33/56 traten 3 Tage nach oculo-nasaler (o.n.) Infektion auf und äußerten sich bei 2 Tieren, die mit einer Dosis von  $10^5$  EID<sub>50</sub> (JH5o) infiziert waren in Form von Apathie und Somnolenz (Abbildung 8). An den darauffolgenden Tagen erkrankten in nahezu allen Gruppen mehrere Puten (Abbildung 8). Bereits 4 Tage nach der Infektion traten moribund erkrankte Tiere in beiden Virusgruppen ( $10^5$  und  $10^6$  EID<sub>50</sub>) auf. Todesfälle ereigneten sich zwischen 6 und 9 dpi. Die letzte Pute erkrankte 10 Tage nach der Virusapplikation (NDV Herts 33/56, o.n.,  $10^4$  EID<sub>50</sub>). Alle mit NDV Herts 33/56 infizierten Gruppen zeigten Morbiditätsraten von 100% mit einer Mortalität von 60-100% (Tabelle 3).

Der klinische Verlauf einer NDV-Infektion mit dem Isolat R1468/12 zeigte insgesamt ein milderes Krankheitsgeschehen als nach einer Infektion mit Herts 33/56: Die ersten Puten erkrankten nach 4 dpi mit Todesfällen ab 4 dpi in der höchsten Virusdosierung nach einer oculo-nasalen Applikation. Todesfälle ereigneten sich zwischen 4 und 8 Tagen nach der Infektion. Die Klinischen Indizes (c.i.) dieser Infektionsgruppen wiesen bei 5 Gruppen Werte unter 2 auf. Lediglich nach einer intramuskulären Infektion mit der höchsten Dosierung ( $10^6$  EID<sub>50</sub>) lag der Wert mit 2,43 wie bei 5 der 6 mit Herts 33/56 infizierten Gruppen über 2. Die

Mortalitätsraten waren bei insgesamt 4 der 6 Vergleichspaarungen geringer als bei den mit Herts 33/56 infizierten Gruppen gleicher Dosis und Applikationsart. Während in den mit  $10^4$  und  $10^5$  EID<sub>50</sub> i.m. infizierten Gruppen die Mortalität bei 50% (JR4m) und 66% (JR5m) lag, betrug sie bei den vergleichbaren Herts 33/56 infizierten Gruppen 83% (JH4m) und 100% (JH5m). Nach oculo-nasaler Infektion lag in den mit  $10^5$  und  $10^6$  EID<sub>50</sub> infizierten Gruppen die Mortalität bei 50% (JR5o) bzw. 66% (JR6o) während sie bei Herts 33/56 infizierten Tieren bei 100% (JH5o) bzw. 83% (JH6o) lag. Insgesamt traten Mortalitätsraten zwischen 50-100% auf (Tabelle 3).

Allgemein trat eine Verschlechterung des klinischen Zustandes lediglich innerhalb des dargestellten Beobachtungszeitraumes der ersten 14 dpi auf. Bei 5 erkrankten Puten, die verschiedenen Gruppen angehörten (JH4o, JH6o, JR4m, JR5m und JR5o) verbesserte sich der klinische Zustand bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes von 21 dpi. Lediglich ein erkranktes Tier in der Gruppe JH4m wies Krankheitszeichen bis zum Ende des Experiments auf.

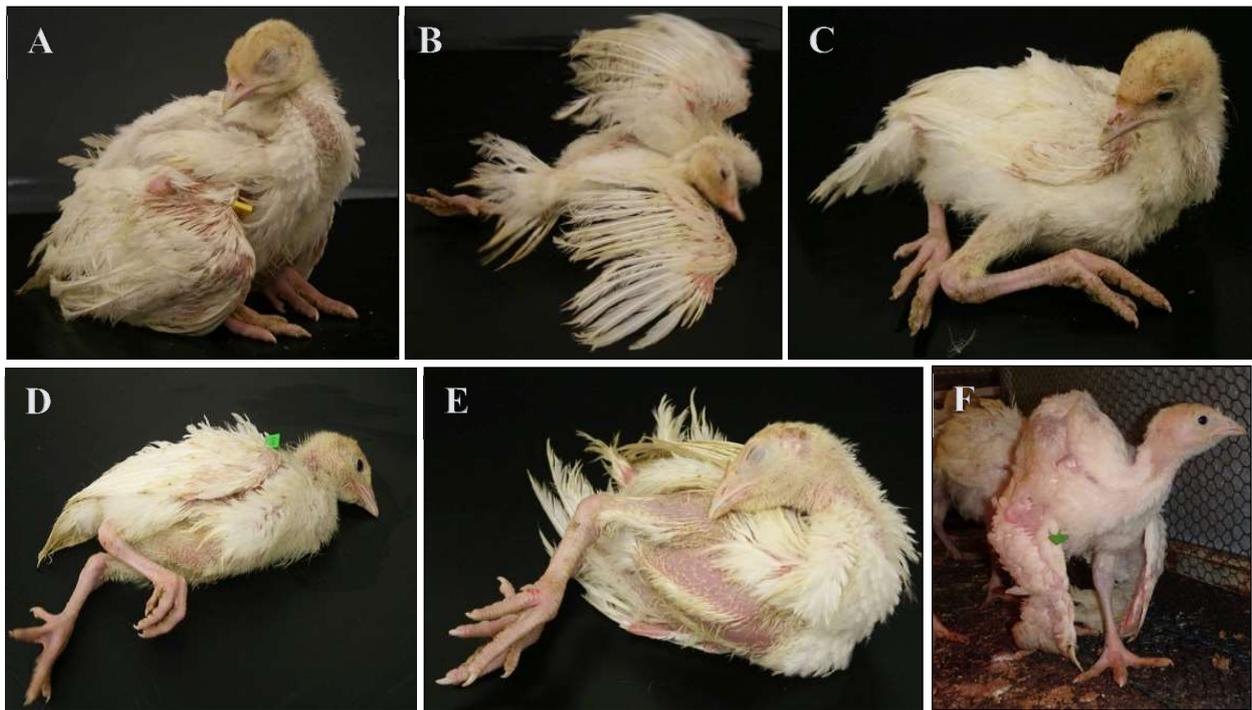
Eine Dosisabhängigkeit des klinischen Verlaufs trat differenziert nach Virusstamm und Inokulationsart auf. Eine Infektion der Puten mit NDV-Stamm Herts 33/56 führte nach i.m. Inokulation bereits in der Gruppe mit  $10^4$  EID<sub>50</sub> zum Tod von 5 der 6 Tieren (JH4m). In den nachfolgenden höheren Dosierungen lag dann die Mortalität jeweils bei 100%.

Demgegenüber führte die i.m. Infektion mit dem NDV-Stamm R1468/12 erst bei der Dosierung von  $10^6$  EID<sub>50</sub> zur 100%igen Mortalität, während bei den Gruppen die mit  $10^4$  EID<sub>50</sub> und  $10^5$  EID<sub>50</sub> infiziert wurden lediglich 3 bzw. 4 Tiere verstarben (Abbildung 8). Diese Dosisabhängigkeit trat nach o.n. Inokulation nicht so deutlich auf. In der mit Herts 33/56 infizierten Gruppen erhöhte sich die Sterblichkeit von 4 auf 6 von 6 Tieren bei Erhöhung der Infektionsdosis von  $10^4$  EID<sub>50</sub> auf  $10^5$  EID<sub>50</sub>. Allerdings trat in der mit  $10^6$  EID<sub>50</sub> o.n. inokulierten Gruppe dann wieder ein überlebendes Tier auf. In den mit R1468/12 o.n. infizierten Gruppen war kein Einfluss der Dosis sichtbar.

Im Vergleich der Applikationswege war nach oculo-nasaler Applikation die klinische Ausprägung etwas geringer. Der Unterschied war insbesondere in den mit  $10^6$  EID<sub>50</sub> infizierten Gruppen evident: So überlebte nach oculo-nasaler Applikation in der NDV Herts 33/56 Gruppe ein Tier, in der mit R1468/12 sogar zwei Tiere, während die i.m. Inokulation in den korrespondierenden Gruppen zu 100% Mortalität führte.

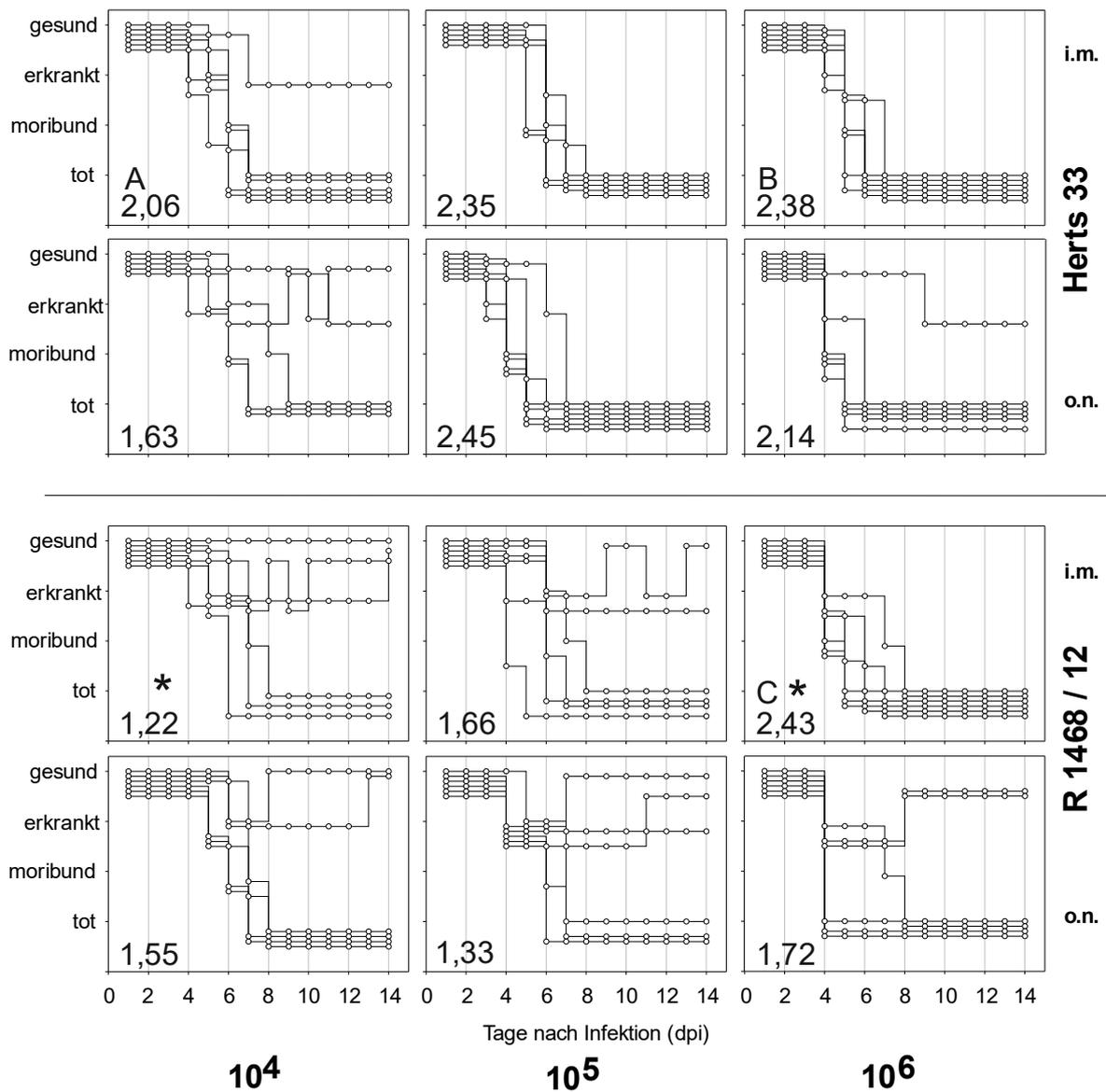
Basierend auf diesen Ergebnissen erwies sich der Infektionsstamm NDV Herts 33/56 als ein robuster ND-Infektionsstamm, der ab einer Dosierung von  $10^5$  EID<sub>50</sub> intramuskulär verabreicht, zu einer Mortalität von 100% führt.

Jeweils eine Pute der Gruppen JH4o und JH5m mussten aus Gründen des Tierschutzes verletzungsbedingt und infektionsunabhängig getötet werden.



**Abbildung 7: Klinische Zeichen nach NDV-Infektion juveniler Puten.**

Dargestellt sind klinische Bilder nach einer Infektion von juvenilen Puten am 28. Lebenstag. Die Puten zeigten Krankheitszeichen wie Apathie mit Flügellähmung (A), beidseitige Lahmheit der Flügel und Beine (B), Seitenlage unterschiedlicher Ausprägungen - Lahmheit der Beine (C), mit Apathie (D), mit Torticollis und zentralnervösen Störungen (E) und beidseitige Flügellähmung ohne zentralnervöse Beteiligung (F).



**Abbildung 8: Klinischer Verlauf bei juvenilen Puten nach intramuskulärer oder oculo-nasaler NDV-Infektion (Herts 33/56; R1468/12) unterschiedlicher Konzentrationen.**

Juvenile Puten wurden am 28. Lebenstag mit unterschiedlichen Viruskonzentrationen von NDV Herts 33/56 (JH4=10<sup>4</sup>, JH5=10<sup>5</sup> und JH6=10<sup>6</sup> EID<sub>50</sub>) oder NDV R1468/12 (JR4=10<sup>4</sup>, JR5=10<sup>5</sup> und JR6=10<sup>6</sup> EID<sub>50</sub>) infiziert. Die Infektion erfolgte intramuskulär (i.m.; M. pectoralis profundus) oder oculo-nasal (o.n.). Abgebildet sind die individuellen klinischen Verläufe der einzelnen Puten unterschiedlicher Gruppen und der jeweilige Klinische Index (c.i.).

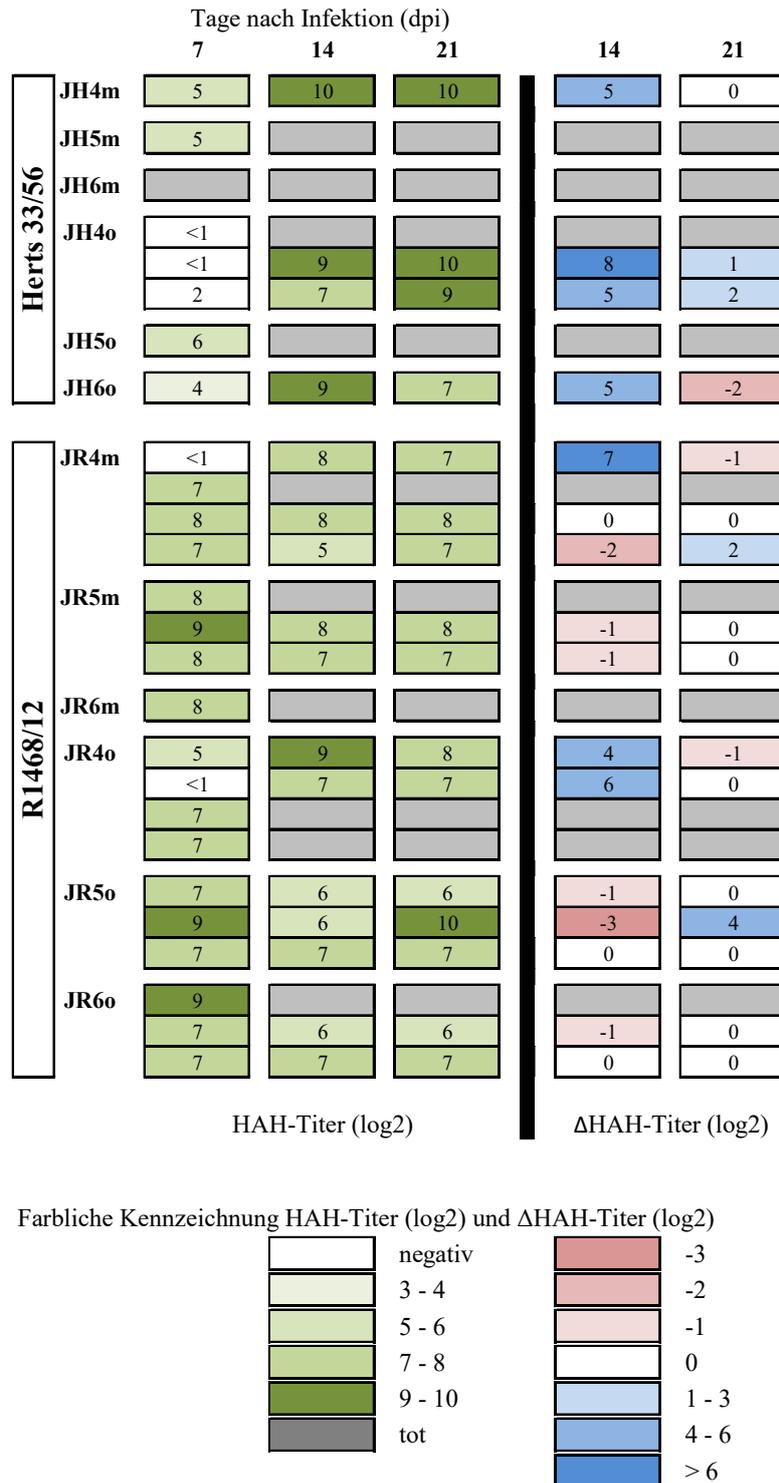
Signifikante Unterschiede sind im Vergleich der juvenilen Putengruppen mit (\*) und zur dazugehörigen adulten Gruppe gleicher Viruskonzentration mit (A-C, vgl. Abbildung 12) gekennzeichnet. Die signifikanten Unterschiede sind angegeben nach paarweisem Wilcoxon-Test mit Bonferroni-Korrektur ( $p < 0,05$ ).

**Tabelle 3: Mortalitätsraten juveniler Puten nach intramuskulärer oder oculo-nasaler NDV-Infektion.**

	<b>10<sup>4</sup></b>	<b>10<sup>5</sup></b>	<b>10<sup>6</sup></b>
<b>JHm</b>	83%	100%	100%
<b>JHo</b>	60%	100%	83%
<b>JRm</b>	50%	66%	100%
<b>JRo</b>	66%	50%	66%

### 1.1.2. Antikörperantwort

Von 25 juvenilen Puten, die die ersten 7 Tage einer Belastungsinfektion überlebten und serologisch am Tag 7 nach Infektion (dpi) untersucht wurden, serokonvertierten 20 Tiere innerhalb der ersten Woche (Abbildung 9). In den mit dem NDV-Stamm R1468/12 inokulierten Gruppen konnte in 16 von 18 Tieren APMV-1-spezifische Antikörper nachgewiesen werden, von denen allerdings in Folge 6 Tiere verstarben. Beide am Tag 7 sero-negativen Tiere überlebten dagegen die Infektion und ab Tag 14 pi waren APMV-1-spezifische Antikörper nachweisbar. Von den mit Herts 33/56 inokulierten Gruppen wiesen 4 von 7 Tiere bereits am Tag 7 nach der Infektion APMV-1-spezifische Antikörper auf, von denen wiederum 2 Tiere im Anschluss verstarben. Demgegenüber überlebten 2 der 3 ursprünglich sero-negativen Tiere, mit Nachweis APMV-1-spezifischer Antikörper ab dem Tag 14. Untersucht man den Verlauf der Antikörperspiegel, so lässt sich feststellen, dass es bei immerhin 7 Tieren zwischen Tag 7 und Tag 14 pi zu einem Anstieg der HAH-Titer (log<sub>2</sub>) von >3 kam, währenddessen ein Antikörperanstieg zwischen Tag 14 und 21 pi lediglich bei vier Tieren nachweisbar war (Abbildung 9).

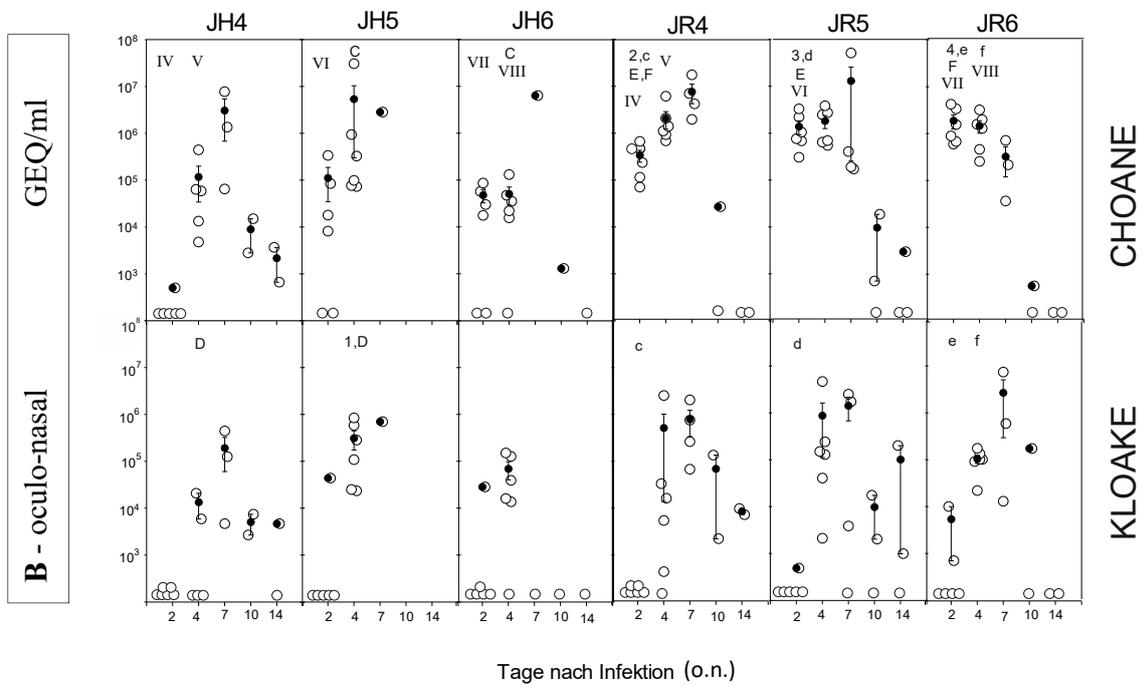
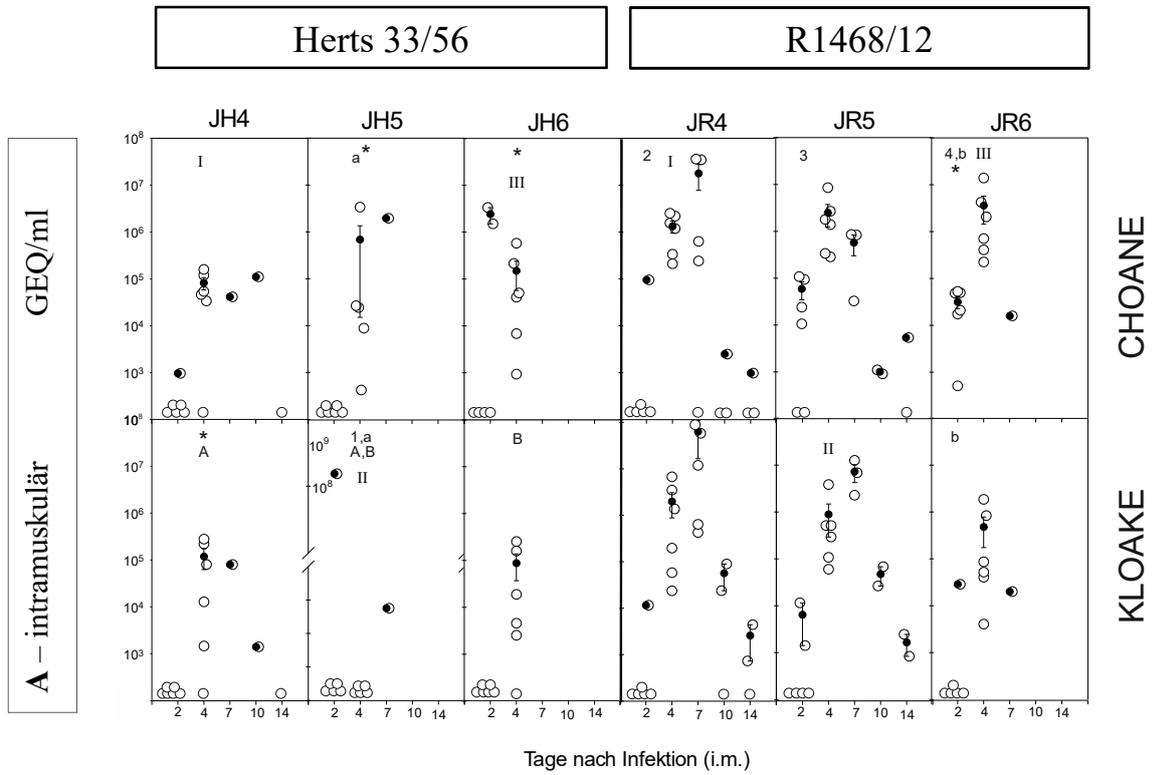


**Abbildung 9: Antikörperstatus von juvenilen Puten nach NDV-Infektion.**

Serumproben juveniler Puten wurden am Tag 7, 14 und 21 Tage nach intramuskulärer (m) oder oculo-nasaler (o) Infektion mit NDV Herts 33/56 (JH4=10<sup>4</sup>, JH5=10<sup>5</sup> und JH6=10<sup>6</sup> EID<sub>50</sub>) oder NDV R1468/12 (JR4=10<sup>4</sup>, JR5=10<sup>5</sup> und JR6=10<sup>6</sup> EID<sub>50</sub>) gewonnen und mittels HAH auf NDV-spezifische Antikörper untersucht. Dargestellt sind die einzelne HAH-Titer (log2) (links) sowie die Differenz zwischen den Werten des Tages 7 und der darauffolgenden Blutabnahme (ΔHAH-Titer (log2) (rechts)).

### 1.1.3. Virusausscheidung

Erste Virusnachweise traten bereits 2 Tage nach der Infektion auf. Diese waren insbesondere in den Tupferproben des Oropharynx nach oculo-nasaler Applikation nachweisbar (Abbildung 10, B): Während alle mit NDV R1468/12 o.n. inokulierten Tiere, unabhängig von der inokulierten Viruskonzentration, Virus am Tag 2 pi ausschieden, war die pharyngeale Virusausscheidung bei den NDV Herts 33/56 o.n. infizierten Tieren nur bei den mit  $10^5$  und  $10^6$  EID<sub>50</sub> inokulierten Gruppen nachweisbar. In den folgenden Probennahmen am Tag 4 und 7 pi, wurde bei erhaltener oro-pharyngealer Ausscheidung nun auch kloakale Ausscheidung beobachtet. Überlebende Tiere konnten zum überwiegenden Teil die Infektion klären: nur in Tieren, die mit  $10^4$  EID<sub>50</sub> des NDV-Stammes Herts 33/56 infiziert waren, wurde noch am Tag 14 pi Virus detektiert. Nach intramuskulärer Applikation war die Virusausscheidung verzögert. Oro-pharyngeale Tupfer der mit NDV R1468/12 intramuskulär infizierten Gruppen wiesen signifikant weniger Virus am Tag 2 pi auf als bei oculo-nasal infizierten Puten (Abbildung 10; 2, 3, 4). Diese Unterschiede traten jedoch am Tag 4 nach Infektion nicht mehr auf. Zu diesem Zeitpunkt ist dann aber bei den mit NDV R1468/12 infizierten Tieren Virus sowohl in den pharyngealen, als auch in den kloakalen Tupfern nachweisbar. Bei überlebenden Tieren die mit diesem Virus inokuliert wurden, waren sogar bis zum Tag 14 pi geringe Virusmengen nachweisbar, während das überlebende Tier der mit  $10^4$  EID<sub>50</sub> Herts 33/56 inokulierten Gruppe kein Virus mehr ausschied.



**Abbildung 10: Virusausscheidung juveniler Puten nach NDV-Infektion.**

Juvenile Puten wurden intramuskulär (**A**-obere Reihe) oder oculo-nasal (**B**-untere Reihe) am 28. Lebenstag mit dem NDV-Stamm Herts 33/56 (JH; links) oder dem Stamm R1468/12 (JR; rechts) infiziert. Dabei wurden drei verschiedene Viruskonzentrationen verwendet ( $10^4$ ,  $10^5$  und  $10^6$  EID<sub>50</sub>;) die mit dem Exponenten bei der Gruppenbezeichnung kenntlich gemacht sind (JH4-6 und JR4-6). Abgebildet sind die individuellen Werte der Virusausscheidung einzelner Puten (○, GEQ/ml), der Gruppendurchschnitt (●) und die Standardabweichung an angegebenen Tagen nach Infektion. Die unterschiedlichen Symbole stehen für signifikante Unterschiede zwischen spezifischen Gruppen bei ansonsten gleichen Kautelen: Vergleich oraler und kloakaler Ausscheidung (Kleinbuchstaben; a-f), Vergleich der verschiedenen Dosen (Großbuchstaben; A-F), Vergleich der beiden ND-Viren (römische Zahlen; I-VIII), Vergleich der beiden Applikationswege (1-4) und Vergleich der Zeitpunkte innerhalb einer Gruppe (Symbole; §, \$, +, ~) sowie Vergleich zwischen juvenilen und adulten Gruppen gleicher Applikation (vgl. Abbildung 14,\*). Die signifikanten Unterschiede sind angegeben nach paarweisem Wilcoxon-Test mit Bonferroni-Korrektur ( $p < 0,05$ ).

**1.1.4. Virale Organbelastung**

Alle Gruppen (n=12) der juvenilen infizierten Puten wiesen Tiere mit hohen viralen Belastungen der Organe auf (Tabelle 4). Nach der Infektion mit NDV Herts 33/56 erkrankten alle Puten. Es konnte jedoch nicht bei jedem Tier eine Viruslast in den entnommenen Organen nachgewiesen werden. So zeigte nur eine von 6 Puten in Gruppe JH4o (NDV Herts 33/56,  $10^4$  EID<sub>50</sub>, o.n.) nach einer oculo-nasalen Infektion eine positive Lungenprobe. Das selbe Tier wies ebenfalls eine hohe virale Belastung in Duodenum und Pankreas auf. Vier weitere Tiere dieser Gruppe mit negativen Lungenproben zeigten ebenfalls positive Proben von Duodenum und Pankreas. Eine konstante hohe Viruslast und 6/6 positiven Proben von Duodenum und Pankreas wies die Gruppe JH5o (NDV Herts 33/56,  $10^5$  EID<sub>50</sub>, o.n.) auf. Die Gruppe zeigte ebenfalls zwei negative Lungenproben. Eine intramuskuläre Infektion mit NDV Herts 33/56 konnte bei 14 von 18 Puten eine positive virale Belastung der Lungenproben induzieren. Die intramuskuläre Infektion mit NDV R1468/12 wies nur 9 von 18 positive Lungenproben auf. Bei insgesamt acht Puten nach einer intramuskulären und oculo-nasalen Infektion mit negativen Lungenproben konnten ebenfalls keine Genomäquivalente in Duodenum und Pankreas nachgewiesen werden. Selbst Tiere in der mittleren ( $10^5$  EID<sub>50</sub>) und höchsten ( $10^6$  EID<sub>50</sub>) Infektionsdosis wurden negativ getestet. Alle Duodenum- und Pankreasproben der niedrigsten NDV R1468/12-Dosis ( $10^4$  EID<sub>50</sub>) wiesen positive Genomäquivalente/ml auf.

Tabelle 4: Virale Organbelastung nach einer NDV-Infektion bei juvenilen Puten.

		Duodenum		Duodenum		Duodenum				
		Lunge	Pankreas	Lunge	Pankreas	Lunge	Pankreas			
GEQ/ml		2,93E+01	1,19E+03	-	-	-	7,29E+04	i.m.	Herts 33/56	
		-	1,04E+08	-	3,81E+06	8,02E+05	8,08E+05			
		1,09E+06	3,84E+07	2,65E+05	-	3,99E+06	-			
		6,65E+06	1,19E+09	1,80E+06	-	1,70E+07	2,67E+06			
		6,52E+06	5,34E+08	9,43E+05	3,38E+07	7,07E+06	2,59E+09			
		6,31E+07	1,17E+08	1,44E+05	1,33E+08	1,37E+07	1,75E+09			
		-	-	-	1,91E+07	-	-			o.n.
		-	2,55E+03	-	3,04E+07	-	2,23E+06			
		-	6,85E+04	3,58E+05	1,19E+05	8,57E+04	5,43E+05			
		-	4,30E+05	2,58E+05	1,48E+06	7,30E+05	4,33E+06			
		-	6,02E+07	1,99E+06	6,48E+07	4,79E+06	1,00E+06			
		4,48E+06	5,83E+08	8,76E+06	4,06E+08	2,11E+06	9,65E+08			
GEQ/ml		-	1,55E+04	-	-	-	-	i.m.	R1468/12	
		3,58E+03	1,48E+05	-	-	-	-			
		-	1,04E+06	5,23E+03	-	1,83E+06	5,52E+06			
		-	2,63E+09	-	4,55E+04	3,47E+06	3,34E+07			
		1,21E+07	6,78E+08	3,52E+07	4,54E+07	2,14E+06	7,98E+07			
		5,36E+07	1,26E+09	-	2,75E+10	1,87E+08	9,91E+08			
		-	2,55E+03	-	-	-	-			o.n.
		-	2,02E+05	-	-	-	-			
		-	1,00E+06	-	5,73E+02	-	6,85E+03			
		-	4,62E+06	-	5,15E+03	6,47E+05	7,41E+06			
		9,76E+06	9,98E+08	3,99E+06	1,13E+07	2,78E+05	4,86E+07			
		3,29E+06	4,37E+09	3,71E+07	2,20E+07	4,54E+06	2,96E+07			
		$10^4$		$10^5$		$10^6$				
Klinische Einteilung bei Versuchsende		<div style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: green; border: 1px solid black;"></div> lebt <div style="display: inline-block; width: 10px; height: 10px; background-color: gray; border: 1px solid black; margin-left: 10px;"></div> tot		Farbliche Kennzeichnung der Virusmenge ( $10^x$ )						
				<div style="display: inline-block; width: 15px; height: 10px; background-color: white; border: 1px solid black;"></div> negativ						
				<div style="display: inline-block; width: 15px; height: 10px; background-color: #e0e0e0; border: 1px solid black;"></div> 1 - 3						
				<div style="display: inline-block; width: 15px; height: 10px; background-color: #c0c0c0; border: 1px solid black;"></div> 4 - 5						
				<div style="display: inline-block; width: 15px; height: 10px; background-color: #a0a0a0; border: 1px solid black;"></div> 6 - 7						
				<div style="display: inline-block; width: 15px; height: 10px; background-color: #808080; border: 1px solid black;"></div> 8 - 10						

## 1.2. Infektionsverlauf in adulten Puten

### 1.2.1. Klinische Manifestation

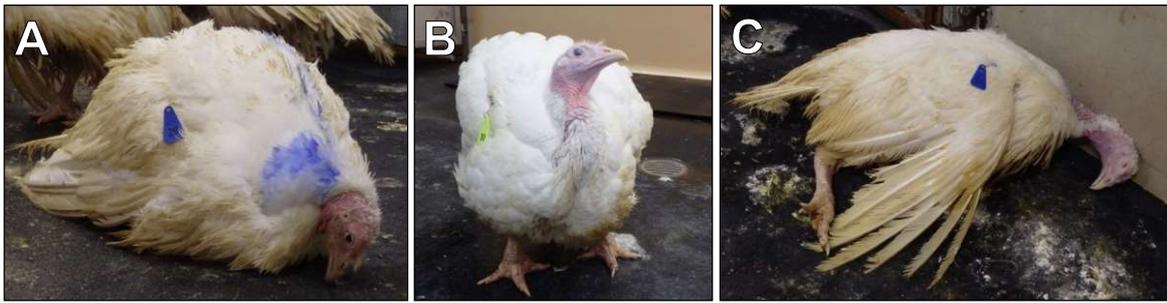
Für die spätere Impfstoffprüfung bei adulten Puten sollte eine geeignete Virusdosis ermittelt werden, bei der mindestens 90 % der Tiere erkranken bzw. sterben, damit die Vorgaben des Europäischen Arzneibuches erfüllt würden. In den Versuchen mit den juvenilen Puten erwies sich die Infektion mit dem Stamm Herts 33/56 im Vergleich zum NDV-Stamm R1468/12 als robusteres Infektionsmodell, mit Induktion einer ausgeprägteren Klinik. Daher wurde für die Infektion der adulten Puten bei dem NDV-Stamm R1468/12 lediglich eine Infektionsdosis von  $10^6$  EID<sub>50</sub> verwendet, während für die Infektion mit Herts 33/56, wie in dem vorangegangenen Experiment, Virusdosen von  $10^4$ ,  $10^5$  und  $10^6$  EID<sub>50</sub> angewendet wurden.

Nach Infektion der alten Puten traten, wie bei den jungen Puten, am Tag 4 pi die ersten klinischen Anzeichen einer Infektion auf (Abbildung 12). Im weiteren Verlauf kam es zu zusätzlichen Neuerkrankungen, die bei einem Tier erst am Tag 20 pi in der Gruppe AH6 auftrat. Insgesamt 14 Puten konnten nach z.T. einem Tag mit Krankheitszeichen als gesund eingestuft werden. Bei einigen Puten lagen sogar 3-5 Tage ohne Krankheitszeichen zwischen den Tagen mit einer deutlichen Erkrankung.

Erkrankte Puten zeigten als erste Symptome Niedergeschlagenheit mit geschlossenen Augen, hängende Flügel, eine gebrochene Rücken-Schwanzlinie und es konnte teilweise Polyurie beobachtet werden. Im weiteren Verlauf der Infektion traten vereinzelt Koordinationsstörungen, zentralnervöse Störungen mit Torticollis, moribund erkrankte Tiere und Todesfälle auf (Abbildung 11).

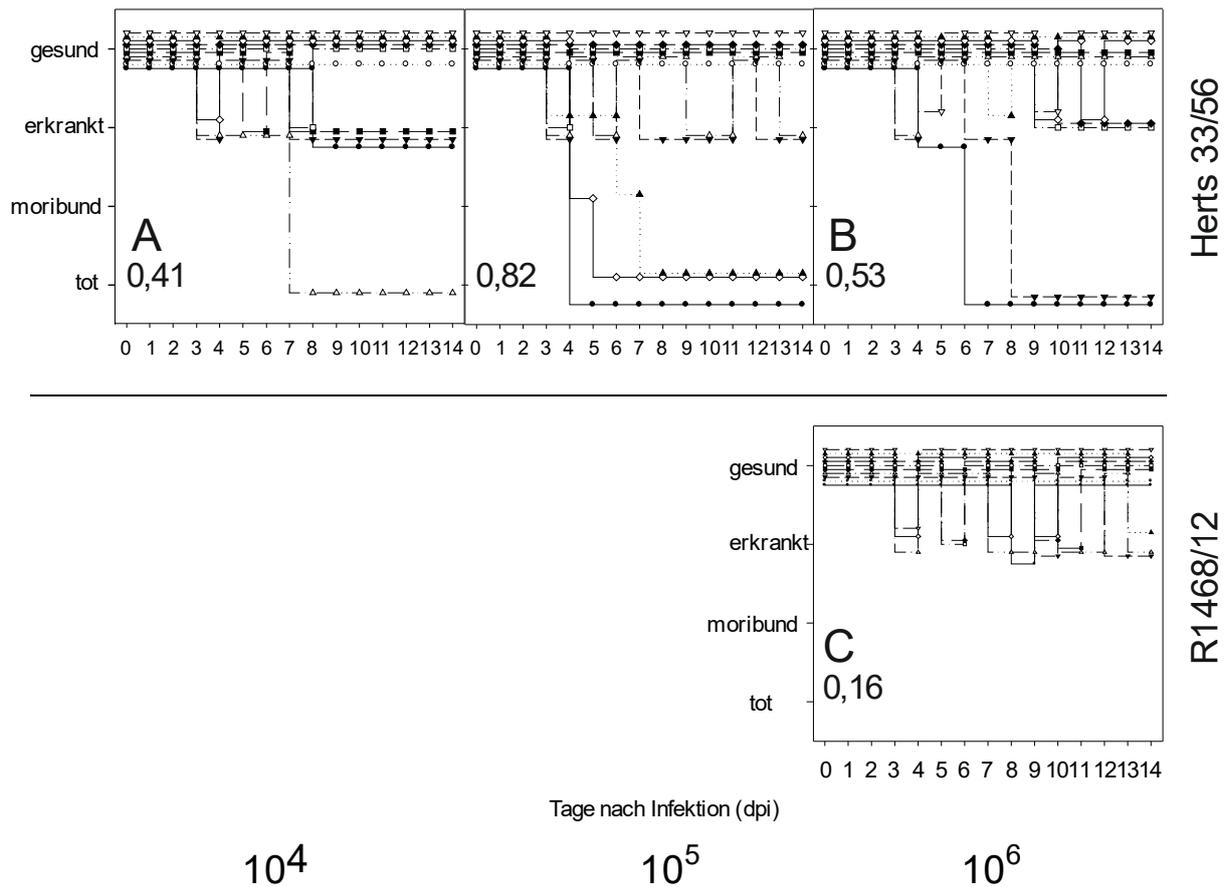
Die Morbiditätsraten bei den NDV Herts 33/56 infizierten Gruppen betragen 70%, 70% und 80% für die aufsteigenden Viruskonzentrationen bei Mortalitätsraten von 10%, 30% und 20%. In der mit NDV R1468/12 infizierten Gruppe wurden lediglich milde klinische Krankheitszeichen wie Niedergeschlagenheit, blasse und gesenkte Köpfe sowie Tiere mit gesträubtem Gefieder beobachtet, die allerdings sukzessive 90 % der Tiere betraf, aber nur in einem Klinischen Index von 0,16 resultierte. Todesfälle traten nicht auf.

Die Untersuchungen bestätigten die höhere Virulenz des NDV-Stammes Herts 33/56, eine Mortalitäts- bzw. Morbiditätsrate von 90% wurde allerdings nicht einmal in der höchsten Viruskonzentration ( $10^6$  EID<sub>50</sub>) sowohl nach Infektion mit NDV Herts 33/56 oder R1468/12 beobachtet. Die Überprüfung einer Schutzimpfung gemäß den Vorgaben des Europäischen Arzneibuches ist somit für adulte Tiere nicht durchführbar.



**Abbildung 11: Klinische Zeichen nach NDV-Infektion adulter Puten.**

Dargestellt sind klinische Bilder nach Infektion von adulten Puten in der 22. Lebenswoche. Die Puten zeigten klinische Zeichen wie Apathie (**A**), zentralnervöse Störungen und Torticollis (**B**), ebenfalls traten Todesfälle (**C**) auf.



**Abbildung 12: Klinischer Verlauf adulter Puten nach intramuskulärer NDV-Infektion.**

Adulte Puten wurden in der 22. Lebenswoche mit unterschiedlichen Virusdosierungen NDV Herts 33/56 (AH4=10<sup>4</sup>, AH5=10<sup>5</sup> und AH6=10<sup>6</sup> EID<sub>50</sub>) oder NDV R1468/12 (AR6=10<sup>6</sup> EID<sub>50</sub>) intramuskulär (M.pectoralis profundus) infiziert. Abgebildet sind die individuellen klinischen Verläufe der einzelnen Puten unterschiedlicher Gruppen und der jeweilige Klinische Index (c.i.).

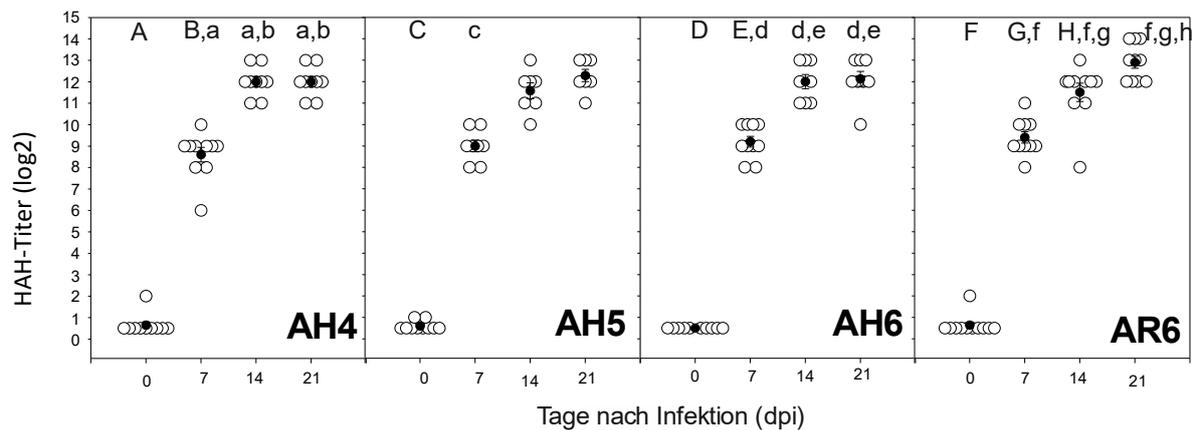
Signifikante Unterschiede in den unterschiedlichen Viruskonzentrationen (NDV Herts 33/56) traten nicht auf. Die Vergleiche zu den dazugehörigen juvenilen Puten sind mit (A-C, vgl. Abbildung 8) gekennzeichnet. Die signifikanten Unterschiede sind angegeben nach paarweisem Wilcoxon-Test mit Bonferroni-Korrektur ( $p < 0,05$ ).

**Tabelle 5: Mortalitätsraten adulter Puten nach NDV-Infektion.**

	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>
AH	10%	30%	20%
AR	-	-	0%

### **1.2.2. Antikörperantwort**

Alle adulten Puten wiesen zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion keine NDV-spezifischen Antikörper im Serum auf (Abbildung 13). Wie auch bei den juvenilen Tieren fand eine Serokonversion innerhalb der ersten 7 Tage nach Infektion statt: mit HAH-Titern ( $\log_2$ ) bis zu 10 bei den NDV Herts 33/56 infizierten Gruppen und bei drei R1468/12 infizierten Tieren sogar auf 11 (Abbildung 13). Die Antikörperspiegel waren am Tag 14 pi auf HAH-Titer bis zu 13 gestiegen, blieben bei den Herts 33/56 infizierten Tieren danach aber auf einem Level. Demgegenüber war nach der NDV R1468/12 Infektion am Tag 21 pi ein signifikanter Anstieg der Antikörperspiegel messbar mit HAH-Titern ( $\log_2$ ) bis zu 14. Zwischen den verschiedenen mit Herts 33/56 infizierten Dosisgruppen bzw. auch zwischen den in der Dosis vergleichbaren NDV Herts 33/56 oder R1468/12 infizierten Gruppen traten keine signifikanten Unterschiede in der Antikörperantwort auf.



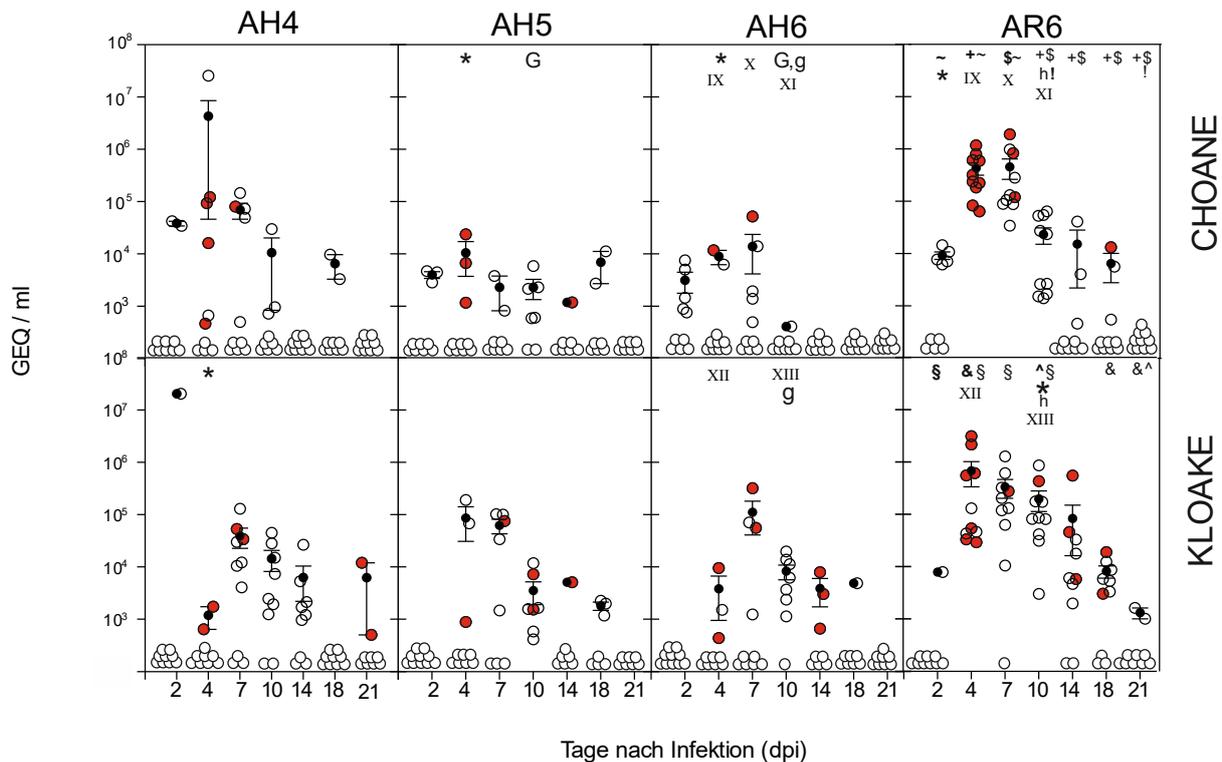
**Abbildung 13: Antikörperantwort adulter Puten nach einer NDV-Infektion.**

Serumproben adulter Puten nach einer Infektion in der 22. Lebenswoche mit NDV Herts 33/56 (AH4=10<sup>4</sup>, AH5=10<sup>5</sup> und AH6=10<sup>6</sup> EID<sub>50</sub>) oder R1468/12 (AR6=10<sup>6</sup> EID<sub>50</sub>) wurden am Tag der Belastungsinfektion und 7, 14 und 21 Tage nach intramuskulärer Infektion gewonnen und mittels HAH auf NDV-spezifische Antikörper untersucht. Dargestellt sind die einzelnen HAH-Titer (log<sub>2</sub>) (○) sowie der Gruppennennungen (●) und die Standardabweichung. Signifikante Unterschiede innerhalb einer Gruppe sind gekennzeichnet. Großbuchstaben (A-H) kennzeichnen die Referenzgruppe, signifikante Unterschiede sind durch Kleinbuchstaben (a-h) angegeben. Es trat keine Signifikanz an denselben Tagen nach Infektion unterschiedlicher Gruppen auf. Die signifikanten Unterschiede sind angegeben nach paarweisem Wilcoxon-Test mit Bonferroni-Korrektur ( $p < 0,05$ ).

### 1.2.3. Virusausscheidung

Die NDV-Ausscheidung bei adulten Puten nach Infektion mit NDV Herts 33/56 war ab Tag 2 pi nachweisbar. Allerdings blieb die Nachweisrate auf einem geringen Niveau (Abbildung 14). Wie auch bei den juvenilen Tieren war kein dosisabhängiger Effekt bei der Virusausscheidung ersichtlich. Im Gegensatz dazu war bei den NDV R1468/12 infizierten Puten (AR6) eine deutlich ausgeprägte Virusausscheidung festzustellen. Sowohl in den oro-pharyngealen als auch in den kloakalen Tupferproben waren an den Tagen 4, 7 und 10 nach Infektion bis auf eine Ausnahme bei allen Tieren eine Virusausscheidung nachweisbar, mit deutlich höherer Viruslast als bei den NDV Herts 33/56 infizierten Gruppen (Abbildung 14: AH6 und AR6). Nach einer hohen Viruslast an den Tagen 4 und 7 nach Infektion nahm die Ausscheidung ab. Virale RNA konnte jedoch an Tag 18 von 7 und an Tag 21 von 2 aus jeweils 10 kloakalen Tupferproben nachgewiesen werden. Oro-pharyngeale Tupfer wiesen eine nicht so beständige Virusausscheidung an diesen späten Messzeitpunkten auf. Es waren

an den Tagen 14 und 18 nach Infektion nur jeweils 3 Tupfer positiv. Darauf folgend an der letzten Probennahme waren die oro-pharyngealen Proben virus-negativ. Interessanterweise konnte jedoch in kloakalen Tupfern von 2 Puten aus der Gruppe, die die niedrigste NDV Herts 33/56 Dosis ( $10^4$  EID<sub>50</sub>; AH4) erhalten hatte, noch infektiöses Virus nachgewiesen werden.



**Abbildung 14: Virusausscheidung adulter Puten nach NDV-Infektion.**

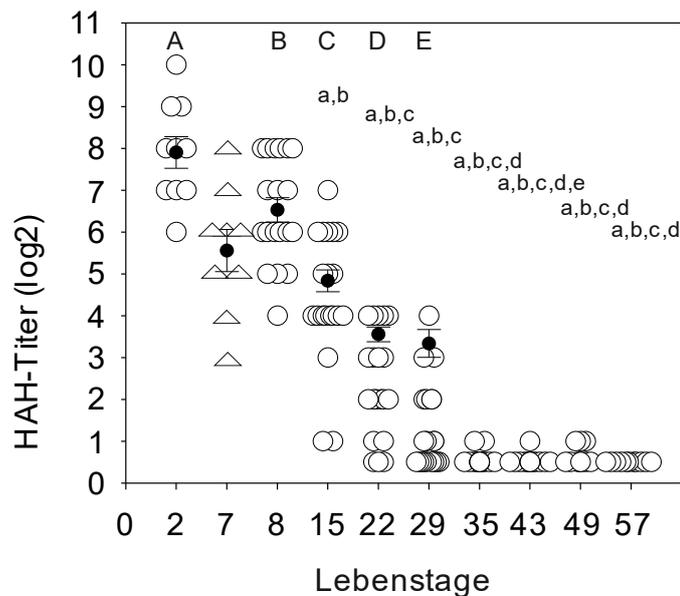
Adulte Puten wurden in der 22. Lebenswoche intramuskulär mit verschiedenen Viruskonzentrationen der NDV-Stämme NDV Herts 33/56 (AH4= $10^4$ , AH5= $10^5$  und AH6= $10^6$  EID<sub>50</sub>) sowie NDV R1468/12 (AR6= $10^6$  EID<sub>50</sub>) infiziert. Abgebildet ist die mittels RTqPCR ermittelte Virusausscheidung in separaten Rachen- und Kloakentupfern einzelner Puten (○, GEQ/ml), der Gruppenschnitt (●) mit Standardabweichung an unterschiedlichen Tagen nach Infektion. Proben in denen infektiöses Virus nachgewiesen wurde sind rot gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede zwischen oraler und kloakaler Ausscheidung sind mit Kleinbuchstaben (g-h), zwischen juvenilen und adulten Gruppen gleicher Applikation mit (\*) (vgl. Abb. 10), dosisabhängige Unterschiede mit Großbuchstaben (G), virusabhängige Ausscheidung mit römischen Zahlen (IX-XIII) und Virusausscheidung innerhalb einer Gruppe mit Symbolen (§, \$, +, ~, ^, !, &) gekennzeichnet. Die signifikanten Unterschiede sind angegeben nach paarweisem Wilcoxon-Test mit Bonferroni-Korrektur ( $p < 0,05$ ).

## 2. Tierversuch 2: Bestimmung des optimalen Impfzeitpunktes und der notwendigen/geeigneten Impfstoffdosis

In einem zweiten Vorversuch wurde kombiniert der geeignete Impfzeitpunkt sowie die adäquate Impfdosis des ND-Impfstoffes für die Puten ermittelt. Basierend auf Erfahrungen bei der Immunisierung von Hühnern erfolgte die Impfung der ersten Gruppe in der ersten Lebenswoche, sowie bei einem Folgeexperiment im Abstand von 7 Tagen in der zweiten und dritten Lebenswoche. Dabei wurde die bei Hühnern bewährte Impfstoffdosis ( $10^6$  EID<sub>50</sub>) angewandt, sowie eine 10fach geringere ( $10^5$  EID<sub>50</sub>) bzw. 10fach höhere Dosis ( $10^7$  EID<sub>50</sub>).

Bei der Ankunft als Eintagsküken waren alle Tiere klinisch gesund und die Gruppe entwickelte sich im Folgenden gleichmäßig. Da die Küken von ND geimpften Elterntieren stammten wiesen sie entsprechend NDV-spezifische Antikörper auf. Von einer Stichprobe der am 7. Lebenstag geimpften Gruppe (n=9) waren alle Tiere APMV-1 sero-positiv und wiesen im Mittel einen HAH-Titer ( $\log_2$ ) von  $5,6 \pm 1,4$  auf (Abbildung 15,  $\Delta$ ). Auch die Seren der zweiten Gruppe von Tieren, die am Tag 14 bzw. 21 nach Schlupf geimpft wurden, wiesen nach dem Schlupf APMV-1-spezifische Antikörper auf: Von initialen HAH-Titern ( $\log_2$ ) von  $7,9 \pm 1,1$  am 2. Lebenstag waren die Titer bereits am 8. Lebenstag auf  $6,5 \pm 1,2$  abgesunken.

Zum Zeitpunkt der Immunisierung waren am 15. Lebenstag 18 von 20 Seren APMV-1 sero-positiv mit HAH-Titern  $\geq 3$  ( $4,8 \pm 1,1$ ). Die Anzahl der APMV-1 sero-positiven Seren sank zum dritten Zeitpunkt der Erstimmunisierung am 22. Lebenstag auf 8 von 17 ab ( $3,6 \pm 0,5$ ). In nicht immunisierten Kontroll-Tieren waren dann am 29. Lebenstag nur noch bei 3 Tieren APMV-1-spezifische Antikörper nachweisbar ( $3,3 \pm 0,6$ ). Bei den anschließenden Probenzeitpunkten waren alle Tiere APMV-1 sero-negativ (Abbildung 15,  $\circ$ ).



**Abbildung 15: Verlauf maternaler Antikörperspiegel in juvenilen Puten während der Aufzucht.**

Dargestellt sind die im HAH gemessenen Antikörper-Titer ( $\log_2$ ) in ungeimpften juvenilen Puten von zwei unabhängigen Vergleichsgruppen (Impfung Tag 7:  $\Delta$ ; Impfung Tag 14 und 21:  $\circ$ ). Neben individuellen Titern ist der Gruppendurchschnitt ( $\bullet$ ) und Standardabweichung angegeben. Buchstaben a-e kennzeichnen signifikante Unterschiede nach paarweisem Wilcoxon-Test mit Bonferroni-Korrektur ( $p < 0,05$ ) zwischen den Tagen (A-E).

## 2.1. ND-Immunisierung

Alle geimpften Tiere, unabhängig vom Impfzeitpunkt oder gewählten Konzentration tolerierten die Impfung gut und es traten keine klinischen Auffälligkeiten auf. Unabhängig ob die Tiere im Alter von 7, 14 oder 21 Tagen immunisiert wurden entwickelten sich die Tiere wie die nicht geimpften Kontrolltiere.

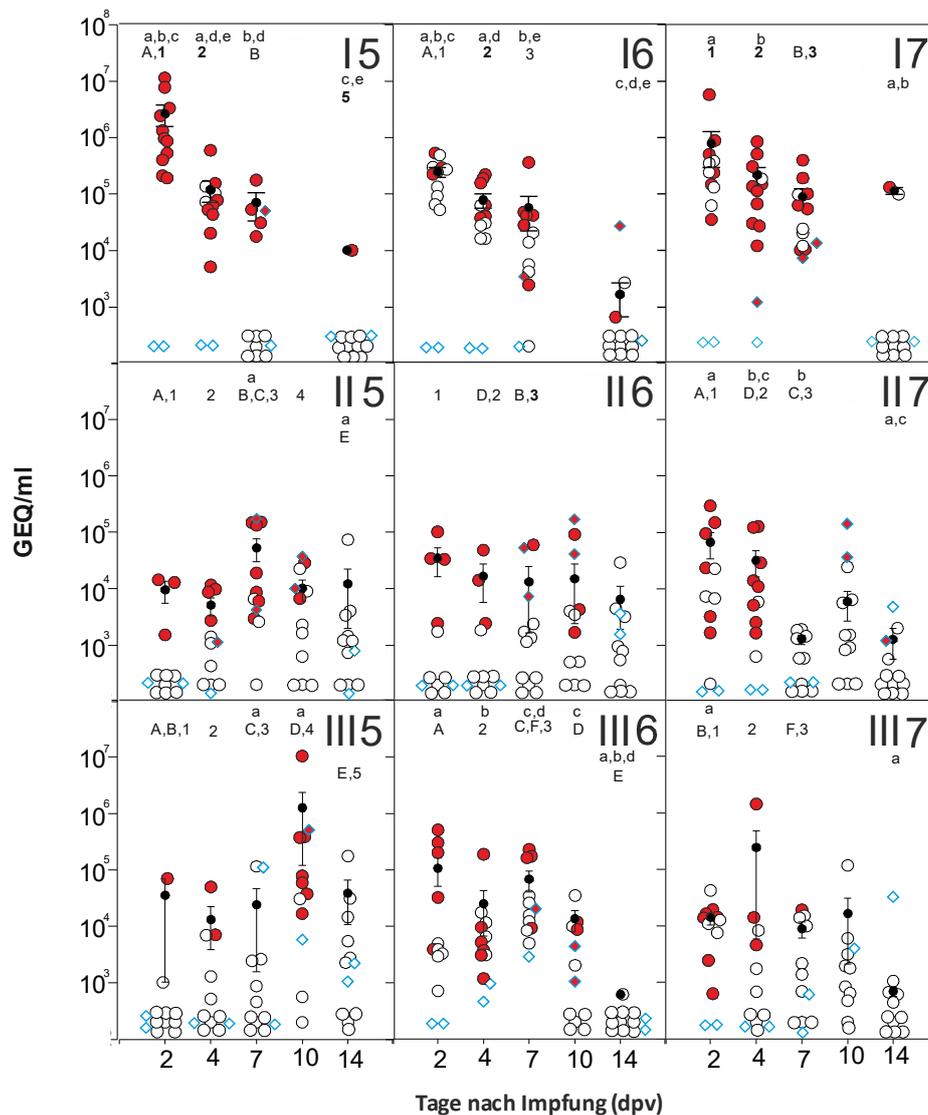
### 2.1.1. Virusausscheidung

Bereits 2 Tage nach der oralen Schutzimpfung konnte in allen Impfstoffkonzentrationen eine Virusausscheidung nachgewiesen werden (Abbildung 16), während die Proben vor der Immunisierung negativ waren.

Im Vergleich der Altersgruppen waren die Virustiter der am 7. Lebenstag geimpften Tiere (Gruppe I) signifikant höher (Abbildung 16, Kennzeichnung 1-5). Die höchsten Virustiter waren am Tag 2 nach Impfung mit einer Impfstoffkonzentration von  $10^5$  EID<sub>50</sub> (I5) nachweisbar. Die Virustiter nahmen in der Gruppe I an den darauffolgenden Tagen sukzessiv

ab (a-e), unabhängig von der gewählten Impfstoffkonzentration. Unterschiede zwischen verschiedenen Impfstoffkonzentrationen waren gering. So waren die Unterschiede in der Gruppe I lediglich am Tag 2 (A) zwischen der mit  $10^5$  oder  $10^6$  EID<sub>50</sub>-geimpften Gruppe und am Tag 7 (B) zwischen den mit  $10^5$  oder  $10^7$  EID<sub>50</sub>-geimpften Gruppe zu beobachten. In den Gruppen II und III, die in der 2. bzw. 3. Lebenswoche geimpft wurden, blieben die nachgewiesenen Virustiter auf einem niedrigen Niveau. So wurde in den Gruppen mit den niedrigen Impfstoffkonzentrationen am Tag 2 pv nur bei 3/10 (II5) und 5/10 (II6), bzw. 2/10 (III5) Puten Virus nachgewiesen. Diese geringe Zahl an Virus ausscheidenden Tieren war noch bis zum 14. dpv zu beobachten. Demgegenüber schieden in der ältesten Gruppen, die mit  $10^6$  und  $10^7$  EID<sub>50</sub> immunisiert wurden (III6 und III7) bereits alle 10 inokulierten Tiere am Tag 2 pv Virus aus. Beide Gruppen (III6 und III7) zeigten dabei durchgängig positive Werte bis zum Tag 10 pv.

Die Ausscheidung des Impfstoffs war in allen geimpften Gruppen ausreichend um das Impfvirus an nicht geimpfte Sentinelputen zu übertragen (Abbildung 16,  $\diamond$ ). Bereits 2 Tage nach dem Zusetzen dieser Kontakttiere war in verschiedenen Gruppen (I7, II5 und III6) Virusausscheidung nachweisbar.



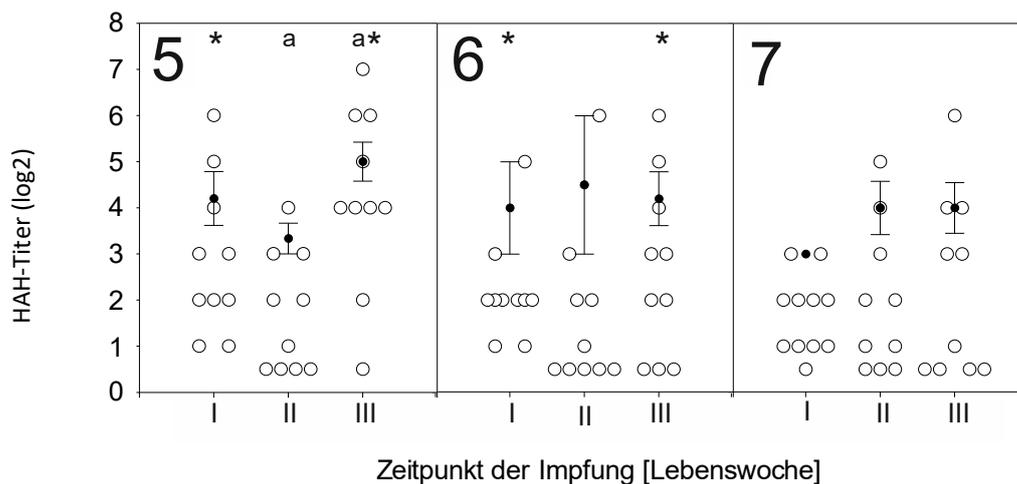
**Abbildung 16: Ausscheidung von Impfvirus bei juvenilen Puten.**

Dargestellt ist die individuelle Virusausscheidung in kombinierten Rachen-, Kloakentupfern (○) von juvenilen Puten die am 7. (I), 14. (II) und 21. (III) Lebenstag mit unterschiedlichen Impfstoffkonzentrationen ( $5=10^5$ ,  $6=10^6$  und  $7=10^7$  EID<sub>50</sub>) immunisiert wurden sowie die Gruppennachweise (●) und Standardabweichungen. Zusätzlich sind die Virusnachweise von Kontakttieren ( $\diamond$ ) dargestellt, die am Tag 2 nach Impfung zu den geimpften Tieren gestellt wurden.

Symbole kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb einer Gruppe an unterschiedlichen Tagen nach Immunisierung (Kleinbuchstaben; a-e), zwischen unterschiedlichen Impfstoffkonzentrationen am gleichen Beprobungstag innerhalb einer Altersgruppe (Großbuchstaben; A-F) bzw. zwischen den verschiedenen Altersgruppen am gleichen Beprobungstag mit gleicher Impfstoffkonzentration mit (Zahlen; 1-5). Die signifikanten Unterschiede sind angegeben nach paarweisem Wilcoxon-Test mit Bonferroni-Korrektur ( $p < 0,05$ ).

### 2.1.2. Antikörperantwort

Am Tag 21 nach der Impfung (pv), zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion, wiesen nur einzelne Tiere im HAH Antikörpertitern  $\geq 3$  ( $\log_2$ ) auf und können als NDV sero-positiv bewertet werden. Die ausgeprägteste Antikörperantwort entwickelte sich in der Gruppe III5, die die Impfung am 21. Lebenstag in einer Konzentration von  $10^5$  EID<sub>50</sub> erhielten. In dieser Gruppe waren insgesamt 8 von 10 Tiere positiv zu bewerten, mit HAH-Titern zwischen 4 bis 7 ( $\log_2$ ) (Abbildung 17). Mit einem Gruppendurchschnitt von  $5,0 \pm 1,1$  ( $\log_2$ ) waren die Antikörper-Titer gegenüber nicht geimpften Kontrollgruppen signifikant erhöht, bei denen zu diesem Zeitpunkt keine Antikörper mehr nachweisbaren waren (vgl. Abbildung 15 und Abbildung 17; \*). Gruppen die in der gleichen Altersgruppen die höheren Impfstoffkonzentrationen erhielten (III6 und III7), wiesen demgegenüber nur jeweils fünf Antikörper-positive Tiere auf. Von den anderen Altersgruppen war lediglich in der Gruppe I5 ebenfalls fünf Tiere als Antikörper-positiv zu bewerten.



**Abbildung 17: Antikörperantwort juveniler Puten nach ND-Immunsierung.**

Verschiedene Altersgruppen von Puten wurden am 7., 14. und 21. Lebenstag geimpft (I-III) und die Antikörpertiter am Tag 21 nach Immunsierung (dpv) mit unterschiedlichen Impfstoffkonzentrationen ( $5=10^5$ ,  $6=10^6$  und  $7=10^7$  EID<sub>50</sub>) gemessen. Gezeigt sind individuelle HAH-Titer ( $\log_2$ ) immunisierter Puten (○), der jeweilige Gruppendurchschnitt (●) und Standardabweichung.

Signifikante Unterschiede zwischen immunisierten Puten und nicht immunisierten Kontrollputen gleichen Alters (vgl. Abbildung 15) sind mit (\*) und zwischen Gruppen der gleichen Impfstoffkonzentrationen und unterschiedlichen Alters sind mit (a) gekennzeichnet. Die signifikanten Unterschiede sind angegeben nach paarweisem Wilcoxon-Test mit Bonferroni-Korrektur ( $p < 0,05$ ).

## 2.2. NDV-Belastungsinfektion

### 2.2.1. Klinische Manifestation

Nach den Belastungsinfektionen, die jeweils am Tag 21 nach der Impfung durchgeführt wurden, trat in allen drei altersgleichen nicht geimpften Kontrollgruppen nach Infektion mit dem Stamm Herts 33/56 eine 100 prozentige Mortalität auf (Tabelle 6).

Erste Krankheitszeichen traten ab Tag 2 nach der Belastungsinfektion (pc) in der Kontrollgruppe CIII auf (Abbildung 18): Betroffen waren alle Tiere der Gruppe und diese verstarben innerhalb der nächsten fünf Tage (c.i.= 2,11). In den anderen Gruppen kam es noch bis zum 8. dpc zu Neuerkrankungen. Die durchschnittliche Inkubationszeit betrug 5-6 Tage. Im Gegensatz zur Herts 33/56 Belastungsinfektion wies eine am 28. Lebenstag mit NDV R1468/12 infizierte Kontrollgruppe lediglich eine Mortalität von 25% auf.

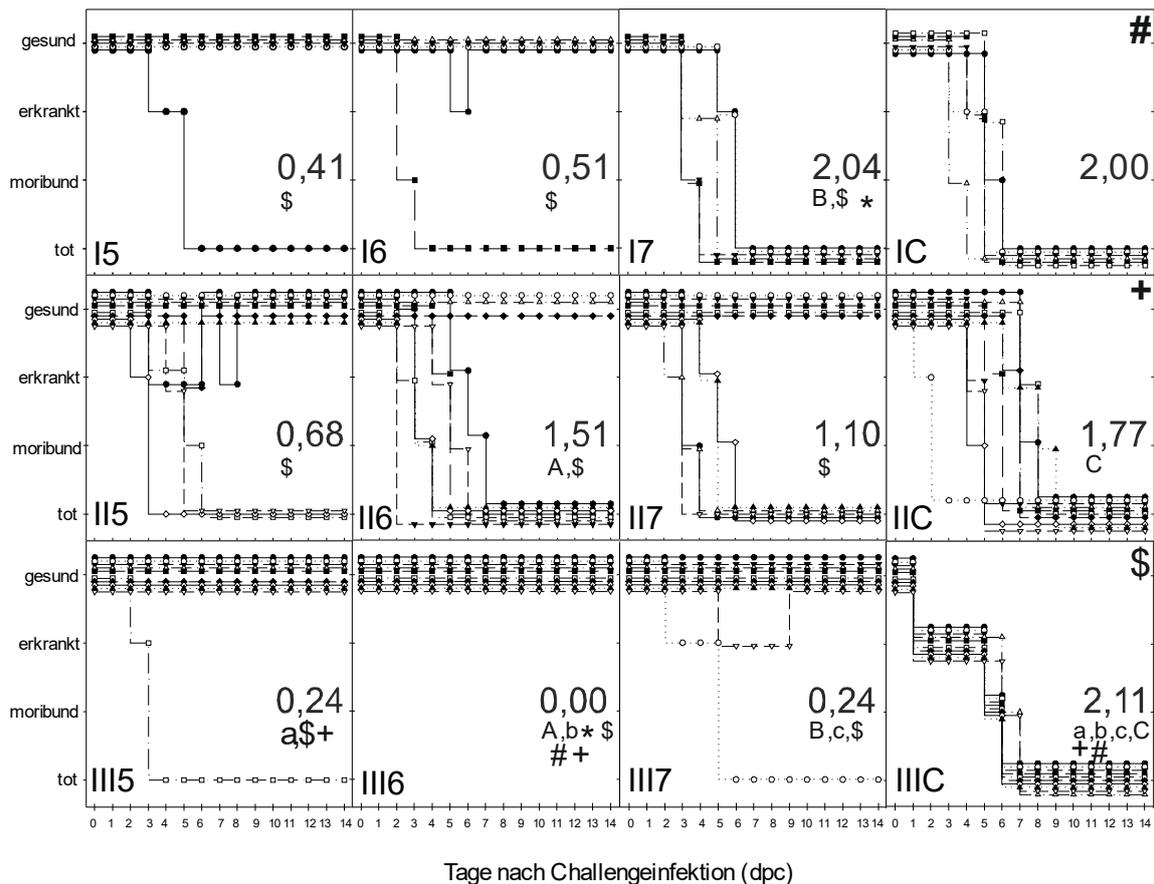
Nach der Herts 33/56 Belastungsinfektion der immunisierten Puten war ein Impfschutz gemäß Europäischem Arzneibuch lediglich bei den mit 3 Wochen immunisierten Tieren nachweisbar. Nur bei diesen drei Gruppen lag die Morbiditätsrate unter 10% und würde den Anforderungen des Europäischen Arzneibuches erfüllen. In der mit  $10^6$  EID<sub>50</sub> immunisierten Gruppe (III6) blieben alle Tiere über den gesamten Beobachtungszeitraum gesund und die Schutzrate lag demzufolge bei 100% (c.i. = 0,0). Bei der niedrigsten und der höchsten Impfstoffkonzentration (III5; III7) erkrankten jeweils 1 bzw. 2 Puten, wobei jeweils ein erkranktes Tier der Gruppen an der Erkrankung verstarb. Mit einer Mortalität von 10% läge dies noch innerhalb der Toleranzschwelle des Europäischen Arzneibuches und bei beiden Gruppen wären die Vorgaben für einen Impfschutz erfüllt.

Von den Gruppen, die am Tag 7 oder 14 immunisiert wurden, trat der heftigste Krankheitsverlauf mit einer Mortalitätsrate von 100% bei der Gruppe I7 (1. LW,  $10^7$  EID<sub>50</sub>; c.i.= 2,04) auf. Die klinischen Krankheitszeichen waren dominiert von Niedergeschlagenheit, übergehend in Apathie und Somnolenz, begleitet von einer Reduzierung der Wasser- und Futtermittelaufnahme. In manchen Fällen war eine einseitige Paralyse von Flügeln und Beinen zu beobachten. Wie in der ungeimpften Kontrollgruppe starben alle Tiere innerhalb von 6 Tagen. Die Gruppen der Altersklasse I5 und I6, die ebenfalls in der 1. Lebenswoche geimpft wurden wiesen demgegenüber mit 20% bzw. 40% moderate Morbiditätsraten auf. In beiden Gruppen verstarb jeweils ein von 5 Tiere (Mortalitätsrate=20%). Ebenfalls wiesen die Gruppen die in der 2. Lebenswoche geimpft wurden, unabhängig von der verwendeten Impfstoffkonzentration, keine adäquate klinische Schutzwirkung gegenüber der

Belastungsinfektion auf. Die Mortalitätsraten dieser Gruppen erstreckten sich zwischen 30% und 70% (Tabelle 6).

Sentinelputen, die 2 Tage nach der Immunisierung in die in der 2. oder 3. Lebenswoche geimpften Gruppen dazugestellt wurden, überlebten die Belastungsinfektionen in allen Impfstoffkonzentrationen. Keine Sentinelpute erkrankte an der Newcastle Krankheit.

Die Untersuchungsergebnisse zeigen, dass eine Impfung juveniler Puten mit AviPro ND C131 in der 3. Lebenswoche eine adäquate Schutzwirkung gegen eine Infektion mit einem velogenen Newcastle Disease Virus Herts 33/56 innerhalb von 21 Tagen nach Impfung induziert.



**Abbildung 18: Klinischer Verlauf einer NDV-Belastungsinfection bei geimpften und nicht geimpften juvenilen Puten.**

Abgebildet ist der klinische Verlauf von juvenilen Puten nach Belastungsinfection mit NDV Herts 33/56 am Tag 21 nach Impfung am 7. (I), 14. (II) und 21. (III) Lebenstag. Jede Altersgruppe wurde mit drei unterschiedlichen Impfstoffkonzentrationen ( $5=10^5$ ,  $6=10^6$  und  $7=10^7$  EID<sub>50</sub>) immunisiert bzw. es wurde eine nicht geimpfte Kontrollgruppe mitgeführt (C). Angegeben ist der Klinische Index (c.i.) der einzelnen Gruppen sowie signifikante Unterschiede zwischen immunisierten und nicht immunisierten Kontrollgruppen der gleichen Altersklasse (Kleinbuchstaben; a-c), zwischen Gruppen derselben Impfstoffkonzentrationen unterschiedlichen Alters (Großbuchstaben; A-C) oder im Vergleich des Krankheitsbeginns zu einer Referenzgruppe (\*, +, #, \$). Die signifikanten Unterschiede sind angegeben nach paarweisem Wilcoxon-Test mit Bonferroni-Korrektur ( $p < 0,05$ ).

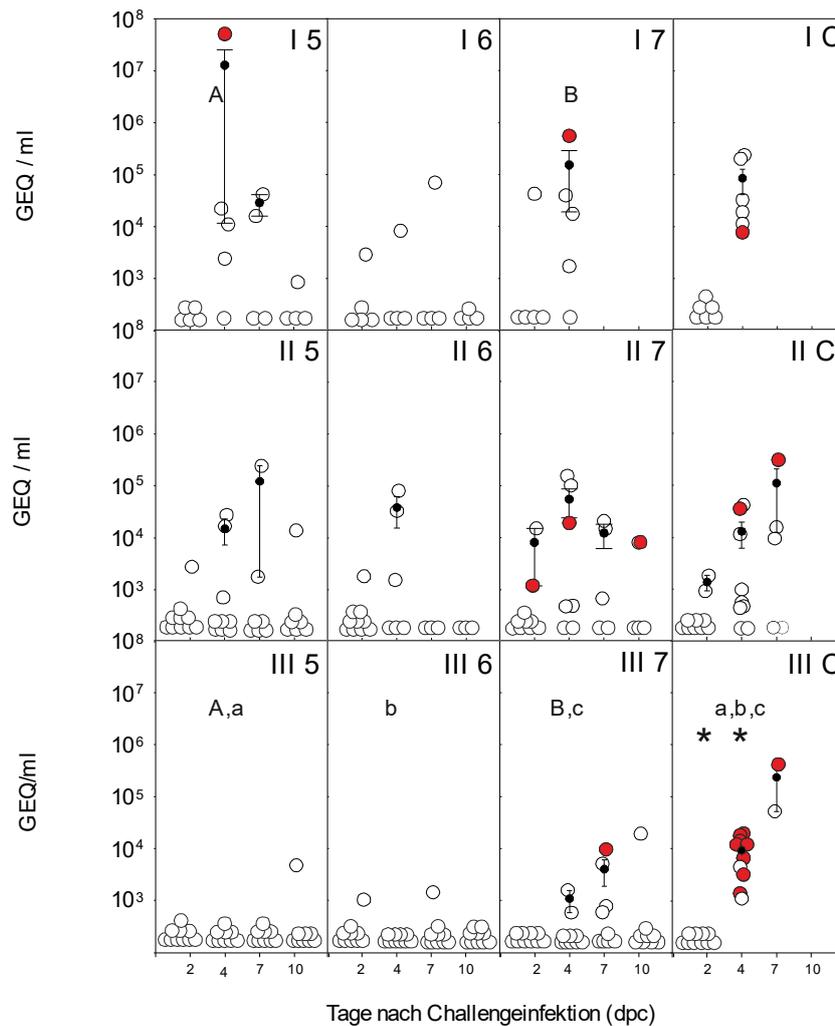
**Tabelle 6: Mortalitätsraten nach NDV-Belastungsinfektion bei geimpften und nicht geimpften juvenilen Puten.**

	<b>10<sup>5</sup></b>	<b>10<sup>6</sup></b>	<b>10<sup>7</sup></b>	<b>C</b>
<b>I</b>	20%	20%	100%	100%
<b>II</b>	30%	70%	50%	100%
<b>III</b>	10%	0%	10%	100%

### 2.2.2. Virusausscheidung

Nach der Belastungsinfektion war Virusausscheidung in allen nicht geimpften Kontrollgruppen messbar. Im Gegensatz zu der Virusausscheidung des oral verabreichten Impfvirus war die Virusausscheidung nach der intramuskulären Infektion erst am Tag 4 nach Infektion ausgeprägt. Am Tag 2 pc waren lediglich 2 Tiere der Kontrollgruppen positiv getestet worden (IIC), während am Tag 4 pc dann aber 77% der Tupferproben der Kontrollgruppe IIC und 100% der Tupferproben der Kontrollgruppen IC und IIIC Virus aufwiesen. Danach nahm die Virusausscheidung bis zum Tag 7 pc weiter zu. Alle getesteten und überlebenden Kontrollputen der Kontrollgruppe CIII und 3 von 5 Puten der Kontrollgruppe CII schieden am Tag 7 nach Belastungsinfektion Virus aus (Abbildung 19). Nur in vereinzelt Tupferproben konnte jedoch Infektiosität nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu den nicht geimpften Kontrollputen traten bei den geimpften Puten lediglich vereinzelt positive Virusnachweise auf. Die höchsten Titer lagen in den Gruppen I5 und I7 vor. Virusausscheidung war auch bei Puten nachweisbar, die keine klinischen Auffälligkeiten aufwiesen: beispielsweise erkrankte in Gruppe I5 (Impfung 1. LW; 10<sup>5</sup> EID<sub>50</sub>) nur ein einzelnes Tier, das am 6. Tag nach Infektion verstarb. In dieser Gruppe waren aber 4 von 5 Proben am Tag 4 pc und 2 von 4 Proben am Tag 7 pc positiv.



**Abbildung 19: Virusausscheidung bei geimpften und nicht geimpften juvenilen Puten nach einer Belastungsinfektion mit NDV Herts 33/56.**

Abgebildet ist die individuelle Virusausscheidung (O, GEQ/ml) von juvenilen Puten in kombinierten Rachen-, Kloakentupfern nach Belastungsinfektion mit NDV Herts 33/56 am Tag 21 nach Impfung am 7. (I), 14. (II) und 21. (III) Lebenstag. Jede Altersgruppe wurde mit drei unterschiedlichen Impfstoffkonzentrationen ( $5=10^5$ ,  $6=10^6$  und  $7=10^7$  EID<sub>50</sub>) immunisiert bzw. es wurde eine nicht geimpfte Kontrollgruppe mitgeführt (C). Angegeben sind die individuellen Werte, sowie die Gruppennormen (●) mit Standardabweichung.

Kombinationstupfer mit nachgewiesener Infektiosität sind rot gekennzeichnet.

Signifikante Unterschiede im Vergleich der unterschiedlichen Tage nach Infektion innerhalb derselben Impfstoffkonzentration und unterschiedlichen Alters sind mit (A, B), innerhalb derselben Altersklasse mit (a-c) und innerhalb derselben Gruppe mit (\*) gekennzeichnet. Die signifikanten Unterschiede sind angegeben nach paarweisem Wilcoxon-Test mit Bonferroni-Korrektur ( $p < 0,05$ ).

### 2.2.3. Antikörperantwort

Nach der Belastungsinfektion wiesen bis auf 4 Tiere alle restlichen 64 überlebenden Tiere Antikörper auf. Am Versuchsende wiesen alle Puten der Gruppe, die in der 1. LW immunisiert wurde positive HAH-Titer auf. Dabei konnte beobachtet werden, dass Puten mit sero-negativen Starttitern höhere Endtiter aufwiesen als Puten mit sero-positiven Starttitern. Die höchsten Titer von  $(\log_2) 10$  bildeten Puten mit Starttitern von 2 in der niedrigsten Impfstoffdosierung. Nach der Infektion mit NDV R1468/12 konnten sogar höchste Antikörpertiter von 12  $(\log_2)$  und eine insgesamt hohe Antikörperantwort gemessen werden. Keine Pute der höchsten Impfstoffkonzentration (I7) überlebte die Belastungsinfektion. Diese Tiere waren alle sero-negativ zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion. Die immunisierten Puten der 2. LW zeigten Endtiter  $(\log_2)$  bis zu 9. 2 Puten mit positiven Antikörpertitern  $(\log_2=3)$  überlebten die Infektion nicht. Dahingegen überlebten 9 der negativen Tiere die Infektion, von denen jedoch 2 ebenfalls negative Antikörpertiter am Ende des Beobachtungszeitraums aufwiesen.

Ebenfalls 10 von 12 sero-negative Puten der 3. LW überlebten die Belastungsinfektion. Diese Puten zeigten Endtiter  $(\log_2)$  bis zu 10. Wie auch in den jüngsten Putengruppen (I) bildeten die ältesten Puten (III) mit sero-negativen Starttitern ebenfalls die höchsten Endtiter von  $(\log_2) 10$  bis zum Versuchsende aus. Insgesamt traten 3/28 Endtiter  $(\log_2)$  von 10 und 4/28 Endtiter von  $(\log_2) 9$  in den Gruppen III auf (Abbildung 20).

8 Kontakttiere, die nach einer Impfung in der 2. und 3. Lebenswoche zu den geimpften Tieren beigelegt wurden, wiesen zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion positive HAH-Titer auf (Abbildung 21). Das Impfvirus konnte somit auf die Sentineltiere übertragen werden und zusätzlich eine Serokonversion in den jeweiligen Tieren auslösen. Den höchsten Antikörpertiter zeigte eine Pute in der Gruppe II5 (2. LW,  $10^5 \text{ EID}_{50}$ ) von  $(\log_2) 9$ . Auch hier überlebten sero-negative Kontakttiere die bevorstehende Belastungsinfektion mit NDV Herts 33/56 mit Endtitern  $(\log_2)$  zwischen 5 und 9. Eine wirkungsvolle Schutzwirkung durch die Impfung konnte somit innerhalb aller Gruppen an Tiere, die nach der Immunisierung dazugelegt wurden weitergegeben werden. Alle Puten blieben gesund und überlebten die Belastungsinfektion. Die höchsten Endtiter  $(\log_2)$  zum Versuchsende betragen ebenfalls 9.

		Starttiter			Endtiter			
		5	6	7	5	6	7	
1 LW	I	Herts 33/56	6	5	2	6	9	
			2	2	2	10	9	
			2	2	2	10	7	
			1	2	1	9		
			1	1	<1		6	
Durchschnitt					8,8	7,8	-	
SD					1,6	1,3	-	
2 LW	II	Herts 33/56	4	6	5	5	4	<1
			3	3	4	<1		9
			3	2	3	8		
			2	2	2			8
			2	1	2	2		
			1	<1	1		5	
<1	<1	1	8	<1				
<1	<1	<1	7		9			
<1	<1	<1	8		5			
Durchschnitt		3,3	4,5	4,0	7,2	4,5	7,75	
SD		0,47	1,5	0,82	1,17	0,5	1,64	
3 LW	III	Herts 33/56	7	6	6	10	5	4
			6	5	4	5	6	6
			6	4	4	8	9	6
			5	3	3	5	5	4
			4	3	3	4	6	10
			4	2	1	4	8	9
4	2	<1	8	5	10			
4	<1	<1	6	9	9			
2	<1	<1	5	7	8			
<1	<1	<1		8				
Durchschnitt		5,0	4,2	4,0	6,1	6,8	7,3	
SD		1,12	1,17	1,1	1,97	1,54	2,26	

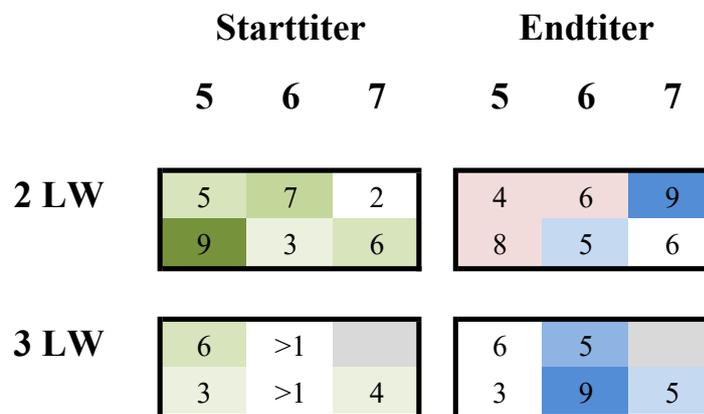
Farbliche Kennzeichnung HAH-Titer (log2) und ΔHAH-Titer (log2)

	negativ		negativ
	3 - 4		0
	5 - 6		1 - 3
	7 - 8		4 - 6
			> 6
			tot

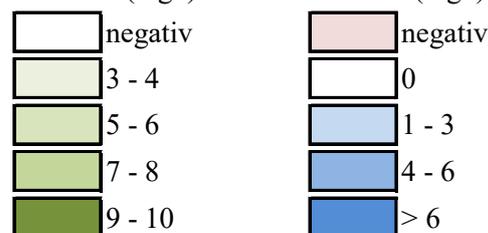
**Abbildung 20: Start- und Endtiter (log<sub>2</sub>) immunisierter juveniler Puten.**

Antikörpertiter der Serumproben von immunisierten juvenilen Puten, die in der 1., 2. und 3. Lebenswoche (I, II, III) geimpft wurden. Die Proben wurden zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion und am Versuchsende entnommen und mittels HAH auf NDV-spezifische Antikörper untersucht. Dargestellt sind die einzelnen HAH-Titer (log<sub>2</sub>) zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion (links) und 14 Tage nach Belastungsinfektion (rechts), sowie der Durchschnitt und Standardabweichung der einzelnen Gruppen. Zur Testung wurde das Impfvirus AviPro ND C131 als Antigen verwendet.

Es traten keine signifikanten Unterschiede zwischen End- und  $\Delta$ HAH-Titer auf (paarweiser Wilcoxon-Test mit Bonferroni-Korrektur,  $p < 0,05$ ).



Farbliche Kennzeichnung HAH-Titer (log<sub>2</sub>) und  $\Delta$ HAH-Titer (log<sub>2</sub>)

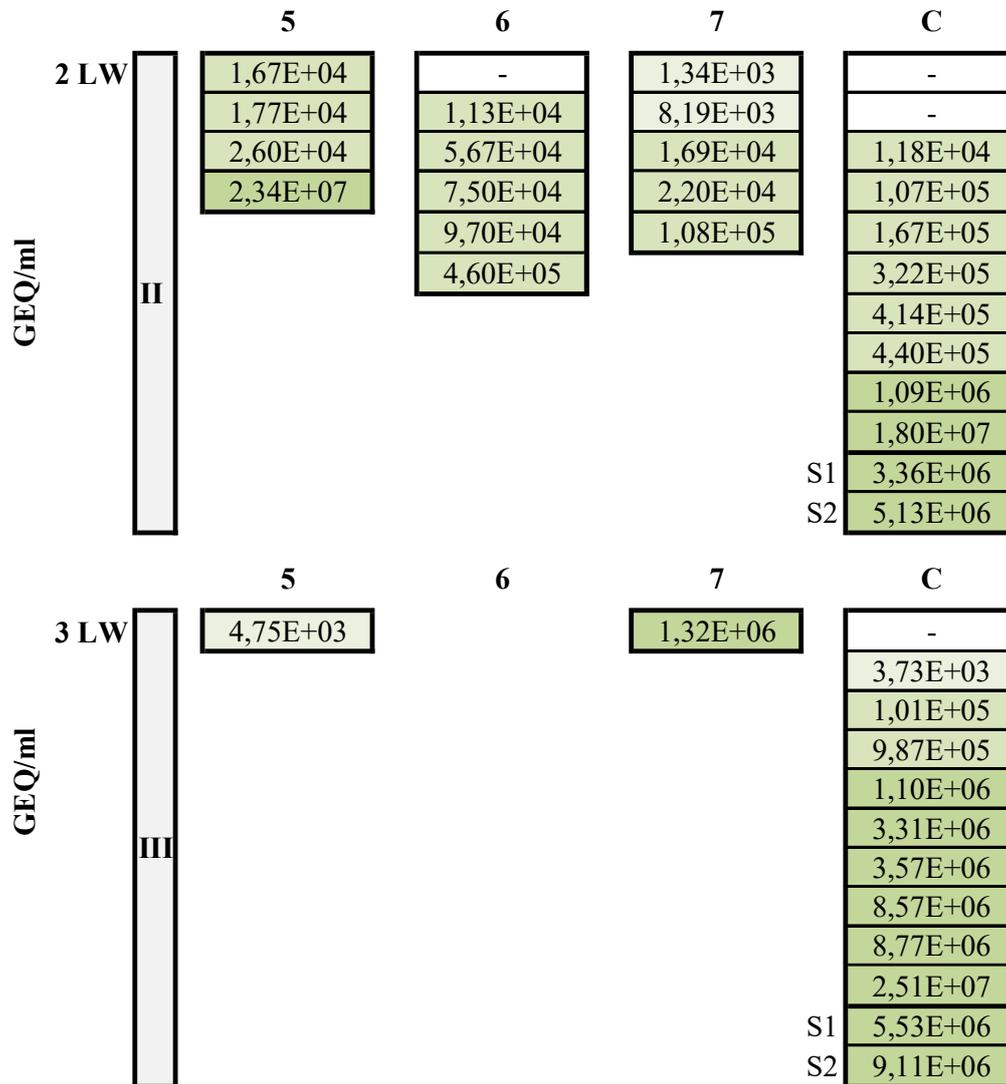
**Abbildung 21: Start- und Endtiter (log<sub>2</sub>) der zugestellten Kontakttiere nach Impfung.**

Dargestellt sind die HAH-Titer (log<sub>2</sub>) zugestellter Kontakttiere 2 Tage nach der Impfung in der 2. (II) und 3. (III) Lebenswoche (Starttiter, links) und nach dem Beobachtungszeitraum einer intramuskulären Belastungsinfektion (Endtiter, rechts).

### 2.3. Virale Organbelastung

Im Gegensatz zu den Tieren, die in der 2. Lebenswoche geimpft wurden konnten die Tiere der 3. Lebenswoche eine Schutzwirkung aufbauen und es verstarben deutlich weniger Puten nach einer Belastungsinfektion. Trotz der vorangegangenen Schutzimpfung wiesen die geimpften und verstorbenen Tiere beider Altersklassen hohe Viruslasten in den Organproben auf. So konnte bei insgesamt 14/15 (II) und 2/2 (III) geimpften Puten positive Organproben nachgewiesen werden (Tabelle 7). Die Durchschnittswerte der GEQ/ml betragen bei den Puten der 2. Lebenswoche jeweils mit absteigenden Werten  $5,86 \times 10^6$  ( $10^5$  EID<sub>50</sub>),  $1,17 \times 10^5$  ( $10^6$  EID<sub>50</sub>) und  $3,13 \times 10^4$  ( $10^7$  EID<sub>50</sub>). Nicht geimpfte Kontrollgruppen (C) beider Altersklassen unterschieden sich geringfügig. Beide Gruppen wiesen negative und positive Organproben auf. So konnte bei den jüngeren 2/10 und bei den älteren 1/10 negative Proben nachgewiesen werden. Höchstwerte an GEQ/ml traten jeweils von  $1,8 \times 10^7$  (II) und  $2,5 \times 10^7$  (III) auf. Die Durchschnittswerte der Kontrollputen betragen  $2,05 \times 10^5$  (II) und  $5,15 \times 10^5$ . Alle 4 nicht geschützte Kontakttiere der Kontrollgruppen (Tabelle 7; S1 und S2) wiesen durch die Belastungsinfektion eine vergleichbare Viruslast (GEQ/ml) der Organe auf.

**Tabelle 7: Virale Organbelastung der Poolproben nach einer Schutzimpfung in der 2. oder 3. Lebenswoche mit einer darauffolgenden Belastungsinfektion.**



Farbliche Kennzeichnung der Virusmenge (10<sup>x</sup>)

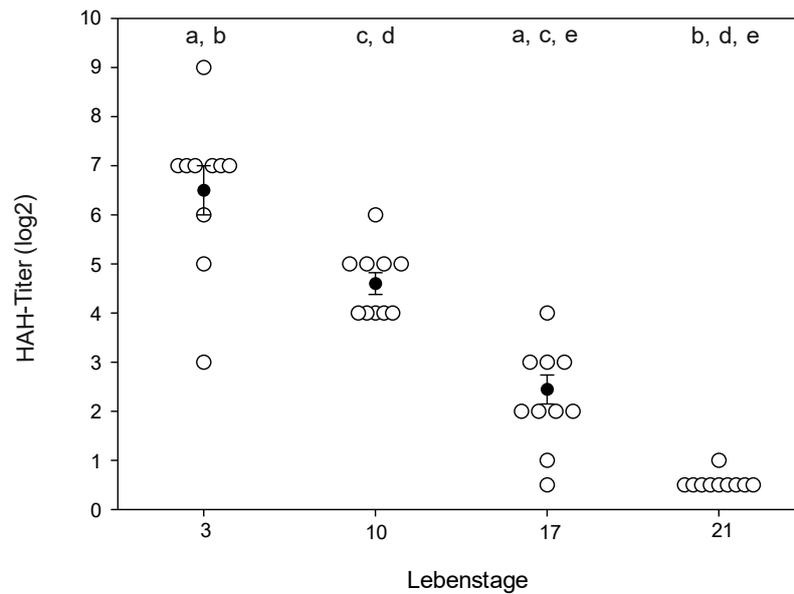
-	negativ
1 - 3	1 - 3
4 - 5	4 - 5
6 - 7	6 - 7
8 - 10	8 - 10

### **3. Tierversuch 3: Bestimmung des Einsetzens und der Dauer der Immunität nach einfacher Impfstoffgabe**

Die vorangegangenen Tierversuche wiesen auf eine Wirksamkeit des Impfstoffes AviPro ND C131 hin, wenn Puten in der dritten Lebenswoche immunisiert wurden. In diesem dritten Teil sollten diese Ergebnisse bestätigt werden unter Verwendung der im Europäischen Arzneibuch vorgesehenen Gruppengrößen von 20 geimpften Tieren. Außerdem sollte der Eintritt des Impfschutzes und die Schutzdauer ermittelt werden. Daher wurden juvenile Puten (n=194) am 21. Lebenstag immunisiert und jeweils Teilgruppen von 20 Tieren am Tag 1, 7, 14, 21, 35, 42 und 56 nach der Immunisierung gemeinsam mit 10 nicht immunisierten Kontrollputen einer Belastungsinfektion mit NDV Herts 33/56 unterzogen. Alle immunisierten und nicht immunisierten Puten waren zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion gesund. Beide Gruppen (immunisiert und nicht immunisiert) entwickelten sich gleichmäßig und es wurden keine klinischen Auffälligkeiten nach der Immunisierung beobachtet. Im Anschluss an die Belastungsinfektion wurden den immunisierten sowie den nicht immunisierten Gruppen ein immunisiertes und ein nicht immunisiertes Kontakttier dazugestellt.

#### **3.1. Serologische Untersuchungen vor der ND-Immunisierung**

Nach dem Schlupf der Puten wurden in Blutserumproben am 3. Lebenstag bei allen Puten NDV-spezifische Antikörper nachgewiesen, mit HAH-Titern ( $\log_2$ ) zwischen 3 und 9 (Abbildung 22). In den darauffolgenden Probenzeitpunkten nahmen die Antikörpertiter ( $\log_2$ ) sukzessive von  $6,5 \pm 1,5$  auf  $4,6 \pm 0,6$  und  $2,4 \pm 0,4$  am 10. bzw. 17. Lebenstag ab. Bereits am Tag 17 waren nur noch 4 Tiere sero-positiv und am 21. Lebenstag, am Tag der Impfung waren keine Antikörper mehr nachweisbar (Abbildung 22).



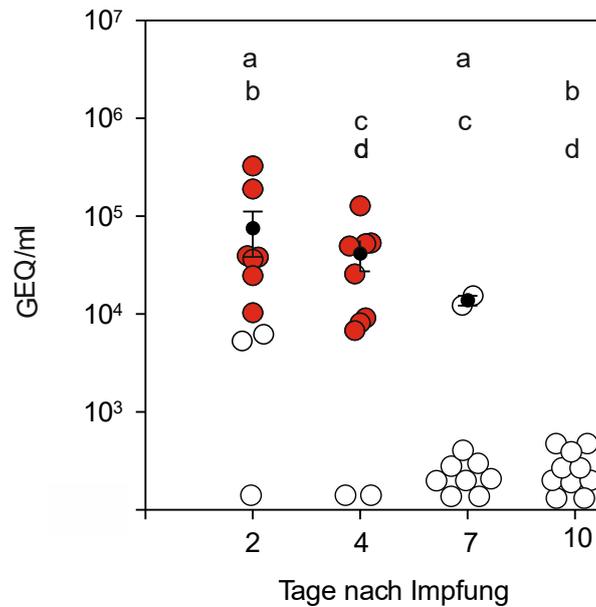
**Abbildung 22: Maternale Antikörper-Verlauf juveniler Puten.**

Dargestellt sind die im HAH gemessenen Antikörper-Titer ( $\log_2$ ) juveniler Puten an angegebenen Tagen nach dem Schlupf. Einzelwerte (○), Gruppendurchschnitte (●) und Standardabweichung werden angegeben. Signifikante Unterschiede der verschiedenen Tage sind mit (a-e) gekennzeichnet nach paarweisem Wilcoxon-Test mit Bonferroni-Korrektur ( $p < 0,05$ ).

### 3.2. ND-Immunsierung

#### 3.2.1. Virusausscheidung

Die Ausscheidung des Impfstamms AviPro ND C131 war bereits am Tag 2 pv bei 9 von 10 Tieren nachweisbar, Virus wurde ebenfalls am Tag 4 pv von 8 der 10 beprobten Tiere ausgeschieden und wie am Tag 2 pv war in der Mehrzahl der positiven Proben neben dem RTqPCR Signal auch infektiöses Virus nachzuweisen (Abbildung 23). Am Tag 7 pv waren lediglich 2 Tupfer Virus-positiv, bevor am Tag 10 pv kein Virus mehr in den Tupfern nachweisbar war.



**Abbildung 23: Virusausscheidung nach Immunisierung am 21. Lebenstag.**

Die Ausscheidung des Impfvirus wurde in kombinierten Rachen-, Kloakentupfer gemessen, die an den angegebenen Tagen nach Impfung entnommen wurden. Dargestellt ist die mittels RTqPCR ermittelte virale Impfvirusausscheidung einzelner Puten (○, GEQ/ml), der Gruppenschnitt (●) mit Standardabweichung. Tupfer in denen infektiöses NDV nachgewiesen wurde sind rot dargestellt.

Signifikante Unterschiede zwischen den Tagen nach Infektion sind nach paarweisem Wilcoxon-Test mit Bonferroni-Korrektur ( $p < 0,05$ ) mit Buchstaben (a-d) gekennzeichnet.

### 3.2.2. Antikörperantwort

Durch die Impfung induzierte Antikörper wurden ab Tag 14 pv nachgewiesen, wohingegen am Tag 1 und 7 nach Impfung alle Serumproben negativ (HAH-Titer  $< 3$  ( $\log_2$ )) getestet wurden. Am Tag 14 pv wiesen 17 der 20 zu diesem Zeitpunkt infizierten Puten positive HAH-Titer ( $\geq 3$  ( $\log_2$ )) auf (Abbildung 27; A). Eine Woche später, am Tag 21 pv, waren 12 der 20 zu infizierenden Puten sero-positiv und der Durchschnittstiter der sero-positiven Tiere war von  $4,6 \pm 1,0$  auf  $6 \pm 1,3$  angestiegen. An den darauffolgenden Zeitpunkten, am Tag 35 und 42 pv wurden gegenüber Tag 14 pv gesunkene Antikörpertiter gemessen mit Gruppenschnitten von jeweils  $5,0 \pm 1$  und  $4,8 \pm 0,7$ . Zu diesen Zeitpunkten sind dann nur 12 bzw. 8 Tiere als Antikörper-positiv zu bewerten. Am letzten Messzeitpunkt, 8 Wochen nach der Impfung (56 dpv) waren alle Serumproben sero-negativ.

Die Blutseren der nicht geimpften Kontrollputen (n=10/Kontrollgruppe) wiesen zu keinem Zeitpunkt der Belastungsinfektionen positive Antikörper auf (Daten nicht gezeigt).

### **3.3. ND-Belastungsinfektion**

#### **3.3.1. Klinische Manifestation**

##### **3.3.1.1. Nicht geimpfte Kontrollgruppen**

Durch die zeitlich gestaffelte Belastungsinfektion der immunisierten Puten 1-56 Tage nach der Immunisierung waren die Tiere zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion zwischen 22 und 77 Tage alt. Dies macht sich in der klinischen Ausprägung der Erkrankung bemerkbar. So steigt die Mortalität von 80% bei 22 und 28 Tage alten Puten auf 100% bei 35 Tage alten Puten um anschließend sukzessive auf 40% bei Belastungsinfektion am 77. Lebenstag abzusinken (Abbildung 25; A). In Bezug auf die Morbidität sind diese Schwankungen allerdings nur bei den jüngsten Tieren evident. In der Gruppe bei denen die Belastungsinfektion am 22. LT durchgeführt wurde, blieb ein Tier nach der Infektion über die gesamte Beobachtungszeit von 3 Wochen gesund. Ein weiteres Tier zeigte 7 Tage nach Infektion, nur an einem einzelnen Tag leichte klinische Krankheitszeichen in Form von Niedergeschlagenheit. Alle weiteren Puten dieser Gruppe starben zwischen dem 5. und 9. Tag nach Infektion, resultierend mit einer Morbiditätsrate von 90% und einem Klinischen Index von 1,40.

Die infizierten Puten aller Kontrollgruppen zeigten klinische Krankheitsanzeichen zwischen dem 3. und dem 5. Tag nach Infektion (Abbildung 24). Der Durchschnitt der Inkubationszeiten betrug 5-6 Tage. Ausgenommen bei einem Tier der 28 Tage alten Kontrollgruppe, bei dem die klinischen Krankheitsanzeichen erst am 10. Tag nach Infektion auftraten. Es traten keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich des Einsetzens der Erkrankung innerhalb der Kontrollgruppen auf. Klinische Krankheitsanzeichen wie Niedergeschlagenheit, die sich in Apathie und Somnolenz entwickelte traten am häufigsten auf. Begleitet mit einer Reduzierung der Wasser- und Futteraufnahme. Einseitige Lähmungen von Flügeln und Läufen traten seltener auf. Bezüglich der Morbidität war bis auf die erste Gruppe, bei den anderen sechs Kontrollgruppen eine Morbiditätsrate von 100% zu verzeichnen.

Die Schwere der Erkrankung ist vor allem in der Kontrollgruppe der Belastungsinfektion 14 Tage nach Immunisierung zu beobachten. Hier trat eine 100%ige Mortalität innerhalb von 7 Tagen nach der Infektion auf und ein dadurch resultierender Klinischer Index von 1,95

(Abbildung 24 und Abbildung 25). Signifikant niedriger ist die klinische Auswirkung einer NDV-Infektion in der ältesten Kontrollgruppe, die im Alter von 77 Tagen infiziert wurde bzw. 56 Tage nach Impfstoffgabe mit einer Mortalitätsrate von 40% und einem Klinischen Index von 1,043. Für die anderen Gruppen sind die Klinischen Indizes nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 25; C, \*).

### 3.3.1.2. Geimpfte Puten

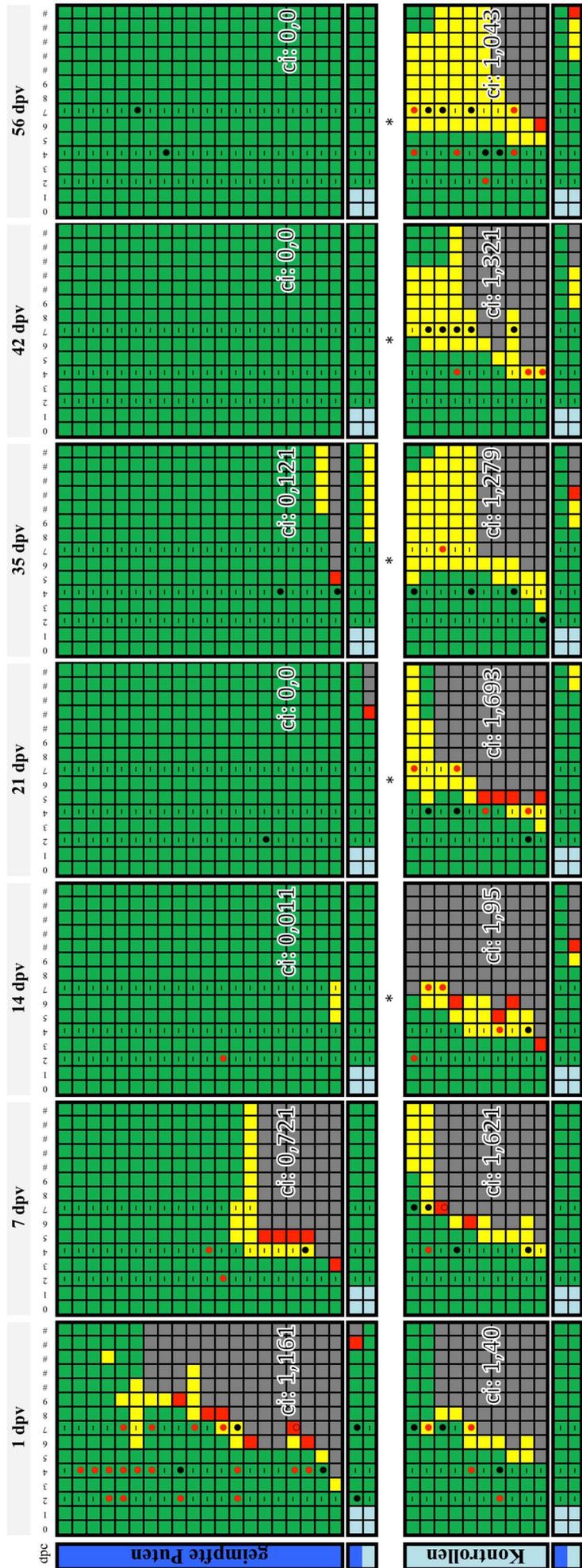
Ein klinischer Schutz trat erst ab 14 Tagen nach der Immunisierung auf, mit einer dann zu beobachtenden Morbiditätsrate von 5%. Demgegenüber war nach der ersten Belastungsinfektion (c.i. = 1,161) am Tag 1 nach Impfung die Morbidität (85%) und die Sterblichkeit (70%), kaum von der ungeimpften Kontrollgruppe zu unterscheiden (c.i. = 1,40; 90% Morbidität und 80% Mortalität). Während der 2. Belastungsinfektion, 7 Tage nach der Immunisierung, reduzierte sich die Anzahl der verstorbenen Tiere zwar auf 6 (c.i. = 0,721; 40% Morbidität, 30% Mortalität), lag aber immer noch deutlich über den Vorgaben des Europäischen Arzneibuchs. Mit Erreichen des Schutzes 14 Tage nach der Impfung entsprachen die sukzessiven immunisierten Gruppen (14-56 dpv) den Standards des Europäischen Arzneibuchs für einen ND-Lebendimpfstoff für Puten. Sie wiesen eine klinische Schutzwirkung bei mindestens 18 Puten auf. Die Erkrankungsfälle traten nur vereinzelt auf: Ein Tier in der Gruppe die 14 Tage nach Impfung infiziert wurde (c.i. = 0,011) zeigte geringgradig Torticollis an einem Tag und eine anschließende Niedergeschlagenheit mit einer Verbesserung ab dem 8. Tag nach Infektion. In der Gruppe der Puten die am Tag 35 nach Impfung infiziert wurde (35 dpv) erkrankte ein Tier am Tag 5 nach Infektion so schwer, dass es aus Gründen des Tierschutzes getötet wurde. Ein weiteres Tier lief unkoordiniert umher und zeigte Niedergeschlagenheit zwischen Tag 10 bis 14 nach Infektion. Nach diesem Beobachtungszeitraum erholte sich dieses Tier von der Erkrankung und blieb bis zum Ende des Experiments, am Tag 21 pc gesund. Keine Pute erkrankte nach einer Belastungsinfektion am Tag 21, 42 oder 56 Tage nach der Immunisierung. Diese drei Gruppen wiesen einen Klinischen Index von 0,0 auf.

Beim direkten Vergleich der Klinischen Indizes der immunisierten und nicht immunisierten Kontrollgruppen des gleichen Infektionszeitpunktes traten signifikante Unterschiede ab einem Infektionszeitpunkt von 14 Tagen nach Immunisierung auf (Abbildung 24; \*).

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Impfung von juveniler Puten im Alter von 3 Wochen mit einer Dosis AviPro ND C131 ( $10^{6,3}$  EID<sub>50</sub>) eine Schutzwirkung gegen eine Infektion mit einem velogenen NDV Herts 33/56 Stamm ab dem 14. Tag nach Immunisierung aufbaut.

Dieser Schutz gegen die Belastungsinfektion hält zusätzlich nach der Einzelgabe des Impfstoffs bis zur 11. Lebenswoche an.

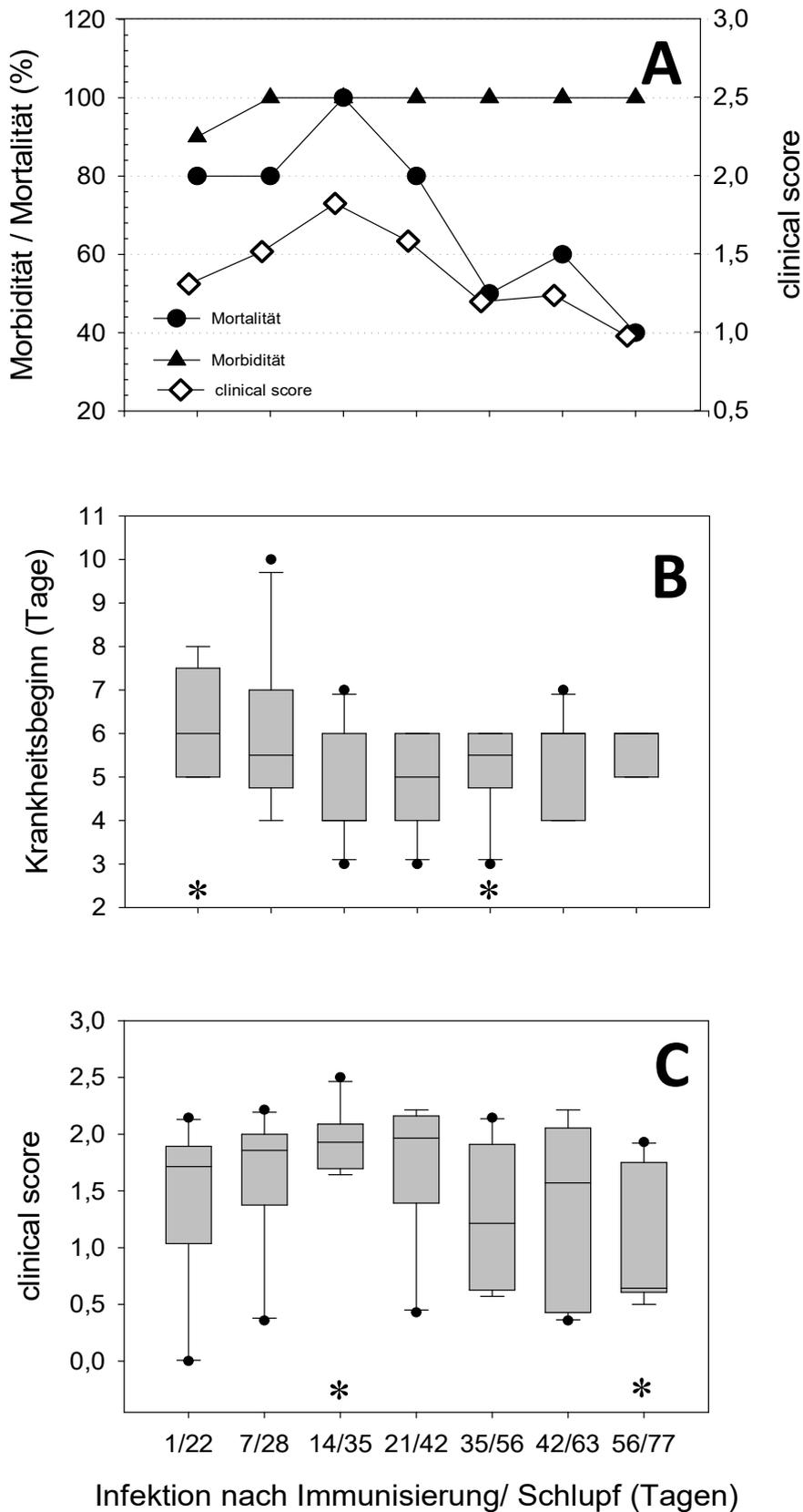
Die Virusausscheidung von NDV infizierten Puten reichte aus um zugestellte Kontakttiere zu infizieren (Klinischer Verlauf der Kontakttiere siehe 3.3.2. Virusausscheidung).



**Abbildung 24: Klinischer Verlauf einer NDV-Infektion bei geimpften und nicht geimpften Puten nach einer Belastungsinfektion an unterschiedlichen Zeitpunkten nach Immunisierung in Korrelation zur Virusausscheidung.**

Infizierte Puten (immunisiert n=20 (dunkelblau); nicht immunisiert n=10 (hellblau)) sowie Kontakttiere der unterschiedlichen Belastungsinfektionen wurden täglich untersucht und klinisch eingestuft (c.s.). Es werden gesunde (grün), erkrankte (gelb), moribunde (rot) und verstorbene (grau) Puten und ebenfalls der Klinische Index der infizierten Gruppen dargestellt. Zusätzlich wird die Korrelation zwischen klinischer Untersuchung und Virusausscheidung gezeigt.

Signifikante Unterschiede zwischen dem klinischen Verlauf der immunisierten und nicht immunisierten Kontrollgruppen sind mit (\*) gekennzeichnet. Nach paarweisem Wilcoxon-Test mit Bonferroni-Korrektur ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 25: Morbiditäts-, Mortalitätsraten und Klinischer Score (A), Inkubationszeiten (B) und Ausprägung der Newcastle Krankheit (C) bei nicht geimpften Puten nach einer NDV-Infektion an unterschiedlichen Zeitpunkten nach Schlupf.**

Legende zu Abbildung 25:

**A:** Dargestellt sind die Morbiditäts- und Mortalitätsraten sowie die Klinischen Scores nicht immunisierter Kontrollgruppen, die an unterschiedlichen Zeitpunkten (22, 28, 35, 42, 56, 63 und 77 Tage nach Schlupf) infiziert wurden.

**B:** Dargestellt sind die Inkubationszeiten der nicht geimpften Kontrollgruppen, die zum selben Zeitpunkt (1, 7, 14, 21, 35, 42 und 56 dpv) wie die immunisierten Puten infiziert wurden.

Signifikante Unterschiede zwischen den geimpften und nicht geimpften Gruppen sind mit (\*) gekennzeichnet.

**C:** Dargestellt sind die Klinischen Scores der einzelnen nicht immunisierter Kontrolltiere (n=10), die zum selben Zeitpunkt (1, 7, 14, 21, 35, 42 und 56 dpv) wie die immunisierten Puten infiziert wurden.

Signifikante Unterschiede zwischen der Ausprägung der Erkrankung der Kontrollgruppen sind mit (\*) gekennzeichnet.

Die Signifikanz ist gekennzeichnet nach paarweisem Wilcoxon-Test mit Bonferroni-Korrektur ( $p < 0,05$ ).

**Tabelle 8: Mortalitäts- und Morbiditätsraten einer NDV-Infektion bei geimpften Puten nach einer Belastungsinfektion an unterschiedlichen Zeitpunkten nach Immunisierung.**

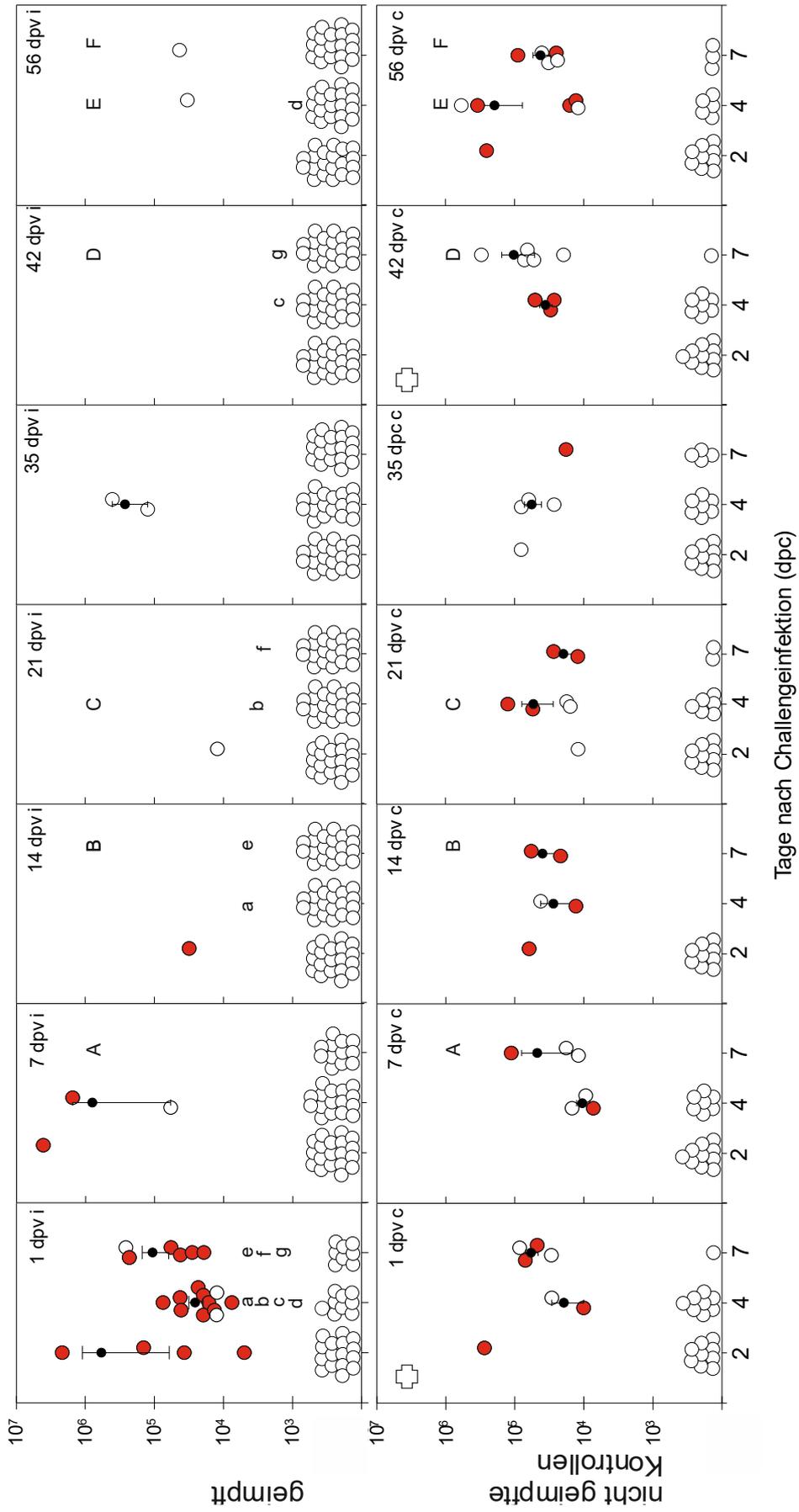
	1 dpv	7 dpv	14 dpv	21 dpv	35 dpv	42 dpv	56 dpv
<b>Mortalität</b>	70%	30%	0%	0%	5%	0%	0%
<b>Morbidität</b>	85%	40%	5%	0%	10%	0%	0%

### 3.3.2. Virusausscheidung

Nach den intramuskulären Belastungsinfektionen mit NDV Herts 33/56 konnte in allen nicht geimpften Kontrollgruppen Ausscheidung von Virus gemessen werden. Allerdings wiesen nur wenige einzelne Puten positive Tupferproben am Tag 2 nach Infektion auf. Zu den späteren Zeitpunkten erhöhte sich die Virus-Ausscheidung und war durchgängig bis zum Tag 7 nach Infektion mit positiven PCR- und Infektiositätswerten vorhanden (Abbildung 26). Die Virusausscheidung war ausreichend um nicht geimpfte Zustelltiere in den Kontrollgruppen der Tage 14-56 nach der Impfung zu infizieren. Klinische Auffälligkeiten begannen zwischen Tag 8 und 12 nach dem Dazusetzen und 4 von 5 erkrankte Puten starben. Eine Übertragung auf geimpfte Zustelltiere konnte in keinem Fall beobachtet werden.

Demgegenüber war bei den geimpften Puten nur bei denen, die bereits 1 Tag nach der Immunisierung infiziert wurden eine ausgeprägte Virusausscheidung zu beobachten. In den darauffolgenden geimpften Gruppen war nur noch vereinzelt Virus nachweisbar, das von 1 bis 2 Tieren an maximal einem Tag ausgeschieden wurde. Jedoch wurde keine Virusausscheidung bei der Gruppe, die 42 dpv infiziert wurde gemessen (Abbildung 26).

Allerdings war die Ausscheidung in den geimpften Gruppen ausreichend um in der Gruppe die am Tag 21 und Tag 35 nach der Impfung infiziert wurde jeweils das nicht geimpfte Zustelltier zu infizieren. 3 der 14 Sentineltiere zeigten Krankheitszeichen wie das Absondern von der Gruppe und zentralnervöse Störungen (Apathie und Seitenlage). In der Infektionsgruppe einen Tag nach Impfung (1 dpv) verstarb das geimpfte Zustelltier am 12. Tag (dpc). In den darauffolgenden Gruppen waren nur noch die nicht geimpften Zustelltiere in der Gruppe die am Tag 21 und 35 nach Impfung infiziert wurden betroffen, die am Tag 10 moribund bzw. am Tag 7 nach dem Dazusetzen erkrankten.



### **Abbildung 26: Virusausscheidung nach NDV-Belastungsinfektion.**

Geimpfte (i; oben, n=20) und nicht geimpfte (c; unten, n=10) Puten wurden an unterschiedlichen Zeitpunkten nach Impfung infiziert und Kombinationstupfer an den angegebenen Tagen entnommen. Dargestellt werden individuelle Ausscheidungswerte der Puten (○, GEQ/ml), Gruppendurchschnitte (●) und Standardabweichung. Infektiöse Tupfer sind rot gefüllt.

Signifikante Unterschiede zwischen den geimpften und nicht geimpften Kontrolltieren derselben Challengegruppe und desselben Tags sind mit (Großbuchstabe; A-F), zwischen den geimpften Gruppen und desselben Tags mit (Kleinbuchstaben; a-g) und beim Gruppenvergleich aller Kontrollgruppen sind mit (+) dargestellt. Die Signifikanz ist gekennzeichnet nach paarweisem Wilcoxon-Test mit Bonferroni-Korrektur ( $p < 0,05$ ).

#### **3.3.3. Antikörperantwort**

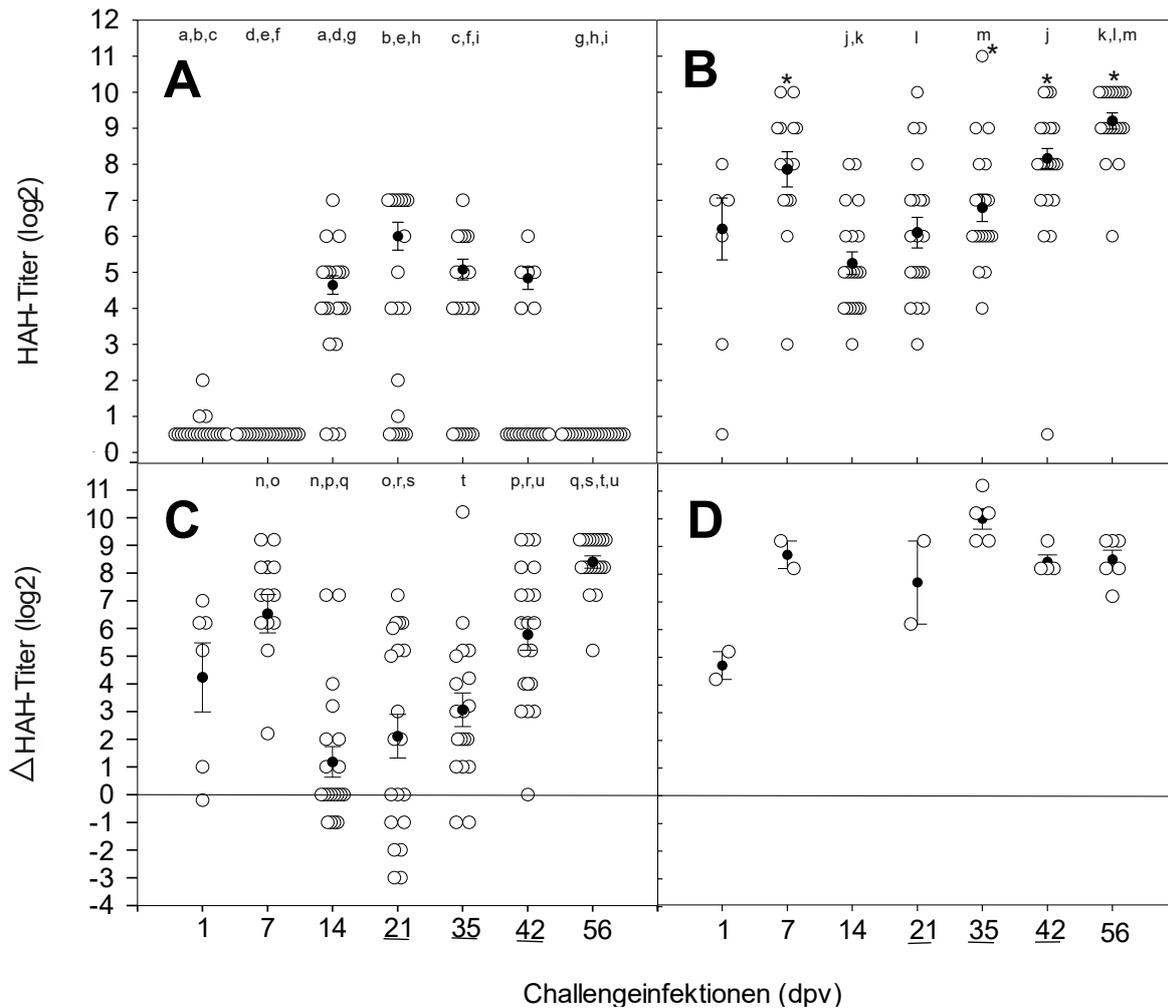
In Folge der Belastungsinfektion mit dem virulenten NDV-Stamm Herts 33/56 ist ein Anstieg der Antikörpertiter zu beobachten, der insbesondere bei Puten zu verzeichnen ist, die vor dem Infektionszeitpunkt einen niedrigen HAH-Titer aufwiesen bzw. sero-negativ waren (Abbildung 27; A und B). So weist die Gruppe die am Tag 7 dpv infiziert wurde nach der Infektion HAH-Titer ( $\log_2$ ) bis zu 10 auf (Gruppendurchschnitt  $8,1 \pm 1,93$ ). Demgegenüber liegen die HAH-Titer ( $\log_2$ ) der am Tag 14 dpv infizierten Gruppe bei maximal 8 (Gruppendurchschnitt  $5,3 \pm 1,4$ ) (Abbildung 27; B). Lediglich 2 Tiere wiesen einen Anstieg der HAH-Titer ( $\log_2$ ) von 7 auf, während 8 Tiere vergleichbare HAH-Titer aufweisen ( $\Delta$ HAH-Titerdurchschnitt  $1,7 \pm 2,3$ ; Abbildung 27; C). Im Gegensatz dazu war bei allen Puten bei denen 56 Tage nach der Immunisierung keine Antikörper nachweisbar waren (56 dpv) nach der Infektion sehr hohe Antikörperspiegel nachweisbar, mit 9 Seren die einen HAH-Titer ( $\log_2$ ) von 10 aufwiesen und einem Gruppendurchschnitt der HAH-Titer ( $\log_2$ ) von  $9,2 \pm 0,9$ . Ebenfalls stiegen, in Gruppen die insgesamt 3 Wochen nach Belastungsinfektion beobachtet wurden (Gruppen 21, 35 und 42), die  $\Delta$ HAH-Durchschnittswerte ( $\log_2$ ) wieder stark an (Abbildung 27; C).

Alle nicht geimpften Kontrollputen, die die Belastungsinfektion überlebt haben zeigten ebenfalls eine positive Immunantwort mit HAH-Titern ( $\log_2$ ) bis zu 11 (Abbildung 27; D; 35 dpv).

Geimpfte und nicht geimpfte Kontakttiere zeigten nach der Belastungsinfektion ebenfalls positive Blutproben im Hämagglutinations-Hemmungstest (Abbildung 28). So zeigte das

immunisierte Tier in der immunisierten Gruppe 7 (7 dpv) einen HAH-Titer ( $\log_2$ ) von 9 und blieb gesund. Das einzige sero-positive Kontakttier (nicht geimpft) in der geimpften Gruppe 35 (35 dpv) erkrankte und zeigte einen HAH-Titer ( $\log_2$ ) von 8 am Beobachtungsende. Das moribund erkrankte nicht immunisierte Kontrolltier der geimpften Gruppe 21 (21 dpv) blieb sero-negativ.

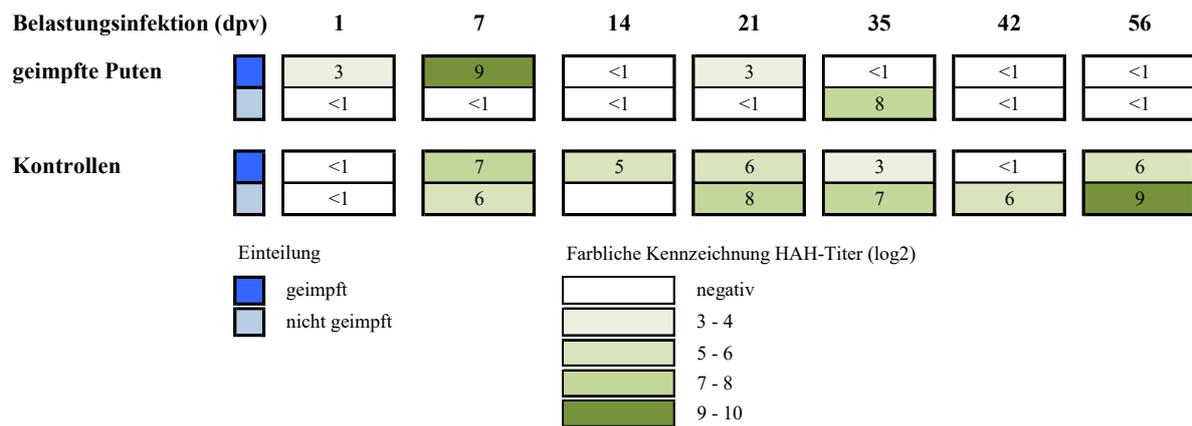
Geimpfte Zustelltiere der Kontrollgruppen blieben alle gesund und wiesen nacheinander HAH-Titer von jeweils ( $\log_2$ ) <1, 7, 5, 6, 3, <1 und 6 der nachfolgenden Belastungsinfektionen auf. Bei den erkrankten und nicht geimpften Kontakttieren der Kontrollgruppen konnten Titerwerte ( $\log_2$ ) von 6-9 beobachtet werden. Dabei erkrankten diese Tiere ab einer Infektion ab dem 35. Lebenstag bis zum Versuchsende.



**Abbildung 27: Antikörperantwort nach ND-Immunsierung und NDV- Belastungsinfektion bei geimpften und nicht geimpften Puten.**

Dargestellt sind die individuellen HAH-Titer ( $\log_2$ ) von geimpften Puten ( $n=20$ ) (A) zum Zeitpunkt der Belastungsinfektionen und (B) nach Belastungsinfektion mit 14 Tagen (1, 7, 14 und 56 dpv) und 21 Tagen Beobachtungszeitraum (21, 35 und 42 dpv). Ebenfalls dargestellt ist die Differenz der Titer vom Zeitpunkt der Belastungsinfektion und Versuchsende mit dem  $\Delta$ HAH-Titer ( $\log_2$ ) von geimpften Puten (C) und nicht geimpften Kontrolltieren (D). Neben den individuellen HAH-Titern (○) werden die Gruppendurchschnitte (●) und Standardabweichung angegeben.

Statistische Unterschiede der unterschiedlichen Gruppen nach paarweisem Wilcoxon-Test mit Bonferroni-Korrektur ( $p < 0,05$ ) werden mit (a-u) gekennzeichnet.



**Abbildung 28: Serologie der geimpften und nicht geimpften Kontakttiere.**

Dargestellt sind die Endtiterwerte (log<sub>2</sub>) von zusätzlichen Sentineltieren am Versuchsende. Die Puten wurden 2 Tage nach Belastungsinfektion zu den Infektionsgruppen dazugestellt und die Proben mittels HAH getestet. Gezeigt sind die geimpften (dunkelblau) und nicht geimpften (hellblau) Kontakttiere der unterschiedlichen Infektionsgruppen.

### 3.4. Virale Organbelastung

Alle mit NDV infizierten und erkrankten Tiere zeigten positive Werte (GEQ/ml) in mindestens einem untersuchten Organ (Tabelle 9). Auffällig sind die vielen negativen Lungenproben in den frühen Belastungsinfektionen 1 und 7 (1 dpv und 7 dpv) sowie der Kontrollgruppe der ersten Infektion am 22. Lebenstag (1 dpv). Erst ab der Kontrollgruppe zu der dazugehörigen Belastungsinfektion 7 (7 dpv) konnten 4 von 10 positive Lungenproben gemessen werden. Die darauffolgenden Kontrollgruppen wiesen ebenfalls nur 3-5 positive Lungenproben auf. Die höchsten und meisten positiven Werte an GEQ/ml traten in allen untersuchten Gruppen jeweils in den Gehirnproben auf. Dabei konnten bei den Kontrollgruppen Höchstwerte von  $3,59 \times 10^9$  GEQ/ml (14 dpv) beobachtet werden. Nachfolgend traten jeweils 8, 10, 8, 9, 7, 6 und 5 von 10 positive Pankreas- und Duodenumproben bei den nicht immunisierten Kontrollgruppen auf. Alle erkrankte Kontrolltiere wiesen ebenfalls positive Organproben auf. Dabei konnte bei gesunden Sentineltieren (Kontrollgruppe 7 dpv; Infektion 28. Lebenstag und Gruppe der Belastungsinfektion 1 dpv) auch positive Proben beobachtet werden.

**Tabelle 9: Virale Organbelastung immunisierter und nicht immunisierter Puten.**

Gruppeneinteilung	1 dpv				7 dpv				14 dpv				21 dpv				35 dpv				42 dpv				56 dpv			
	Gehirn	Lunge	Pankreas Duodenum																									
geimpft	-	-	-	6,30E+03	-	-	-	-	-	5,71E+07	-	-	-	4,38E+06	-	-	-	4,01E+04	-	-	-	-	-	-	-			
nicht geimpft	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,80E+05	-	-	1,58E+05	-	-	-	8,07E+02	-	-	-	-	-	-	-	-			
geimpft	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,79E+06	-	-	5,29E+04	-	-	-	5,29E+04	-	-	-	-	-	-	-	-			
nicht geimpft	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,50E+05	-	-	9,76E+04	-	-	-	9,76E+04	-	-	-	-	-	-	-	-			
geimpft	1,34E+04	-	-	-	-	-	-	-	1,11E+08	-	-	7,99E+05	-	-	-	7,99E+05	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
nicht geimpft	1,49E+05	-	-	-	-	-	-	-	1,22E+08	-	-	4,51E+04	-	-	-	4,51E+04	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
geimpft	2,43E+05	1,63E+04	-	-	-	-	-	-	8,60E+08	-	-	2,24E+06	-	-	-	2,24E+06	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
nicht geimpft	5,48E+08	-	1,22E+05	2,28E+05	-	-	-	-	2,08E+09	2,33E+05	8,30E+07	1,41E+05	4,75E+06	1,45E+04	1,47E+06													
geimpft	1,15E+10	-	1,29E+04	1,15E+10	-	-	-	-	2,40E+08	-	-	-	-	-	-	2,40E+08	-	-	-	-	-	-	-	-				
nicht geimpft	2,55E+07	-	3,58E+04	4,97E+03	-	-	-	-	3,25E+08	-	-	2,64E+04	-	-	-	3,25E+08	-	-	-	-	-	-	-	-				
geimpft	1,44E+06	-	-	7,61E+04	-	-	-	-	2,40E+08	-	-	1,09E+06	-	-	-	2,40E+08	-	-	-	-	-	-	-	-				
nicht geimpft	2,15E+08	-	4,27E+05	2,64E+09	-	-	-	-	4,82E+07	2,02E+06	9,07E+06	1,65E+06	2,71E+04	1,94E+06														
geimpft	9,68E+07	-	2,41E+05	3,17E+03	-	-	-	-	4,82E+07	2,02E+06	9,07E+06	1,65E+06	2,71E+04	1,94E+06														
nicht geimpft	1,80E+07	-	1,53E+05	7,16E+03	-	-	-	-	4,82E+07	2,02E+06	9,07E+06	1,65E+06	2,71E+04	1,94E+06														
geimpft	1,31E+07	-	-	8,23E+07	-	-	-	-	4,82E+07	2,02E+06	9,07E+06	1,65E+06	2,71E+04	1,94E+06														
nicht geimpft	6,47E+07	-	-	3,75E+06	-	-	-	-	4,82E+07	2,02E+06	9,07E+06	1,65E+06	2,71E+04	1,94E+06														
geimpft	8,09E+04	-	-	6,96E+09	-	-	-	-	4,82E+07	2,02E+06	9,07E+06	1,65E+06	2,71E+04	1,94E+06														
nicht geimpft	4,51E+09	1,15E+02	3,25E+06	5,72E+08	-	-	-	-	4,82E+07	2,02E+06	9,07E+06	1,65E+06	2,71E+04	1,94E+06														
geimpft	7,75E+05	3,34E+03	4,81E+06	7,88E+07	-	-	-	-	4,82E+07	2,02E+06	9,07E+06	1,65E+06	2,71E+04	1,94E+06														
nicht geimpft	-	-	-	4,50E+05	-	-	-	-	4,82E+07	2,02E+06	9,07E+06	1,65E+06	2,71E+04	1,94E+06														
geimpft	1,92E+05	-	4,77E+04	1,11E+08	-	-	-	-	4,82E+07	2,02E+06	9,07E+06	1,65E+06	2,71E+04	1,94E+06														
nicht geimpft	1,76E+06	-	1,09E+04	1,22E+08	-	-	-	-	4,82E+07	2,02E+06	9,07E+06	1,65E+06	2,71E+04	1,94E+06														
geimpft	1,08E+08	-	2,06E+05	8,60E+08	1,28E+04	6,57E+05	4,51E+04	2,08E+09	2,33E+05	8,30E+07	1,41E+05	4,75E+06	1,45E+04	1,47E+06														
nicht geimpft	2,79E+08	-	3,21E+05	4,24E+07	-	-	-	-	4,82E+07	2,02E+06	9,07E+06	1,65E+06	2,71E+04	1,94E+06														
geimpft	3,28E+07	-	1,52E+04	7,98E+09	2,81E+05	4,33E+05	2,01E+09	9,47E+05	5,02E+07	5,02E+07	6,49E+03	1,78E+05	3,98E+03	3,26E+06	3,98E+03	3,26E+06	3,98E+03	3,26E+06	3,98E+03	3,26E+06	3,98E+03	3,26E+06	3,98E+03					
nicht geimpft	1,03E+08	-	9,71E+05	5,02E+07	-	-	-	-	4,82E+07	2,02E+06	9,07E+06	1,65E+06	2,71E+04	1,94E+06														
geimpft	-	-	-	1,78E+05	-	-	-	-	4,82E+07	2,02E+06	9,07E+06	1,65E+06	2,71E+04	1,94E+06														
nicht geimpft	-	-	-	3,26E+06	-	-	-	-	4,82E+07	2,02E+06	9,07E+06	1,65E+06	2,71E+04	1,94E+06														

Farbliche Kennzeichnung Virusmenge (10<sup>3</sup>), GEQ/ml

Gruppeneinteilung

geimpft  1-3  6-7

nicht geimpft  4-5  8-10

negativ  -

Reihenfolge der Puten stimmt mit Abbildung 24 überein

## V. DISKUSSION

Hohe wirtschaftliche Schäden in Geflügelbetrieben können durch viralen Erreger wie die Newcastle Krankheit (Atypische Geflügelpest) ausgelöst werden. Neben der Merzung von infizierten Beständen, stellt die Impfung die zweite wichtige Säule der ND-Bekämpfung dar. Dabei besteht in Deutschland eine Impfpflicht für Hühner und Puten in allen Beständen gegen die Newcastle Krankheit.

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung einer protektiven Immunantwort verschiedener ND-Lebendimpfstoffe bei sehr frühzeitigen Applikationen durch die Neutralisation maternaler Antikörper gehemmt werden kann (BELL et al., 1991; CZIFRA et al., 1998; WESTBURY et al., 1984a). Somit spielt der optimale Impfzeitpunkt in Abhängigkeit des Alters der Putenküken eine besondere Rolle.

Des Weiteren reagieren Puten sehr untypisch auf eine Newcastle Disease Infektion. Frühere Berichte weisen daraufhin, dass Puten resistenter gegen eine ND-Infektion sind als gleich alte Hühner. Ebenfalls gibt es Unterschiede in der Pathogenität und der Immunantwort nach einer Impfung bei Puten zwischen dem 28. und dem 38. Lebenstag (ALEXANDER et al., 1999). Box (BOX et al., 1970) demonstriert ebenfalls eine längere Inkubationszeit bis zur moribunden Erkrankung (24-48h) bei Puten im Vergleich zu Hühnern. Sogar signifikant höhere Antikörper-Titer im Hämagglutinations-Hemmungstest konnten nach einer ND-Infektion bei Putenhähnen nachgewiesen werden (TSAI et al., 1992). Eine gewisse Altersresistenz entwickeln Putenküken bereits in der 4. Lebenswoche (BONEY et al., 1975; YADIN, 1976).

### **1. Empfänglichkeit juveniler und adulter Puten auf eine Newcastle Disease Virus Infektion**

Gesicherte Ergebnisse über die klinische Empfindlichkeit von Puten auf eine NDV-Infektion sind begrenzt und aufgrund von Virusstamm-spezifischen Unterschieden teilweise widersprüchlich. Die Überprüfung der Schutzwirkung eines ND-Impfstoffes erfordert allerdings nach dem Europäischen Arzneibuch, dass eine durchzuführende Belastungsinfektion in der ungeimpften Kontrollgruppe 90% der Tiere ausgeprägte klinische Symptome aufweisen bzw. an der Infektion sterben müssen. Um eine adäquate Schutzwirkung gegen eine Belastungsinfektion mit einem geeigneten ND-Virus zu testen wurde daher initial die Pathogenität von zwei NDV-Stämmen untersucht. Neben dem im

Europäischen Arzneibuch vorgeschlagenen Virusstamm aus dem Jahre 1956 (Herts 33/56, Klasse II, Genotyp IV) wurde ein aktuelles NDV-Isolat getestet, das im Zuge eines NDV-Ausbruches im Nahen Osten im Jahre 2012 isoliert wurde (chicken/middle east/R1468/2012, Klasse II, Genotyp VII). Initial wurden Putenküken im Alter von 28 Lebenstagen infiziert. Dieser Zeitpunkt ergab sich aus der Annahme, dass der Impfstoff in der ersten Lebenswoche eingesetzt wird und nach drei Wochen seine Wirksamkeit überprüft werden soll. Neben der im Europäischen Arzneibuch vorgesehenen intramuskulären Infektion sollte die oculo-nasale Inokulation untersucht werden. Letztere entspricht dem natürlichen Infektionsweg und würde bezüglich einer bestehenden Immunität, die lokale Immunität berücksichtigen.

Nach der Infektion der juvenilen Puten am 28. Lebenstag wiesen Tiere aller Gruppen klinische Anzeichen auf. Betroffen waren bis auf ein Tier in der Gruppe die mit der geringsten Dosis ( $10^4$  EID<sub>50</sub>) des Stammes NDV R1468/12, die i.m. inokuliert wurde, alle Tiere. Die ersten Tiere mit klinischen Zeichen traten zwischen dem Tag 3 pi (n=2) und 4 pi (n=31) nach Infektion auf bzw. es kam zu spontanen Todesfällen (Tag 4 pi, n=3; Tag 5 pi n=14). Dies deckt sich mit Berichten aus der Literatur. Nach Infektion von 6 Wochen alten spezifisch pathogen freien Putenküken brach die Erkrankung zwischen Tag 2 bis 5 nach Infektion auf, während die Inkubationszeit bei 4 Wochen alten Puten aus kommerzieller Herkunft 8-10 Tage betrug (PIACENTI et al., 2006). Das Spektrum der klinischen Zeichen stimmte mit denen in dieser Arbeit beobachteten klinischen Störungen überein. Die Tiere zeigten ebenfalls klinische Symptome wie Niedergeschlagenheit, unkontrollierte Bewegungen des Kopfes mit Inkoordination, Körpertremor, Paralyse von Beinen und Flügel und Todesfolge (PIACENTI et al., 2006). Die Art der Erkrankung stimmt dabei mit den klinischen Zeichen, die bei Hühnern beobachtet werden überein. Auch bei Hühnern tritt ebenfalls Niedergeschlagenheit, Torticollis, Paralyse, zentralnervöse Störungen sowie Durchfall, Ödematisierung des Kopfes, respiratorische Störungen und der Tod auf (McFERRAN & McCracken, 1988). Allerdings ist bei der Pute ein milderer Verlauf und längere Inkubationszeiten zu beobachten (BEAUDETTE, 1943). Inkubationszeiten bei akuten Krankheitsverläufen betragen im Vergleich beim Huhn 2, maximal 3 Tage (KAURA & IYER, 1937). Bei velogenen Krankheitsverläufen beträgt sie beim Huhn 3-4, meist 4-6 Tage mit einer raschen Ausbreitung innerhalb der Herde mit Todesfällen (KALETA, 1992).

Die Ergebnisse der vorliegenden Infektionsstudien verdeutlichen allerdings die Variabilität der klinischen Ausprägungen. Die Art der Inokulation scheint dabei eine untergeordnete Rolle zu spielen. Sowohl nach i.m. als auch bei der o.n. Inokulation kam es zu tödlichen Krankheitsverläufen und es waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Allerdings

erschien die klinische Manifestation nach o.n. Infektion variabler in Bezug auf die Virusdosis: So lag nach o.n. Infektion mit NDV Herts 33/56 und einer Viruskonzentration von  $10^5$  EID<sub>50</sub> die Mortalität bei 100%, in der Gruppe mit einer 10fach höheren Dosis ( $10^6$  EID<sub>50</sub>) allerdings bei 83%. Ein Tier erkrankte in dieser Gruppe erst nach einer Inkubationszeit von 9 Tagen. Bei den mit R1468/12 o.n. infizierten Tieren ist dies ebenfalls feststellbar: So genesen jeweils zwei Tiere in der mit  $10^4$  und  $10^6$  EID<sub>50</sub> inokulierten Gruppen, während in der Gruppe mit  $10^5$  EID<sub>50</sub> drei Tiere überleben. Dies spiegelt sich auch im Klinischen Index wieder, der relativ konstant bleibt. Nach i.m. Inokulation ist demgegenüber eine klare Dosisabhängigkeit nach Infektion mit dem Stamm R1468/12 festzustellen mit drei, zwei, bzw. keinem überlebendem Tier bei aufsteigender Virusdosis. Demgegenüber liegt bei Herts 33/56 bereits bei  $10^5$  und  $10^6$  EID<sub>50</sub> die Mortalität bei 100%.

Der variabler erscheinende klinische Verlauf nach o.n. Inokulation könnte an verschiedenen Abwehrmechanismen liegen, die den Infektionsverlauf bei der Infektion über die Schleimhäute modulieren. Die natürlichen Barrieren und lokale Abwehrmechanismen in den Schleimhäuten stehen den Viren als erste Schutzbarrieren gegenüber. Zudem ist bei Infektion über den Respirations- oder Digestionstrakt vor Generalisierung eine lokale Replikation notwendig, die durch Abwehrmechanismen der angeborenen Immunität bzw. früh einsetzender spezifischen Immunität stark beeinflusst werden kann (NEUMANN U. & KALETA, 1992). Demgegenüber ist durch die intramuskulären Inokulationen eine schnelle Ausbreitung zu postulieren mit einer rasanten systemischen Infektion. Darauf deutet die höhere Viruslast der Organe (Tabelle 4). Während nach i.m. Applikation von NDV Herts 33/56 insgesamt nur 4 Lungenproben negativ getestet wurden, waren im Vergleich 9 Lungenproben nach o.n. Infektion virusnegativ. Dies spiegelt sich auch in der Höhe der Viruslast in diesen Organen wieder.

In Bezug auf die Kriterien des Europäischen Arzneibuches, nach denen in einer nicht geimpften Kontrollgruppe mindestens 90% der Tiere schwer erkranken bzw. versterben müssen, würde nach o.n. Inokulation lediglich die Gruppe die  $10^5$  EID<sub>50</sub> des NDV-Stammes Herts 33/56 erhalten hat, eine valide Belastungsinfektion darstellen. Die zu beobachtende Variation nach o.n. Inokulation könnte allerdings den Erfolg einer Impfstoffüberprüfung gefährden. So wäre z.B. durch das nur leicht erkrankte Tier in der o.n. mit  $10^6$  EID<sub>50</sub> des NDV-Stammes Herts 33/56 inokulierten Gruppe, eine Vakzineprüfung nicht zu bewerten. Daher sollte für das einzusetzende Infektionsmodell die i.m. Applikation genutzt werden. Bei dieser Inokulationsart würde die Infektion mit  $10^5$  und  $10^6$  EID<sub>50</sub> des Stammes Herts 33/56 sowie  $10^6$  EID<sub>50</sub> des ND-Stammes R1468/12 die Vorgaben des Europäischen Arzneibuches

erfüllen. Somit bot der Stamm Herts 33/56 eine 10fache Sicherheitsspanne und wurde für die zukünftigen Experimente ausgewählt.

Ob dieses Infektionsmodell auf adulte Puten übertragbar ist, sollte durch die Infektion von 22 Wochen alten Puten geklärt werden. Dabei wurde in Anlehnung der vorangegangenen Untersuchungen der Stamm NDV Herts 33/56 mit Dosen von  $10^4$  bis  $10^6$  EID<sub>50</sub>/Pute getestet, wobei als Inokulationsmethode ausschließlich die robustere i.m. Inokulation verwendet wurde. Im Gegensatz zu den juvenilen Puten war bei den adulten Puten eine Altersresistenz gegen eine ND-Infektion feststellbar: Zwar erkrankten in der Gruppe mit der höchsten Viruskonzentration 8 der 10 22 Wochen alten Puten, aber es starben nur 2 der betroffenen Tiere (c.i. = 0,53; Abbildung 12; Gruppe AH6). Die restlichen 6 erkrankten Puten dieser Gruppe zeigten milde klinische Krankheitszeichen mit geringgradiger Apathie oder Inappetenz. Interessanterweise traten vergleichbare klinische Ergebnisse bei Gruppen, die die 10- und 100fach geringere Virusdosis erhalten hatten auf. Die Klinischen Indizes betragen bei diesen Gruppen jeweils 0,41 ( $10^4$  EID<sub>50</sub>) und 0,82 ( $10^5$  EID<sub>50</sub>) im Vergleich zu 0,53 ( $10^6$  EID<sub>50</sub>). Auch nach Infektion mit NDV R1468/12 war eine Abschwächung der Pathogenität bei adulten Puten zu beobachten. Bei diesem Stamm beschränkte sich die Infektion auf eine Konzentration von  $10^6$  EID<sub>50</sub> pro Tier, da nur mit dieser Konzentration bei jungen Tieren eine Mortalität von 100% induziert wurde. Bei den adulten Tieren erkrankten zwar 9 von 10 infizierten Tieren, die Klinik war allerdings nur mild und die Tiere erholten sich bis zum Versuchsende von der Infektion ohne dass es zu Todesfällen gekommen wäre.

Die abgeschwächte Pathogenität in den adulten Tieren kann nicht auf eine fehlende Virusreplikation zurückgeführt werden. So war bei Puten aller adulten Tiergruppen Virus in den oralen und kloakalen Tupferproben nachweisbar, unabhängig von der Viruskonzentration. In der Gruppe der R1468/12 ( $10^6$  EID<sub>50</sub>) infizierten Tieren mit ausbleibender Mortalität war sogar eine ab dem Tag 2 nach Infektion eine höhere und konstant anhaltende Virusreplikation zu beobachten (Abbildung 14). Die serologischen Daten stützen die virologischen Befunde einer anhaltenden Virusreplikation: Wie bei den überlebenden juvenilen Puten serokonvertierten ebenfalls alle adulten Tiere (Abbildung 13).

Da die adulten Tiere i.m. infiziert wurden, der Virusnachweis allerdings lokal erfolgte, sprechen die Befunde für die Fähigkeit der Viren sich auch in den adulten Tieren hämatogen auszubreiten. Eine lokale Beschränkung der Replikation auf den oberen Respirationstrakt und den Verdauungstrakt wäre denkbar. Die Ergebnisse aus dem Versuch 3 (Experiment vi) weisen allerdings bei überlebenden ungeimpften Kontrolltieren Virus in der Lunge und

Gehirn nach (Tabelle 9). Speziell eine Replikation im Gehirn ist für velogene Pathotypen zu erwarten. Der positive Virusnachweis in überlebenden Tieren legt allerdings den Schluss nahe, dass nicht alleine der Organtropismus des Virus entscheidend für die Pathologie der Erkrankung ist. Weiterführende Untersuchungen zur Manifestation und feingeweblichen Veränderungen im Gehirn von Tieren mit positivem Virusnachweis, könnten in zukünftigen Untersuchungen helfen diesen Sachverhalt zu klären.

In Bezug auf die Überprüfung einer ND-Impfung bleibt zu konstatieren dass die nachgewiesene Altersresistenz den Nachweis einer Schutzwirkung nach den Richtlinien des Europäischen Arzneibuches unmöglich macht. Die geförderten Mortalitätsraten (90%) der nicht geimpften Kontrolltiere werden nicht erreicht.

## **2. Bestimmung des optimalen Impfzeitpunktes und der notwendigen/geeigneten Impfstoffdosis**

Durch die in Deutschland bestehende Impfpflicht bei Geflügel sind mehrere Impfstoffe für eine Schutzimpfung entwickelt worden. Tabelle 1 zeigt die zugelassenen Impfstoffe für die jeweiligen Geflügelspezies. Dabei werden für eine Schutzimmunsierung bei Puten aktuell die Virusstämme LaSota und Clone 30 in Deutschland verwendet. Eine Schlüsselrolle eines wirkungsvollen ND-Impfstoffs ist die frühzeitige Induzierung einer protektiven Immunität. Daher wurden ND-Lebendimpfstoffe, wie AviPro ND C131 mit reduzierter Virulenz entwickelt. Sie werden von den Impflingen, auch bei Verabreichung frühzeitig nach dem Schlupf ohne Nebenwirkungen vertragen.

Aufgrund des hohen Infektionsdruckes in endemisch von ND betroffenen Regionen, liegen bereits unterschiedliche Impfstudien zur frühen Applikation von ND-Impfstoffen vor. So untersuchte Yadin (YADIN, 1976) an Puten mit mütterlicherseits übertragenen Immunität eine Spray-Vakzination mit den Impfstoffen Hitchner oder LaSota am 7., 35. und 63. Lebenstag. In dieser Studie war ein Anstieg der Antikörper-Titer erst 2 Wochen nach der ersten Impfung messbar. Eine Wiederholungsimpfung in der 9. Lebenswoche brachte die höchsten Antikörper-Titer. Bei unterschiedlichen Applikationswegen demonstrierte Bengelsdorff (BENGELSDORFF, 1973) bei 2 Wochen alten Puten eine bessere Immunreaktion nach einer Impfung mit LaSota. Eine intramuskuläre Applikation induzierte dabei die schlechtesten HAH-Antikörperwerte. Nasale, intratracheale oder Spray-Impfungen mit dem NDV-Stamm Hitchner B1 demonstrierten höhere Antikörperwerte.

In der vorgelegten Untersuchung sollte spezifisch die Wirksamkeit eines in der Virulenz abgeschwächten Newcastle Disease Impfstoffes (LAH; AviPro ND C131) untersucht werden. Erfahrungen mit diesem Impfstoff bei Hühnern konnten als Anhaltspunkt dienen, aufgrund der besonderen Biologie von Puten waren allerdings die Details der ND-Impfung mit dem Impfstoff spezifisch für Puten zu etablieren. Die Untersuchungen des zweiten Teilprojektes sollten den optimalen Impfzeitpunkt und die notwendige Impfdosis für die Induzierung eines adäquaten Impfschutzes ermitteln. In Anlehnung an die Verhältnisse in der Praxis wurden die durchgeführten Impfungen mit Tieren von geimpften Elterntieren durchgeführt, die maternale Antikörper (MDA) aufweisen.

Der Impfstoff wurde nach Applikation in kombinierten Choanen-, Kloakentupfern nachgewiesen und erfolgreich auf nicht geimpfte Sentineltiere übertragen (Abbildung 16). Dies spricht für eine effiziente Replikation des Virus, die bis zum Tag 10 pv anhielt, mit vereinzelt Nachweisen sogar am Tag 14 pv. Signifikante Unterschiede bestanden dabei zwischen den in der 1. Lebenswoche geimpften Tieren und Tieren, die in der 2. und 3. Lebenswochen geimpft wurden: Dabei waren die Ausscheidungswerte nach der Impfung in der 1. Lebenswoche am höchsten. Sehr gleichmäßig und homogen war die Virusausscheidung bei den ältesten Puten messbar. So zeigten zusätzlich dazugestellte Sentineltiere bereits 4 Tage nach der Impfung eine positive Impfvirusreplikation bei der Schutzimpfung nach der 3. Lebenswoche.

Trotz dieser ausgeprägten Virusreplikation wurden die durchgeführten Impfungen von den Puten aller Altersklassen gut vertragen: Es traten keine Nebenwirkungen und dosisabhängige klinische Auffälligkeiten aufgrund der Impfung innerhalb der verschiedenen Gruppen auf. Dies spricht für die gute Verträglichkeit des Impfstoffes. Aerosol-Impfungen mit dem Lebendvakzinen Hitchner B1 können dahingegen vermehrtes Niesen und eine leicht reduzierte Gewichtszunahme bei Hühnerküken verursachen. Diese Symptome sind bei einer LaSota-Impfung im Vergleich stärker ausgeprägt (WESTBURY et al., 1984b).

Ein klinischer Schutz durch das Impfvirus war jedoch trotz der ausgeprägten Virusreplikation nicht in allen Altersgruppen nachweisbar (Abbildung 18). Ein 90%iger klinischer Schutz war nur bei den Puten messbar, die in der 3. Lebenswoche immunisiert wurden. Die Schutzwirkung und die Zulassungsvoraussetzung nach dem Europäischen Arzneibuch (ND-Lebendimpfstoff 01/2008:0450) konnten somit nur bei einer Durchführung der Impfung ab dem 21. Lebenstag bestätigt werden. Im Gegensatz dazu wurde der zugelassene

Mortalitätsgrenzwert von 10% bei den in der 1. und 2. Lebenswoche geimpften Puten übertroffen.

Ein Grund für die ungenügende Wirksamkeit des Impfstoffes nach Applikation in der 1. und 2. Lebenswoche könnte im Vorliegen der maternalen Antikörper liegen. Es ist bekannt, dass maternale Antikörper bei sehr frühzeitigen Impfungen nach dem Schlupf mit dem Impfvirus interferieren können. Dies ist gut für die Impfung gegen das Infektiöse Bursitis Virus dokumentiert (BLOCK et al., 2007).

Weitere Experimente mit Küken zeigen ebenfalls die Interferenz maternaler Antikörper mit Lebendimpfstoffen und die Möglichkeit das Impfvirus zu neutralisieren (BENGELSDORFF, 1973 & 1974a; GIAMBRONE & CLOSSER, 1990).

Bei unseren Experimenten wurden immunisierte Putenküken verwendet, die als Nachzucht von kommerziell geführten Brütereien stammen. Diese Elterntiere wurden gegen die Newcastle Krankheit geimpft. Dementsprechend waren bei den Putenküken hohe Titer von maternalen Antikörpern messbar. Die höchsten Titerstufen wurden am 2. Lebenstag beobachtet mit einer anschließenden Abnahme bis unter die Nachweisgrenze ab dem 35. Lebenstag (Abbildung 15). Demzufolge bestehen bei juvenilen Puten hohe maternale Antikörpertiter bei sehr frühzeitigen Impfungen. Allerdings reduzieren die gegen NDV gerichteten maternalen Antikörper der vorliegenden Experimente nicht die lokale Replikation des Impfvirus (Abbildung 16). Im Gegenteil, die höchste Replikation des Impfvirus ist in den jüngsten Putengruppen (geimpft am 7. Lebenstag) zu beobachten. Interessanterweise treten keine Unterschiede bei der Höhe der Impfvirus-Ausscheidung bei denen am 14. und 21. Lebenstag geimpften Puten auf, obwohl die maternalen Antikörper-Titer am 14. Tag nach Schlupf höhere Werte aufweisen. Diese kombinierten Daten aus Serologie und Virusreplikation bekräftigen die Vorstellung, dass maternale Serumantikörper nicht die lokale Virusreplikation beeinflussen. Dies ist nachvollziehbar, da die mukosale Immunität vorwiegend durch IgA vermittelt wird, die zwar über den Eidotter übertragen werden (KASPERS et al., 1996), aber nicht in den Blutkreislauf der Nachzucht aufgenommen werden und als protektive Immunglobuline im Verdauungstrakt der frisch geschlüpften Küken begrenzt bleiben (ROSE & ORLANS, 1981). Folglich sind maternale Antikörper nicht in der Lage die lokale Replikation von Impfvirus zu unterdrücken. Dennoch induziert das replizierende Impfvirus keine protektive Immunität bei Putenküken mit maternalen Antikörpern vor der 3. Lebenswoche.

Frühere Impfversuche mit Puten zeigen unterschiedliche Entwicklungen der Immunantwort und des klinischen Schutzes in Abhängigkeit des maternalen Immunstatus, des Tieralters und des Impfmanagements. So zeigt z.B. eine orale Impfung von 4 Wochen alten Puten mit einem lentogenen Hitchner-B1-Stamm ( $10^{7.4}$  EID<sub>50</sub>/ml/Pute) eine 95%ige Schutzwirkung gegen verschiedene Challengeviren. Eine Dosisreduzierung der Impfstoffkonzentration auf  $10^6$  EID<sub>50</sub>/ml/Pute reduzierte den klinischen Schutz ebenfalls auf 80%. Im Vergleich zum Impfstamm LaSota mit der selbigen Dosis ( $10^6$  EID<sub>50</sub>/ml) konnte keine bessere Schutzwirkung des Impfvirus beobachtet werden (BENGELSDORFF, 1974a). Puten, die mit einem Hitchner-B1-Stamm immunisiert wurden zeigten in einer anderen Studie höhere Antikörperwerte nach einer nasalen-, intratrachealen- oder Spray-Impfung. Den geringsten Schutz wiesen die Tiere zwischen der 2. und 5. Lebenswoche auf. Ebenfalls waren nicht immunisierte Puten weit weniger empfänglich gegen das Challengevirus als Hühner (BENGELSDORFF, 1973). Ein weiterer Immunisierungsversuch mit einem LaSota-Stamm beschreibt eine unzureichende Immunantwort von Puten mit maternalen Antikörpertitern. Die Revakzination dieser Tiere in der 4. -6. Lebenswoche zeigt die Sensibilisierung der immunisierten Tiere durch die vorangegangene Impfung. Sie zeigen durch die Revakzinierung hohe und langanhaltende HAH-Titer ( $\log_2$ ) zwischen 8 und 9 (BOX et al., 1976).

Neben dem Vorliegen von maternalen Antikörpern könnte auch allein das Alter der Tiere für die schlecht ausgebildete Immunität nach einer frühzeitigen Impfung verantwortlich sein. Alexander und Kollegen beschreiben, dass das Alter von Hühnern oder Puten eine Hauptrolle für die Entwicklung der Immunantwort durch die Schutzimpfung spielt. Dies zeigen verschiedene Untersuchungen an 28 und 38 Tage alten geimpften und nicht geimpften Puten (ALEXANDER et al., 1999). Ein vergleichbares Phänomen wurde bei Verwendung eines inaktivierten Impfstoffes gegen *Bordetella avium* bei antikörperfreien Puten beobachtet. Unabhängig ob der Impfstoff im Alter von 1, 7, 10, 14 oder am 21. Lebenstag verabreicht wurde, waren Antikörper frühestens ab dem 28. Lebenstag nachweisbar (GLÜNDER et al., 2004).

Dies deckt sich mit Untersuchungen von Smialek und Kollegen (SMIALEK et al., 2015) die zeigen, dass Puten mit selbst geringen Spiegeln maternaler Antikörper frühestens 7 Tage nach der Impfung gegen das Virus der Puten Rhinotracheitis (TRT) reagieren.

Ein möglicher Einfluss von maternalen Antikörpern auf die Immunantwort könnte durch eine Interferenz bei der systemischen Erkennung von viralem Antigen bedingt sein. Zirkulierende

maternale Antikörper würden dabei das virale Antigen binden und es dadurch vor antigenpräsentierenden Zellen verschleiern. Diese Hypothese würde übereinstimmen mit der Beobachtung, dass maternale Antikörper mit der Immunantwort auf inaktivierte Impfstoffe interferieren (ABDELWHAB et al., 2012). Dies stimmt mit Untersuchung von Box überein, der beobachtete, dass Putenküken mit maternalen Antikörpern auf eine Impfung (intraokulär/intranasal sowie intramuskulär) innerhalb der ersten 4 Lebenswochen nur eine schwache Antikörperantwort ausbilden. Eine Revakzination dieser geimpften Gruppen nach 4 bis 6 Wochen resultiert in hohe langanhaltende HAH-Titer und zeigt, dass diese Tiere durch die Erstimpfung sensibilisiert wurden. Eine wiederholte Impfung im Alter von 29 Wochen bewirkt eine nochmalige Erhöhung der HAH-Titer ( $\log_2$ ) auf 10-11 (BOX et al., 1976).

Von Haushühnern (*Gallus gallus var. domesticus*) ist bekannt, dass ihr Immunsystem nach dem Schlupf erst reifen muss und seine volle Funktionalität nicht vor der 6. bis 8. Lebenswoche erreicht wird (JUNGBÄCK, 2006). Beispielsweise wird die de-novo-Synthese von IgA bereits zwischen dem 6. und 13. Lebenstag eingeleitet. Jedoch benötigt es weitere 7 Wochen nach dem Schlupf bevor die IgA-Expression ihre Höchstwerte erreicht (LAMMERS et al., 2010). Entsprechende Daten über die Entwicklung des Immunsystems bei Puten liegen nicht vor, wären aber wichtig für die wissenschaftlich fundierte Impfprogramme bei Jungtieren. Weitere Studien sollten diese Fragestellung behandeln um Impfversagen durch zu frühes Impfen zu vermeiden. Es wäre zu klären ob dies ein Impfstamm spezifisches Phänomen darstellt oder generelle physiologische Ursachen hat.

Aus praktischer Sicht wäre die Ermittlung eines optimalen Impfzeitpunktes in Abhängigkeit der maternalen Antikörperspiegel zu erwägen. Entsprechende Strategien haben sich bei der Infektiösen Bursitis (IBD) durchgesetzt. Unter Berücksichtigung der Halbwertszeit von maternalen Antikörpern kann durch serologische Untersuchungen ein Zeitfenster für den optimalen Impfzeitpunkt gewählt werden, bei dem der Impfstoff für das Küken unschädlich ist und eine gute Immunantwort induziert. Für diese Berechnung hat sich die Deventer Formel bewährt (JUNGBÄCK, 2006). Dies wäre spezifisch für Puten zu untersuchen.

Die Untersuchungen weisen ebenfalls darauf hin, dass Antikörperspiegel gemessen im HAH keine verlässlichen Aussagen über die Schutzwirkung erlauben. So wiesen auch die mit drei Wochen geimpften und geschützten Gruppen, einen hohen Anteil an sero-negativen Tieren auf. Die Entwicklung von Surrogat Markern, die eine Voraussage einer Schutzwirkung gestatten wäre wünschenswert.

In Bezug auf die Impfstoffzulassungsuntersuchungen belegten die Ergebnisse dieser Teilstudie die Wirksamkeit einer Impfung am 21. Tag nach Schlupf. Bereits bei einer Impfstoffkonzentration von  $10^5$  EID<sub>50</sub>/Pute waren 90 % der Tiere gegen die klinische Manifestation einer Newcastle Krankheit geschützt. Auch die 100fache Dosierung ( $10^7$  EID<sub>50</sub>/Pute) wurde gut von den Puten vertragen. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde für die finale Prüfung des Impfstoffes mit einer Impfstoffkonzentration von  $10^{6,3}$  EID<sub>50</sub>/Pute eine Sicherheitsmarge berücksichtigt und als Impfzeitpunkt die dritte Lebenswoche gewählt.

### **3. Bestimmung des Einsetzens und der Dauer der Immunität nach einfacher Impfstoffgabe**

Ausgehend von den Ergebnissen der vorangegangenen Experimente wurden für die finalen Untersuchungen gemäß des Europäischen Arzneibuches 20 geimpfte und 10 ungeimpfte Puten pro Zeitpunkt untersucht.

Das etablierte Modell der Belastungsinfektion löste in allen nicht immunisierten Kontrollgruppen eine klinisch manifeste Newcastle Krankheit aus. Allerdings blieb ein Kontrolltier der jüngsten Gruppe, die am 22. Lebenstag infiziert wurde über den gesamten Beobachtungszeitraum gesund. Ein weiteres Küken zeigte nur an einem Beobachtungstag geringfügige Lethargie (7 Tage nach Infektion), war sonst aber klinisch unauffällig. Bei beiden Tieren wurde am Tag 7 nach Infektion Virus nachgewiesen und die Tiere serokonvertierten nach der Infektion. Alle Kontrollputen die eine Woche später infiziert wurden (Belastungsinfektion am 28. Lebenstag) erkrankten und es starben 8 Tiere dieser Gruppe. In der Kontrollgruppe, die am 35. Lebenstag infiziert wurde starben alle Puten innerhalb 8 Tage nach der Infektion.

Dieser Anstieg der Morbidität/Mortalität stände im Einklang sinkender Restaktivität der maternalen Antikörper. Die Werte der maternalen Antikörper nehmen über die ersten Lebenswochen ab, und waren allerdings ab dem 21. Lebenstag nicht mehr im HAH nachweisbar. Dies würde wiederum bestätigen, dass der HAH kein Korrelat der Protektion ist. Diese Daten belegen aber eindeutig die zeitliche Beschränkung der Wirksamkeit der passiven Immunität, die bei Mastputen mit 3 Wochen nach dem Schlupf nur sehr eingeschränkt vorhanden ist.

Bei den weiteren Belastungsinfektionen ist ab dem 56. Lebenstag eine allmähliche Zunahme der Resistenz zu beobachten. Bei den Puten die älter als 6 Wochen alt sind nehmen die Klinischen Indizes (c.i.) nach den Infektionen weiter ab. Den geringsten Wert (c.i.) zeigt die

Kontrollgruppe 56 Tage nach Impfung, die zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion 11 Wochen alt ist (c.i. = 1,04). Dort überleben 6 Puten den gesamten Beobachtungszeitraum. Im Gegensatz zu den Infektionen in der 22. Lebenswoche (Experiment ii) zeigen alle bis zu 11 Wochen alten Tiere klinische Anzeichen einer Newcastle Krankheit. Dementsprechend konnte die Wirksamkeitstestung des ND-Impfstoffs gemäß den Richtlinien des Europäischen Arzneibuchs eindeutig bis zu 8 Wochen nach der Impfung am 21. Lebenstag durchgeführt und getestet werden.

Die Ergebnisse der geimpften Tiere belegen, dass eine Impfung mit AviPro ND C131 eine belastbare Immunität in jungen Puten ab Tag 14 nach der Impfung induziert. Eine Interferenz zwischen dem Impfvirus und dem velogenen NDV-Stamm Herts 33/56, die durch Infektion am Tag 1 nach der Impfung getestet wurde, ist nicht nachweisbar. Der Grad der auftretenden Klinik und der Virusausscheidung ist nicht von der Kontrollgruppe zu unterscheiden. Allerdings ist bereits am Tag 7 nach der Impfung eine Reduktion der klinischen Manifestation und auch der Virusausscheidung zu verzeichnen.

Die Unterschiede zwischen den geimpften und den dazugehörigen nicht geimpften Gruppen sind jedoch erst ab einem Zeitraum von 14 Tagen nach der Impfung signifikant (Abbildung 24; \*). Dies würde mit der physiologischen Kinetik einer Immunantwort korrelieren. Die einsetzende Antikörperantwort wird durch die auftretenden Serokonversion 2 Wochen nach der Schutzimpfung untermauert (Abbildung 27). Allerdings bleiben bereits zu diesem frühen Zeitpunkt der Belastungsinfektion Tiere sero-negativ, sind aber klinisch geschützt. Dieser Anteil an klinisch geschützten aber HAH sero-negativen Tieren nimmt stetig zu und findet seinen Höhepunkt am Tag 56 nach der Impfung, an dem alle Puten zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion sero-negativ sind.

Interessanterweise ist festzustellen, dass der virulente NDV-Stamm Herts 33/56 eine Induktion von Serumantikörpern bereits eine Woche nach der Infektion auslöst: Dies war bei den Vorversuchen zur Etablierung des Belastungsinfektionsmodells bei Infektion der 4 Wochen (Abbildung 9) und 22 Wochen alten Puten (Abbildung 13) evident. Im Vergleich zu den geimpften Tieren induziert die Infektion mit dem virulenten NDV-Stamm Herts 33/56 höhere HAH-Titer. Während bei den durchgeführten Impfungen maximale HAH-Titer ( $\log_2$ ) von 7 auftraten (Abbildung 17 und Abbildung 27), sind nach Infektion mit NDV-Stamm Herts 33/56 Maximalwerte von 10 ( $\log_2$ ) festzustellen. Diese stärkere Immunogenität des virulenten NDV-Stammes Herts 33/56 könnte Ausdruck einer systemischen Infektion darstellen, mit Virus-Replikation in mehreren parenchymalen Geweben. Demgegenüber bleibt

aufgrund ihrer Trypsinabhängigkeit die Replikation der lentogenen NDV-Impfstämme auf den Respirations- und Verdauungstrakt begrenzt (ALEXANDER et al., 2004).

Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass HAH-Antikörper-Titer zwar nicht als Korrelat der Immunität dienen können, aber als indirekter Marker für die Replikation virulenter NDV Herst 33/56 nach Belastungsinfektion geeignet wären. Untersucht man diese Hypothese an den serologischen Daten nach Belastungsinfektion so fällt auf, dass die Höhe der Antikörpertiter am Ende des Versuches umgekehrt proportional zu den Antikörpertitern vor Belastungsinfektion sind: So serokonvertierten alle Puten, die 7 Tage nach der Impfung infiziert wurden und vor der Belastungsinfektion sero-negativ waren und anschließend HAH-Titer ( $\log_2$ ) von bis zu 10 aufwiesen. Das gleiche Phänomen war in der Gruppe zu beobachten, die am Tag 56 nach Impfung mit NDV Herts 33/56 infiziert wurde. Im Gegensatz dazu war bei Puten, die 14 bzw. 21 Tage nach Impfung infiziert wurden und vor Infektion HAH-Titer ( $\log_2$ ) von bis zu 7 aufwiesen nach Belastungsinfektion nur ein geringer Anstieg der HAH-Titer zu beobachten (Abbildung 27, C). Vergleicht man nun die lokale Virusausscheidung der kombinierten Rachen- und Kloakentupfer zwischen den Gruppen mit hohem und geringen Antikörperanstieg sind keine Unterschiede festzustellen: In allen Gruppen liegen nur sporadische Virusnachweise vor. Die Virusausscheidung war in den geimpften Gruppen, die am Tag 42 und 56 nach der Impfung infiziert wurden so gering (Abbildung 26), dass Virus nicht auf geimpfte Sentinelputen übertragen wurde.

Ob der Anstieg der Antikörper jedoch Ausdruck einer systemischen Antigenstimulation ist, z.B. durch Ausbreitung in lymphatische Gewebe wie die Cäcaltonsillen oder Milz, kann durch die durchgeführten Untersuchungen nicht beurteilt werden. Folgeuntersuchungen zum Antigengehalt in den Organen wären geeignet diese Fragestellung zu bearbeiten. Die Ergebnisse könnten wichtige Hinweise auf den adäquaten Zeitpunkt einer Auffrischungsimpfimmunisierung liefern. Sie würden somit zur Verbesserung des Impfprotokolls beitragen. Eine Testung der Seren vor und 21 Tage nach Re-Vakzinierung kann zum Beispiel klären ob eine Re-Vakzinierung in der Lage ist die Immunantwort zu re-stimulieren.

Basierend auf den durchgeführten Untersuchungen konnte ein Impfprotokoll erarbeitet werden, dass nach einmaliger oraler Applikation des Impfstoffes an dreiwöchige Puten auch in Gegenwart maternaler Antikörper einen Impfschutz für 8 Wochen (56 Tage) induziert. Die Demonstration eines länger anhaltenden Impfschutzes wird durch den nachgewiesenen altersabhängigen Anstiegs der Resistenz gegen eine klinisch manifeste Newcastle Krankheit erschwert. Daher ist eine Auffrischungsimpfung alle 8 Wochen anzuraten. Für weibliche

Masttiere wäre eine einmalige Auffrischungsimpfung in der 11. Lebenswoche ausreichend, während für männliche Tieren, bei 22 Wochen Mastdauer, eine dritte Auffrischungsimpfung in der 19. Lebenswoche notwendig wäre. Die Impfintervalle würden entsprechend für die Zuchttiere verlängert werden.



## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit überprüft die Wirksamkeit eines in der Virulenz abgeschwächten ND-Lebendimpfstoffes (AviPro ND C131) für Puten. Bei den initialen Experimenten zur Validierung des Belastungsinfektionsmodells gemäß Europäischem Arzneibuch erwies sich der klassische NDV-Stamm Herts 33/56 gegenüber einem aktuell zirkulierenden velogenen Genotyp VII NDV-Stamm (R1468/12) als pathogener für Puten: Die Infektion mit dem NDV-Stamm Herts 33/56 führte nach i.m. Infektion von 4 Wochen alten Puten bereits bei einer Infektionsdosis von  $10^4$  EID<sub>50</sub> zu einer Mortalität von 83%, die bei Infektionsdosen von  $10^5$  EID<sub>50</sub> und  $10^6$  EID<sub>50</sub> auf 100% gesteigert war. Demgegenüber führte die Infektion mit dem NDV Genotyp VII Stamm erst bei einer Dosis von  $10^6$  EID<sub>50</sub> zu einer Mortalität von 100%, während bei den Infektionsdosen von  $10^4$  EID<sub>50</sub> und  $10^5$  EID<sub>50</sub> die Mortalitätsraten bei 50 und 66% lagen. Bei oculo-nasaler Infektion war diese deutliche Korrelation von Viruskonzentration zur Mortalitätsrate für beide NDV-Stämme nicht gegeben, und bei dem NDV-Stamm R1468/12 erreichte die Mortalität auch bei Verwendung von  $10^6$  EID<sub>50</sub> nur 66%.

Bei einer Infektion von 22 Wochen alten Puten betrug die Mortalität nach i.m. Infektion mit  $10^6$  EID<sub>50</sub> bei dem NDV-Stamm Herts 33/56 lediglich 20% und bei dem NDV Genotyp VII R1468/12 wiesen die Tiere lediglich leichte klinische Störungen auf, und es verstarb kein Tier. Demzufolge wurden die folgenden Wirksamkeitsprüfungen des ND-Impfstoff, die gemäß dem Europäischen Arzneibuchs eine Mortalität bzw. das Auftreten von erheblichen klinischen Störungen bei 90% der ungeimpften Kontrollputen fordert, nur bei juvenilen Puten durch i.m. Belastungsinfektion mit  $10^6$  EID<sub>50</sub> des NDV-Stammes Herts 33/56 geplant.

Der zweite Experimentaltel klärte für den Impfstoff AviPro ND C131 den bestmöglichen Impfzeitpunkt bezogen auf das Alter der Tiere sowie die einzusetzende Impfstoffkonzentration. Unabhängig von der Impfstoffkonzentration ( $10^5$ ,  $10^6$  und  $10^7$  EID<sub>50</sub>/Pute) wurde die Impfung sehr gut vertragen, und es traten zu keinem Zeitpunkt Nebenwirkungen auf. Allerdings wurde nur bei der Impfung von 3 Wochen alten Puten ein zu fordernder Schutz von 90% oder mehr bei den geimpften Tieren erreicht, während nach Impfung von 1 und 2 Wochen alten Tieren die Mortalität nach Belastungsinfektion zum Teil bei 100% lag. Die Schutzwirkung war bei den 3 Wochen alten Tieren bereits ab einer Impfstoffkonzentration von  $10^5$  EID<sub>50</sub> gegeben. Für die anschließende Prüfung des zeitlichen

Eintritts sowie Dauer der Immunität wurde mit einer 10fach höheren Dosis als Sicherheitsmarge des Impfstoffs AviPro ND C131 ( $10^{6,3}$  EID<sub>50</sub>/Pute) geplant.

Der abschließende Tierversuch wies nach Immunisierung von 3 Wochen alten Puten die Ausbildung einer voll ausgebildeten Immunität innerhalb von 14 Tagen nach, die bis zur letzten Belastungsinfektion, 56 Tage nach der Impfung, unverändert voll ausgeprägt war. Das Einsetzen des klinischen Schutzes ging zeitlich einher mit dem Auftreten von NDV-spezifischen Serumantikörpern am Tag 14 nach der Impfung. Allerdings lag keine direkte Korrelation der im Hämagglutinations-Hemmungstest (HAH) gemessenen Antikörperspiegel und dem klinischen Schutz vor: Zu keinem Zeitpunkt der 7 Belastungsinfektionen waren in allen geschützten Tieren HAH-Titer nachweisbar bzw. vor der letzten Belastungsinfektion am Tag 56 nach Impfung waren sogar alle Tiere sero-negativ aber klinisch geschützt.

Serologische Untersuchungen können demnach bei Untersuchung von Puten 2 bis 5 Wochen nach einer ND-Impfung als ein Indikator für eine angemessen durchgeführte Impfung dienen, später nach Immunisierung ist ein Fehlen von ND-spezifischen Antikörpern jedoch nicht als unzureichende Immunität zu interpretieren.

Die durchgeführten Experimente zeigen, dass eine Newcastle Disease Impfung mit dem Impfstoff AviPro ND C131 in der 3. Lebenswoche bei Puten innerhalb von 14 Tagen einen vollkommenen klinischen Schutz induziert mit z.T. steriler Immunität. Der Schutz bestand dabei ab der 5. Lebenswoche und blieb, auch in Abwesenheit messbarer HAH-Antikörpertiter, bis zum Abschluss der Versuche in der 11. Lebenswoche bestehen. Für den kompletten Schutz während einer Mastperiode bzw. bei Zuchttieren ist eine Wiederholungsimpfung alle 8 Wochen angezeigt.

## VII. SUMMARY

### **Newcastle disease (ND) in turkeys and prevention by vaccination with a live-attenuated ND-vaccine.**

The current study investigated the efficacy of a live-attenuated Newcastle disease (ND)-vaccine (AviPro ND C131) in turkeys. Initial experiments validated a challenge model according to the European Pharmacopeia. It became apparent that infection with the classical NDV strain Herts 33/56 is more pathogenic for turkeys than an actual circulating NDV genotype VII strain (R1468/12). Intramuscular infection (i.m.) with NDV strain Herts 33/56 at an infection dose of  $10^4$  EID<sub>50</sub> induced a mortality rate of 83% in 4 week old turkeys. Mortality increased to 100% when virus dose was increased to  $10^5$  EID<sub>50</sub> and  $10^6$  EID<sub>50</sub>, respectively. In contrast, infection with the NDV genotype VII strain induced a mortality rate of 100% only with a dose of  $10^6$  EID<sub>50</sub>, whereas infection doses of  $10^4$  EID<sub>50</sub> and  $10^5$  EID<sub>50</sub> induced mortality rates of 50 and 66%, respectively. When infection was done oculo-nasally (o.n.), clinical manifestation was less severe for both strains. For NDV strain R1468/12 mortality rate did not exceed 66%, even at the highest virus dose of  $10^6$  EID<sub>50</sub>. In addition, no correlation between virus concentration and mortality rate was evident after o.n. infection. In 22 weeks old turkeys i.m. infection with NDV strain Herts 33/56 resulted in a lower mortality rate of 20%. Infection with NDV genotype VII R1468/12 even induced mild clinical signs in adult turkeys but no mortality. To fulfill the requirements of the European Pharmacopeia with mortality rate or severe clinical signs in at least 90% of non-vaccinated control animals, subsequent efficacy testing of the ND-vaccine was performed only with turkey poults by i.m. challenge infection with NDV strain Herts 33/56 at an infection dose of  $10^6$  EID<sub>50</sub>.

The second set of experiments explored the most opportune age of turkey poults for vaccination and the adequate concentration of AviPro ND C131. Immunization was well tolerated with no undesirable secondary side effects at any time, irrespective of the used vaccine concentration ( $10^5$ ,  $10^6$  und  $10^7$  EID<sub>50</sub>/turkey) and the time of application, i.e. 1, 2 or 3 weeks of age. However a protection rate of 90% or more was only achieved in 3 weeks old turkeys, whereas after vaccination of 1 and 2 weeks old turkeys and subsequent challenge infection 3 weeks after vaccination, mortality rate was up to 100%. For protection in 3 week old turkeys, an immunization dose of  $10^5$  EID<sub>50</sub> was sufficient, but to include a safety margin the following experiments were conducted with a 10-fold higher dose of the vaccine AviPro ND C131 ( $10^{6.3}$  EID<sub>50</sub>/turkey).

Onset of immunity was reached 14 days post vaccination (dpv) of 3 week old turkeys and lasted until the last challenge infection at day 56 pv. The onset of the clinical protection was paralleled by appearance of NDV specific serum antibodies on day 14 pv, but no direct correlation between antibody titer and clinical protection was observed: In all 5 challenge infections proving protection, some turkeys tested sero-negative by haemagglutination inhibition test (HI) but were still protected, and for the challenge infection on day 56 pv all animals were HI-negative but still protected.

These data suggest that serological tests like HI, performed 2 to 5 weeks after immunization can be a valuable indicator for an adequate vaccination of turkeys, but lack of antibodies later on is no indication for an insufficient immunity.

In conclusion, Newcastle disease vaccination of 3 week old turkeys with AviPro ND C131 induces full clinical protection leading to a reduction of viral shedding to a marginal level within 14 days. Protection persisted from the 5<sup>th</sup> week of life until the 11<sup>th</sup> week of age. For protection over the entire fattening period or for breeder flocks, respectively, revaccinations every 8 weeks are recommended.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

1. 92/66/EWG Richtlinie des Rates vom 14. Juli 1992 über Gemeinschaftsmaßnahmen zur Bekämpfung der Newcastle-Krankheit Amtsblatt Nr. L 260 vom 05.09.1992 S. 0001 - 0020.
2. 93/152/EWG Entscheidung der Kommission vom 8. Februar 1993 über die Kriterien für Impfstoffe für Routineimpfungen gegen die Newcastle-Krankheit Amtsblatt Nr. L 059 vom 12.03.1993 S. 0035 - 0035.
3. Abdelwhab EM, Grund C, Aly MM, Beer M, Harder TC, Hafez HM. Influence of maternal immunity on vaccine efficacy and susceptibility of one day old chicks against Egyptian highly pathogenic avian influenza H5N1. *Vet Microbiol.* 2012; 155(1): 13-20.
4. Abul-Aziz TA, Arp LH. Pathology of the trachea in turkeys exposed by aerosol to lentogenic strains of Newcastle disease virus. *Avian Diseases* 1983a; 27, 1002-1011.
5. Abul-Aziz TA, Arp LH. Progression of tracheal lesions in turkeys exposed by aerosol to LaSota strain of Newcastle disease virus. *Avian Diseases* 1983b; 27, 1131-1141.
6. Al-Garib SO, Gielkens ALJ, Gruys E, Hartog L, Koch G. Immunoglobulin class distribution of systemic and mucosal antibody responses to newcastle disease in chickens. *Avian Diseases* 2003a; 47: 32-40.
7. Al-Garib SO, Gielkens ALJ, Gruys E, Koch G. Review of Newcastle disease virus with particular references to immunity and vaccination. *Worlds Poultry Science Journal* 2003b; 59: 185-200.
8. Aldous EW, Mynn JK, Banks J, Alexander DJ. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. *Avian Pathol* 2003; 32: 239-56.
9. Aldous EW, Seekings JM, McNally A, Nili H, Fuller CM, Irvine RM, Alexander DJ, Brown IH. Infection dynamics of highly pathogenic avian influenza and virulent avian paramyxovirus type 1 viruses in chickens, turkeys and ducks. *Avian Pathol* 2010; 39: 265-73.
10. Alexander DJ. Newcastle Disease diagnosis. In: *Newcastle Disease* ed. by Alexander DJ, Kluwer Academic Publishers, Boston 1988; 147-160.

11. Alexander DJ. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Rev Sci Tech* 2000; 19: 443-62.
12. Alexander DJ. Newcastle disease. *British Poultry Science* 2001; 42: 5-22.
13. Alexander DJ. Newcastle disease, other avian paramyxoviruses and pneumovirus infections. In: Saif, Y. M., Barnes, H. J., Glissen, J. R., Fadly, A. M., McDougald, L. R. and Swayne, D. E. (eds.). *Diseases of poultry*, 11 th edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, Blackwell Publishing 2003; 63-88.
14. Alexander DJ, Aldous EW, Fuller CM. The long view: a selective review of 40 years of Newcastle disease research. *Avian Pathol* 2012; 41: 329-35.
15. Alexander DJ, Banks J, Collins MS, Parsons G, Cox B, Frost KM, Speidel EC, Ashman S, Aldous EW. Experimental assessment of the pathogenicity of the Newcastle disease viruses from outbreaks in Great Britain in 1997 for chickens and turkeys, and the protection afforded by vaccination. *Avian pathology* 1999.
16. Alexander DJ, Bell JG, Alders RG. A technology review: Newcastle disease, with special emphasis on its effects on village chickens. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 2004; 63 p.
17. Alexander DJ, Senne DA. Newcastle Disease, other Avian Paramyxoviruses and Pneumovirus Infections. Y.M. Saif, A.M. Fadly. J.R. Glisson, L.R. McDougald. L.K. Nolan & D.E. Swayne, (Eds.), Ames, Iowa State University Press: Blackwell Publishing 2008; 75-116.
18. Allan WH. Newcastle disease. *Dev Biol Stand* 1975; 28: 445-50.
19. Arx U. Untersuchungen von Serum und Liquor cereбрalis von Brieftauben auf Antikörper gegen Paramyxovirus-1 und deren Bezug zu Alter, Impftermin und pathologische Veränderungen sowie serologische Untersuchungen zur Verbreitung der Influenza-A-Virusinfektion bei Tauben in der Bundesrepublik Deutschland. 1986; *Vet. med. Diss.*, Gießen.
20. Ballagi-Pordany A, Wehmann E, Herczeg J, Belak S, Lomniczi B. Identification and grouping of Newcastle disease virus strains by restriction site analysis of a region from the F gene. *Arch Virol* 1996; 141: 243-61.

21. Beard CW, Hanson RP. Newcastle disease. In Disease of poultry. Eds.: Hofstad MS, Barnes HJ, Calnek BW, REID WM, Yoder HW, 8 ed. Ames, IA: Iowa State University Press 1984: 452-70.
22. Beaudette FR. A review of the literature on Newcastle disease. Proceedings of the 47th Annual Meeting United States Livestock Sanitary Association, Chicago, USA, December 1943; 122-177.
23. Beaudette FR, Bivins JA, Miller BR. Newcastle disease immunization with live virus. Cornell Veterinarian 1949; 39: 302-34.
24. Bell IG, Nicholls PJ, Norman C, Cooper K, Cross GM. The serological responses of chickens to mass vaccination with a live V4 Newcastle disease virus vaccine in the field and in the laboratory. 2. Layer pullets. Australian Veterinary Journal, 1991; 68 (3): 90-2.
25. Benecke N. Der Mensch und seine Haustiere: Die Geschichte einer jahrtausendealten Beziehung. Stuttgart: Theiss, 1994. ISBN 3806211051, 1954, S. 392-393.
26. Bengelsdorff HJ. Vaccination and revaccination of turkeys using the Newcastle disease vaccination virus B1 and La Sota strains. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 1973; 86: 192-5.
27. Bengelsdorff HJ. Antigenicity and immunization studies on the B1 vaccine strain used against Newcastle disease in the fowl, turkey and psittacines. Zentralbl Veterinarmed B 1974a; 21: 22-31.
28. Bengelsdorff HJ, Koschel E. Über die Konzentrierung präzipitierender Virusantikörper aus Eidotter. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 1974b; 87, 396-400.
29. Biancifiori F, Fioroni A. An occurrence of Newcastle disease in pigeons: virological and serological studies on the isolates. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 1983; 6: 247-52.
30. Block H, Meyer-Block K, Rebeski DE, Scharr ,H, de Wit S, Karl Rohn K, Rautenschlein S. A field study on the significance of vaccination against infectious bursal disease virus (IBDV) at the optimal time point in broiler flocks with maternally derived IBDV antibodies, Avian Pathology, 2007; 36:5, 401-409.
31. BMVEL, Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft. Zukunft der Tierhaltung, Bericht der gleichnamigen Arbeitsgruppe im Juli 2002a.

32. BMVEL, Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft. Zweite Bekanntmachung der deutschen Übersetzung von Empfehlungen des Ständigen Ausschusses des Europäischen Übereinkommens zum Schutz von Tieren in landwirtschaftlichen Tierhaltungen vom 22. Februar 2002b.
33. Bogoyavlenskiy A, Berezin V, Prilipov A, Usachev E, Lyapina O, Korotetskiy I, Zaitceva I, Asanova S, Kydyrmanov A, Daulbaeva K, Shakhvorostova L, Sayatov M, King D. Newcastle disease outbreaks in Kazakhstan and Kyrgyzstan during 1998, 2000, 2001, 2003, 2004, and 2005 were caused by viruses of the genotypes VIIb and VIId. *Virus Genes* 2009; 39, 94-101.
34. Boney WA Jr, Stone HD, Gillette KG, Coria MF. Viscerotropic velogenic Newcastle disease in turkeys: immune response following vaccination with either viable B1 strain or inactivated vaccine, *Avian Dis.* 1975 Jan-Mar; 19(1):19-30.
35. Box PG, Helliwell BI, Halliwell PH. Newcastle disease in turkeys. Determination of the 50 per cent. Lethal dose of the Herts (1933) Weybridge strain of Newcastle disease virus and the potency of B.P.L. inactivated Newcastle disease vaccine in turkeys. *Vet Rec* 1970; 86: 524-7.
36. Box PG, Furminger IG, Robertson WW, Warden D. Immunisation of maternally immune turkey poults against Newcastle disease. *Avian Pathol* 1976; 5: 307-14.
37. Box PG. Poultry Vaccines-Live or killed? *Poultry International* 1984; May: 58-66.
38. Braun RW, Bartenschlager R. Biologische Grundlagen und Taxonomie. In: Doerr HW Gerlich WH (Hrsg.). *Medizinische Virologie. Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen*, 2. Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart, 2002; S. 7-32.
39. Briand FX, Henry A, Massin P, Jestin V. Complete genome sequence of a novel avian paramyxovirus. *J Virol* 2012; 86: 7710.
40. Brown AC. The epidemiology of Newcastle disease in Great Britain. *Proc R Soc Med* 1965; 58: 801-2.
41. Brown J, Resurreccion RS, Dickson TG. The relationship between the hemagglutination-inhibition test and the enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody to Newcastle disease. *Avian Dis* 1990; 34: 585-7.

42. BUND e.V., Bund für Umwelt und Naturschutz Deutschland. Putenhaltung in NRW, Ergebnisse einer BUND-Recherche 2013/2014, BUND NRW 2014.
43. Burridge MJ, Riemann HP, Utterback WW. Methods of spread of velogenic viscerotropic Newcastle disease virus in the southern Californian epidemic of 1971-1973. *Avian Dis* 1975; 19: 666-78.
44. Calain P, Roux L. The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. *J Virol* 1993; 67: 4822-30.
45. Calnek W, Smith MW. Vaccination against Marek's disease with cell-free turkey herpesvirus: interference by maternal antibody. *Avian Dis* 1972; 16: 954-7.
46. Cannon MJ, Russell PH. Secondary in vitro stimulation of specific cytotoxic cells to Newcastle disease virus in chickens. *Avian Pathol* 1986; 15: 731-40.
47. Cattoli G, Susta L, Terregino C, Brown C. Newcastle disease: a review of field recognition and current methods of laboratory detection. *J Vet Diagn Invest* 2011; 23: 637-56.
48. Chambers P, Millar NS, Bingham RW, Emmerson PT. Molecular cloning of complementary DNA to Newcastle disease virus, and nucleotide sequence analysis of the junction between the genes encoding the haemagglutinin-neuraminidase and the large protein. *J Gen Virol* 1986; 67 ( Pt 3): 475-86.
49. Chang PW. Newcastle Disease. *Handbook of Zoonoses; Second Edition*, CPC Press, Ames 1981; 261-4.
50. Charlton BR. Newcastle Disease. *Avian disease manual*. Order from American Association of Avian Pathologists, Poultry Pathology Laboratory, University of Pennsylvania 2000; 57-61.
51. Chimeno Zoth S, Gomez E, Carrillo E, Berinstein A. Locally produced mucosal IgG in chickens immunized with conventional vaccines for Newcastle disease virus. *Braz J Med Biol Res* 2008; 41: 318-23.
52. Cho SH, Kwon HJ, Kim TE, Kim JH, Yoo HS, Park MH, Park YH, Kim SJ. Characterization of a recombinant Newcastle disease virus vaccine strain. *Clinical and Vaccine Immunology* 2008; 15: 1572-9.
53. Choppin PW, Scheid A. The Role of Viral Glycoproteins in Adsorption, Penetration, and

- Pathogenicity of Viruses. *Reviews of Infectious Diseases* 1980; 2: 40-61.
54. Czifra G, Meszaros J, Horvath E, Moving V, Engstrom BE. Detection of NDV-specific antibodies and the level of protection provided by a single vaccination in young chickens, *Avian Pathol.* 1998; 27(6): 562-5.
55. Couceiro ES, Couceiro JN, Cabral MC. Hemagglutinating and fusogenic activities of Newcastle disease virus: studies on receptor binding specificity and pH-induced conformational changes. *Mémoires do Instituto Oswaldo Cruz* 1995; 90, 515-520.
56. Crowe TM, Bowie RCK, Bloomer P, Mandiwana TG, Hedderson TAJ, Randi E, Pereira SL, Wakeling J. Phylogenetics, biogeography and classification of, and character evolution in, gamebirds (Aves: Galliformes): effects of character exclusion, data partitioning and missing data," *Cladistics*, 2006; vol. 22, no. 6, 495–532.
57. Cutting JA, Roth TF. Changes in specific sequestration of protein during transport into the developing oocyte of the chicken. *Biochim Biophys Acta* 1973; 298: 951-5.
58. Czegledi A, Ujvari D, Somogyi E, Wehmann E, Werner O, Lomniczi B. Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. *Virus Res* 2006; 120: 36-48.
59. Darbyshire JH, Peters RW. Humoral antibody response and assessment of protection following primary vaccination of chicks with maternally derived antibody against avian infectious bronchitis virus. *Res Vet Sci* 1985; 38: 14-21.
60. de Leeuw OS, Koch G, Hartog L, Ravenshorst N, Peeters BP. Virulence of Newcastle disease virus is determined by the cleavage site of the fusion protein and by both the stem region and globular head of the haemagglutinin-neuraminidase protein. *J Gen Virol* 2005; 86: 1759-69.
61. Deibel R, Emord DE, Dukelow W, Hinshaw JS and Wood JM. Influenza viruses and paramyxoviruses in ducks in the Atlantic flyway, 1977-1983, including an H5N2 isolate related to the virulent chicken virus. *Avian Diseases* 29, 1985; 970-985.
62. Diel DG, da Silva LH, Liu H, Wang Z, Miller PJ, Afonso CL. Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes. *Infect Genet Evol* 2012; 12: 1770-9.
63. Dobson N, Simmins GB. The introduction of Newcastle disease by means of frozen

- poultry carcasses. Report of the 9th World's Poultry Congress, Paris 1951; 3: 18-21.
64. Dorn P, Seidl H, Wessling E. Vergleichende Untersuchungen zum Antikörpernachweis gegen die Newcastle-Krankheit im Serum und Eidotter legender Hennen. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 1973; 86: 349-50.
65. Dortmans JC, Koch G, Rottier PJ, Peeters BP. Virulence of Newcastle disease virus: what is known so far? *Vet Res* 2011; 42: 122.
66. Doyle TM. A hitherto unrecorded disease of fowls due to a filter passing virus. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* 1927; 40.
67. Easton AJ, Pringle CR. The negative sense single stranded RNA viruses. Mononegavirales. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz, EJ (eds.). *Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, Amsterdam, 2012; pp. 651-657.
68. European Pharmacopoeia. (6.0; 01/2008:0450; Newcastle Disease Vaccine (LIVE)).
69. Fauquet CM, Fargette D. International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species. *Virology* 2005; 2: 64.
70. Feldhaus, L, Sieverding E. *Putenmast*. Ulmer Verlag, Stuttgart 2001.
71. Flint SJ, Enquist LW, Racaniello VR, Skalka AM. *Principles of Virology*, 3. Auflage, American Society for Microbiology Press, Washington, DC, 2009.
72. Fontana JM, Bankamp B, Rota PA. Inhibition of interferon induction and signaling by paramyxoviruses. *Immunol Rev* 2008; 225: 46-67.
73. Gale C, McCartney MG, Sanger VL. Newcastle disease in turkeys. *American Journal of the Veterinary Medical Association* 1961; 139, 462-465.
74. Gallili GE, Ben-Nathan D. Newcastle disease vaccines. *Biotechnol Adv* 1998; 16: 343-66.
75. Geflügelpest-Verordnung. Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpest und die Newcastle-Krankheit. vom 03. November 2004, Bundesgesetzblatt 2004 Teil I Nr. 57, S. 2748 vom 9. November 2004, geändert am 20.12.2005 durch Bundesgesetzblatt 2005 Teil I Nr. 74, S. 3499 vom 23. Dezember 2005- Bekanntmachung der Neufassung: Bundesgesetzblatt 2005 Teil I Nr 74, S. 3538 vom 23. Dezember 2005.

76. Gharaibeh S, Mahmoud K. Decay of maternal antibodies in broiler chickens. *Poult Sci* 2013; 92: 2333-6.
77. Ghumman JS, Wiggins AD, Bankowski RA. Antibody response and resistance of turkeys to Newcastle disease vaccine strain LaSota. *Avian Dis* 1976; 20: 1-8.
78. Giambrone JJ, Closser J. Effect of breeder vaccination on immunization of progeny against Newcastle Disease. *Avian Disease*, 1990; 34: 114-119.
79. Glünder G, van der Ven H, Foulman A. Studies on the efficacy of different adjuvants in live stock specific bacterial vaccines for turkeys against *Bordetella* infection and onset of antibody titers in respect to the age of the turkey poults. *Pol J Vet Sci* 2004; 7: 77-81.
80. Gohm DS, Schelling DE, Audigé L, Thür B. Newcastle-Krankheit – seroepidemiologische Untersuchung einer hochansteckenden Tierseuche beim Geflügel und bei Wildvögeln in der Schweiz. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 1999; 141, 549-558.
81. Goldhaft TM. Historical Note on the Origin of the Lasota Strain of Newcastle-Disease Virus. *Avian Dis* 1980; 24: 297-301.
82. Goodbourn S, Randall RE. The regulation of type I interferon production by paramyxoviruses. *J Interferon Cytokine Res* 2009; 29: 539-47.
83. Grimes SE. A Basic Laboratory Manual for the Small-Scale Production and Testing of I-2 Newcastle Disease Vaccine. ISBN 974-7946-26-2 2002/22.
84. Günther DR. Serologische Untersuchungen zur Immunantwort von Mastputen (*Meleagris gallopavo*) auf verschiedene NDV-Impfschemata und NDV-Impfstoffe. *Dresdner Kolloquium* 2011.
85. Hafez HM. Übersicht über Probleme der haltungs- und zuchtbedingten Erkrankungen der Mastputen. *Arch. Geflügelk.*, 1996; 60 (6), 249-256.
86. Hafez HM. Gesundheitsstörungen bei Puten im Hinblick auf die tierschutzrelevanten und wirtschaftlichen Gesichtspunkte. *Arch. Geflügelk.*, 1999; 63, 73-76.
87. Hales RH, Ostler HB. Newcastle disease conjunctivitis with subepithelial infiltrates. *Br J Ophthalmol* 1973; 57: 694-7.

88. Hanson RP, Brandly CA. Identification of vaccine strains of Newcastle disease virus. *Science* New York 1955; 122: 156-7.
89. Hanson RP. World wide spread of viscerotropic Newcastle disease. Proceedings of the 76th Meeting of the U.S. Animal Health Association, Miami Beach, Fla, USA, 1972; 275-9.
90. Hanson RP. Newcastle Disease. In: Isolation and Identification of Avian Pathogens, ed. Hitchner SB, Domermuth CH, Purchase HG, Williams JE. Kennett Square, American Association of Avian Pathologists, 1975; 160-173.
91. Harrison MS, Sakaguchi T, Schmitt AP. Paramyxovirus assembly and budding: building particles that transmit infections. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42: 1416-29.
92. Hartwig H, Hilbrecht K. Zur serologischen Diagnostik der atypischen Geflügelpest. Sonderabdruck aus der Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 1953; 1-6.
93. Heller ED, Nathan DB, Perek M. The transfer of Newcastle serum antibody from the laying hen to the egg and the chick. *Res Vet Sci* 1977; 22: 376-9.
94. Hitchner SB, Johnson EP. A virus of low virulence for immunizing fowls against Newcastle disease (avian pneumoencephalitis). *Vet Med* 1948; 525-30.
95. Hitchner SB. Serendipity in Science - Discovery of B-1 Strain of Newcastle-Disease Virus. *Avian Dis* 1975; 19: 215-23.
96. Hodgins DC, Kang SY, de Arriba L, Parreno V, Ward LA, Yuan L, To T, Saif LJ. Effects of maternal antibodies on protection and development of antibody responses to human rotavirus in gnotobiotic pigs. *J Virol* 1999; 73: 186-97.
97. Iyer SG. Studies on Newcastle (Ranikhet) disease virus. *Indian Journal of Veterinary Science*, 1943; 13, 1-26.
98. Jeurissen SHM, Boonstra-Blom AG, Al-Garib SO, Hartog L, Koch G. Defence mechanisms against viral infection in poultry: A review. *Veterinary Quarterly* 2000; 22: 204-8.
99. Jorgensen PH, Handberg KJ, Ahrens P, Manvell RJ, Frost KM, Alexander DJ. Similarity of avian paramyxovirus serotype 1 isolates of low virulence for chickens obtained from contaminated poultry vaccines and from poultry flocks. *Vet Rec* 2000; 146: 665-8.

100. Jungbäck C. Schutzimpfung beim Geflügel, In: Tierärztliche Impfpraxis, Hans Joachim Selbitz , Manfred Maas 3. Auflage, Enke-Verlag, 2006.
101. Jungbäck C, Lemke I. Sachgerechte Anwendung von Impfstoffen. In: Tierärztliche Impfpraxis Hrsg. Selbitz H-J, Moos M, ed.: Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1997: 19-26.
102. Jungherr E, Terrell N. Observations on the spread of Newcastle disease. 5th Proceedings united States Livestock Sanitary Association, 1946; 158-171.
103. Kaura RL, Iyer SG. Peculiar nervous derangement in a fowl infected with Ranikhet disease. Imperial Council of Agricultural Research (India). Miscellaneous Bulletin, 1937; 15, 3-7.
104. Kaleta EF, Alexander DJ, Russell PH. The first isolation of the avian PMV-1 virus responsible for the current panzootic in pigeons? Avian Pathol 1985; 14: 553-7.
105. Kaleta EF, Baldauf C. Newcastle disease in free-living and pet birds. In Newcastle Disease, ed. Alexander DJ. Boston, Kluwer Academic Publisher, 1988; 197-246.
106. Kaleta EF. Paramyxovirusinfektionen. In: Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels. Ein Handbuch für Wissenschaft und Praxis. Herausgeber Heider, G. und Monreal, G. unter Mitwirkung von Mészáros, J., Band I., Gustav Fischer Verlag, Jena und Stuttgart 1992: 587-661.
107. Kapczynski DR, Afonso CL, Miller PJ. Immune responses of poultry to Newcastle disease virus. Dev Comp Immunol 2013; 41: 447-53.
108. Kaspers B, Bondl H, Göbel TW. Transfer of IgA from albumen into the yolk sac during embryonic development in the chicken. Zentralbl Veterinarmed A., 1996; 43(4) :225-31.
109. Kaspers B, Göbel T. Das adaptive Immunsystem des Haushuhns, eine Einführung. Lohmann Information 1/2000 2000; 1: 1-4.
110. Kawaguchi T, Nomura K, Hirayama Y, Kitagawa T. Establishment and characterization of a chicken hepatocellular carcinoma cell line, LMH. Cancer Res 1987; 47: 4460-4.
111. Kim LM, King DJ, Curry PE, Suarez DL, Swayne DE, Stallknecht DE, Slemons RD, Pedersen JC, Senne DA, Winker K, Afonso CL. Phylogenetic diversity among low-virulence newcastle disease viruses from waterfowl and shorebirds and comparison of

- genotype distributions to those of poultry-origin isolates. *J Virol* 2007a; 81: 12641-53.
112. Kim LM, King DJ, Suarez DL, Wong CW, Afonso CL. Characterization of class I Newcastle disease virus isolates from Hong Kong live bird markets and detection using real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2007b; 45: 1310-4.
113. Kim SH, Subbiah M, Samuel AS, Collins PL, Samal SK. Roles of the fusion and hemagglutinin-neuraminidase proteins in replication, tropism, and pathogenicity of avian paramyxoviruses. *J Virol* 2011; 85: 8582-96.
114. Kinde H, Hullinger PJ, Charlton B, McFarland M, Hietala SK, Velez V, Case JT, Garber L, Wainwright SH, Mikolon AB, Breitmeyer RE, Ardans AA. The isolation of exotic Newcastle disease (END) virus from nonpoultry avian species associated with the epidemic of END in chickens in southern California: 2002-2003. *Avian Dis* 2005; 49: 195-8.
115. Klemm R. Das Management entscheidet über die Wirtschaftlichkeit. *DGS- Magazin* 45, 2004; 35-39.
116. Knorr HL, Weber A. Ocular manifestations of selected zoonoses in humans. *Tierarztl Prax* 1992; 20: 347-54.
117. Kolakofsky D, Pelet T, Garcin D, Hausmann S, Curran J, Roux L. Paramyxovirus RNA synthesis and the requirement for hexamer genome length: the rule of six revisited. *J Virol* 1998; 72: 891-9.
118. Kraneveld F. A Poltry Disease in the Dutch East Indies. *Netherlands Indisch Bladen von Diergeneeskunde* 1926; 38: 448-50.
119. Laliberte JP, McGinnes LW, Peeples ME, Morrison TG. Integrity of membrane lipid rafts is necessary for the ordered assembly and release of infectious Newcastle disease virus particles. *J Virol* 2006; 80: 10652-62.
120. Lamb RA, Collins PL, Kolakofsky D, Melero JA, Nagai Y, Oldstone MBA, Pringle CR, Rima BK. Paramyxoviridae. In: Fauquet CM, Maniloff J, Mayo A, Desselberger U, Ball LA (eds.). *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, London 2005; 655- 668.
121. Lamb RA, Parks GD. Paramyxoviridae: The viruses and Their Replication. In: *Fields Virology* Howley. Knipe DM and Howley PM, ed. Philadelphia, Lippincott Williams &

- Wilkins, a Wolters Kluwer Business 5th: 2007: 1449-96.
122. Lammers A, Wieland WH, Kruijt L, Jansma A, Straetemans T, Schots A, den Hartog G, Parmentier HK. Successive immunoglobulin and cytokine expression in the small intestine of juvenile chicken. *Dev Comp Immunol.* 2010; 34(12): 1254-62.
  123. Lancaster JE. Newcastle disease - control by vaccination. *Veterinary Bulletin* 1964; 57-76.
  124. Lancaster JE. A history of Newcastle disease with comments on its economic effects. *World Poultry Sci J* 1976; 32: 167-75.
  125. Lippmann O. Human conjunctivitis due to the Newcastle-disease virus of fowls. *Am J Ophthalmol* 1952; 35: 1021-8.
  126. Lomniczi B, Wehmann E, Herczeg J, Ballagi-Pordány A, Kaleta EF, Werner O, Meulemans G, Jorgensen PH, Manté AP, Gielkens ALJ, Capua I, Damoser J. Newcastle disease outbreaks in recent years in Western Europe were caused by an old (VI) and a novel genotype (VII). *Archives of Virology Vol.* 143, 1998; 1: 49-64.
  127. Macpherson LW. Some Observations On The Epizootiology Of Newcastle Disease. *Can J Comp Med Vet Sci* 1956; 20: 155-68.
  128. Marangon S, Busani L. The use of vaccination in poultry production. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 2006; 265-74.
  129. Marino OC, Hanson RP. Cellular and humoral response of in ovo-bursectomized chickens to experimental challenge with velogenic Newcastle disease virus. *Avian Dis* 1987; 31: 293-301.
  130. Marsh F, Helenius A. Virus entry into animal cells. *Advances in Virus Research* 1989; 36, 107-150.
  131. Mayo MA. Virus taxonomy - Houston 2002. *Arch Virol* 2002; 147: 1071-6.
  132. Mayr A, Eißner G, Mayr-Bibrack B. Impfkomplikationen. In: *Handbuch der Schutzimpfungen in der Tiermedizin.* Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg 1984; 316-28.
  133. McFerran JB, McCracken RM. Newcastle disease. In *Newcastle disease*, ed. Alexander DJ, Kluwer Academic Publishers, Boston, 1988; 161-183.

134. Miller PJ, King DJ, Afonso CL, Suarez DL. Antigenic differences among Newcastle disease virus strains of different genotypes used in vaccine formulation affect viral shedding after a virulent challenge. *Vaccine* 2007; 25: 7238-46.
135. Miller PJ, Estevez C, Yu Q, Suarez DL, King DJ. Comparison of viral shedding following vaccination with inactivated and live Newcastle disease vaccines formulated with wild-type and recombinant viruses. *Avian Dis* 2009; 53: 39-49.
136. Miller PJ, Decanini EL, Afonso CL. Newcastle disease: evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. *Infection Genetics Evolution* 2010; 10: 26-35.
137. Miller PJ, Killian ML, Pederson JC, Afonso CL. Avian Paramyxovirus serotype 1 strains of low virulence with unusual fusion protein cleavage sites isolated from poultry species, American Association of Avian Pathologists Annual Meeting, July 16-19, 2011; St. Louis, Missouri. p. 114.
138. Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H. 15.3. Paramyxoviren in Molekulare Virologie 3. Auflage, Springer 2010.
139. MSD-Tiergesundheit. Impfung bei Rassegeflügel. Informationen für Rassegeflügelzüchter und -halter, 710592-D.Dezember 2012; (010) 118.
140. Nagai Y, Klenk HD, Rott R. Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. *Virology* 1976; 72: 494-508.
141. Neumann U, Kaleta EF. Immunsystem und Immunreaktionen. In: Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels. Ein Handbuch für Wissenschaft und Praxis. Herausgeber Heider, G. und Monreal, G. unter Mitwirkung von Mészáros, J. Band I., 1992; S. 159-185.
142. Ogasawara T, Gotoh B, Suzuki H, Asaka JI, Shimokata K, Rott R, Nagai Y. Expression of Factor-X and Its Significance for the Determination of Paramyxovirus Tropism in the Chick-Embryo. *Embo Journal* 1992; 11: 467-72.
143. OIE (Office International des Epizooties), world organisation for animal health. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees) Chapter 2.3.14. NEWCASTLE DISEASE (INFECTION WITH NEWCASTLE DISEASE VIRUS), NB: Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2012; 555-74.
144. OIE (Office International des Epizooties), world organisation for animal health. 2014;

[http://www.oie.int/wahis\\_2/resource/maps/tmp/5305d06e\\_274c\\_7.png](http://www.oie.int/wahis_2/resource/maps/tmp/5305d06e_274c_7.png)

145. Pedersen JC, Senne DA, Woolcock PR, Kinde H, King DJ, Wise MG, Panigrahy B, Seal BS. Phylogenetic relationships among virulent Newcastle disease virus isolates from the 2002-2003 outbreak in California and other recent outbreaks in North America. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2329-34.
146. Peeters BP, Gruijthuisen YK, de Leeuw OS, Gielkens AL. Genome replication of Newcastle disease virus: involvement of the rule-of-six. *Arch Virol* 2000; 145: 1829-45.
147. P.E.I., Paul-Ehrlich-Institut, Stand Bundesanzeiger-Veröffentlichung Nr. 407 vom 08.03.2015 (Banz AT 16.06.2015 B4).
148. Perozo F, Merino R, Afonso CL, Villegas P, Calderon N. Biological and phylogenetic characterization of virulent Newcastle disease virus circulating in Mexico. *Avian Dis* 2008; 52: 472-9.
149. Phillips RJ, Samson AC, Emmerson PT. Nucleotide sequence of the 5'-terminus of Newcastle disease virus and assembly of the complete genomic sequence: agreement with the "rule of six". *Arch Virol* 1998; 143: 1993-2002.
150. Piacenti AM, King DJ, Seal BS, Zhang J, Brown CC. Pathogenesis of Newcastle disease in commercial and specific pathogen-free turkeys experimentally infected with isolates of different virulence. *Vet Pathol* 2006; 43: 168-78.
151. Raethel H. Hühnervogel der Welt. Weltbild Verlag GmbH Augsburg, 1991; S. 118-133.
152. Raggi LG, Lee GG, Rosenwald AS, Gramenzi F. Response of turkey hens inoculated with a mesogen strain of Newcastle disease virus. *Avian Diseases* 1966; 10: 556-563.
153. Ramachandran A, Horvath CM. Paramyxovirus disruption of interferon signal transduction: STATus report. *J Interferon Cytokine Res* 2009; 29: 531-7.
154. Redmann T, Kaleta EF, Heider G. Immunprophylaxe. In: *Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels. Ein Handbuch für Wissenschaft und Praxis*. Herausgeber Heider, G. und Monreal, G. unter Mitwirkung von Mészáros, J. Band I. 1992; S. 187-202.
155. Regenmortel MHV, van Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Esters MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, CcGeoch DJ, Pringle CR, Wickler RB. Nidovirales in: *Virus taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*.

- Academic Press, San Diego 2000.
156. Reynolds DL, Maraqa AD. Protective immunity against Newcastle disease: the role of antibodies specific to Newcastle disease virus polypeptides. *Avian Dis* 2000; 44: 138-44.
  157. Rose ME, Orlans E. Immunoglobulins in the egg, embryo, and young chick. *Dev. Comp. Immunol.*, 1981; 5:15–20.
  158. Rott R. In vitro differentiation of pathogenic and nonpathogenic avian influenza viruses. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 1985; 98: 37-9.
  159. Rott R, Klenk HD. Molecular basis of infectivity and pathogenicity of Newcastle disease virus. In *Newcastle Disease*, ed. Alexander DJ, Boston, Kluwer Academic Publisher, 1988; 98-112.
  160. Rue CA, Susta L, Cornax I, Brown CC, Kapczynski DR, Suarez DL, King DJ, Miller PJ, Afonso CL. Virulent Newcastle disease virus elicits a strong innate immune response in chickens. *J Gen Virol* 2011; 92: 931-9.
  161. Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE. Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. *Disease of Poultry*, 12th ed Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa, USA 2008.
  162. Sawant PM, Verma PC, Subudhi PK, Chaturvedi U, Singh M, Kumar R, Tiwari AK. Immunomodulation of bivalent Newcastle disease DNA vaccine induced immune response by co-delivery of chicken IFN-gamma and IL-4 genes. *Vet Immunol Immunopathol* 2011; 144: 36-44.
  163. Schijns VEJC, van de Zande S, Lupiani B, Reddy SM. P. 20.7. Maternal Antibodies, In: *Avian Immunology*, second edition, Schat KA, Kaspers B, Kaiser, Elsevier, 2014.
  164. Seal BS, King DJ, Sellers HS. The avian response to Newcastle disease virus. *Dev Comp Immunol* 2000; 24: 257-68.
  165. Sharma JM. Introduction to poultry vaccines and immunity. *Adv Vet Med* 1999; 41: 481-94.
  166. Sharma JM. The avian immune system. In: *Disease of Poultry*, 11th edition. eds Saif, M., Barnes, H.J., Glisson, J.R., Fadly A.M., McDougald, L.R., Swayne, D.E. Iowa State University Press, Ames, Iowa, . 2003; 5-16.

167. Siegmann O, Kaleta EF. Control of the efficacy of vaccinations against Newcastle disease. *Archiv für Geflügelkunde* 1973; 121-6.
168. Smialek M, Pestka D, Tykalowski B, Stenzel T, Koncicki A. Development of vaccine-induced immunity against TRT in turkeys depends remarkably on the level of maternal antibodies and the age of birds on the day of vaccination, *BMC Vet Res.* 2015; 7;11:28.
169. Snoeck CJ, Ducatez MF, Owoade AA, Faleke OO, Alkali BR, Tahita MC, Tarnagda Z, Ouedraogo JB, Maikano I, Mbah PO, Kremer JR, Muller CP. Newcastle disease virus in West Africa: new virulent strains identified in non-commercial farms. *Archives of Virology* 2009; 154: 47-54.
170. Spradbow PB. Geographical distribution. In *Newcastle Disease*, ed. Alexander DJ. Boston, Kluwer Academic Publisher, 1988; 247-255.
171. Statistisches Bundesamt. Land- und Forstwirtschaft, Fischerei "Geflügel". Wiesbaden, 2015; Fachserie 3 Reihe 4.2.3. Stand 1. Juni 2015.
172. Steward M, Vipond IB, Millar NS, Emmerson PT. RNA editing in Newcastle disease virus. *J Gen Virol* 1993; 74 ( Pt 12): 2539-47.
173. Susta L, Miller PJ, Afonso CL, Brown CC. Clinicopathological characterization in poultry of three strains of Newcastle disease virus isolated from recent outbreaks. *Veterinary Pathology* 2011; 48: 349-60.
174. Swayne DE, King DJ. Avian influenza and Newcastle disease. *J Am Vet Med Assoc* 2003; 222: 1534-40.
175. Swayne DE. The global nature of avian influenza. In: Swayne, DE (ed.). *Avian Influenza*. Blackwell Publishing Ltd., Ames, Iowa, USA 2008; 123-143.
176. Terregino C, Capua I. Conventional diagnosis of Newcastle disease virus infection. *Avian influenza and Newcastle disease*, ed. Capua I, Alexander DJ 2009; Springer Milan, Milan Italy: 123-5.
177. TierSeuchAnzV. Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen, Ausfertigungsdatum: 23.05.1991. Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen in der Fassung der Bekanntmachung vom 19. Juli 2011 (BGBl. I S. 1404), die zuletzt durch Artikel 6 der Verordnung vom 29. Dezember 2014 (BGBl. I S. 2481) geändert worden ist Ausfertigungsdatum: 23.05.1991.

178. Traub E. Über einen Adsorbatimpfstoff zur aktiven Immunisierung gegen atypische Geflügelpest. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 1943; 39-20.
179. Tsai HJ, Saif YM, Nestor KE, Emmerson DA, Patterson RA. Genetic variation in resistance of turkeys to experimental infection with Newcastle disease virus. *Avian Dis.* 1992; 36(3): 561-5.
180. Tumova B, Stumpa A, Janout V, Uvizl M, Chmela J. A further member of the Yucaipa group isolated from the common wren (*Troglodytes troglodytes*). *Acta Virol* 1979; 23: 504-7.
181. Utterback WW, Schwartz JH. Epizootiology of velogenic viscerotropic Newcastle disease in southern California, 1971-1973. *J Am Vet Med Assoc* 1973; 163: 1080-8.
182. van der Heide L, Kalbac M, Hall WC. Infectious tenosynovitis (viral arthritis): influence of maternal antibodies on the development of tenosynovitis lesions after experimental infection by day-old chickens with tenosynovitis virus. *Avian Dis* 1976; 20: 641-8.
183. Wakamatsu N, King DJ, Kapczynski DR, Seal BS, Brown CC. Experimental pathogenesis for chickens, turkeys, and pigeons of exotic Newcastle disease virus from an outbreak in California during 2002-2003. *Vet Pathol* 2006; 43: 925-33.
184. Wang LF, Collins PL, Fouchier RAM, Kurath G, Lamb RA, Randall RE, Rima BK. Paramyxoviridae. In: King, A. M. Q., Adams M. J., Carstens, E. B. and Lefkowitz, E. J. (eds.). *Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, London, 2012; pp. 651-657.
185. Wang Z, Liu H, Xu J, Bao J, Zheng D, Sun C, Wei R, Song C, Chen J. Genotyping of Newcastle disease viruses isolated from 2002 to 2004 in China. *Annales of the New York Academy of Sciences* 2006; 1081: 228–239.
186. Weltmore A. A classification for the birds of the world. *Smithson Miscellaneous Collection*, 1960; 139, 1–37.
187. Werner O. Avian influenza – situation in Germany 1995-1997. 1998 In: *Proceedings of the 4th Annual Meeting of the Newcastle Disease and Avian Influenza Laboratories of Countries of the European Union*, Brussels, 1998; 9-10.
188. Westbury HA. Newcastle disease virus in Australia. *Australian Veterinary Journal* 1981; 57, 292- 298.

189. Westbury HA, Parsons G, Allan WH. Comparison of the immunogenicity of Newcastle disease virus strains V4, Hitchner B1 and La Sota in chickens. 2 Tests in chickens with maternal antibody to the virus, *Australian Veterinary Journal*, 1984a; 61 (1):10-3.
190. Westbury, HA, Parsons G, Allan WH, Duration of excretion of virulent newcastle disease virus following challenge of chickens with different titers of serum antibody to the virus, *Australian Vet. H*, 1984b; 61: 44-6.
191. Wilde A, McQuain C, Morrison T. Identification of the sequence content of four polycistronic transcripts synthesized in Newcastle disease virus infected cells. *Virus Res* 1986; 5: 77-95.
192. Xiao S, Nayak B, Samuel A, Paldurai A, Kanabagattebasavarajappa M, Prajitno TY, Bharoto EE, Collins PL, Samal SK. Generation by reverse genetics of an effective, stable, live-attenuated newcastle disease virus vaccine based on a currently circulating, highly virulent Indonesian strain. *PLoS One* 2012; 7: e52751.
193. Yadin H. Spray vaccination of turkeys against Newcastle disease. *Avian Pathology* 1976; 5: 97-103.
194. Yusoff K, Tan WS. Newcastle disease virus: macromolecules and opportunities. *Avian Pathol* 2001; 30: 439-55.

## IX. ANHANG

### 1. Tabellen

**Tabelle 10: Gruppeneinteilung Experiment i. (6 juvenile Puten/Gruppe).**

<b>Gruppe</b>	<b>Virus</b>	<b>Dosis</b>	<b>Applikationsweg</b>
JH4m	Herts 33/56	10 <sup>4</sup> EID <sub>50</sub>	i.m.
JH4o	Herts 33/56	10 <sup>4</sup> EID <sub>50</sub>	o.n.
JH5m	Herts 33/56	10 <sup>5</sup> EID <sub>50</sub>	i.m.
JH5o	Herts 33/56	10 <sup>5</sup> EID <sub>50</sub>	o.n.
JH6m	Herts 33/56	10 <sup>6</sup> EID <sub>50</sub>	i.m.
JH6o	Herts 33/56	10 <sup>6</sup> EID <sub>50</sub>	o.n.
JR4m	R1468/12	10 <sup>4</sup> EID <sub>50</sub>	i.m.
JR4o	R1468/12	10 <sup>4</sup> EID <sub>50</sub>	o.n.
JR5m	R1468/12	10 <sup>5</sup> EID <sub>50</sub>	i.m.
JR5o	R1468/12	10 <sup>5</sup> EID <sub>50</sub>	o.n.
JR6m	R1468/12	10 <sup>6</sup> EID <sub>50</sub>	i.m.
JR6o	R1468/12	10 <sup>6</sup> EID <sub>50</sub>	o.n.

**Tabelle 11: Gruppeneinteilung Experiment ii. (10 adulte Puten/Gruppe).**

<b>Gruppe</b>	<b>Virus</b>	<b>Dosis</b>	<b>Applikationsweg</b>
AH4m	Herts 33/56	10 <sup>4</sup> EID <sub>50</sub>	i.m.
AH5m	Herts 33/56	10 <sup>5</sup> EID <sub>50</sub>	i.m.
AH6m	Herts 33/56	10 <sup>6</sup> EID <sub>50</sub>	i.m.
AR6m	R1468/12	10 <sup>6</sup> EID <sub>50</sub>	i.m.

**Tabelle 12: Gruppeneinteilung Experiment iii.**

<b>Gruppe</b>	<b>Impfdosis AviPro ND C131</b>	<b>Infektionsvirus (0,5ml i.m./Pute)</b>	<b>Anzahl</b>
I7	$10^7$ EID <sub>50</sub>	Herts 33/56; $10^6$ EID <sub>50</sub>	5
I7R	$10^7$ EID <sub>50</sub>	R1468/12; $10^6$ EID <sub>50</sub>	6
I2x6	$2 \times 10^6$ EID <sub>50</sub>	Herts 33/56; $10^6$ EID <sub>50</sub>	5
I2x6R	$2 \times 10^6$ EID <sub>50</sub>	R1468/12; $10^6$ EID <sub>50</sub>	4
I6	$10^6$ EID <sub>50</sub>	Herts 33/56; $10^6$ EID <sub>50</sub>	5
I6R	$10^6$ EID <sub>50</sub>	R1468/12; $10^6$ EID <sub>50</sub>	6
I5x5	$5 \times 10^5$ EID <sub>50</sub>	Herts 33/56; $10^6$ EID <sub>50</sub>	5
I5x5R	$5 \times 10^5$ EID <sub>50</sub>	R1468/12; $10^6$ EID <sub>50</sub>	5
I5	$10^5$ EID <sub>50</sub>	Herts 33/56; $10^6$ EID <sub>50</sub>	5
I5R	$10^5$ EID <sub>50</sub>	R1468/12; $10^6$ EID <sub>50</sub>	6
I4	$10^4$ EID <sub>50</sub>	Herts 33/56; $10^6$ EID <sub>50</sub>	6
I4R	$10^4$ EID <sub>50</sub>	R1468/12; $10^6$ EID <sub>50</sub>	5
IC	keine	Herts 33/56; $10^6$ EID <sub>50</sub>	6
ICR	keine	R1468/12; $10^6$ EID <sub>50</sub>	4

**Tabelle 13: Gruppeneinteilung Experiment iv.**

<b>Gruppe</b>	<b>Impfdosis AviPro ND C131</b>	<b>Challengevirus (0,5ml i.m./Pute)</b>	<b>Anzahl</b>
II5	$10^5$ EID <sub>50</sub>	Herts 33/56; $10^6$ EID <sub>50</sub>	10
II6	$10^6$ EID <sub>50</sub>	Herts 33/56; $10^6$ EID <sub>50</sub>	10
II7	$10^7$ EID <sub>50</sub>	Herts 33/56; $10^6$ EID <sub>50</sub>	10
IIC	keine	Herts 33/56; $10^6$ EID <sub>50</sub>	10

**Tabelle 14: Gruppeneinteilung Experiment v.**

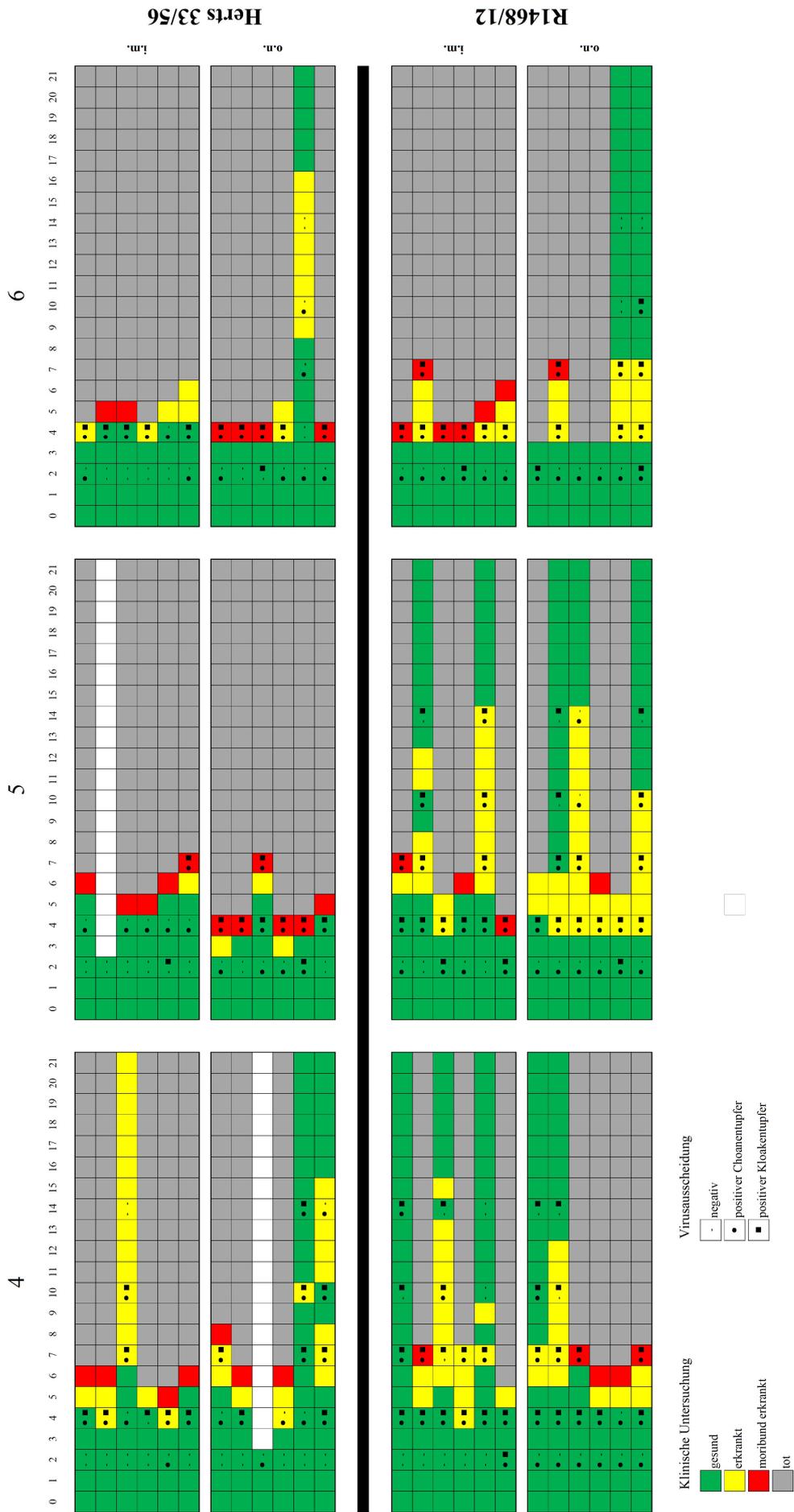
<b>Gruppe</b>	<b>Impfdosis AviPro ND C131</b>	<b>Challengevirus (0,5ml i.m./Pute)</b>	<b>Anzahl</b>
III5	$10^5$ EID <sub>50</sub>	Herts 33/56; $10^6$ EID <sub>50</sub>	10
III6	$10^6$ EID <sub>50</sub>	Herts 33/56; $10^6$ EID <sub>50</sub>	10
III7	$10^7$ EID <sub>50</sub>	Herts 33/56; $10^6$ EID <sub>50</sub>	10
IIIC	keine	Herts 33/56; $10^6$ EID <sub>50</sub>	10

**Tabelle 15: Gruppeneinteilung Experiment vi.**

<b>Gruppe</b>	<b>Impfdosis AviPro ND C131</b>	<b>Virus</b>	<b>Dosis</b>	<b>Zeitpunkt der Belastungsinfektion</b>
1i	10 <sup>6,3</sup> EID <sub>50</sub>	Herts 33/56	10 <sup>6</sup> EID <sub>50</sub>	22. LT*; 1 dpv <sup>#</sup>
1c	-	Herts 33/56	10 <sup>6</sup> EID <sub>50</sub>	22. LT
7i	10 <sup>6,3</sup> EID <sub>50</sub>	Herts 33/56	10 <sup>6</sup> EID <sub>50</sub>	28. LT; 7 dpv
7c	-	Herts 33/56	10 <sup>6</sup> EID <sub>50</sub>	28. LT
14i	10 <sup>6,3</sup> EID <sub>50</sub>	Herts 33/56	10 <sup>6</sup> EID <sub>50</sub>	35. LT; 14 dpv
14c	-	Herts 33/56	10 <sup>6</sup> EID <sub>50</sub>	35. LT
21i	10 <sup>6,3</sup> EID <sub>50</sub>	Herts 33/56	10 <sup>6</sup> EID <sub>50</sub>	42. LT; 21 dpv
21c	-	Herts 33/56	10 <sup>6</sup> EID <sub>50</sub>	42. LT
35i	10 <sup>6,3</sup> EID <sub>50</sub>	Herts 33/56	10 <sup>6</sup> EID <sub>50</sub>	56. LT; 35 dpv
35c	-	Herts 33/56	10 <sup>6</sup> EID <sub>50</sub>	56. LT
42i	10 <sup>6,3</sup> EID <sub>50</sub>	Herts 33/56	10 <sup>6</sup> EID <sub>50</sub>	63. LT; 42 dpv
42c	-	Herts 33/56	10 <sup>6</sup> EID <sub>50</sub>	63. LT
56i	10 <sup>6,3</sup> EID <sub>50</sub>	Herts 33/56	10 <sup>6</sup> EID <sub>50</sub>	77. LT; 56 dpv
56c	-	Herts 33/56	10 <sup>6</sup> EID <sub>50</sub>	77. LT

\*LT= Lebenstag , #dpv= days post challenge

Tabelle 16: Korrelation zwischen klinischem Verlauf und Virusausscheidung bei juvenilen Puten nach einer NDV-Infektion.



**Tabelle 17: Korrelation zwischen klinischem Verlauf und Virusausscheidung adulter Puten nach einer NDV-Infektion.**

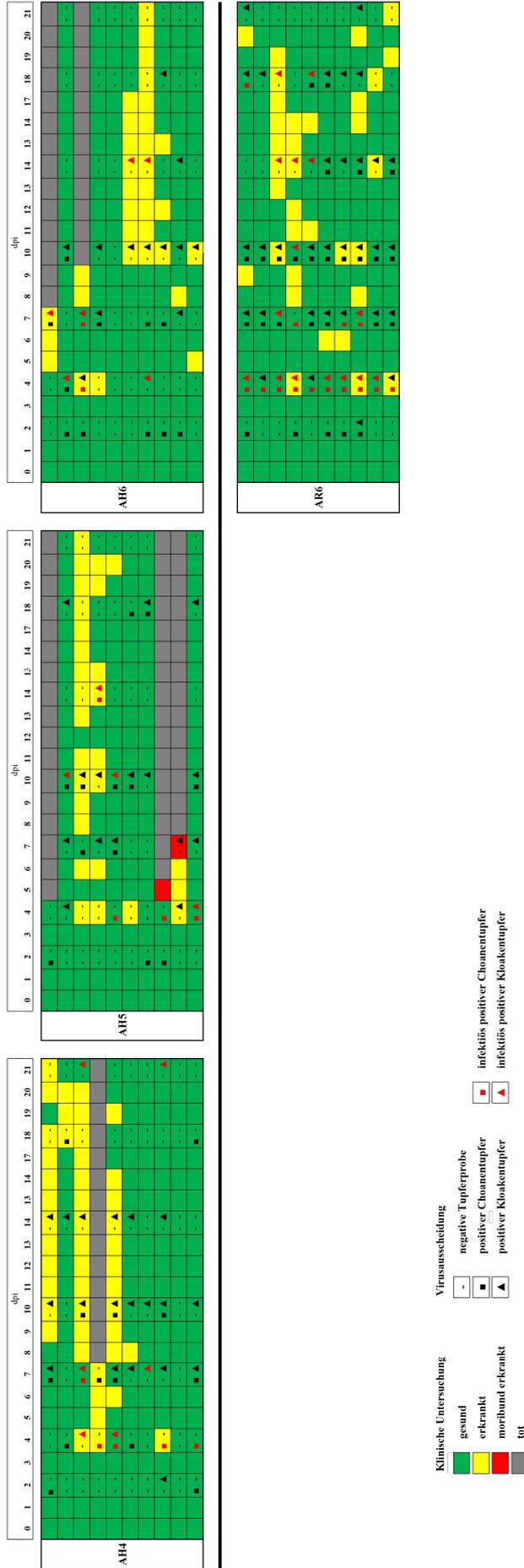
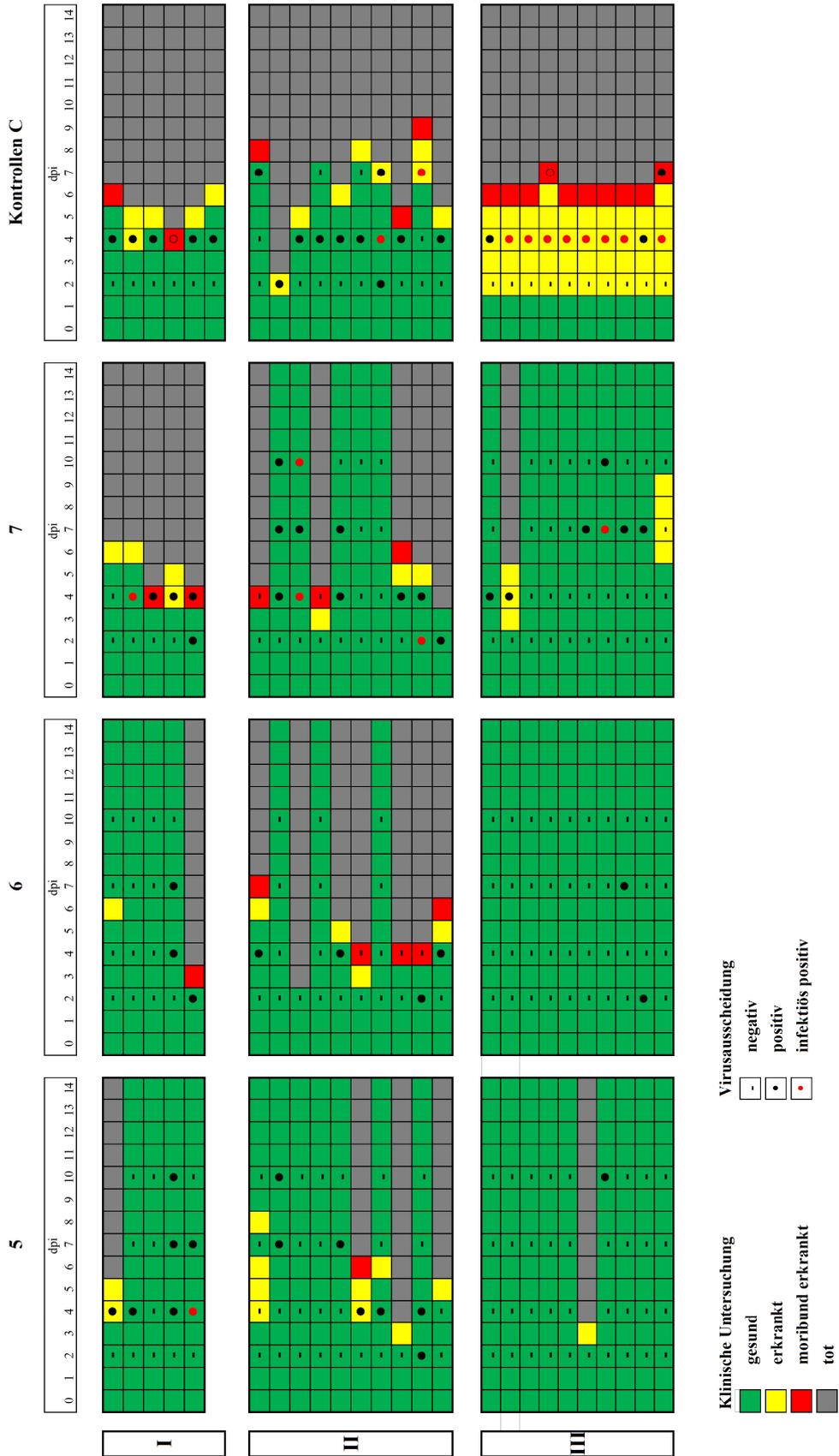


Tabelle 18: Korrelation zwischen klinischem Verlauf und Virusausscheidung juveniler geimpfter und nicht geimpfter Puten.



## 2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: In Deutschland zugelassene Geflügelimpfstoffe gegen die Newcastle Krankheit. .....	31
Tabelle 2: Newcastle Disease Viren – KID <sub>50</sub> /ml und EID <sub>50</sub> /ml.....	36
Tabelle 3: Mortalitätsraten juveniler Puten nach intramuskulärer oder oculo-nasaler NDV- Infektion. ....	53
Tabelle 4: Virale Organbelastung nach einer NDV-Infektion bei juvenilen Puten. .	58
Tabelle 5: Mortalitätsraten adulter Puten nach NDV-Infektion.....	61
Tabelle 6: Mortalitätsraten nach NDV-Belastungsinfektion bei geimpften und nicht geimpften juvenilen Puten.....	73
Tabelle 7: Virale Organbelastung der Poolproben nach einer Schutzimpfung in der 2. oder 3. Lebenswoche mit einer darauffolgenden Belastungsinfektion. ....	79
Tabelle 8: Mortalitäts- und Morbiditätsraten einer NDV-Infektion bei geimpften Puten nach einer Belastungsinfektion an unterschiedlichen Zeitpunkten nach Immunisierung. .	89
Tabelle 9: Virale Organbelastung immunisierter und nicht immunisierter Puten. ...	96
Tabelle 10: Gruppeneinteilung Experiment i. (6 juvenile Puten/Gruppe). ....	133
Tabelle 11: Gruppeneinteilung Experiment ii. (10 adulte Puten/Gruppe). ....	133
Tabelle 12: Gruppeneinteilung Experiment iii.....	134
Tabelle 13: Gruppeneinteilung Experiment iv.....	135
Tabelle 14: Gruppeneinteilung Experiment v.....	135
Tabelle 15: Gruppeneinteilung Experiment vi.....	136
Tabelle 16: Korrelation zwischen klinischem Verlauf und Virusausscheidung bei juvenilen Puten nach einer NDV-Infektion.....	137
Tabelle 17: Korrelation zwischen klinischem Verlauf und Virusausscheidung adulter Puten nach einer NDV-Infektion.....	138
Tabelle 18: Korrelation zwischen klinischem Verlauf und Virusausscheidung juveniler geimpfter und nicht geimpfter Puten.....	139

### 3.        **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Geographisches Verteilungsmuster der gemeldeten ND-Fälle (2014); Quelle: OIE, 2014. ( <a href="http://www.oie.int/wahis_2/resource/maps/tmp/5305d06e_274c_7.png">http://www.oie.int/wahis_2/resource/maps/tmp/5305d06e_274c_7.png</a> )	7
Abbildung 2: Phylogenetische Stammbäume der NDV unter Verwendung der Neighbor Joining Methode.....	18
Abbildung 3: Dreidimensionale schematische Darstellung eines Paramyxovirus (PNEUMOVIRUS LABORATORY HOMEPAGE, 2000)	19
Abbildung 4: Newcastle Disease Virus und Genomaufbau. (Quelle: <a href="http://www.fli.bund.de/548.98.html">www.fli.bund.de/548.98.html</a> ) .....	20
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Tierversuche (Experiment i - vi). .....	37
Abbildung 6: Zytopathogener Effekt von NDV auf LMH-Zellen. Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme. ....	44
Abbildung 7: Klinische Zeichen nach NDV-Infektion juveniler Puten. ....	51
Abbildung 8: Klinischer Verlauf bei juvenilen Puten nach intramuskulärer oder oculo-nasaler NDV-Infektion (Herts 33/56; R1468/12) unterschiedlicher Konzentrationen.....	52
Abbildung 9: Antikörperstatus von juvenilen Puten nach NDV-Infektion.....	54
Abbildung 10: Virusausscheidung juveniler Puten nach NDV-Infektion.....	57
Abbildung 11: Klinische Zeichen nach NDV-Infektion adulter Puten. ....	60
Abbildung 12: Klinischer Verlauf adulter Puten nach intramuskulärer NDV-Infektion.	61
Abbildung 13: Antikörperantwort adulter Puten nach einer NDV-Infektion. ....	63
Abbildung 14: Virusausscheidung adulter Puten nach NDV-Infektion.....	64
Abbildung 15: Verlauf maternaler Antikörperspiegel in juvenilen Puten während der Aufzucht. ....	66
Abbildung 16: Ausscheidung von Impfvirus bei juvenilen Puten. ....	68
Abbildung 17: Antikörperantwort juveniler Puten nach ND-Immunisierung. ....	69
Abbildung 18: Klinischer Verlauf einer NDV-Belastungsinfektion bei geimpften und nicht geimpften juvenilen Puten.....	72
Abbildung 19: Virusausscheidung bei geimpften und nicht geimpften juvenilen Puten nach einer Belastungsinfektion mit NDV Herts 33/56. ....	74
Abbildung 20: Start- und Endtiter (log <sub>2</sub> ) immunisierter juveniler Puten. ....	77
Abbildung 21: Start- und Endtiter (log <sub>2</sub> ) der zugestellten Kontakttiere nach Impfung.	77
Abbildung 22: Maternale Antikörper-Verlauf juveniler Puten. ....	81
Abbildung 23: Virusausscheidung nach Immunisierung am 21. Lebenstag.....	82
Abbildung 24: Klinischer Verlauf einer NDV-Infektion bei geimpften und nicht geimpften	

---

Puten nach einer Belastungsinfektion an unterschiedlichen Zeitpunkten nach Immunisierung in Korrelation zur Virusausscheidung.....	87
Abbildung 25: Morbiditäts-, Mortalitätsraten und Klinischer Score (A), Inkubationszeiten (B) und Ausprägung der Newcastle Krankheit (C) bei nicht geimpften Puten nach einer NDV-Infektion an unterschiedlichen Zeitpunkten nach Schlupf.....	88
Abbildung 26: Virusausscheidung nach NDV-Belastungsinfektion.....	92
Abbildung 27: Antikörperantwort nach ND-Immunisierung und NDV-Belastungsinfektion bei geimpften und nicht geimpften Puten. ....	94
Abbildung 28: Serologie der geimpften und nicht geimpften Kontakttiere.....	95

## **X. DANKSAGUNG**

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ein ganz herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Korbel für die Übernahme und die Vorlage der Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Betreuer am Friedrich-Loeffler-Institut Herrn PD Dr. Christian Grund, der mir bei der Durchführung der Studie und bei der Planung der Tierversuch stets zur Seite stand. Ich bedanke mich sehr für seine Korrekturvorschläge, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt Cornelia Illing für die geduldige Laboreinarbeitung, die außerordentliche Unterstützung bei den unzähligen Probenaufarbeitungen und die nicht ermüdete Motivation, die ich während meiner Zeit im Labor sowie nach meiner Tätigkeit am FLI spüren durfte. Liebe Conny, DANKE für alles!

Bei allen Mitarbeitern der Labore A. Römer-Oberdörfer und T. Harder bedanke ich mich für die schöne Zeit auf der Insel Riems und die Unterstützung bei den Tierversuchen und Labortätigkeiten.

Bei Herrn M. Ziller bedanke ich mich für das Engagement und seine Unterstützung bei der statistischen Auswertung sowie bei Herrn G. Strebelow für seine Unterstützung bei der Probenbearbeitung.

Danke an die Tierpfleger und Sektionshelfer des ISG und der „43“ des FLIs für die Mithilfe bei den Probennahmen und der Betreuung der Tierversuche.

Jens Teifke danke ich für die spannenden Einblicke in die Pathologie, sein Vertrauen, das mir in den Räumlichkeiten der Pathologie gegeben wurde, sowie für die Unterstützung bei allen Vorträgen und Tagungen. Danke für jegliche Fort- und Weiterbildungen und die interessanten jagdlichen und imkerlichen Momente.

Ein großes Dankeschön gilt meiner ganzen Familie und meinen Freunden. Danke für eure seelische und moralische Unterstützung und die Geduld damit ich meine Ziele verwirklichen kann.