

Aus der Klinik für Vögel
Lehrstuhl für Geflügelkrankheiten
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Rüdiger T. Korbel

Arbeit angefertigt unter Leitung von Priv.-Doz. Dr. C. H. Grund

**Untersuchung zum Erregernachweis der Schnabel- und
Federkrankheit (psittacine beak and feather disease) und
der Wellensittichnestlingserkrankung (budgerigar fledgling
disease) bei Vertretern der Ordnung *Psittaciformes***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München
von
Beate Köhler
aus Erlangen

München 2009

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Grund
Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Hartmann
Univ.-Prof. Dr. Straubinger

Tag der Promotion: 6. Februar 2009

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Befiederung allgemein.....	3
2.2	Schnabel- und Federkrankheit der Papageien	5
2.2.1	Ätiologie.....	5
2.2.2	Pathogenese und Pathologie.....	9
2.2.3	Klinik.....	10
2.2.4	Diagnose	13
2.3	Wellensittichnestlingserkrankung	15
2.3.1	Ätiologie.....	15
2.3.2	Pathogenese und Pathologie.....	19
2.3.3	Klinik.....	20
2.3.4	Diagnose	22
2.4	Differentialdiagnosen.....	24
3	Material und Methoden	28
3.1	Patientengut.....	28
3.1.1	Teil 1: Diagnostische Proben.....	28
3.1.2	Teil 2: Junge Graupapageien	30
3.1.3	Untersuchungsmaterial und Probennahme	30
3.2	DNA-Isolierung.....	32
3.3	Photometrische Absorptionsmessung.....	34
3.4	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)	35
3.4.1	BFDV-PCR	36
3.4.2	BFPyV-PCR.....	37
3.4.3	PsHV-PCR.....	37

3.4.4	12S rDNA-PCR.....	38
3.5	Agarose-Gelelektrophorese	38
3.6	Virusanzucht	40
4	Ergebnisse	42
4.1	Nachweis viraler DNA von BFDV	42
4.1.1	Vögel mit Befiederungsstörungen.....	42
4.1.2	Vögel, die akut starben	45
4.1.3	Vögel mit intaktem Gefieder	45
4.2	Nachweis viraler DNA von BFPyV.....	47
4.2.1	Vögel mit Befiederungsstörungen.....	47
4.2.2	Vögel, die akut starben	47
4.2.3	Vögel mit intaktem Gefieder	48
4.3	Zusammenfassung: Symptome beider Erkrankungen.....	48
4.4	Diagnostik	50
4.4.1	<i>Intra vitam</i> Diagnostik	50
4.4.2	<i>Post mortem</i> Diagnostik.....	50
4.5	Ausbruch der perakuten PBFD bei Graupapageien	51
4.5.1	Bestätigung der Diagnose PBFD	51
4.5.2	Vergleich der PCR-Ergebnisse.....	52
5	Diskussion.....	57
5.1	Häufigkeit der BFPyV- und BFDV-Infektionen.....	57
5.2	BFPyV-Infektion und Federveränderungen	59
5.3	BFDV-Infektion und Federveränderungen.....	61
5.4	Akute Todesfälle bei einer Infektion mit BFPyV oder BFDV.....	63
5.5	Verlässlichkeit der <i>intra vitam</i> Proben in der Diagnostik.....	64
5.6	Perakute PBFD bei jungen Graupapageien	65

5.7	<i>Post mortem</i> Diagnostik bei jungen Graupapageien	67
5.8	Die PCR als Diagnostikum der Wahl?	70
6	Zusammenfassung	72
7	Summary	74
8	Literaturverzeichnis	76

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APV	Aviäres Polyomavirus (avian polyomavirus)
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
BELISA	blocking enzyme-linked immunosorbant assay
BFD	Wellensittichnestlingserkrankung (budgerigar fledgling disease)
BFPyV	Erreger der BFD (budgerigar fledgling disease polyomavirus)
BFDV	Erreger der Schnabel- und Federkrankheit der Papageien (beak and feather disease virus)
bzw.	beziehungsweise
C1 – 4	Genomabschnitte auf dem Komplementärstrang, die möglicherweise für Proteine codieren
CAV	chicken anaemia virus
CEF	Hühnerembryofibroblasten (chicken embryofibroblasts)
cpE	zytopathischer Effekt (cytopathic effect)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEPC-Wasser	mit DEPC behandeltes doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleinacid)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbant assay
et al.	und andere (et alteri)
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde (hour)
HAH-Test	Hämagglutinations-Hemmungs-Test
HA-Test	Hämagglutinations-Test
HEF	Hühnerembryofibroblasten
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

MEM	Minimum Essential Medium
Min.	Minute
mM	milimolar
n	Anzahl
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte (optic dense)
ORF	Leserahmen (open reading frame)
PBFD	Schnabel- und Federkrankheit der Papageien (psittacine beak and feather disease)
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (phosphat buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PsHV	Erreger der Pacheco'schen Papageienkrankheit (psittacine herpesvirus)
Rep-Protein	mit der Replikation assoziiertes Protein
RZB	relative Zentrifugalbeschleunigung
SNT	Serumneutralisationstest (serum neutralisation test)
Tab.	Tabelle
v. a.	vor allem
V1 - 4	Genomabschnitte auf dem Virusstrang, die möglicherweise für Proteine codieren
z. B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematischer Aufbau einer Schwungfeder.....	S. 3
Abb. 2	Genomorganisation des beak and feather disease virus.....	S. 6
Abb. 3	Genomorganisation des budgerigar fledgling disease polyomavirus.....	S. 16
Abb. 4	Federrupfer.....	S. 24
Abb. 5	Weißhaubenkakadu mit Federverlust.....	S. 25
Abb. 6	Beispiele für Befiederungsstörungen.....	S. 28
Abb. 7	Entnahme einer Federprobe.....	S. 31
Abb. 8	Ergebnisse der BFDV- und BFPyV-PCR.....	S. 43
Abb. 9	Typische Federveränderungen bei der PBFD.....	S. 44
Abb. 10	Nachweis viraler DNA von BFDV und BFPyV im getesteten Patientengut.....	S. 49
Abb. 11	BFDV-PCR-Ergebnisse aller 34 Graupapageien.....	S. 52
Abb. 12	Konzentration der isolierten Gesamt-DNA bei positiver PCR.....	S. 55
Abb. 13	PCR-Ergebnisse einer repräsentativen Bursa Fabricii-Probe.....	S. 56

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Diagnostische Möglichkeiten zum Nachweis der Schnabel- und Federerkrankung (Pbfd) und der Wellensittichnestlings-erkrankung (Bfd).....	S. 23
Tab. 2	Differentialdiagnosen bei verschiedenen Befiederungsstörungen....	S. 26
Tab. 3	Art und Anzahl der untersuchten Vögel und deren Einteilung in sechs Gruppen.....	S. 29
Tab. 4	Spezies, Symptome, Proben und Alter der Bfdv-PCR-positiven Vögel.....	S. 46
Tab. 5	Spezies, Symptome, Proben und Alter der BFPyV-PCR-positiven Vögel.....	S. 48
Tab. 6	Qualität und Quantität der extrahierten Gesamt-DNA.....	S. 54

1 Einleitung

Während regional ansässige Vogelarten bereits seit mehr als viertausend Jahren gehalten werden, gelangten die ersten Papageien und Sittiche im Jahr 327 vor Christus im Laufe der Indienfeldzüge nach Europa. Heute sind Ziervögel in Deutschland in jedem 20. Haushalt anzutreffen. Sie treten mit 3,4 Millionen gehaltenen Tieren an Platz vier hinter Hund, Katze und den kleinen Heimtieren wie Kaninchen, Hamster und Meerschweinchen (IVH, 2007) und stellen damit ein bedeutendes Klientel in der tierärztlichen Praxis dar. Aufgrund der klinischen Symptomarmut der Vögel (Korbel et al., 2009) werden Patientenbesitzer meist erst in einem sehr fortgeschrittenen Stadium auf eine Erkrankung aufmerksam. Eine Ausnahme stellt das Symptom „Befiederungsstörung“ dar, da dies für den Besitzer augenscheinlich ist und deshalb betroffene Vögel häufig in der Praxis vorgestellt werden. Unter den differentialdiagnostisch bei diesem Symptomkomplex zu berücksichtigenden Ursachen nehmen zwei viral bedingte Erkrankungen eine besondere Stellung ein: sowohl die Schnabel- und Federkrankheit der Papageien (psittacine beak and feather disease, PBFD) als auch die Wellensittichnestlingserkrankung (budgerigar fledgling disease, BFD) führen bei Vertretern der Ordnung „*Psittaciformes*“ (Ordnung der Papageienartigen) einerseits zu chronisch progressiven Veränderungen des Gefieders und andererseits zu akuten Todesfällen von Jungvögeln. Zudem sind die Infektionen mit den zu Grunde liegenden Viren, dem „beak and feather disease virus“ (BFDV) und dem „budgerigar fledgling disease polyomavirus“ (BFPyV), bei einem großen Teil der Tiere mit subklinischen Verläufen assoziiert. Durch eine hohe Infektiosität und eine hohe Tenazität kommt es bei beiden Viren zu einer raschen Ausbreitung in Beständen. Unerkannte Virusträger können damit bei Einführung in eine neue Gruppe eine Gefährdung für die anderen Tiere darstellen bzw. unerkannt die Anlagen einer nicht kausal therapierbaren Erkrankung in sich tragen.

Bei der Vielzahl der für Befiederungsstörungen in Betracht zu ziehenden Ursachen ist für eine effiziente Diagnosestellung eine Gewichtung der Differentialdiagnosen

essentiell. Neben Kenntnissen über die Ausprägung und den Verlauf der Erkrankungen, die Altersverteilung und Empfänglichkeit der verschiedenen Spezies haben Informationen über die Häufigkeit der in Frage kommenden Infektionserkrankungen eine wichtige Bedeutung. Informationen über die Verbreitung der BFDV- und BFPyV-Infektionen sind allerdings lückenhaft. Zumeist konzentrierten sich Studien auf eine Beschreibung von Einzelfällen oder beschäftigten sich mit punktuellen Untersuchungen von Zuchtbeständen. Studien über das Auftreten der Infektionen in dem Patientenklintel fehlen bisher. Zudem sind Angaben über geeignetes Probenmaterial bei verschiedenen Vogelarten und verschiedenen Zeitpunkten beider Infektionserkrankungen sehr uneinheitlich. Angaben über die Aussagekraft verschiedener Organproben bei der perakuten Form der PBFD beim Graupapagei (*Psittacus erithacus*) liegen nicht vor.

Ziel dieser Arbeit war es, das Vorkommen von BFDV und BFPyV an vorgestellten Patienten zu untersuchen. Dazu sollte exemplarisch am Patientengut der Klinik für Vögel der LMU der Infektionsstatus von Tieren in Bezug auf Befiederungsstörungen ermittelt werden. Neben Vögeln mit klinisch manifesten Federerkrankungen sollten akut gestorbene Jungvögel und klinisch unauffällige Vögel in die Untersuchung einbezogen werden. Die besondere Berücksichtigung einer Gruppe von akut an PBFD gestorbenen Graupapageien sollte zudem klären, welche Organproben für eine verlässliche Diagnostik von BFDV-Infektionen geeignet sind. Die Ergebnisse der Studie geben kurativ tätigen Tierärzten und Tierärztinnen Anhaltspunkte für die Relevanz der BFDV- und BFPyV-Infektion bezogen auf die vorgestellte Spezies und dienen damit einer Gewichtung der differentialdiagnostischen Liste für „Befiederungsstörungen“.

2 Literaturübersicht

2.1 Befiederung allgemein

ANATOMIE DER FEDER UND FEDERARTEN

Die Feder entsteht als Hautanhangsorgan anders als das Haar beim Säugetier aus dem Zusammenwirken von Korium (Dermis) und Epidermis aus dem Federfollikel (Vollmerhaus und Sinowatz, 1992). Der grobe anatomische Aufbau der Feder wird hier am Beispiel einer differenzierten Schwungfeder dargestellt (Abb. 1). Die kräftige, durchgehende Achse (Federkiel) wird unterteilt in den freien Federschaft und die in der Haut befindliche Federspule (König et al., 2009). Der Federschaft entlässt seitlich die beiden Federfahnen, die aus vielen Federästen und davon abzweigenden Federstrahlen bestehen, untereinander stabilisiert durch Häkchen. Am Übergang von Federschaft zu -spule befindet sich die Afterfeder. Der Federfollikel entspricht in seiner Größe der von ihm beherbergten Federspule. Während des Wachstums ist jede Feder von einer verhornten Federscheide umgeben, die bei der fertigen Feder von der Spitze her beginnend aufplatzt und die Haupt- und Afterfeder entlässt.

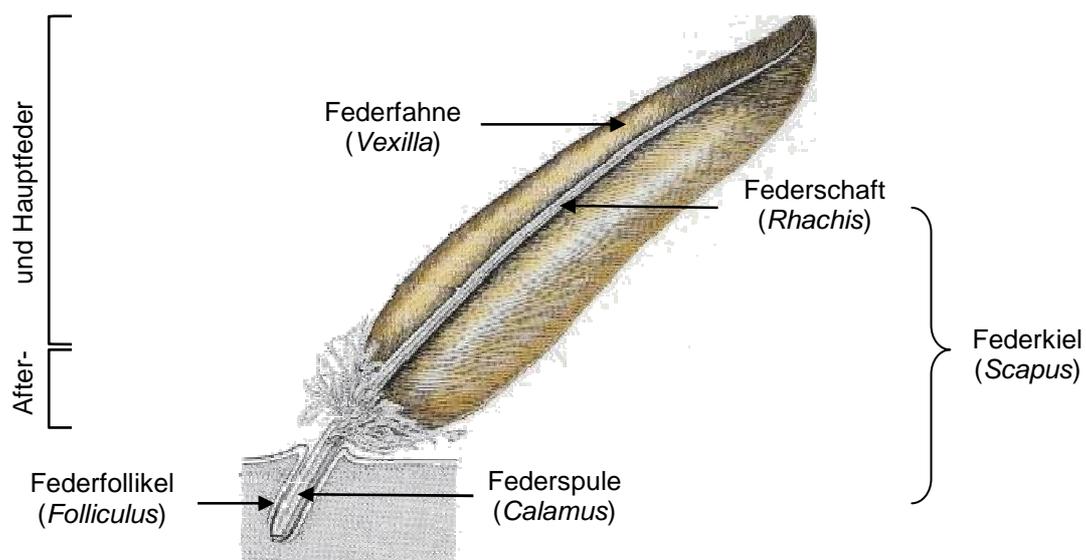


Abb. 1 Schematischer Aufbau einer Schwungfeder (modifiziert nach König, 2009)

Im bleibenden Gefieder sind nach Gestalt und Funktion unterschiedliche Federarten ausgebildet: von außen sichtbar sind die Deckfedern (*Tectrices*), die in die großen Schwung- und Schwanzfedern (*Remiges*) und die kleineren Konturfedern (*Pennae contourae*) aufgeteilt werden. Darunter befinden sich die Dunen (*Plumae*), die in erster Linie für die Thermoregulation wichtig sind.

Nach dem Schlupf entwickeln die Papageiennestlinge als erste Federn die Erstlingsdunen (*Neoptile*), die bereits vor dem Verlassen des Nestes durch Dauerdunen im definitiven Federkleid (*Teleoptile*) ersetzt werden. Dieses erste fertig ausgebildete Federkleid – das Junggefieder – befähigt zum Fliegen und die Jungvögel beginnen mit den Flugübungen. Dieses Gefieder wird nach ca. sechs Monaten (große tierartige Unterschiede) durch das Erwachsenengefieder ersetzt. An bestimmten Stellen des Körpers existieren hochspezialisierte Federn: Borstenfedern (*Setae*) kommen in verschiedener Form am Kopf vor und übernehmen Aufgaben als Wimpern und Augenbrauen. Die Fadenfedern (*Filiplumae*) sind über den ganzen Körper verteilt, haben einen fast nackten Schaft und eine ausgeprägte Innervation. Sie melden Störungen oder Unordnung in der Lage der Konturfedern. Die Puderdunen (*Pulviplumae*) schließlich produzieren ein feinkörniges, wachsartiges Hautpuder, das zur Gefiederpflege bestimmt ist.

PHYSIOLOGIE DES FEDERWACHSTUMS

Die Federn werden in regelmäßigen, artspezifischen Abständen im Rahmen der so genannten Mauser gewechselt. Da die Mauser bei Papageien kontinuierlich erfolgt, bleiben sie in dieser Zeit flugfähig. Während der ersten Mauser werden alle *Neoptile* innerhalb einer kurzen Zeitspanne ersetzt, wohingegen in den darauf folgenden Mauserperioden vogelartig unterschiedlich nur ein Teil der Federn ersetzt wird, und so mehrere Generationen von Federn nebeneinander vorkommen können (Cooper und Harrison, 1994). Die Mauser beginnt an Kopf, Nacken und Brustkorb und erst danach werden die Schwungfedern der Flügel, gefolgt von den Schwanzfedern, ersetzt. Die Mauser der Federn an einzelnen anatomischer Regionen kann unabhängig voneinander stattfinden, so dass an manchen Körperpartien die Federn in kürzeren Abständen erneuert werden als an anderen. Die Puderdunen werden

kontinuierlich gewechselt. Jeder infektiöse oder systemische Prozess, der die Ernährung oder Durchblutung der sich entwickelnden Feder stört, kann zu deren Veränderung führen. Je nach Zeitpunkt der Schädigung in Relation zur Mauser können so Deformationen, Verfärbungen oder Verlust von Federn verschiedene Ausmaße annehmen. Die endokrine Steuerung der Mauser ist noch nicht ins Detail erforscht, die Schilddrüsenhormone sowie die Gonadenhormone spielen jedoch eine große Rolle (Cooper und Harrison, 1994, McNabb, 2000): hohe Thyroxinspiegel bewirken durch ihren antigonatotropen Effekt ein Absinken des Östrogenspiegels und eine Induktion der Mauser. Ebenfalls stimulierend auf eine Federneubildung wirken Medroxyprogesteron, Prolaktin oder eine Absenkung der Lichtintensität.

2.2 Schnabel- und Federkrankheit der Papageien

2.2.1 Ätiologie

TAXONOMIE

Die Schnabel- und Federkrankheit der Papageien wird hervorgerufen durch das „**beak and feather disease virus**“ (**BFDV**), dass in die Familie Circoviridae (Todd et al., 2005) eingegliedert ist. Vertreter dieser Familie sind unbehüllte, icosaedrische Viren mit einer Größe von 19-26 nm im Durchmesser, die eine zirkuläre, einzelsträngige DNA mit einer Länge von 1,8 bis 2,3 Kilobasen (kb) aufweisen.

Die Familie Circoviridae besteht aus dem Genus Circovirus und dem Genus Gyrovirus, dessen einziger Vertreter das „chicken anaemia virus“ (**CAV**) ist. Zu den Circoviren werden außer dem BFDV noch das „porcine circovirus“ 1 und 2 (**PCV 1, PCV 2**) sowie das „canary circovirus“ (**CaCV**), das „goose circovirus“ (**GoCV**) und das „pigeon circovirus“ (**PiCV**) gezählt (Todd et al., 2005). Auch wurden auf Genomebene sehr ähnliche Viren bei Moschusenten (*Cairina moschata*) (Hattermann et al., 2003), Straußen (*Struthio camelus*) (Eisenberg et al., 2003), Staren (*Sturnus vulgaris* und *Sturnus unicolor*) (Johne et al., 2006 b), Neuhollandkrähen (*Corvus coronoides*) (Stewart et al., 2006), Gouldamadinen

(*Chloebia gouldiae*) (Todd et al., 2007), Silbermöwen (*Larus argentatus*) (Todd et al., 2007) und Höckerschwänen (*Cygnus olor*) (Halami et al., 2008) gefunden.

GENOMORGANISATION UND AUFBAU

Das BFDV ist ein unbehülltes Virus mit einer Größe von 12-16 nm (Niagro et al., 1998; Richie et al., 1990) im Durchmesser und einem ikosaedrischen Aufbau. Das einzelsträngige, zirkuläre Genom mit einer Länge von 1992-2002 nt (Abb. 2) beinhaltet mehrere mögliche Leserahmen (open reading frames, ORF's) (Bassami et al., 1998). Dabei liegen drei dieser potentiellen Leserahmen auf dem Virusstrang (V1 - V3) und die anderen vier auf dem Komplementärstrang (C1 – C4), der während der Replikation gebildet wird. Der Genomabschnitt V1 mit einer Länge von 867 nt codiert für das 33,3 kDa große „replication associated protein“ (Rep-Protein). Der Abschnitt C1 mit einer Länge von 741 nt codiert für das 28,9 kDa große Kapsidprotein. Die Funktionen der restlichen ORF's sind unbekannt (Bassami et al., 1998).

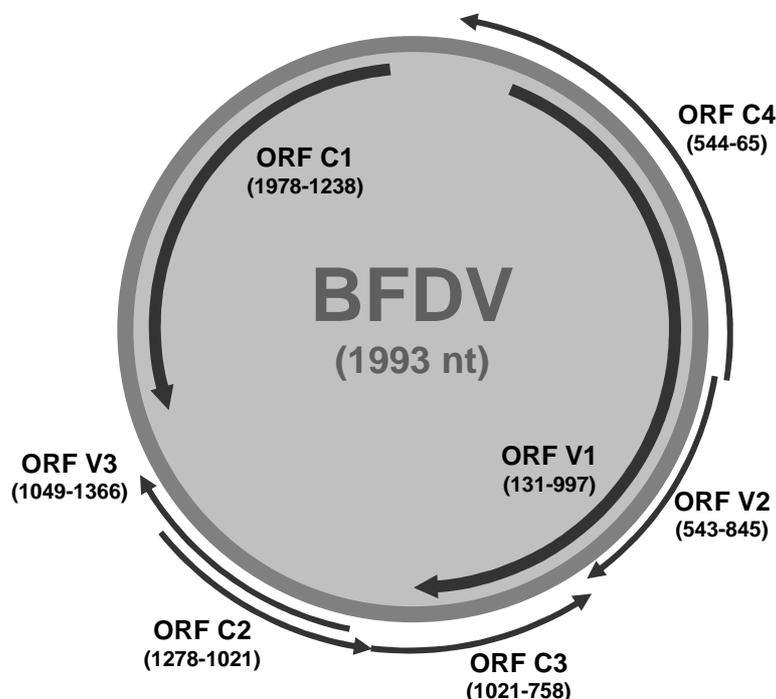


Abb. 2 Genomorganisation des beak and feather disease virus mit sieben potentiellen Leserahmen (open reading frame, ORF) (modifiziert nach Bassami et al., 1998)

REPLIKATION

Wie alle Circoviren benötigt auch BFDV für seine Replikation die Maschinerie der Wirtszelle. Da die DNA-Synthese ausschließlich im Zellkern stattfindet, muss das Virus nicht nur die Zellwand passieren, sondern auch die Kernhülle. Dabei scheint das Kapsidprotein die entscheidende Rolle zu spielen (Heath et al., 2006): das Protein besitzt eine Kern-Erkennungsstelle, mit deren Hilfe es durch die Kernhülle geschleust wird. Außerdem besitzt es sowohl eine DNA-Bindungsstelle für die virale DNA als auch eine Proteinbindungsstelle, an der verankert auch das Rep-Protein in den Kern gelangen und dort die DNA-Replikation initiieren kann. Nach der Virusvermehrung erfolgt die Ausschleusung der fertigen Virionen wahrscheinlich durch eine virusinduzierte Apoptose der infizierten Zelle (Trinkaus et al., 1998). Bisher sind alle Bemühungen gescheitert, BFDV in einem konventionellen Zellsystem zu vermehren.

WIRTSSPEKTRUM UND VERBREITUNG

Eine Infektion mit BFDV ist bereits bei über 50 Papageienspezies dokumentiert (Rauae et al., 2003) und kommt scheinbar nur bei Vertretern der Ordnung *Psittaciformes* vor. Es kann davon ausgegangen werden, dass alle Papageien empfänglich für eine Infektion sind (Latimer et al., 1990). Das Virus ist endemisch in Australien, wo es eine der häufigsten Viruserkrankungen darstellt (Pass und Perry, 1984; Raidal und Cross, 1994), wird mittlerweile aber auch in wild lebenden Papageien in Afrika (Heath et al., 2004) gefunden. Virale DNA von BFDV wurde bei in Gefangenschaft gehaltenen Vögeln in Italien (Bert et al., 2005), Taiwan (Hsu et al., 2006), Japan (Ogawa et al., 2005; Sanada et al., 1999), Österreich (Hess et al., 2004; Loupal et al., 1990), Deutschland (Rahaus und Wolff, 2003), Südafrika (Heath et al., 2004), den USA (de Kloet und de Kloet, 2004; Ritchie et al., 1989), Neuseeland (Ritchie et al., 2003) und den Niederlanden (Schoemaker et al., 2000) detektiert, weshalb man von einer weltweiten Verbreitung ausgeht.

VERWANDTSCHAFT

Basierend auf der V1-Region, die für das Rep-Protein kodiert, wurden PCR-Produkte verschiedener BFDV-positiver Vögel in ihrer Nucleotidsequenz verglichen und dabei wurden drei Gruppierungen entdeckt: eine bei Loris (*Loriidae*) (Lorikeet lineage, LL), die anderen bei Kakadus (*Cacatuidae*) (cokatoo lineage, CL) und bei einem Wellensittich (*Melopsittacus undulatus*) (budgerigar lineage, BL) (Richie et al., 2003), was auf eine gewisse Wirtsspezifität hindeutet. Ähnliches konnte bei einem Vergleich der C1-Region, die für das Kapsidprotein kodiert, festgestellt werden, allerdings wurden hier die einzelnen BFDV-Stämme in sechs Gruppierungen eingeteilt (de Kloet und de Kloet, 2004). Eine weitere Untersuchung aus Afrika ergab acht verschiedene Genotypen bei einem Vergleich der C1-Region (Heath et al., 2004). Diese Wirtsspezifität konnten Raue et al. (2004) in seinen Analysen, basierend auf der C1-Region, nicht erkennen, jedoch vermutet er einen Zusammenhang zwischen verschiedenen BFDV-Stämmen und dem Krankheitsverlauf (akut oder chronisch). Es fiel hier eine große Homologie zwischen den Isolaten von Loris auf, die eine akute Pbfd überlebten und deren Gefieder sich wieder regenerierte. Ebenfalls einheitlich erschienen Isolate von jungen Graupapageien, die unter der perakuten Form litten. Sequenzanalysen aus Taiwan, die sowohl die V1- als auch die C1-Region verglichen, ergaben im Gegensatz zu den vorher genannten Studien keine Wirtsspezifität und auch keine einheitlichen Gruppen bezogen auf den Krankheitsverlauf (Hsu et al., 2005).

Alle vergleichenden Sequenzanalysen ergaben jedoch, dass die V1-Region im Gegensatz zur C1-Region relativ einheitlich in ihrer Nucleotidsequenz ist (Bassami et al., 2001; de Kloet und de Kloet, 2004; Heath et al., 2004). Ein Erklärungsversuch hierfür sind die verschiedenen Aufgaben der ableitbaren Proteine: das Rep-Protein wird bei der Initialisierung der viralen DNA-Replikation benötigt – kommt es durch Mutationen zum Funktionsausfall, kann sich das Virus nicht mehr vermehren (Heath et al., 2004). Im Gegensatz hierzu ist das Kapsidprotein ständigem Selektionsdruck durch das Immunsystem des Wirtes ausgesetzt. Hier können Mutationen zu geringen Veränderungen in der Antigenität führen, wodurch das Immunsystem umgangen werden kann.

2.2.2 Pathogenese und Pathologie

Eine Virusübertragung kann einerseits horizontal, über die Inhalation virushaltigen Federstaubes oder über die orale Aufnahme von infiziertem Kot und Kropfinhalt BFDV-positiver Vögel erfolgen (Latimer et al., 1991). Andererseits sind auch Hinweise für eine vertikale Übertragung vorhanden. Rahaus konnte in einer Untersuchung bei 20% der 15 untersuchten embryonierten Papageieneier virale DNA mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) nachweisen (Rahaus und Wolff, 2008).

Der Aufnahme von Viren folgt eine kurze Virämie (Latimer et al., 1991; Johne et al., 2004) und die Infektion der Zielzellen: dies sind vor allem sich schnell teilende Zellen (Latimer et al., 1996), da Circoviren auf die Zellteilung der Wirtszelle angewiesen sind (Heath et al., 2006). Virale Einschlusskörper – intrazytoplasmatisch und intranukleär (Ritchie et al., 1990 b) – werden in den Zellen des Federepithels und des Federfollikelepithels (Sanada et al., 1999; Trinkaus et al., 1998), aber auch im gesamten Magen-Darmtrakt (Ritchie et al., 1991; Latimer et al., 1990), der Leber (Dahlhausen und Radabaugh, 1993; Sanada et al., 1999) und den lymphatischen Organen Bursa Fabricii und Thymus (Ritchie et al., 1989; Wylie und Pass, 1987; Latimer et al., 1991) bzw. dem Knochenmark (Latimer et al., 1991) gefunden.

Histologische Veränderungen der Haut werden besonders in den Bezirken des Federepithels und des Follikelepithels festgestellt, in denen die Keratinproduktion stattfindet (Sanada et al., 1999). Hierdurch kommt es zu einer Deformation oder zum Verlust der Feder (Trinkaus et al., 1998). Typische Veränderungen an den Federn sind persistierende Federhülsen, Einblutungen in den Federschaft, kurze, gelockte Federn, Federn mit zirkulären Einschnürungen und Hungerstreifen (Grimmale) in der Federfahne (Pass and Perry, 1984; Gerlach und Leipold, 1993). Diesen Veränderungen liegt eine Kombination aus Dystrophie und Hyperkeratose zugrunde. Die Dystrophie führt zu Nekrosen der Epithelzellen, was zu den beschriebenen gelockten Federn führt, die Hyperkeratose zu persistierenden Federscheiden und einem verlängerten Schnabel- und Krallenhorn. Entzündungen und Nekrosen in der

Federpulpa führen zu Einschnürungen, Blutungen in den Schaft und zu Grimmalen in der Federfahne.

Die Schädigung der einzelnen Feder tritt während ihres Wachstums ein, die hieraus resultierenden Folgen (Deformationen, Farbveränderung oder Verlust) können deshalb meist symmetrisch und von Mauser zu Mauser fortschreitend beobachtet werden (Pass und Perry, 1984).

Neben diesen Veränderungen ist eine Infektion des lymphoiden Gewebes charakteristisch. Es werden Nekrosen und Lymphozytendepletionen in der Bursa Fabricii und im Thymus gesehen (Richie et al., 1989; Wylie und Pass, 1987; Latimer et al., 1991). Hierdurch wird eine Immunsuppression bei jungen Vögeln vermutet, die häufig zu Sekundärinfektionen führt. Auch eine Infektion des Knochenmarks wurde bei manchen Vögeln belegt (Latimer et al., 1991).

Eine Infektion mit BFDV führt in vielen Fällen nicht zu einer Erkrankung, sondern zur Ausbildung einer protektiven Immunantwort und damit zu einer transienten Infektion (Ritchie et al., 1990 a). Die Höhe des Antikörpertiters im Blut scheint mit der Ausprägung der Symptome negativ zu korrelieren (Khalesie et al., 2005). Viele symptomlose adulte Vögel, bei denen ein Antigennachweis negativ ausfällt, weisen hohe Antikörperspiegel auf. Ein negativer oder niedriger Antikörperspiegel wird bei akut und chronisch erkrankten Vögeln beobachtet. Diese Beobachtung könnte mit der beschriebenen Immunsuppression erklärt werden (Latimer et al., 1991).

2.2.3 Klinik

„During the years 1887-1888 in the Adelaide Hills, South Australia, red-rumped parrots (*Psephotus haematotonus*) were found to be suffering from a disease or infection which prevented feathers being renewed after moulting; naked, but otherwise healthy-looking birds were seen running about on the ground where they were easy prey to all predators” (Ashby, 1907).

Diese anekdotische Beschreibung gibt das Wesen der chronischen Verlaufsform der Erkrankung recht anschaulich wieder. Die Schnabel- und Federkrankheit ist eine Allgemeinerkrankung, die bei vielen verschiedenen Papageienarten auftritt, und ist klassischerweise mit Federverlust, Deformationen und Verfärbungen des Gefieders gekennzeichnet. Je nach Alter des betroffenen Vogels, nach Infektionsdosis, Art der Übertragung und evtl. Virulenz des Isolates erkranken die betroffenen Tiere verschieden stark (Latimer et al., 1991).

Neben der chronischen Verlaufsform mit progressiven Gefiederveränderungen gibt es akute Verlaufsformen, die einerseits mit plötzlich auftretenden, umfangreichen Federveränderungen einhergehen oder andererseits mit nur dezenten Veränderungen am Gefieder und einer kurzen Krankheitsphase zum Tod des Vogels führen.

Es gibt Hinweise darauf, dass einige Arten weniger empfindlich auf eine Infektion reagieren. So zeigten junge Aras klinische Symptome nach einer BFDV-Infektion, erholten sich jedoch von der Erkrankung und wurden BFDV-negativ (Dahlhausen und Radabaugh, 1993). Auch bei Wellensittichen ist eine Heilung der Pbfd beschrieben (Hess et al., 2005).

CHRONISCHER VERLAUF

Der chronische Verlauf wird klassischerweise mit der Schnabel- und Federerkrankung in Zusammenhang gebracht. Betroffen von dieser Form sind hauptsächlich Jungvögel, aber auch adulte Tiere (Pass and Perry, 1984). Die Symptome erscheinen schleichend und schreiten von Mauser zu Mauser fort. Eine Infektion der Federfollikel führt zu einem Verlust von Daunen und Konturfedern an allen Körperregionen. Dieser Federverlust ist meist symmetrisch, wobei die abgestoßenen Federn mehr und mehr von strukturell veränderten Federn ersetzt werden (Pass and Perry, 1984). Die ersten Veränderungen treten meist an den Daunenfedern im Hüftbereich auf, die langen Schwung- und Schwanzfedern sind meist erst nach den Daunen- und kleineren Konturfedern betroffen (Latimer et al.,

1991; Pass and Perry, 1984). Durch den Verlust von Puderfedern wird das bei schwarzen Schnäbeln pudrig grau erscheinende Schnabelhorn seidenmatt und schwarz (Loupal et al., 1990; Pass and Perry, 1984). Bei manchen Vögeln wachsen keine Federn nach und sie werden nach und nach nackt.

Neben diesen Federveränderungen kommt es durch die Infektion der lymphatischen Organe zu einer teils ausgeprägten Immunsuppression (Latimer et al., 1991; Ritchie et al., 1990), die in vielen Fällen zum Tod der Vögel durch Sekundärinfektionen mit wenig pathogenen Pilzen, Bakterien oder anderen Mikroorganismen führt.

Die Vögel können auch mit starker Beeinträchtigung des Gefieders bei guter Pflege jahrelang mit ungestörtem Allgemeinbefinden überleben, solange eine Immunsuppression fehlt oder nur wenig ausgeprägt ist.

Bei Kakadus kann es zusätzlich zu den Federveränderungen zu einer Verlängerung des Ober- und Unterschnabels kommen, gefolgt von der Entstehung von transversalen und longitudinalen Fissuren und Frakturen, die in späteren Stadien die Futteraufnahme behindern können (Pass und Perry, 1984; Latimer et al., 1991). Veränderungen im Krallenhorn ähneln denen des Schnabels und sind nur selten zu sehen (Pass und Perry, 1984).

AKUTER VERLAUF

Die Erkrankung verläuft bei jungen, flügge werdenden Vögeln sehr viel rascher: während der ersten Mauser der Erstlingsdunen zum Jugendgefieder erscheinen relativ plötzlich am gesamten Körper veränderte, missgebildete Federn oder die erkrankten, wachsenden Federn fallen aus. Die Federveränderungen sind mit denen der chronischen Form identisch. In manchen Fällen weisen betroffene Vögel allerdings kaum Federveränderungen auf, sondern sie zeigen Apathie und Durchfall. Die Vögel können ein bis zwei Wochen nach dem Auftreten klinischer Symptome sterben (Ritchie et al., 1990 a). Frisch geschlüpfte Tiere zeigen bei Ausbruch der

Erkrankung vor dem Tod nur sehr unspezifische Zeichen einer Septikämie mit Pneumonie, Kropfstase, Enteritis, Anorexie und Gewichtsverlust.

PERAKUTE FORM DER PBFED BEI JUNGEN GRAUPAPAGEIEN

Eine besondere, tödlich verlaufende Form tritt bei Graupapageien im Alter von bis zu zwölf Monaten auf. Betroffene Vögel erkranken plötzlich sehr schwer und zeigen unspezifische Symptome wie Anorexie, Gewichtsverlust, Erbrechen und Müdigkeit. Charakteristische Federveränderungen liegen nicht vor oder erscheinen nur sehr dezent (Schoemaker et al., 2000).

2.2.4 Diagnose

Neben der klinischen bzw. pathologisch-anatomischen Untersuchung sind aufgrund der vielen Differentialdiagnosen weiterführende virologische Untersuchungen anzuschließen (Tab. 1).

Beim toten Tier ist eine histologische Untersuchung mit Nachweis von viralen Einschlusskörperchen in den verschiedenen Organen gängige Praxis (Phalen, 2006). Bei unspezifischen Veränderungen kann eine elektronenmikroskopische Untersuchung oder eine DNA *in situ*-Hybridisierung angeschlossen werden.

Da das BFDV bisher nicht kultivierbar ist, fällt die Möglichkeit der Virusvermehrung mit anschließender Charakterisierung des Virus weg. Zur Diagnostik von BFDV kann dessen Fähigkeit, Erythrozyten zu agglutinieren im Hämagglutinationstest (HA) (Khalesi et al., 2005) genutzt werden. Der Test wird jedoch dadurch erschwert, dass das Virus nur bestimmte Erythrozyten von Kakadus, Meerschweinchen und Gänsen agglutiniert, teilweise mit individuellen Unterschieden (Ritchie et al., 1991, Sanada und Sanada, 1999). Als Probenmaterial können sowohl Organe als auch Kloakentupfer, Blut oder Federn eingesetzt werden.

Ein sehr sensitives und spezifisches Verfahren stellt die PCR dar, mit deren Hilfe virale DNA in kurzer Zeit nachweisbar ist. Diese Untersuchung ist jedoch nur im Zusammenhang mit einer klinischen oder pathologischen Verdachtsdiagnose sinnvoll, da ein positives Ergebnis nicht gleichzeitig eine produktive Infektion bedeutet. Das Probenmaterial ist dasselbe wie bei dem Hämagglutinationstest.

Da eine Infektion mit BFDV zu einer Antikörperantwort führt, können serologische Tests zur Verlaufsuntersuchung und zur Überprüfung neu erworbener Vögel verwendet werden. Der Einsatz eines indirekten „enzyme linked immunosorbent assays“ (ELISA) (Johns et al., 2004), bei dem Antikörper gegen BFDV nachgewiesen werden, ist wegen der fehlenden Verfügbarkeit sekundärer Antikörper verschiedener Spezies nicht für alle Papageienvögel möglich. Unabhängig von sekundären Antikörpern und damit der zu untersuchenden Spezies ist der Hämagglutinationshemmungstest (HAH), der zur Untersuchung auf Antikörper gegen das BFDV eingesetzt wird (Kalhesie et al., 2005).

Die Bestimmung der Antikörper gegen BFDV ist als Bestandsuntersuchung und zur Untersuchung von Neuzugängen in einen Bestand ein wichtiges Hilfsmittel, hat jedoch als Untersuchung von Einzelvögeln zur Kontrolle eines Krankheitsverlaufes nur eingeschränkte Aussagekraft. Der Antikörperspiegel bei BFDV-infizierten Vögeln scheint negativ mit der Virusausscheidung über die Federn korreliert zu sein (Kalhesie et al., 2005; Riddoch et al., 1996). Infizierte Vögel, die das Virus eliminieren, serokonvertieren und weisen hohe Antikörperspiegel auf, wohingegen sowohl akut als auch chronisch an PBFV erkrankte Vögel sehr geringe Antikörperspiegel aufweisen können.

2.3 Wellensittichnestlingserkrankung

2.3.1 Ätiologie

TAXONOMIE

Die Wellensittichnestlingserkrankung wird durch das „budgerigar fledgling disease polyomavirus“ (**BFPyV**) hervorgerufen, welches zur Familie Polyomaviridae gehört (Hou et al., 2005). Vor 1999 wurde das Genus Polyomavirus in die Familie Papovaviridae eingeordnet, zusammen mit dem Genus Papillomavirus, das bei vielen Säugetieren und dem Menschen vorkommt (Müller und Nitschke, 1986). Polyomaviren sind rund 45 nm große, kubisch aufgebaute, unbehüllte Viren, deren ikosaedrisches Kapsid eine doppelsträngige, zirkuläre DNA umschließt (Kaaden und Mahnel, 1993). Die Polyomaviren der Säugetiere führen klassischerweise zu persistierenden, latenten Infektionen, die keine spezifischen Erkrankungen hervorrufen, wegen ihrer Fähigkeit der Transformation in heterogenen Zellen jedoch als fakultativ onkogen gelten. Eine Infektion mit den Polyomaviren der Vögel, sowohl mit dem BFPyV als auch mit dem „goose hemorrhagic polyomavirus“ (**GHPyV**) (Johne und Müller, 2003), kann jedoch zu Erkrankungen mit einer hohen Mortalität führen. Aufgrund phylogenetischer Studien, zusammen mit den beschriebenen biologischen Unterschieden, wird eine Unterteilung der Familie Polyomaviridae in das Genus „Mastpolyomavirus“ und das Genus „Avipolyomavirus“ diskutiert (Johne et al., 2006 a).

Die humanen Polyomaviren „JC-Virus“ (**JCPyV**) und „BK-Virus“ (**BKPyV**) lösen ebenso wie das „murine pneumotropic virus“ (**MPtPyV**) und das bei Affen vorkommende „**SV40**“ nur in immunsupremierten Individuen Erkrankungen aus (Perez-Losada et al., 2006). Das „hamster polyomavirus“ (**HPyV**) bzw. das „murine polyomavirus“ (**MPyV**) führen zu Epitheliomen bzw. zur Ausbildung verschiedener Tumore.

Bei Jungvögeln von Gimpeln (*Pyrrhula pyrrhula griseiventris*) und Dohlen (*Corvus monedula*), die an einer Erkrankung mit hoher Mortalität litten, wurden Polyomaviren

(„finch polyomavirus“, **FPyV**, und „crow polyomavirus“, **CPyV**) isoliert, die jedoch noch nicht klassifiziert sind (Johne et al., 2006 a).

GENOMORGANISATION UND AUFBAU

Das BFPyV ist ein unbehülltes Virus mit einer Größe von 42-49 nm (Bozeman et al., 1981; Davis et al., 1981) im Durchmesser und einem ikosaedrischen Aufbau. Es besitzt eine doppelsträngige, zirkuläre DNA mit einer Länge von 4981 nt (Müller und Nitschke, 1986; Rott et al., 1988). Sie ist mit Hilfe von vier zellulären Histonen (H2A, H2B, H3 und H4) in Form einer Superspirale organisiert und ist somit sehr Platz sparend angeordnet. Das BFPyV hat eine große Ähnlichkeit mit anderen Polyomaviren, inklusive der Morphologie, des Infektionszyklus und der Organisation des Virusgenoms (Abb. 3).

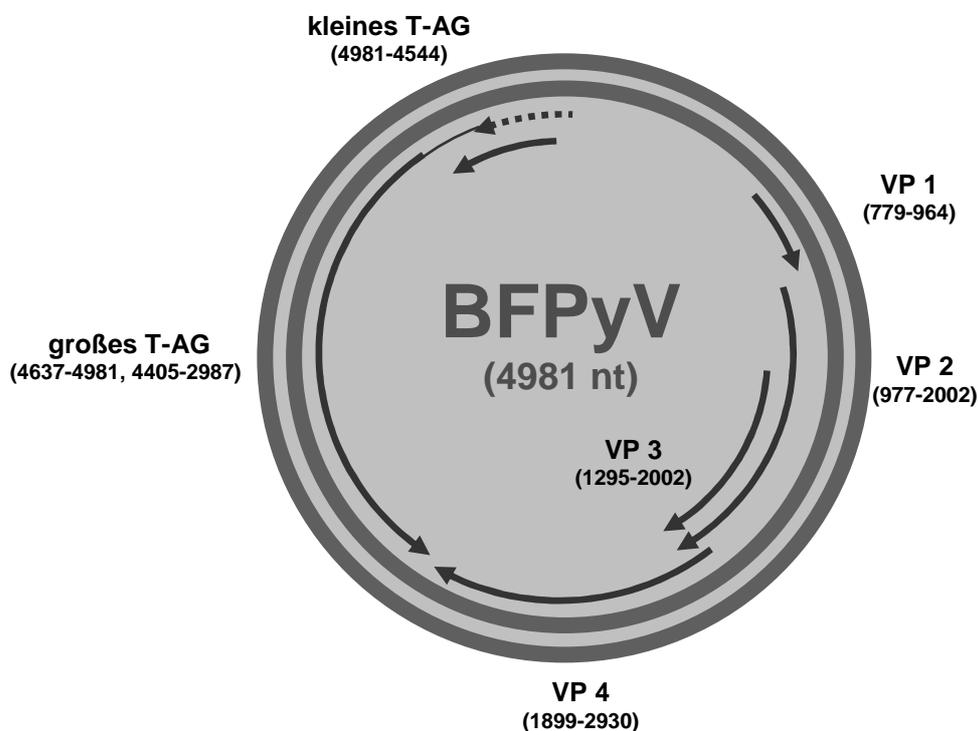


Abb. 3 Genomorganisation des budgerigar fledgling disease polyomavirus mit den codierenden Genomabschnitten der 4 Strukturproteine (VP1-4) und der zwei Tumor Antigene (T-AG) (modifiziert nach Rott et al., 1988, und Johne und Müller, 2007)

Das Genom besteht aus einer früh und einer spät zu replizierenden Region: die früh zu replizierende Region kodiert für ein großes und ein kleines Tumor-Antigen (T-Antigen), die spät zu replizierende Region für die drei Strukturproteine Virusprotein 1 (42 kDa), Virusprotein 2 (39 kDa) und Virusprotein 3 (29 kDa) sowie für eine Gruppe so genannter Agnoproteine. Das Virusprotein 1 ist das größte Strukturprotein und wird durch den Genomanschnitt *VP 4* kodiert, das bei den Säuger-Polyomaviren vorkommende Agnoprotein 1 entspricht beim BFPyV dem Virusprotein 4 (Johne und Müller, 2007) und wird durch den Genomabschnitt *VP 1* kodiert.

Bei den Polyomaviren der Säugetiere besteht das Kapsid aus den Virusproteinen 1-3, bei den aviären Polyomaviren wird zusätzlich das Agnoprotein 1a (Virusprotein 4) in unphosphorelierter Form eingebaut (Liu und Hobom, 2000). Abweichend von diesem Grundbauplan kommen noch einige kleinere Proteine vor, die durch „splicing“-Vorgänge bzw. durch transskriptionale Modifikationen wie Phosphorelierung entstehen und in ihrer Funktion noch nicht restlos erforscht sind (Rodgers und Consigli, 1996; Liu et al., 2000; Johne und Müller, 2007).

REPLIKATION

Die genaue Replikation von BFPyV ist bisher noch nicht bis ins Detail geklärt. Bei dem Polyomavirus SV40 der Affen, das bereits ausführlicher analysiert wurde, besitzen die Virusproteine VP2 und VP3 eine DNA-Bindungsstelle, ein Kernlokalisierungssignal und eine Bindungsstelle zu VP1 (Phalen et al., 1999). Durch diese Proteine kann das virale Genom in den Zellkern gelangen, wo die Replikation stattfindet. Eine Region auf dem viralen Genom von Säuger-Polyomaviren, die für kein Protein kodiert, beinhaltet den Ursprung der Replikation, inklusive einer „Verstärkungsstelle“ (Enhancer), einer Bindungsstelle für das große T-Antigen und andere Bindungsstellen für mehrere zelluläre Proteine (Phalen et al., 1999). Das Agnoprotein 1a (VP4) kommt in einer phosphorelierten und einer nicht phosphorelierten Form vor. Die phosphorelierte Form bindet an späte virale mRNA und beeinflusst hierdurch die Expression der späten Strukturproteine. Unphosphoreliert ist dieses Protein Bestandteil des Viruskapsides (Liu und Hobom, 2000). Nach der Replikation durch die Wirtszelle wird mit Hilfe der Strukturproteine

VP2 und VP3 das virale Genom in Form eines „Minichromosoms“ verpackt und im viralen Kapsid verankert. Das Hauptstrukturprotein VP1 bewirkt schließlich im Beisein von Kalziumionen einen selbständigen Zusammenbau in Virionen (Rodgers und Consigli, 1996). Die Ausschleusung aus der Zelle wird durch eine Lyse – hervorgerufen durch VP4 – bewerkstelligt (Johne und Müller, 2007).

WIRTSSPEKTRUM UND VERBREITUNG

Typisch für alle Säuger-Polyomaviren und das Polyomavirus der Gänse (GHPyV) ist deren hohe Wirtsspezifität (Perez-Losada et al., 2006). Das BFPyV hingegen weist ein sehr breites Wirtsspektrum auf. Neben vielen verschiedenen Arten von Papageien (Graham und Calnek, 1985; Phalen et al., 1994; Dahlhausen und Radabaugh, 1996; Enders et al., 1997; Johne und Müller, 1998) sind ebenfalls Vertreter der *Passeriformes* (Sandmeier et al., 1999; Rossi et al., 2005) und der *Falconiformes* (Johne und Müller, 1998) empfänglich. Außerdem konnte eine Infektion mit BFPyV bei einem Grünarassari (*Pteroglossus viridis*) (Lafferty et al., 1999) nachgewiesen werden. Das Virus wurde außerhalb von Australien in Kanada (Bernier et al., 1981), den USA (Davis et al., 1980; Bozeman et al., 1981), Deutschland (Müller und Nitschke, 1986; Johne und Müller, 1998), Afrika (Johne und Müller, 1998; Rossi et al., 2005), der Slowakei (Literak et al.; 2006), Japan (Ogawa et al., 2006), der Türkei (Özmen und Dörrestein, 2004) und der Schweiz (Sandmeier et al., 1999) gefunden, weshalb von einer weltweiten Verbreitung ausgegangen wird.

Obwohl der Virusname BFPyV durch das „Internationale Komitee der Virustaxonomie“ (Hou et al., 2005) festgelegt wurde, hat sich aufgrund des breiten Wirtsspektrums die Bezeichnung **Aviäres Polyomavirus (APV)** in der Literatur durchgesetzt (Johne und Müller, 1998).

VERWANDTSCHAFT

BFPyV-Isolate verschiedener Spezies und verschiedener geographischer Herkunft wurden auf Genomebene verglichen und es stellte sich heraus, dass sie antigenetisch sehr einheitlich sind. Sie können deshalb alle zusammen einem

Genotyp und einem Serotyp zugeordnet werden (Johne und Müller, 1998; Phalen et al., 1999).

2.3.2 Pathogenese und Pathologie

Der Hauptweg der Übertragung des BFPyV ist horizontal, wahrscheinlich über den Respirationstrakt durch Inhalation virushaltigen Staubes (Bernier et al., 1981). Es ist jedoch auch eine Übertragung durch Fliegen (Fam. Calliphoridae) bei wild lebenden Vögeln möglich (Potti et al., 2007). Durch die Detektion viraler Einschlusskörperchen in Hoden und Ovar (Bernier et al., 1981) ist auch eine vertikale Übertragung denkbar.

Auf das Eindringen des Erregers und eine Virämie folgt entweder nach ca. 10-14 Tagen (Phalen, 2006) eine Erkrankung oder das Immunsystem reagiert mit der Bildung protektiver Antikörper (AK). Der Großteil der älteren Vögel mit intaktem Immunsystem zeigt nach einer Infektion mit BFPyV keinerlei Symptome, sie können aber über viele Monate Virusausscheider bleiben.

Nach einer Virämie kann eine Virusreplikation histologisch durch eine Zellkernvergrößerung mit intranukleären, großen, hellen, leicht basophilen Einschlusskörperchen (Jacobson et al., 1984) in den meisten Organen nachgewiesen werden: in Haut und Follikelepithel, den Nieren, dem Myokard sowie in Leberzellen, Gehirn, Lunge, Kropf, Pankreas, Nebenniere, Duodenum und Jejunum, Hoden, Ovar und Milz (Bernier et al., 1981).

Die pathologisch-anatomischen Veränderungen, die letztlich zum Tod der Tiere führen, sind vielfältig. Am auffälligsten sind das regelmäßige Auftreten eines Hydroperikards, eine Vergrößerung von Herz und Leber mit Nekroseherden in den Organen und geschwollene, gestaute Nieren (Davis et al., 1981) sowie Aszites (Bernier et al., 1981). Auch petechiale Blutungen an den Nieren, dem Darm, dem Myokard und in die Unterhaut, hervorgerufen durch eine generelle Blutungsneigung (Bernier et al., 1981; Jacobson et al., 1984), treten regelmäßig auf. Die Blutungsneigung wird entweder durch eine verminderte Bildung von

Gerinnungsfaktoren in der Leber oder durch eine ausgeprägte Thrombozytopenie ausgelöst (Phalen, 2006). Aszites, Hydroperikard und Ödeme werden durch eine Hypoproteinämie ausgelöst. Diese kann durch eine verminderte Bildung von Albumin (durch eine Zerstörung der Leberzellen) oder durch einen Verlust der Serumproteine über die Nieren (durch eine häufig auftretende membranöse Glomerulopathie) verursacht werden (Gerlach et al., 1998; Phalen, 2006). Eine weitere Ursache für die Ödeme kann eine erhöhte vaskuläre Permeabilität sein (Graham und Calnek, 1986). Die Schädigung der Leber kann labordiagnostisch durch einen Anstieg der Leberenzyme sowie klinisch durch einen Ikterus mit Gelbfärbung der Urate erfasst werden (Phalen, 2006).

Die Replikation des Virus in Follikelepithel und Haut sowie in vielen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes und den Nieren führt zu einer Virusausscheidung über die Exkremente bzw. über Federstaub und Hautschuppen (Phalen, 2006), was zu einer schnellen Ausbreitung im Bestand über die Luft führen kann.

2.3.3 Klinik

Die Wellensittichnestlingserkrankung ist eine Allgemeinerkrankung, die bei vielen verschiedenen Papageienarten auftritt und häufig tödlich verläuft. Überlebende Wellensittiche können Federänderungen entwickeln. Die klinische Ausprägung variiert dabei stark, je nach Alter und Art der Tiere:

Bei dem am häufigsten betroffenen Wellensittich kann ein Viruseintrag in einen unbelasteten Bestand zu einem Krankheitsausbruch mit einer Mortalität von bis zu 100% bei Nestlingen im Alter von unter 15 Tagen führen (Bernier et al., 1981). Es sind außerdem auch Jungvögeln verschiedener Spezies betroffen, es scheint jedoch deutliche Unterschiede im Krankheitsverlauf zu geben. So sind Agaporniden sehr häufig von der akuten Form betroffen, wohingegen Aras nur sehr milde erkranken (Johne et al., 2004).

Adulte Vögel sind prinzipiell ebenfalls empfänglich (Gerlach et al., 1998), erkranken allerdings nur selten (Dahlhausen und Radabaugh, 1996; Phalen et al., 1991). Tritt

jedoch eine Erkrankung auf, sterben die Vögel meist nach einer kurzen Krankheitsphase (Enders et al., 1996). Einige erwachsene Vögel, die eine Erkrankung überleben, entwickeln nach Jahren eine membranöse Glomerulopathie, die wahrscheinlich durch Immunkomplexe verursacht wird (Gerlach et al., 1998; Jacobson et al., 1984). Wellensittiche, die eine Erkrankung überleben, entwickeln häufig Veränderungen am Gefieder.

AKUTER VERLAUF

Der akute Verlauf tritt vor allem bei Wellensittich im Alter von unter 15 Tagen auf. Es sind jedoch auch Nestlinge anderer Papageienarten betroffen, jedoch meist mit niedrigerer Mortalität. Durch eine generalisierte Blutungsneigung kommt es zu ausgeprägten Hämatomen und daraus resultierender Anämie (Blässe). Eine Leberschädigung führt zu einem Ikterus, was sich an einer Gelbfärbung der Urate zeigt (Phalen, 2006). Meist tritt der Tod ganz plötzlich ein, manchmal erst ein bis zwei Tage nach dem Auftreten leichter klinischer Symptome wie verzögerte Kropfentleerung, Regurgitation, Anorexie und Blutungen (Graham und Calnek, 1985).

CHRONISCHER VERLAUF

Ältere Wellensittiche, die eine Erkrankung überleben, können ein verzögertes Wachstum der Schwanz- und Konturfedern sowie Veränderungen in der Federtextur wie Lichterwerden der Federfahne und einen Mangel an Häkchen zeigen (Bernier et al., 1981). Betroffene Vögel sind oft flugunfähig und werden daher Hopser oder Renner genannt. Nach einer oder mehreren Mäusern kann sich das Federkleid bei der BFD wieder normalisieren (Johne et al., 2003). Federveränderungen im Zuge einer BFPyV-Infektion treten bei juvenilen Wellensittichen regelmäßig auf, werden seltener auch beim Rosenköpfchen mit chronisch ulzerierender Dermatitis gefunden und äußern sich hier in einer Braunverfärbung der Federn (Cornelissen et al., 2001).

KLINISCH INAPPARENTER VERLAUF

Adulte Tiere machen meist eine subklinische Infektion durch, können über lange Zeit intermittierend Virus ausscheiden und somit ein Reservoir darstellen (Phalen, 2006).

SONDERFORMEN

Einige Vögel, die eine BFD-Erkrankung überleben, entwickeln daraufhin ausgeprägte Ödeme und teilweise Aszites (Phalen, 2006). Bei Nestlingen von Kakadus wird gelegentlich im Laufe einer BFPyV-Infektion eine starke interstitielle Pneumonie mit einer hohen Anzahl an Einschlusskörperchen in den Pneumozyten zweiter Ordnung festgestellt, die vermutlich durch einen abweichenden BFPyV-Stamm verursacht wird. Begünstigend für den Ausbruch der Erkrankung wirkt eine Immunsuppression, beispielsweise durch eine Koinfektion mit BFDV (Phalen et al., 1991; Dahlhausen und Radabaugh, 1996) oder Stress, ausgelöst durch einen Transport oder Quarantäne (Enders et al., 1996).

2.3.4 Diagnose

Auch bei der Wellensittichnestlingserkrankung ist es nötig, nach einer Verdachtsdiagnose und entsprechenden klinischen oder pathologisch-anatomischen Veränderungen weitere virologische Untersuchungen anzuschließen (Tab. 1):

Beim toten Tier ist eine histologische Untersuchung veränderter Organe mit dem Nachweis von viralen Einschlusskörperchen gängige Praxis. Bei unspezifischen Veränderungen kann auch hier eine elektronenmikroskopische Untersuchung oder eine DNA *in situ*-Hybridisierung angeschlossen werden (Phalen, 2006). Die Anzucht in einer Zellkultur mit Charakterisierung des Virus sichert die histologische Diagnose. Die Anzucht gelingt auf frischen Hühnerembryofibroblasten (HEF). Infiziert man die Zellen zu spät, ist kein cytopathischer Effekt (cpE) zu sehen (Müller und Nitschke, 1986). Auch in Fibroblastenkulturen von Wellensittichembryonen (BEF) kann das Virus vermehrt werden (Bozeman et al., 1981), jedoch sind diese Zellen wenig gebräuchlich.

Auch bei der Untersuchung auf virale DNA von BFPyV kann die PCR genutzt werden. Diese Untersuchung ist jedoch nur im Zusammenhang mit einer klinischen oder pathologischen Verdachtsdiagnose sinnvoll, da ein positives Ergebnis nicht gleichzeitig eine produktive Infektion bedeutet.

Als serologischer Test wurde ein „blocking-ELISA“ (BELISA) zur Untersuchung auf Antikörper gegen BFPyV (Khan et al., 2000) entwickelt. Gängige Praxis ist jedoch der Serumneutralisationstest (SNT), der eine hohe Sensitivität aufweist, allerdings eine Durchführungsdauer von mehreren Tagen benötigt.

Nach einer Infektion mit BFPyV wird innerhalb von zwei bis drei Wochen ein messbarer Spiegel neutralisierender Antikörper gebildet (Phalen, 2006). Infizierte Tiere können jedoch noch Monate bis Jahre Virusausscheider bleiben, ohne klinische Symptome aufzuweisen (Dahlhausen und Radabaugh, 1996). Deshalb sollte man jeden Neuzugang zunächst in Quarantäne halten und nach drei Wochen serologisch untersuchen. Seronegative Tiere stellen ein geringes Infektionsrisiko für den Bestand dar, seropositive Tiere sollten jedoch als mögliche Infektionsquelle behandelt werden und auf Virusausscheidung hin untersucht werden (Phalen, 2006).

Tab. 1 Diagnostische Möglichkeiten zum Nachweis der Schnabel- und Federkrankheit (Pbfd) und der Wellensittichnestlingserkrankung (Bfd)

		BFDV	BFPyV
"Virusnachweis"	Histologie	X	X
	Anzucht		X
	HAH	X	
	PCR	X	X
Antikörpernachweis	SNT		X
	HAH	X	
	BELISA ¹⁾		X
	ELISA ²⁾	X	

¹⁾ Khan et. al., 2000 ²⁾ Johne et. al., 2004

2.4 Differentialdiagnosen

Neben den zwei Viruserkrankungen gibt es für das Leitsymptom Befiederungsstörung noch viele nicht-infektiöse Ursachen für Veränderungen in Farbe oder Form der Federn sowie für Federverlust (Tab. 2).

Die meisten Vögel weisen physiologisch federlose Stellen, sog. Federraine (*Apteriae*), mit tierartlichen Unterschieden auf (König et al., 2009). Kakadus haben eine federlose Stelle unter der Haube, beim Nymphensittich ist häufig der Hinterkopf kahl, v. a. bei Schecken oder sehr hellen Farbschlägen wie Lutos oder Albinos. Am Bauch und am seitlichen Hals besitzen die meisten Papageien solche Federraine. Fallen an anderen Körperpartien federlose Stellen auf, ist deren Lokalisation wichtig.



Abb. 4 Federrupfer

Typische federlose Stellen bei der Automutilation sind Brust, Beine und die Oberseite der Flügel. Das Kopfgefieder ist unverändert, wie bei diesem Timneh-Graupapagei (*Psittacus erithacus timneh*) offensichtlich.

Beißt sich der Vogel selbst die Federn ab oder rupft er sie sich aus, so ist stets das Kopfgefieder, das der Vogel mit dem Schnabel nicht erreicht, unverändert (Abb. 4). Rupft der Partnervogel, tut er dies meist aufgrund eines übersteigerten Sozialtriebes an typischen Stellen am Kopf und rund um den Hals des Partners. Automutilation,

die durch eine Verhaltensstörung ausgelöst wird, stellt gerade bei den großen Papageien ein Problem dar. Die sehr gesellig lebenden Tiere haben in der Natur ein starkes soziales Gefüge. So kann es bei einzeln gehaltenen Tieren durch Langeweile, sexuelle Frustration, Veränderungen in der Routine und Unsicherheit, bei in der Gruppe gehaltenen Vögeln durch Überbesatz und ungleiches Geschlechterverhältnis sowie durch Fehlprägung zum Federrupfen kommen.

Zur physiologischen Ausbildung der Federn benötigt der Körper verschiedenste Substanzen (Krautwald-Junghanns, 1999): hierzu gehören die Aminosäuren Lysin, Methionin, Arginin und Threonin, die Vitamine A, B, E und H sowie die Spuren- und Mengenelemente Zink, Selen, Kalzium, Eisen und Kupfer. Bei einem Defizit an diesen Substanzen kommt es deshalb zu einem mangelhaften Wachstum oder Veränderung in Farbe oder Form der wachsenden Feder. Zu einem Defizit kommt es nicht nur bei einer fehlerhaften Fütterung, die zu einem absoluten Mangel an den genannten Substanzen führt. Auch relative Mangelsituationen durch eine starke Endoparasitose (Abb. 5), durch exokrine Pankreasinsuffizienz oder chronische Durchfälle, die zu einer Malabsorption führen, können in sehr ausgeprägten Gefiederveränderungen gipfeln.



Abb. 5 Weißhaubenkakadu (*Cacatua alba*) mit Federverlust

Dieser Weißhaubenkakadu litt an einer hochgradigen Askariden-Infestation. Nach der Behandlung mit Fenbendazol wuchsen die Federn wieder nach (rechtes Bild).

Chronische Durchfälle können verschiedene Ursachen haben, wie einen Befall mit *Macrorhabdus ornithogaster* („Megabakterien“) beim Wellensittich, Tuberkulose und die Neuropathische Drüsenmagendilatation. Hepatopathien führen durch eine Malassimilation zu einer Mangelsituation.

Mechanische Schäden des Gefieders durch Technopathien, wie zu kleine Käfige oder Überbesatz, beschränken sich meist auf die Schwanzfedern und sind durch Adspektion und den Vorbericht leicht zu diagnostizieren. Sehr selten führt ein starker Ektoparasitenbefall, wie von Vogelmilben, Federspül- und Federbalgmilben und Federlingen, zu einer mechanischen Schädigung des Gefieders und häufig auch zu Pruritus und Unruhe.

Tab. 2 Differentialdiagnosen bei verschiedenen Befiederungsstörungen (modifiziert nach KRAUTWALD-JUNGHANNS, 1999)

Ätiologie \ Symptom	mangelhafte Federneubildung	Deformation	Verfärbung	Federrupfen	
				mit Juckreiz	ohne Juckreiz
Nährstoffmangel (absolut, relativ)	X	X	X	X	X
Hepatopathie	X	X	X	X	
Schwermetall-Intoxikation			X		
Psittacine beak and feather disease	X	X	X		
Neoplasien der Haut	X	X		X	
Budgerigar fledgling disease	X	X			
Hormonimbilanz	X	X	X		
Ektoparasiten				X	
Follikulitis / follikuläres Trauma	X	X		X	
Trockene Luft / Reizstoffe				X	
Kongenitale Defekte	X	X	X		
Verhalten					X

Sind nur einzelne Federn von Deformationen, Farbveränderungen oder Verlust betroffen, kann auch eine isolierte Schädigung des Follikels durch Trauma (z. B. Ausrupfen der Feder), Entzündung (bakterielle oder mykotische Follikulitis) oder eine Neoplasie (benachbarte Haut meist ebenfalls verändert) ursächlich sein. Eine

spezielle Mutation beim Wellensittich führt zu gelockten und überlangen Federn. Betroffene Vögel – Federputzer oder Federduster genannt – haben eine Lebenserwartung von unter einem Jahr.

Eine Hypothyreose bzw. ein Hyperöstrogenismus oder ein Mangel an Progesteron führt zu einer fehlenden Induktion der Mauser. Federn überaltern und fallen aus, werden aber nicht nachgebildet und die Vögel werden mehr und mehr nackt – meist beginnend am Kopf, Nacken und Brustkorb, da hier die normale Mauser beginnt.

3 Material und Methoden

3.1 Patientengut

In einem ersten Teil wurden diagnostische Proben verschiedener Papageienspezies mit Hilfe der PCR auf virale DNA von BFDV und BFPyV untersucht und die beobachteten Symptome verglichen. In einem zweiten Teil wurden bei einer Gruppe junger Graupapageien verschiedene Organe entnommen und auf deren Verlässlichkeit als Proben für die BFDV-PCR getestet.

3.1.1 Teil 1: Diagnostische Proben

In dem Zeitraum von März 2003 bis September 2005 wurden insgesamt 265 Proben auf das Vorhandensein viraler DNA von BFDV und 135 Proben auf BFPyV untersucht. Die verschiedenen Proben wurden zum Teil an die virologische Abteilung der Klinik für Vögel eingesandt und zum Teil in der Ziervogelklinik und der pathologischen Abteilung Patienten bzw. eingesandten toten Vögeln entnommen. Bei den Vögeln handelt es sich um Vertreter aus 26 verschiedenen Gattungen, die auf sechs „Vogelgruppen“ aufgeteilt wurden (Tab. 3).



Abb. 6 Beispiele für Befiederungsstörungen

Links: Vasapapagei (*Coracopsis vasa*) mit Federverlust am Kopf

Rechts: Graupapagei (*Psittacus erithacus*) mit Rotverfärbung einzelner Konturfedern

Es wurden insgesamt 120 Vögel *intra vitam* und elf Vögel *post mortem* aufgrund von Befiederungsstörungen mit Hilfe der PCR auf BFDV und 46 Tiere *intra vitam* bzw. zehn Tiere *post mortem* auf BFPyV untersucht. Als Befiederungsstörungen wurden mangelnde Federneubildung, Federverlust, Deformationen und Verfärbungen von Federn (Abb. 6) sowie Federrupfen gewertet.

Tab. 3 Art und Anzahl der untersuchten Vögel und deren Einteilung in sechs Gruppen

Gruppen		BFDV	BFPyV	Vogelart
Amazonen, AZ		25	5	Amazona aestiva, albifrons, autumnalis, farinosa, festiva, leucocephala, ochrocephala
Kakadus, KK	Cacatua	35	4	Cacatua alba, galerita, goffini, leadbeateri, moluccensis, roseicollis, sulphurea
	Callocephalon	6	0	Callocephalon fimbriatum
	Calyptorhynchus	4	3	Calyptorhynchus f. funereus, magnificus
Graupapageien, GP		95	59	Psittacus erithacus
Andere Papageien, PP	Agapornis	4	0	Agapornis roseicollis
	Anodorhynchus	5	4	Anodorhynchus hyazinthinus
	Ara	14	4	Ara ararauna, chloroptera
	Choracopsis	3	1	Coracopsis nigra, vasa
	Cyanopsitta	2	2	Cyanopsitta spixii
	Ecleptus	8	5	Ecleptus roratus
	Forpus	2	0	Forpus coelestis, xanthopterygius
	Opopsitta	1	1	Opopsitta guillemoti
	Pionites	2	1	Pionites leukogaster
Pionus	4	4	Pionus chalopterus, menstruus	
Wellensittiche, WS		35	33	Melopsittacus undulatus
Andere Sittiche, ST	Alisterus	2	1	Alisterus amboinensis, scapularis
	Aratinga	2	0	Aratinga wagneri frantata
	Cyanoramphus	3	0	Cyanoramphus novaezelandiae
	Eupsittula	2	0	Eupsittula aurea
	Neophema	2	2	Neophema pulchella
	Nymphicus	5	1	Nymphicus hollandicus
	Platycercus	3	2	Platycercus eximius, icterotis
	Purpureicephalus	1	1	Purpureicephalus spurius
	Pyrrhura	0	1	Pyrrhura rhodogaster
Taenogygia	0	1	Taenogygia guttata	
gesamt		265	135	

Zusätzlich wurden 79 klinisch gesunde Vögel und 55 Tiere, die relativ akut starben und keine Federveränderungen aufwiesen, auf virale DNA von BFDV bzw. 47 klinisch gesunde und 32 akut gestorbene Tiere auf virale DNA von BFPyV untersucht.

Alle Vögel stammten aus privater Einzelhaltung oder kleiner Gruppenhaltung ohne eine Vorgeschichte von BFDV oder BFPyV. Der Großteil der untersuchten Tiere war bereits seit über drei Monaten in Besitz. Die wissenschaftlichen Namen der Vögel sind der Systematik von Wolters entnommen (Wolters, 1982).

3.1.2 Teil 2: Junge Graupapageien

Aus einem Graupapageienbestand, in dem innerhalb von 20 Monaten 56 von insgesamt 158 Vögeln vermeintlich an PBFD starben, wurden 34 tote Tiere zur Untersuchung eingesandt. Die Tierkörper waren in Gruppen zusammengefasst in Plastiktüten eingefroren. Der Erhaltungszustand war zum Teil autolytisch. Es wurde von allen Tieren eine pathologische Untersuchung durchgeführt und für nachfolgende PCR-Untersuchungen die Milz, die Leber, die Bursa Fabricii und die Haut inklusive Federspulen (Haut-mit-Feder-Proben) steril entnommen. Alle Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -70 °C eingefroren.

3.1.3 Untersuchungsmaterial und Probennahme

Aufbewahrungsmedium

Minimum Essential Medium (MEM) mit Earle's Salzen, nicht essentiellen Aminosäuren und L-Glutamin (Biochrom AG, Berlin)

Als Probenmaterial für die *intra vitam* Diagnostik wurden Kloakentupfer und Blut sowie Federspulen von frisch aus der Haut gezogenen Federn verwendet (Abb. 7) – falls vorhanden wurden veränderte Federn gewählt. Die Federspulen wurden direkt nach der Entnahme in sterile 2 ml Reaktionsgefäße (safe-lock tubes, Eppendorf, Köln) ohne Medium verbracht. Eine Blutprobe wurde durch sterile Punktion der

rechten Jugularvene (*Vena jugularis*) gewonnen und mit Heparin als Antikoagulans versetzt. Bei der Entnahme eines Kloakentupfers wurde darauf geachtet, unter Spreizen der Perikloakalregion und unter Zuhilfenahme eines dünnen Stäbchentupfers eine Kontamination mit der äußeren Haut zu vermeiden. Die Tupfer wurden umgehend in 2 ml Reaktionsgefäße (safe-lock tubes, Eppendorf, Köln) verbracht, die jeweils 400 µl MEM enthielten.

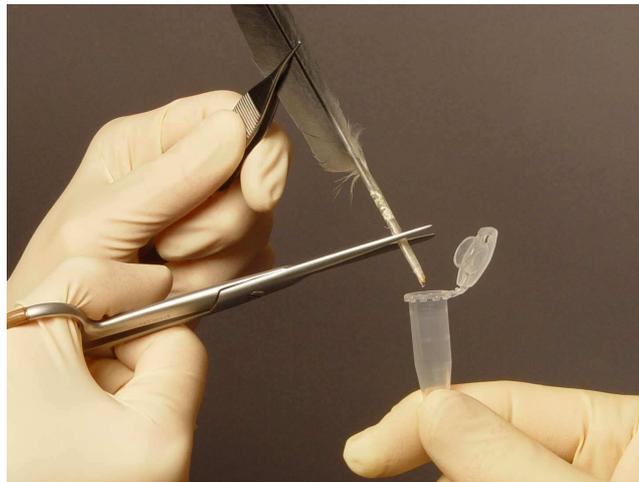


Abb. 7 Entnahme einer Federprobe

Der Nachweis einer BFDV- bzw. BFPyV-Infektion mittels PCR ist über eine Federprobe möglich. Um eine Kontaminationsgefahr der Probe zu minimieren, sollte eine frisch mit einer Pinzette aus der Vogelhaut gezogene Feder verwendet werden. Direkt anschließend wird die Federspule so abgeschnitten, dass diese in ein steriles Probengefäß fällt.

Für die *post mortem* Diagnostik der Patienten im ersten Teil der Arbeit wurde zur Untersuchung auf BFDV, falls präparierbar, die Bursa Fabricii (n = 27) oder andernfalls die Leber (n = 17) bzw. die Milz (n = 2) gewählt. Bei sechs Vögeln gelangten die Nieren, bei 13 weiteren Tieren ein Homogenisat aus nicht näher spezifizierten Organen zur Untersuchung. Für die Untersuchung auf BFPyV wurde ebenfalls die Bursa Fabricii (n = 14), die Leber (n = 18) oder die Nieren (n = 7), bei drei Tieren ein Homogenisat aus nicht näher spezifizierten Organen für die Untersuchung verwendet. In vielen Fällen wurden mehrere Organe parallel untersucht. Eine differenzierte Darstellung der PCR-Ergebnisse aus verschiedenen

Organen wurde bei den positiv getesteten Vögeln angegeben. Alle Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei - 70 °C tiefgefroren.

Bei der Entnahme der Haut-mit-Feder-Proben der Graupapageien aus dem zweiten Teil der Arbeit wurde darauf geachtet, die Kontaminationsgefahr so gering wie möglich zu halten, indem nur der innere Teil des Federkiels, die Spule, zur Untersuchung gelangte.

3.2 DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen DNA-Isolierkits (DNAeasy tissue kit, Quiagen, Hilden) gemäß der Beschreibung des Herstellers durchgeführt. Alle Arbeiten wurden unter Verwendung von DNase freiem Einwegmaterial und Handschuhen durchgeführt. Arbeitsgeräte, Arbeitsflächen und Handschuhe wurden weitestgehend vor und nach dem Gebrauch mit einem Dekontaminationsspray gegen DNA, RNA, DNase, RNase, Bakterien und Phagen behandelt (LTK-008, Biodelta GmbH, Löhne).

Medium

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

8,0 g NaCl	Natriumchlorid reinst (Fa.Merck, Darmstadt)
0,2 g KCl	Kaliumchlorid (Fa.Merck, Darmstadt)
1,15 g Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat (SIGMA, St.Louis, USA)
0,2 g KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat zur Analyse, ISO (Fa.Merck, Darmstadt)

ad 1000 ml Aqua bidest., pH 7,4, autoklaviert und bei 4 °C gelagert

Von den zu untersuchenden Gewebeproben wurde für die DNA-Isolierung ein ca. 25 mg schweres Teilstück mit Hilfe einer sterilen Einmalklinge entnommen. Dieses Teilstück wurde in einem doppelt autoklavierten 2 ml-Reaktionsgefäß (safe-lock tube

Eppendorf, Köln) mit 180 µl des Lysepuffers ATL und 20 µl Proteinase K gemischt. Nach guter Durchmischung (Vortex-Genie 2, scientific industries/Roth, Karlsruhe) wurde der Ansatz über Nacht in einem Inkubator (ThermoStat plus, Eppendorf, Köln) auf 55 °C erwärmt. Am Folgetag wurden nach gründlichem Mischen (Vortex-Genie 2, scientific industries/Roth, Karlsruhe) 200 µl des Lysepuffers AL zugefügt und 10 Minuten lang bei 70 °C (ThermoStat plus, Eppendorf, Köln) eine maximale Lyse der Zellen ausgelöst. Nach Fällung der DNA durch Zugabe von 200 µl Ethanol (96-100 %) (Roth, Karlsruhe) und gründlichem Mischen (Vortex-Genie 2, scientific industries/Roth, Karlsruhe) erfolgte die eigentliche Extraktionsprozedur:

1. Adsorption an die Säulenmembran

Der Ansatz wurde auf die in einem 2 ml Sammelröhrchen (safe-lock tubes, Eppendorf, Köln) befindliche DNeasy-Zentrifugationssäule überführt und bei einer RZB (relative Zentrifugalbeschleunigung) von ca. 6000 x g eine Minute lang zentrifugiert.

2. Beseitigung von Verunreinigungen

Der Durchfluss wurde verworfen, die Säule in ein leeres Sammelröhrchen eingebracht und mit 500 µl des ersten Waschpuffers AW1 (enthält 57 % Ethanol) übergossen. Nach einminütiger Zentrifugation bei einer RZB von ca. 6000 x g und Verwerfen des Durchflusses wurde die Säule erneut in ein Sammelröhrchen gestellt, 500 µl AW2 Puffer (enthält 70 % Ethanol) zugegeben und drei Minuten lang bei einer RZG von ca. 16060 x g zentrifugiert.

3. Elution der Nukleinsäuren

Die durch Zentrifugation getrocknete Säule wurde für eine Minute mit 200 µl des AE Elutionspuffers in einem sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß (safe-lock tube, Eppendorf, Köln) inkubiert und eine Minute bei einer RZB von ca. 6.000 x g zentrifugiert. Das erhaltene Eluat (Nukleinsäurelösung) wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

Für die Verarbeitung von Kloakentupfern und Federn wurde das Protokoll gewählt, das die DNA-Isolierung aus Zellkulturen beschreibt. Die **Federspulen** wurden mit einer sterilen Pinzette ergriffen und in sterilen, 2-fach autoklavierten 2 ml Reaktionsgefäßen (safe-lock tube, Eppendorf, Köln) zwischen Deckel und Gefäß eingeklemmt, wodurch beim Herausziehen der Feder die Pulpa im Gefäß verblieb. Anschließend wurde 200 µl Phosphat gepufferte Lösung (PBS), 20 µl Proteinase K und 200 µl des Lysepuffers AL zur Pulpa gegeben und gründlich gemischt, bevor der Ansatz zehn Minuten bei 70 °C (ThermoStat plus, Eppendorf, Köln) lysiert wurde. Das Medium, in dem sich die **Kloakentupfer** befinden, wurde inklusive des Tupfers vor der Verarbeitung gründlich gemischt (Vortex-Genie 2, scientific industries/Roth, Karlsruhe) und der Tupfer wurde an der Seitenwand des Gefäßes ausgepresst. 200 µl des Mediums wurden nun in ein leeres 2 ml Reaktionsgefäß (safe-lock tubes, Eppendorf, Köln) überführt. Auch hierzu wurde 20 µl Proteinase K und 200 µl des Lysepuffers AL gegeben, bevor der Ansatz zehn Minuten bei 70 °C (ThermoStat plus, Eppendorf, Köln) inkubiert wurde. Für die DNA-Isolierung aus **Blut** wurde das entsprechende Protokoll gewählt, wobei das Blut vorher zentrifugiert wurde und 10 µl des mit Leukozyten angereicherten „buffy coats“ in 220 ml PBS, 20 µl Proteinase K und 200 µl Lysepuffer AL für zehn Minuten bei 70 °C (ThermoStat plus, Eppendorf, Köln) inkubiert wurden. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol verlief die restliche Extraktionsprozedur der DNA aus Federn, Kloakentupfern und Blut homolog zu der Extraktion aus Organen (siehe oben).

Die isolierte DNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei - 20 °C eingefroren.

3.3 Photometrische Absorptionsmessung

Vor der Amplifikation der isolierten DNA der Gruppe Graupapageien wurde deren Lichtschwächung (Extinktion) bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge mit Hilfe eines Spektralphotometers (nanodrop, Erlangen) gemessen. Dabei hängt die Extinktion bei konstanter Wellenlänge des Lichts von den Eigenschaften der Substanz im Strahlengang ab. Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe der Absorption bei 260 nm

Wellenlänge (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) berechnet. Zur Bestimmung der Qualität der isolierten DNA wurde zusätzlich die optische Dichte (OD) bei 280 nm Wellenlänge (Absorptionsmaximum von Proteinen, Phenolen und anderen Kontaminationen) gemessen und der Quotient aus OD 260 nm / OD 280 nm bestimmt. Dieser sollte bei reiner DNA etwa 1,8 betragen. War der Wert kleiner, so lag möglicherweise eine Verunreinigung durch Proteine vor. Höhere Werte wiesen auf eine DNA-Denaturierung hin.

3.4 Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Bei der PCR wird durch eine hitzeresistente DNA-Polymerase mit Hilfe von spezifischen Primern und Puffern eine bestimmte DNA-Sequenz amplifiziert. Dabei durchläuft das PCR-Reaktionsgemisch mit Hilfe eines Thermocyclers ein genau definiertes Temperaturprogramm, bei dem die DNA zyklisch wiederholt immer dieselben Prozesse eingeht: Denaturierung (Auftrennung der doppelsträngigen DNA), Annealing (Bindung der Primer an die DNA-Einzelstränge) und Elongation (Auffüllen des DNA-Doppelstranges mit freien Nukleotiden von der Primer-DNA-Bindungsstelle aus durch die DNA-Polymerase). Auch hier wurden alle Arbeiten unter Verwendung von DNase freiem Einwegmaterial und Handschuhen durchgeführt. Arbeitsgeräte, Arbeitsflächen und Handschuhe wurden weitestgehend vor und nach dem Gebrauch mit einem Dekontaminationsspray gegen DNA, RNA, DNase, RNase, Bakterien und Phagen behandelt (LTK-008, Biodelta GmbH, Löhne). Alle Arbeitsschritte erfolgten an einem sterilen Arbeitsplatz (Lamin Air HB 2448, Heraeus instruments GmbH, München).

Materialien

Diethylpyrocarbonat- (DEPC-) Behandlung von Aqua bidest.

Zu je 500 ml Aqua bidest. wurden 0,5 ml DEPC (SIGMA, St.Louis, USA) gegeben, bei Raumtemperatur über Nacht (mindestens 8 h) inkubiert und anschließend autoklaviert (mindestens 121 °C für 20 Min.). Das DEPC-behandelte Aqua bidest. (DEPC-Wasser) wurde portioniert bei - 20 °C gelagert.

Bei den verwendeten **DNA-Polymerase-Sets** waren alle benötigten Puffer und Elektrolytlösungen enthalten.

Alle **Primer** wurden bei der Firma metabion GmbH (Martinsried) hergestellt und anschließend mit sterilem Diethylpyrocarbonat- (DEPC-) behandeltem Aqua bidest. auf eine Konzentration von 100 pmol/µl gebracht.

Der **PCR-Nucleotide-Mix (dNTPs)** wurde von der Firma Promega (Madison, USA) bezogen.

3.4.1 BFDV-PCR

Primer-Sequenzen:

Nr. 2, s: 5`-AACCCTACAGACGGCGAG-3`

Nr. 4, as: 5`-GTCACAGTCCTCCTTGTACC-3`

Für die Amplifikation eines 717 bp großen Teiles des „beak and feather disease virus“ innerhalb von ORF 1 wurde das Protokoll von Ypelaar (Ypelaar et al., 1999) mit nachfolgenden Modifikationen gewählt. 25 µl des Reaktionsgemisches beinhalteten 25 pmol der beiden Primer, 0,2 mM dNTPs, 1 mM MgCl₂ und 0,2 IU Taq-DNA-Polymerase (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen). Eine Positivkontrolle enthielt die DNA eines an der chronischen Verlaufsform der PBFV erkrankten Weißhaubenkakadus, die Negativkontrolle enthielt statt einer DNA-Probe 10 µl DEPC-Wasser. Nach Zugabe von 10 µl der isolierten DNA zu den Reaktionsgemischen fand die PCR im Thermocyclers Cyclone 96 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bei folgenden Temperaturbedingungen statt: 15 Min. bei 95 °C (Aktivierung der Polymerase und initiale Denaturierung), 32 Durchgänge mit jeweils 30 s bei 95 °C, 20 s bei 57 °C, 30 s bei 72 °C und einer letzten Extension bei 72 °C für fünf Min.

3.4.2 BFPyV-PCR

Primer-Sequenzen:

BFD 1: 5` - CAA GCA TAT GTC CCT TTA TCC C - 3`

BFD 2: 5` - CTG TTT AAG GCC TTC CAA GAT G – 3`

Für die Amplifikation eines 310 bp großen Teiles des „avian polyomavirus“ innerhalb der t/T Antigenregion wurde das Protokoll von Johne (Johne und Müller, 1998) mit nachfolgenden Modifikationen gewählt. 25 µl des Reaktionsgemisches beinhalteten 25 pmol der beiden Primer, 0,2 mM dNTPs, 1x Puffer, 1x Enhancer Solution P und 0,3 IU Taq-DNA-Polymerase (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen). Eine Positivkontrolle enthielt die isolierte DNA von auf Hühnerembryofibroblasten vermehrtem BFPyV, die Negativkontrolle enthielt statt einer DNA-Probe DEPC-Wasser. Nach Zugabe von 10 µl der isolierten DNA zu den Reaktionsgemischen fand die PCR im Thermocyclers Cyclone 96 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bei folgenden Temperaturbedingungen statt: 15 Min. bei 95 °C (Aktivierung der Polymerase und initiale Denaturierung), 32 Durchgänge mit jeweils 30 s bei 95 °C, 20 s bei 57 °C, 30 s bei 72 °C und einer letzten Extension bei 72 °C für fünf Min.

3.4.3 PsHV-PCR

Primer-Sequenzen:

PsHV 1: 5` - CAA TGC GTG GGG TTA AAC TCG GAA CTA GAA G - 3`

PsHV 2: 5` - GAT GTT AGG CTC GTG TAG TCG – 3`

Für die Amplifikation eines 667 bp großen Teiles des „psittacine herpesvirus“ (PsHV, Erreger der Pacheco'schen Krankheit) innerhalb des ORF UL 17/16 wurde das Protokoll von Tomaszewski (Tomaszewski et al., 2003) mit nachfolgenden Modifikationen gewählt. 25 µl des Reaktionsgemisches beinhalteten 25 pmol der beiden Primer, 0,1 mM dNTPs, 2,5 mM MgCl₂ und 0,75 IU Taq-DNA-Polymerase (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen). Eine Positivkontrolle enthielt die isolierte DNA einer an der Pacheco'schen Krankheit gestorbenen Amazone, die Negativkontrolle enthielt statt einer DNA-Probe DEPC-Wasser. Nach Zugabe von 10

µl der isolierten DNA zu den Reaktionsgemischen fand die PCR im Thermocyclers Cyclone 96 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bei folgenden Temperaturbedingungen statt: 15 Min. bei 95 °C (Aktivierung der Polymerase und initiale Denaturierung), 40 Durchgänge mit jeweils 30 s bei 94 °C, 45 s bei 60 °C, 90 s bei 72 °C und einer letzten Extension bei 72 °C für fünf Min.

3.4.4 12S rDNA-PCR

Primer-Sequenzen:

12 S rDNA L: 5` - GGA TTA GAT ACC CCA CTA TGC - 3`

12 S rDNA H: 5` - AGG GTG ACG GGC GGT ATG TAC G - 3`

Für die Amplifikation eines 436 bp großen Teiles der aviären mitochondrialen DNA wurde das Protokoll von Bert (Bert et al., 2003) mit nachfolgenden Modifikationen gewählt. 25 µl des Reaktionsgemisches beinhalteten 25 pmol der beiden Primer und einen gebrauchsfertigen Master Mix (Promega GmbH, Mannheim). Eine Positivkontrolle enthielt die isolierte DNA aus dem Blut eines klinische gesunden SPF-Huhnes (Lohmann Tierzucht, Cuxhaven), die Negativkontrolle enthielt statt einer DNA-Probe DEPC-Wasser. Nach Zugabe von 10 µl der isolierten DNA zu den Reaktionsgemischen fand die PCR im Thermocyclers Cyclone 96 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bei folgenden Temperaturbedingungen statt: zwei Min. bei 94 °C (Initiale Denaturierung), 32 Durchgänge mit jeweils 30 s bei 94 °C, 60 s bei 58 °C, 30 s bei 70 °C und einer letzten Extension bei 70 °C für sieben Min.

3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese kann die Größe von DNA-Stücken bestimmt werden, wie sie z. B. bei der PCR entstehen. Durch Anlegen einer konstanten Spannung werden die Stücke der Länge nach aufgetrennt und durch

Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht sichtbar gemacht. Als Referenzgröße dient ein ebenso aufgetragener und gefärbter Marker.

Material

EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8,0)

186,1 g $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \times 2H_2O$ Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure (EDTA)-
Dinatrium-Dihydrat (Roth, Karlsruhe)

20 g NaOH Natriumhydroxid (Merck, Darmstadt)

ad 100 ml Aqua bidest., pH 8,0 mit NaOH einstellen.

Bei Raumtemperatur lagern.

5 x TBE Puffer

54 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma, St. Louis, USA)

27,5 g Borsäure (Merck, Darmstadt)

20 ml EDTA-Lösung (0,5 M, pH8,0)

ad 1 l Aqua bidest.

Bei Raumtemperatur lagern.

Zur Herstellung eines 1 x TBE Puffers wurde ein Teil der 5fach konzentrierten Lösung mit 4 Teilen Aqua bidest. verdünnt.

2 %ige Agarose

2 g Agarose (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)

20 ml 5 x TBE Puffer

ad 100ml Aqua bidest.

Bei Raumtemperatur lagern.

Ladepuffer (Blue/Orange 6 x Loading Dye, Promega, Madison, USA)

Größenmarker (100bp DNA Ladder, Promega, Madison, USA)

Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe)

ad 1 ml Aqua dest., bei 4 °C lagern

vor Gebrauch wurde die Lösung 1:1000 in Aqua bidest. verdünnt

Durchführung

Die 2 %ige Agarose wurde in einem Mikrowellenherd so lange erhitzt, bis sie vollkommen geschmolzen und die Lösung klar war. Anschließend wurde sie auf ca. 50 °C abgekühlt und in eine Elektrophoresekammer (Kammer und Spannungsquelle: Pharmacia LKB – GPS 200/400, Pharmacia) mit Probenaschenkamm gegossen. Nachdem das Gel vollständig abgekühlt war, konnte der Probenkamm entfernt und das Gel mit 1 x TBE-Puffer überschichtet werden. Die Proben wurden nun mit dem Ladepuffer vermischt (5 µl PCR-Produkt + 1 µl Ladepuffer) und in die Probenaschen pipettiert. Als Referenz wurde eine Probenasche mit Größenmarker befüllt. Danach wurde so lange eine konstante Spannung von 120 V an der Kammer angelegt, bis die Proben ausreichend weit im Gel aufgetrennt wurden. Die beiden Farbstoffe Bromphenolblau und Xylen-Cyanol-FF im Ladepuffer und im Marker wurden dabei als Orientierung verwendet. Nach 30-minütiger Färbung des Gels mit Ethidiumbromid wurden die PCR-Produkte fluoreszenzoptisch unter ultraviolettem Licht nachgewiesen und fotografiert (intas Gel Jet Imager 2000, intas, Göttingen).

3.6 Virusanzucht

Die Leberproben der Graupapageiengruppe aus dem zweiten Teil der Arbeit wurden auf das Vorhandensein von auf Hühnerembryofibroblasten (chicken embryo fibroblasts, HEF) kultivierbaren Viren untersucht. Die Virusanzucht erfolgte hierbei nach Standardmethoden (Reynolds et al., 1989).

Material

Mörser, Pistill und Meersand

PBS (Herstellung siehe oben)

Bakterienfilter, Porengröße 0,45 µm (Minisart, Sartorius AG, Göttingen)

Antibiotika: Penicillin (Sigma, St. Louis, USA), Gentamycin (Seromed, Berlin), Streptomycinsulfat (Sigma, St. Louis, USA)

Durchführung

Die Leberproben wurden mit Hilfe eines sterilen Mörsers und Pistills homogenisiert, in einem Verhältnis von 1:10 in PBS resuspendiert und mit einer Antibiotikallösung versetzt (Penicillin 2000 IE/ml, Gentamycin 50 µg/ml, Streptomycinsulfat 2 mg/ml). 100 µl dieser Suspension wurden mit am Vortag kultivierten Hühnerembryofibroblasten (HEF) in 24-Loch-Platten (Zellkultur Multiwellplatte, 24 wells, Greiner, Solingen) inokuliert. Pro Organ wurde dabei ein Doppelansatz durchgeführt. Die Zellen wurden alle 24 Stunden lichtmikroskopisch auf das Vorhandensein eines cytopathischen Effektes (cpE) hin überprüft. Nach fünf Tagen wurden 100 µl jeder Kultur auf frische HEF übertragen. Nach weiteren fünf Tagen wurden die Proben als negativ gewertet, wenn bis dahin kein cpE auftrat.

Weitere bakteriologische und histologische Untersuchungen erscheinen aufgrund der teilweise bereits fortgeschrittenen Autolyse der Tierkörper sowie des Gefriervorganges nicht sinnvoll.

4 Ergebnisse

In dem ersten Teil der Arbeit wurde die Nachweishäufigkeit viraler DNA von BFDV und BFPyV bei symptomlosen Vögeln sowie bei Vögeln mit Befiederungsstörungen und akut gestorbenen Tieren im Patientengut der Klinik für Vögel aus dem süddeutschen Raum ermittelt. Anschließend wurden die Einzelergebnisse der PCR-positiven Vögel in Hinblick auf die Symptome und das Alter ausgewertet.

4.1 Nachweis viraler DNA von BFDV

Ein fünf Monate alter Graupapagei, der in der Klinik für Vögel als Patient eingeliefert wurde, wies ein hochgradig gestörtes Allgemeinbefinden bei physiologischer Befiederung auf. Am Tag der Vorstellung wurden ein Kloakentupfer und eine Blutprobe entnommen und auf virale DNA von BFDV hin untersucht. Der Vogel starb jedoch noch am Abend der Probennahme. Die Besitzer wünschten keine pathologische Untersuchung. Dieser Vogel wurde zwar *intra vitam* untersucht und wies keine Befiederungsstörung auf, wird jedoch aufgrund des letalen Verlaufes bei der Auswertung in die Gruppe der akuten Todesfälle integriert.

Die insgesamt 265 auf virale DNA von BFDV untersuchten Vögel wurden in drei Gruppen unterteilt:

- Vögel mit klinischen Befiederungsstörungen (n = 131), die *intra vitam* (n = 120) oder *post mortem* (n = 11) untersucht wurden
- Tiere, die ohne Befiederungsstörungen (per)akut starben (n = 55)
- Vögel mit intaktem Gefieder (n = 79)

4.1.1 Vögel mit Befiederungsstörungen

Insgesamt wurden 120 lebende und 11 tote Tiere mit Befiederungsstörungen untersucht. Dabei wurde bei 24 Vögeln (18,3 %) virale DNA von BFDV gefunden

(Abb. 8 A). Bei den 24 Vögeln handelte es sich um Vertreter unterschiedlicher Arten (Tab. 4). Sie wurden mit dem Vorbericht Federrupfen (n = 7), Federverlust (n = 15) und deformierte Federn (n = 1) vorgestellt. Ein Gelbhaubenkakadu mit Federverlust und deformierten Federn wurde aufgrund einer Fraktur des Oberschnabels euthanasiert und anschließend untersucht.

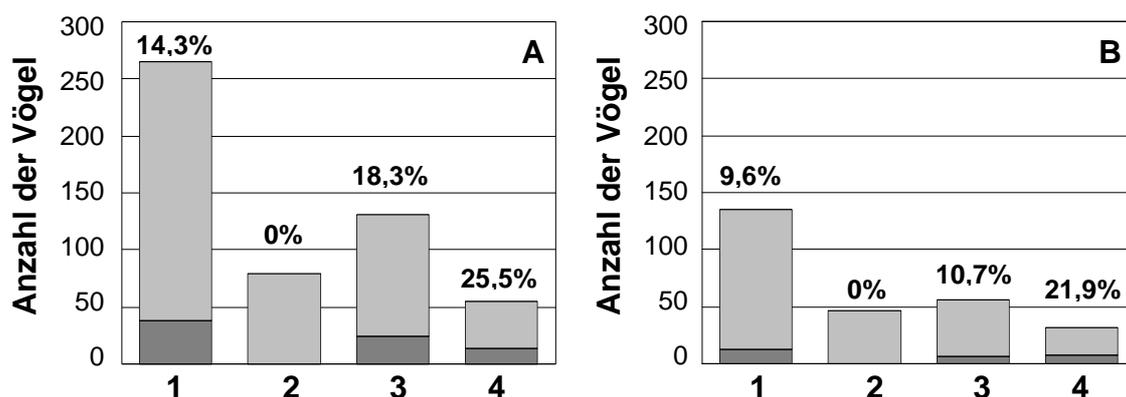


Abb. 8 Ergebnisse der BFDV- und BFPyV-PCR

Darstellung der untersuchten PCR-negativen □ und PCR-positiven ■ Vögel mit Angabe des jeweiligen prozentualen Anteils positiver Tiere. Der erste Balken (1) zeigt die Gesamtzahl der Vögel, die dann aufgeteilt wurden in klinisch unauffällige (2) Vögel, Tiere mit Befiederungsstörungen (3) und akut gestorbene Tiere (4). **A** gibt dabei die Ergebnisse der BFDV-PCR, **B** die der BFPyV-PCR an.

Bei den insgesamt sieben als Federrupfer vorgestellten Tieren handelte es sich um zwei Graupapageien, einen kleinen Vasapapagei (*Coracopsis nigra*), einen Gelbhaubenkakadu (*Cacatua galerita*), einen Nymphensittich (*Nymphicus hollandicus*), einen Edelpapagei (*Ecliptus roratus*) und eine Weißstirnamazone (*Amazona albifrons*). Bei der genaueren Untersuchung des Gefieders fielen bei dem kleinen Vasapapagei deutlich deformierte Federn auf (Abb. 9) und bei dem Graupapagei war eine Rotverfärbung einzelner verbliebener Federn zu erkennen. Die restlichen fünf BFDV-positiven Rupfer hatten ein physiologisches Restgefieder.



Abb. 9 Typische Federveränderungen bei der PBF

sind zirkuläre Einschnürungen (----->), Einblutungen in den Federschaft (-->) und persistierende Federscheiden (—>), wie hier bei der BFDV-PCR-positiven Feder eines kleinen Vasapapageis (*Coracopsis nigra*).

Unter den 15 Tieren, die durch einen Federverlust auffielen, waren zehn Wellensittiche (*Melopsittacus undulatus*), eine Weißstirnamazone, ein dunkelroter Ara (*Ara chloroptera*), ein Rosenköpfchen (*Agapornis roseicollis*), ein Glanzflügelpapagei (*Pionus chalopterus*) und ein Graupapagei vertreten. Zwei Wellensittiche, das Rosenköpfchen, der Graupapagei und der Glanzflügelpapagei wiesen zusätzlich zum Federverlust mehrere deformierte Federn im Restgefieder auf. Auch der euthanasierte Gelbhaubenkakadu mit der Fraktur des Oberschnabels wies Deformationen der verbliebenen Federn auf, ebenso wie der Gelbhaubenkakadu (*Cacatua galerita*), der bereits mit diesem Vorbericht vorgestellt wurde. Bei allen zehn Wellensittichen setzte der Federverlust vorherichtlich sehr plötzlich ein und begann an den langen Schwung- und Schwanzfedern.

Die BFDV-PCR-positiven Vögel mit Befiederungsstörungen hatten ein Alter von drei Wochen bis zu 23 Jahren, wobei Vögel im Alter von einem Jahr oder jünger ca. ein Drittel (n = 7) der untersuchten Tiere ausmachten. Von drei Vögeln war das Alter nicht zu eruieren.

4.1.2 Vögel, die akut starben

Von den 55 toten Tieren, die ein physiologisches Gefieder aufwiesen, zeigten 14 Tiere (25,5 %) ein positives PCR-Ergebnis (Abb. 8 A). Ein vierjähriger BFDV-PCR-positiver Wellensittich starb an einer Streptokokkenseptikämie und wies einen Tumor im Kropfbereich auf (Tab. 4). Alle anderen akut gestorbenen BFDV-positiven Tiere waren 13 von 19 (68,4 %) untersuchten Graupapageien in einem Alter unter einem Jahr. Sie zeigten zu 75 % einen guten Ernährungszustand. Zwei der drei Tiere mit einem reduzierten Ernährungszustand wiesen eine Leukozytopenie und eine Anämie auf. Von den restlichen Vögeln lagen keine Blutbefunde vor.

4.1.3 Vögel mit intaktem Gefieder

Es wurden insgesamt 79 Vögel mit ungestörtem Allgemeinbefinden und ohne Befiederungsstörungen auf virale DNA von BFDV mit Hilfe der PCR untersucht. Bei keinem der untersuchten Tiere (0 %) konnte virale DNA detektiert werden (Abb. 8 A).

Tab. 4 Spezies, Symptome, Proben und Alter der BFDV-PCR-positiven Vögel

Spezies	Gefiederzustand (Sonstiges)	Probenmaterial ¹	Alter*
<i>intra vitam Diagnostik</i>			
Agapornis roseicollis	Federverlust (-deformationen)	Feder	1 J
Amazona albifrons	Federrupfer	Feder, Blut , Kloake	>7 J
Amazona albifrons	Federverlust	Feder, Blut , Kloake	adult
Ara chloroptera	Federverlust	Feder	adult
Cacatua galerita	Federrupfer	Feder, Blut, Kloake	2 J
Coracopsis nigra	Federrupfer (-deformationen)	Feder, Blut, Kloake	5 J
Ecleptus roratus	Federrupfer	Blut	
Melopsittacus undulatus	Federverlust (-deformationen)	Feder	1 J
Melopsittacus undulatus	Federverlust	Feder, Kloake	2 J
Melopsittacus undulatus	Federverlust	Feder, Kloake	6 M
Melopsittacus undulatus	Federverlust	Feder	18 M
Melopsittacus undulatus	Federverlust	Feder	3 W
Melopsittacus undulatus	Federverlust	Feder, Kloake	3 W
Melopsittacus undulatus	Federverlust (-deformationen)	Feder, Blut, Kloake	12 W
Melopsittacus undulatus	Federverlust	Feder, Blut	juvenil
Melopsittacus undulatus	Federverlust	Feder	
Melopsittacus undulatus	Federverlust	Blut	
Nymphicus hollandicus	Federrupfer	Feder, Kloake	10 J
Psittacus erithacus	Federrupfer (Rotfärbung)	Feder	23 J
<i>post mortem Diagnostik</i>			
Psittacus erithacus	Federrupfer	Feder , Niere	8 J
Pionus chalopterus	Federverlust (-deformation)	Kloake , Feder , Blut , Leber , Niere , Thymus	5 J
Cacatua galerita	Schnabelhornnekrose, Federverlust (-deformation)	Kloake , Blut , Leber , Kropfwand	adult
Cacatua galerita	Federdeformation	Leber , Niere, Gehirn	adult
Psittacus erithacus	Federverlust (-deformation)	Leber	20 J
Psittacus erithacus	o.b.B.	Leber, Bursa, Milz	4,5 M
Psittacus erithacus	o.b.B.	Kloake, Feder, Leber, Bursa	1 J
Psittacus erithacus	o.b.B.	Leber, Bursa	juvenil
Psittacus erithacus	o.b.B.	Leber, Bursa	6 M
Psittacus erithacus	o.b.B.	Leber, Bursa	4 M
Psittacus erithacus	o.b.B.	Leber, Bursa	juvenil
Psittacus erithacus	o.b.B. (Aspergillose)	Leber, Bursa	4 M
Psittacus erithacus	o.b.B. (red. Ernährungszustand)	Kloake, Blut Bursa	6 M
Psittacus erithacus	o.b.B. (red. EZ, Anämie, Leukozytopenie)	Leber, Niere	juvenil
Psittacus erithacus	o.b.B. (red. EZ, Anämie, Leukozytopenie)	Niere, Knochenmark	3 M
Psittacus erithacus	o.b.B.	Leber, Milz, Niere	3 M
Psittacus erithacus	o.b.B.	Organe	4 M
Psittacus erithacus	o.b.B.	Blut, Kloake	6 M
Melopsittacus undulatus	o.b.B. (Tumor, Streptokokkenseptikämie)	Organe	4 J

* Das Alter der Vögel ist angegeben in Wochen (W), Monaten (M) und Jahren (J).

¹⁾ Fettgedruckt sind die Organe mit negativem PCR-Ergebnis.

4.2 Nachweis viraler DNA von BFPyV

Die insgesamt 135 auf virale DNA von BFPyV untersuchten Vögel können in drei Gruppen unterteilt werden:

- Vögel mit klinischen Befiederungsstörungen (n = 56), die *intra vitam* (n = 46) oder *post mortem* (n = 10) untersucht wurden
- Tiere, die ohne Befiederungsstörungen (per)akut starben (n = 32)
- Vögel mit intaktem Gefieder (n = 47)

4.2.1 Vögel mit Befiederungsstörungen

Unter den 46 Vögeln, die mit Federveränderungen *intra vitam* untersucht wurden, waren ausschließlich Wellensittiche BFPyV-PCR-positiv (Tab. 5). Fünf Wellensittiche im Alter von drei Monaten bis zu zwei Jahren wiesen einen Verlust der Federn, beginnend mit den Schwung- und Schwanzfedern auf. Bei einem dieser Vögel wuchsen die Federn deformiert nach. Bei diesem Wellensittich und einem der zweijährigen Vögel konnte mit Hilfe der PCR eine Doppelinfektion mit BFDV und BFPyV nachgewiesen werden. Unter den zehn Tieren, die mit Befiederungsstörungen *post mortem* untersucht wurden, war ein weiterer siebenjähriger Wellensittich mit Federverlust BFPyV-PCR-positiv. Es konnte somit eine Nachweishäufigkeit bei den untersuchten Vögeln von 10,7 % ermittelt werden (Abb. 8 B).

4.2.2 Vögel, die akut starben

Von den 32 Tieren, die ohne Federveränderungen starben, war die BFPyV-PCR siebenmal (21,9 %) positiv (Abb. 8 B). Es handelte sich hierbei um Jungvögel unterschiedlicher Spezies in einem Alter von unter einem Jahr (Tab. 5). Eine Amazone, zwei Gelbbrustaras (*Ara ararauna*), ein dunkelroter Ara, ein Wellensittich und ein Orangebrustzwergpapagei (*Opopsita guliemiterti*) wurden als akute Todesfälle ohne besonderen Vorbericht eingesandt. Ein zehntägiger Wellensittich

wurde mit dem Vorbericht einer erhöhten Jungvogelsterblichkeit im Bestand zur pathologischen Untersuchung gebracht.

Tab. 5 Spezies, Symptome, Proben und Alter der BFPyV-PCR-positiven Vögel

Spezies	Gefiederzustand (Sonstiges)	Probenmaterial ¹	Alter*
<i>intra vitam Diagnostik</i>			
Melopsittacus undulatus	Federverlust	Feder, Kloake	4 M
Melopsittacus undulatus	Federverlust (-deformationen)	Feder, Blut, Kloake	3 M
Melopsittacus undulatus	Federverlust	Feder, Kloake	1 J
Melopsittacus undulatus	Federverlust	Feder, Kloake	2 J
Melopsittacus undulatus	Federverlust	Feder	2 J
<i>post mortem Diagnostik</i>			
Ara ararauna	o.b.B.	Leber, Bursa, Niere	10 W
Amazona spec.	o.b.B.	Feder, Leber, Bursa	1 M
Melopsittacus undulatus	Federverlust	Leber, Niere, Hoden	7 J
Ara chloroptera	o.b.B. (Hämorrhagie)	Niere	juvenil
Melopsittacus undulatus	o.b.B. (Jungvogelsterben)	Leber, Bursa, Milz	1,5 W
Melopsittacus undulatus	o.b.B.	Organe	6 M
Ara ararauna	o.b.B.	Leber, Milz, Niere	juvenil
Cyclopsitta guliemitertii	o.b.B. (Hämorrhagie)	Leber , Bursa	10 W

* Das Alter der Vögel ist angegeben in Wochen (W), Monaten (M) und Jahren (J).

¹⁾ Fettgedruckt sind die Organe mit negativem PCR-Ergebnis.

4.2.3 Vögel mit intaktem Gefieder

Bei keinem (0 %) der 47 Vögel mit physiologischem Gefieder konnte virale DNA von BFPyV mit Hilfe der PCR nachgewiesen werden (Abb. 8 B).

4.3 Zusammenfassung: Symptome beider Erkrankungen

Zusammenfassend wurde bei dieser Untersuchung auffällig, dass BFDV bei verschiedenen Vogelarten mit unterschiedlichen Federveränderungen nachgewiesen wurde (Abb. 10 A), wohingegen das BFPyV in dem untersuchten Patientengut mit

klinischen Veränderungen des Gefieders nur beim Wellensittich nachweisbar war (Abb. 10 D).

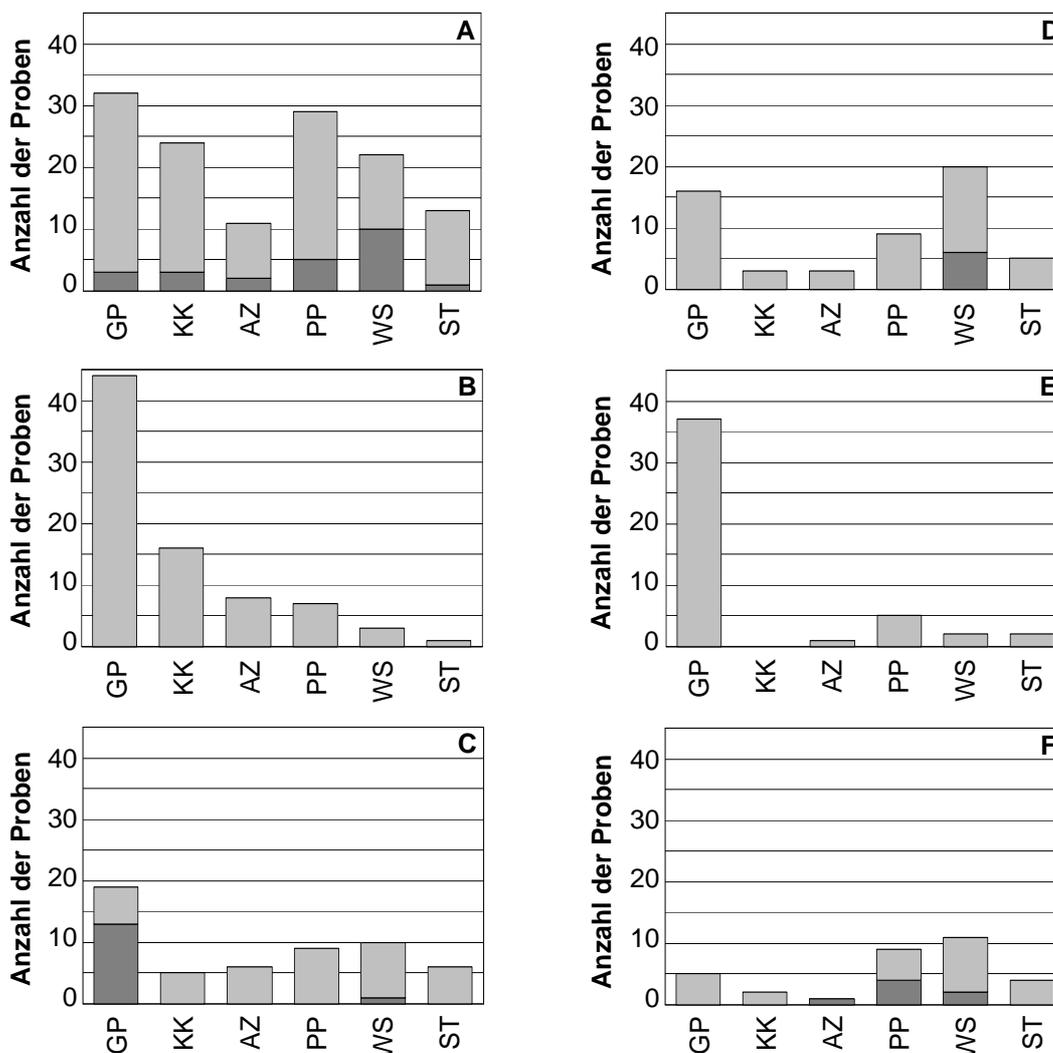


Abb. 10 Nachweis viraler DNA von BFDV und BFPyV im getesteten Patientengut

Mit Hilfe der PCR wurden insgesamt 265 Vögel auf virale DNA von BFDV hin untersucht. Die Vögel sind dabei nach Symptomen unterteilt dargestellt: Vögel mit Befiederungsstörungen (A), Vögel ohne Befiederungsstörungen (B), und akut gestorbene Vögel (C). Analog wurden die Ergebnisse der 135 auf BFPyV untersuchten Vögel dargestellt: Vögel mit Befiederungsstörungen (D), Vögel ohne Befiederungsstörungen (E) und akut gestorbene Vögel (F). Dabei sind die Anzahl der untersuchten Proben sowie die PCR-positiven Proben , jeweils nach Vogelgruppen (GP = Graupapageien, KK = Kakadus, AZ = Amazonen, PP = andere Papageien, WS = Wellensittiche, ST = andere Sittiche) geordnet, dargestellt.

Auch bei den akuten Todesfällen gab es Unterschiede zwischen den beiden Infektionserkrankungen in Hinblick auf die betroffenen Papageiengruppen (Abb. 10 C und F). Eine Infektion mit BFPyV konnte bei Jungtieren aus drei verschiedenen Gruppen (Papageien, Wellensittiche und Amazonen) nachgewiesen werden, eine Infektion mit BFDV, außer bei einem adulten Wellensittich mit einem Tumor im Kropfbereich, ausschließlich bei jungen Graupapageien im Alter von unter einem Jahr.

Bei klinisch gesunden Vögeln konnten beide Infektionserreger nicht nachgewiesen werden (Abb. 10 B und E).

4.4 Diagnostik

4.4.1 *Intra vitam* Diagnostik

Bei den insgesamt 21 *intra vitam* positiv auf virale DNA von BFDV getesteten Vögeln fielen bei vier Tieren Abweichungen in den Einzelergebnissen der getesteten Proben auf (Tab. 4). Bei einer Amazone, einem Ara und einem Vasapapagei wurden die drei Proben Kloakentupfer, Blut und Feder als Untersuchungsmaterial verwendet, wobei die Feder bei diesen Vögeln ein positives PCR-Ergebnis lieferte, die anderen Proben jedoch zum Teil PCR-negativ waren. Bei einem Nymphensittich war die Feder, nicht aber der Kloakentupfer BFDV-PCR-positiv.

4.4.2 *Post mortem* Diagnostik

Ähnliches konnte auch bei der BFDV-Diagnostik *post mortem* beobachtet werden (Tab. 4): bei den Tieren mit Befiederungsstörungen war bei einem Glanzflügelpapagei nur das Thymusgewebe PCR-positiv, bei einem Gelbhaubenkakadu nur die Kropfschleimhaut. Bei einem weiteren Gelbhaubenkakadu waren die Niere und das Gehirn, nicht jedoch die Leber PCR-positiv und bei einem Graupapagei nur die Niere, nicht die untersuchte Feder. Unter

den akut ohne Befiederungsstörungen gestorbenen Vögeln erbrachte bei einem juvenilen Graupapagei die Nieren, nicht aber das Knochenmark ein positives Ergebnis. Bei einem Zwergpapagei war das BFPyV-PCR-Ergebnis der Bursa Fabricii positiv, das der Leber jedoch negativ (Tab. 5).

4.5 Ausbruch der perakuten PBF D bei Graupapageien

Der zweite Teil der Untersuchung widmete sich speziell der Frage nach der Verlässlichkeit verschiedener Organe für die *post mortem* Diagnostik von akut verstorbenen jungen Graupapageien mit Hilfe der konventionellen PCR. Insgesamt wurden 34 Graupapageien untersucht, die einen Ausbruch der perakuten PBF D der jungen Graupapageien (Schoemaker et al., 2000) mit einer Mortalität von 34,4 % nicht überlebten. Die PCR-Ergebnisse aus den lymphatischen Organen Bursa Fabricii und Milz sowie der Leber und Haut-mit-Feder-Proben wurden verglichen.

4.5.1 Bestätigung der Diagnose PBF D

Bis auf sieben Tiere, die eine gering- bis mittelgradige Reduktion der Pektoralismuskulatur aufwiesen, hatten die restlichen Vögel einen guten Ernährungszustand. Alle Tiere wiesen bei der äußerlichen Adspektion ein komplettes Gefieder mit physiologisch entwickelten Federn, Krallen- und Schnabelhorn auf. Bei acht der Vögel war eine diskrete Rotverfärbung der Konturfedern des caudalen Abdomens sowohl auf der Dorsal- als auch auf der Ventralseite auffällig. Veränderungen der inneren Organe waren dominiert von einer Hepatomegalie (n=15) und Splenomegalie (n=12).

Um andere Ursachen für akute Todesfälle mit einer hohen Mortalität als die PBF D auszuschließen, wurde eine Leberprobe aller 34 Tiere mit Hilfe der PCR auf virale DNA des BFPyV und des „psittacine herpesvirus“ untersucht. Die PCR ergab keinen Hinweis auf eine andere vorhandene Virusinfektion, ebenso waren bei einem

Anzuchtversuch auf HEF keine Viren kultivierbar. Anschließend wurden stichprobenhaft von fünf Tieren mit einer Hepato- und Splenomegalie Organabstriche der Milz und Leber einer Färbung nach Stamp unterzogen. Diese ergab keinen Hinweis auf das Vorliegen einer Chlamydieninfektion (Psittakose).

Mit Hilfe der PCR konnte bei 29 der 34 Vögel (Abb. 11) virale DNA des BFDV nachgewiesen werden. Es fiel jedoch bei den Untersuchungen ein hoher Anteil an falsch-negativ getesteten Organproben auf, die erst nach einer Verdünnung der isolierten DNA PCR-positiv wurden. Dieses Phänomen soll weiter untersucht werden.

4.5.2 Vergleich der PCR-Ergebnisse

Bei Verwendung von unverdünnter isolierter DNA war eine Haut-mit-Feder-Probe in den meisten Fällen PCR-positiv (26/34), gefolgt von der Leber (21/33), der Bursa Fabricii (9/27) und der Milz (9/32).

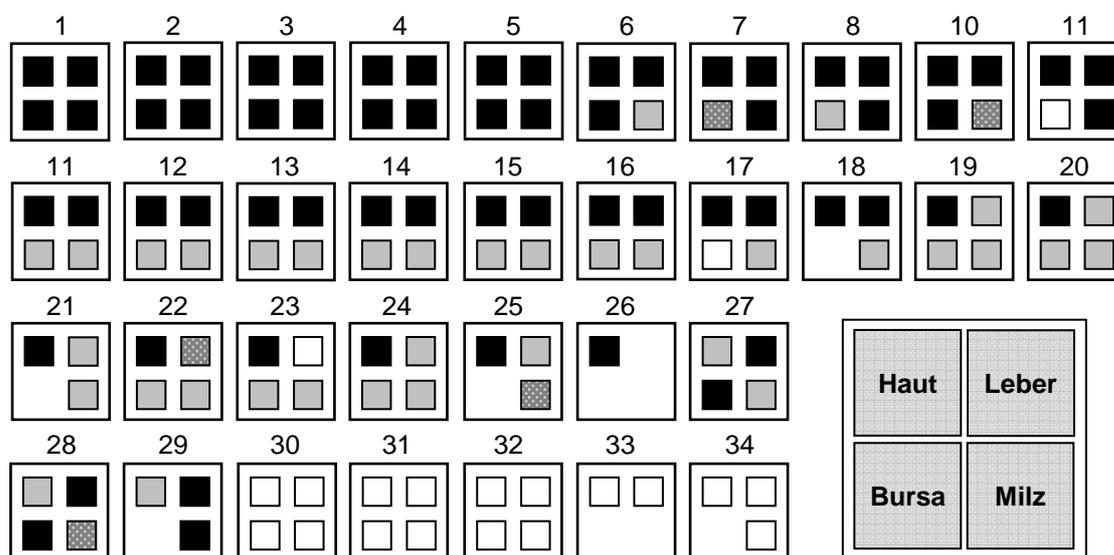


Abb. 11 BFDV-PCR-Ergebnisse aller 34 Graupapageien (*Psittacus erithacus*)

Jedes große Quadrat symbolisiert einen Vogel und die vier kleinen Quadrate im Inneren stehen jeweils für eines der getesteten Organe Haut-mit-Feder, Leber, Bursa Fabricii und Milz. Die Farbe der Quadrate entspricht dabei positiven PCR-Ergebnissen bei der Verwendung von unverdünnter DNA bzw. DNA in einer Verdünnung von 1:20, 1:100 und 1:1000.

Die Mehrzahl der initial negativ getesteten Haut-mit-Feder- (3/3), Leber- (5/7), Bursa Fabricii- (12/15) und Milz-Proben (16/19) wurde in einer folgenden PCR unter Verwendung verdünnter DNA (1:20) PCR-positiv. Unter Verwendung einer weiteren Verdünnung (1:100) konnten weitere PCR-positive Milz- (3/3), Leber- (1/2) und Bursa Fabricii-Proben (1/3) detektiert werden. Eine Verdünnung bis zu 1:1000 änderte nichts an dem negativen PCR-Ergebnis von einer Leber und zwei Bursa Fabricii-Proben von Tieren, die in den anderen inneren Organen ein positives PCR-Ergebnis aufwiesen. Fünf der Papageien erbrachten in der BFDV-PCR von allen Organproben bis zu einer Verdünnung der DNA von 1:1000 ein negatives Ergebnis.

Um zu untersuchen, ob die Qualität oder die Quantität der isolierten DNA zu falsch-negativen PCR-Ergebnissen führt, wurde die Absorption der DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Die DNA-Isolierung aus den Haut-mit-Feder-Proben enthielt die niedrigste Menge an Gesamt-DNA mit einer Durchschnittskonzentration von $40,9 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 36,2$ (Tab. 6). Die Konzentration an DNA bei den Präparationen aus den inneren Organen war deutlich höher als die aus der Haut mit einem relativ ähnlichen Gehalt an Gesamt-DNA in der Leber ($266,1 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 106,2$), Milz ($254,8 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 136,1$) und Bursa Fabricii ($238,1 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 224,3$). Bezogen auf die Qualität der isolierten DNA, die durch die Ratio OD 260 / OD 280 abgeschätzt werden kann, sind die Isolierungen aus den inneren Organen sehr homogen. Sie weisen alle einen Wert in dem Bereich von 1,8 bis 2,0 oder deren Nähe auf, was für eine hohe Reinheit der isolierten DNA spricht. Die DNA-Präparationen aus den Haut-mit-Feder-Proben weisen höhere Werte auf, was für eine schlechtere Qualität spricht.

Tab. 6 Qualität und Quantität der extrahierten Gesamt-DNA

Probenmaterial		Quotient OD260/OD280	DNA-Konzentration (ng/µl)		
			niedrigste	höchste	Durchschnitt
Haut	gesamt (n=29)	3,3 ± 5,8	1,8	166,2	40,9 ± 36,2
	1:1 (n=26)	3,4 ± 6,1	1,8	104,2	34,2 ± 25,0
	1:20* (n=3)	2,3 ± 0,4	23,0	166,2	99,2 ± 58,8
Leber	gesamt (n=27)	2,0 ± 0,2	45,8	488,4	266,1 ± 106,2
	1:1 (n=21)	2,1 ± 0,2	45,8	488,4	271,4 ± 114,1
	1:20* (n=5)	1,9 ± 0,1	169,5	345,6	257,3 ± 72,4
	1:100* (n=1)	2,1 ± 0,0	199,8	199,8	199,8 ± 0,0
Milz	gesamt (n=28)	2,1 ± 0,2	25,4	457,0	254,8 ± 136,1
	1:1 (n=9)	2,1 ± 0,2	25,4	315,4	159,5 ± 117,6
	1:20* (n=16)	2,1 ± 0,2	37,2	457,0	291,0 ± 128,8
	1:100* (n=3)	1,9 ± 0,1	339,3	348,3	347,3 ± 6,2
Bursa	gesamt (n=22)	2,0 ± 0,2	27,8	979,7	238,1 ± 224,3
	1:1 (n=9)	2,1 ± 0,2	31,6	979,7	240,1 ± 294,9
	1:20* (n=12)	2,0 ± 0,2	27,8	531,0	247,0 ± 294,9
	1:100* (n=1)	1,9 ± 0,0	113,0	113,0	113,0 ± 0,0

*Verdünnung, die nötig ist, um ein positives PCR-Ergebnis zu erhalten.

Die Einzelproben zeigen einen hohen Grad an Heterogenität, angegeben durch die hohe Standardabweichung von knapp 6 (Tab. 6). Aber gerade diese DNA-Isolierungen mit einem geringen Gehalt an Gesamt-DNA und einer niedrigen Qualität zeigen bei der Verwendung in unverdünnter Form ein positives PCR-Ergebnis (Abb. 12).

Zusätzlich zur Untersuchung der Qualität und der Quantität wurde die verwendete DNA nach generellen Inhibitoren einer PCR überprüft. Dazu wurde ein Teil der mitochondrialen DNA von Vögeln (12S rDNA) in repräsentativen Proben amplifiziert: I) drei DNA-Proben, die erst nach einer Verdünnung von 1:100 ein positives PCR-Ergebnis erbrachten, II) drei DNA-Proben, die auch bei einer Verdünnung von 1:1000 PCR-negativ blieben, und III) DNA aus der Leber der fünf BFDV-PCR-negativen

Vögel. In allen elf Proben konnte mitochondriale DNA mit Hilfe der PCR amplifiziert werden.

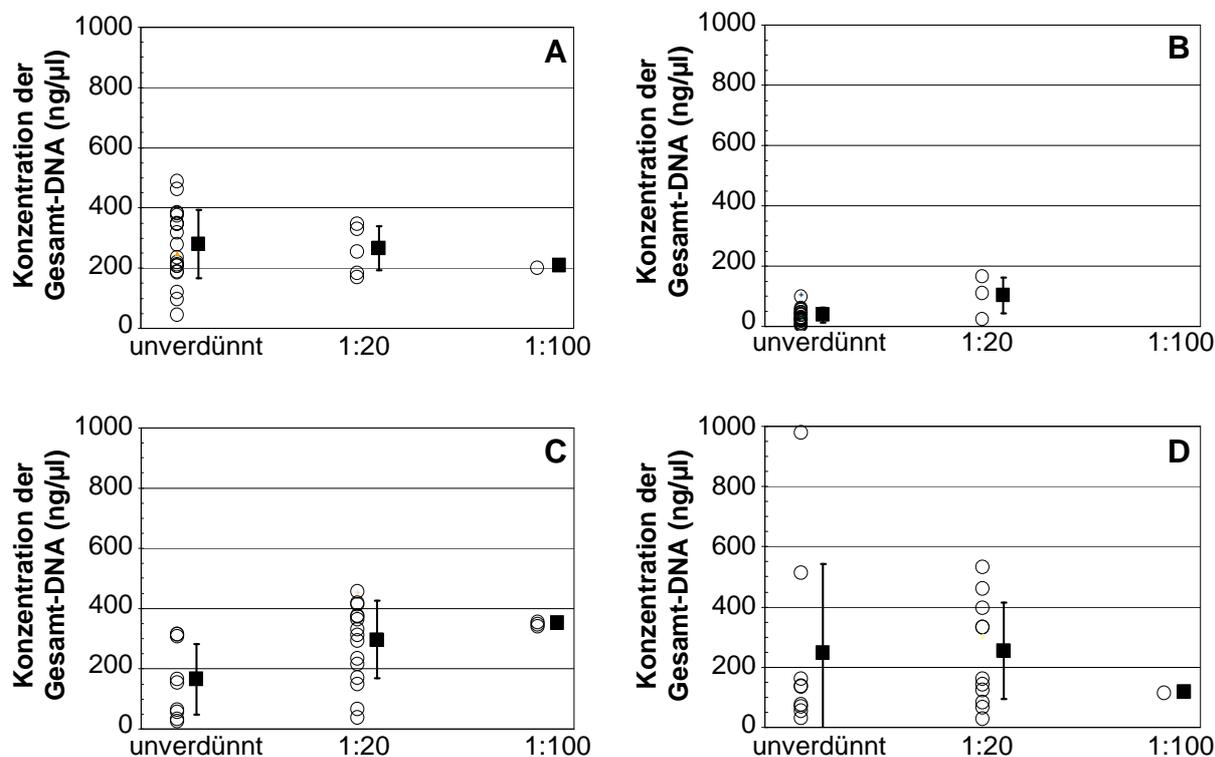


Abb. 12 Konzentration der isolierten Gesamt-DNA bei positiver PCR

Gezeigt werden hier die Konzentrationen der isolierten Gesamt-DNA der verschiedenen Proben in Relation zu der Verdünnung, die benötigt wird, um ein positives PCR-Ergebnis zu erhalten. Untersucht wurden Leber (A), Hautmit-Feder (B), Milz (C) und Bursa Fabricii (D). Dargestellt sind die Einzelergebnisse ○ und der Mittelwert ■ mit der Standardabweichung.

Da in dem PCR-Protokoll zur Amplifikation der 12S rDNA ein anderes DNA-Polymerase System verwendet wurde, wurde noch eine weitere PCR angeschlossen, die mit demselben Enzym wie die BFDV-PCR arbeitet. So soll ausgeschlossen werden, dass enzyspezifische Inhibitoren für den beobachteten Effekt verantwortlich sind. Hierfür wurde eine „Spiking“-PCR durchgeführt, bei der verschiedenen DNA-Präparationen jeweils 1 µl einer DNA-Isolierung zugefügt wurde, die von mit BFPyV infizierten HEF Zellen stammt. Anschließend wurde mit Hilfe eines

PCR-Protokolls, welches dieselbe Polymerase verwendet, virale DNA von BFPyV in dieser Mischung amplifiziert. Das Ergebnis dieser „Spiking“-PCR mit der DNA einer Bursa Fabricii-Probe, die nach einer Verdünnung von 1:20 PCR-positiv wurde und eine Konzentration von 395.8 ng DNA/µl aufwies, ist in Abb. 13 zu sehen. Bei dieser DNA-Präparation erbrachte unverdünnt sowohl die 12S rDNA-PCR (Bande 6) als auch die „Spiking“-PCR (Bande 7) positive Ergebnisse. Auch die fünf kritischen DNA-Präparationen, die erst in einer Verdünnung von 1:100 ein positives PCR-Ergebnis lieferten, waren in der „Spiking“-PCR bereits in unverdünnter Form positiv.

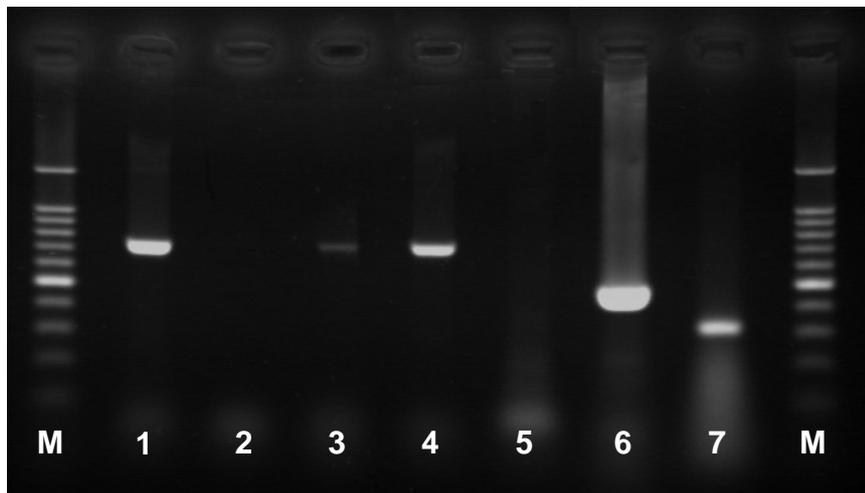


Abb. 13 PCR-Ergebnisse einer repräsentativen Bursa Fabricii-Probe

Hier gezeigt sind die Ergebnisse einer Bursa Fabricii-Probe eines Graupapagei (*Psittacus erithacus*). Die isolierte DNA wurde zuerst unverdünnt (2) auf BFDV untersucht, dann in einer Verdünnung von 1:20 (3) und 1:100 (4). Zusätzlich wurde die DNA unverdünnt in der 12S rDNA (6) und in der „Spiking“-PCR (7) eingesetzt. Eine BFDV-positive Probe (1) und DEPC-Wasser (5) wurden als Positiv- bzw. Negativkontrolle eingesetzt sowie ein „100 bp DNA ladder“ als Größenmarker (M).

5 Diskussion

In der vorgelegten Arbeit wurden Patienten der Klinik für Vögel der LMU München auf das Vorhandensein viraler DNA von BFPyV und BFDV hin untersucht. Darunter waren Vertreter vieler verschiedener Vogelarten, jedoch mit einer teilweise relativ geringen Anzahl an Einzelvögeln. Um eine Aussage über die Prävalenz beider Infektionserreger in Deutschland treffen zu können, sind große Fallzahlen der verschiedenen Arten nötig, am Besten aufgeteilt nach verschiedenen Altersstufen (Nestlinge, juvenile und adulte Vögel) und Herkünften (große Gruppenhaltung oder Einzelvögel), was bei einer Untersuchung von Patientengut nicht möglich ist. Rahaus und Wolff untersuchten klinisch unauffällige Vögel aus ganz Deutschland und konnten bei 39,2 % der Tiere virale DNA von BFDV mit Hilfe der PCR nachweisen (Rahaus und Wolff, 2003). Bei einer so hohen Anzahl an infizierten Tieren ist sicherlich die Aussagekraft der Detektion der Virus-DNA in klinisch auffälligen Vögeln als kritisch zu erachten, da auch hier davon ausgegangen werden muss, dass jeder dritte Vogel infiziert ist. Um zu testen, ob auch in unserem Patientengut von einer ähnlich hohen Anzahl an Virusträgern zu rechnen ist, wurde der Anteil an PCR-positiven Tieren in Hinblick auf BFDV und BFPyV bei Vögeln mit Befiederungsstörungen, klinisch unauffälligen und akut gestorbenen Tieren bestimmt und mit dem Vorkommen in anderen Ländern verglichen.

5.1 Häufigkeit der BFPyV- und BFDV-Infektionen

Virale DNA-Segmente sowohl von BFDV (14,3 %) als auch von BFPyV (9,6 %) wurden mit Hilfe der PCR regelmäßig im Patientengut aus dem süddeutschen Raum nachgewiesen.

Untersuchungen aus verschiedenen Ländern über die Nachweishäufigkeit von BFDV und BFPyV bei in menschlicher Obhut gehaltenen Papageien variieren teilweise sehr deutlich: so waren in einer PCR-Studie aus Italien 8,05 % der untersuchten Vögel

BFDV-positiv und 0,79 % BFPyV-positiv (Bert et al., 2005). In einer taiwanesischen Studie wiesen 41,2 % der Vögel ein positives BFDV-PCR-Ergebnis und 15,2 % ein positives BFPyV-PCR-Ergebnis auf (Hsu et al., 2006). Über einen Anteil von 39,2 % BFDV-positiver Vögel wurde in einer Studie aus Deutschland berichtet (Rahaus und Wolff, 2003). In einer weiteren Studie dieser Autoren wurden keine BFPyV-positiven Vögel nachgewiesen (Rahaus und Wolff, 2005). Eine Studie aus Japan erbrachte bei 2,7 % der untersuchten Papageinenvögel ein positives BFPyV-PCR-Ergebnis (Ogawa et al., 2006). Diese starken Variationen können zum Teil auf Unterschiede in den untersuchten Populationen zurückgeführt werden. In Italien und Taiwan wurden Vögel mit und ohne Federveränderungen untersucht, wohingegen in den vorangegangenen Studien aus Deutschland und aus Japan nur symptomlose Vögel in die Studie einbezogen wurden. Auch die Herkunft der Tiere ist in den verschiedenen Studien uneinheitlich. Die Vögel in der deutschen und der italienischen Studie kamen zu einem großen Teil von Züchtern, bei der Arbeit aus Taiwan wurden demgegenüber nur Vögel aus privater Einzel- bzw. kleiner Gruppenhaltung untersucht. Um geographische Unterschiede bei der Häufigkeit der Infektionen herauszustellen, werden Untersuchungen mit ähnlichen Populationen in Hinblick auf den Gesundheitszustand und die Herkunft der Vögel (Einzelvögel oder Vögel aus großer Gruppenhaltung) benötigt.

Überraschend ist jedoch der große Unterschied zwischen der vorliegenden Studie im Vergleich zu der Studie von Rahaus und Wolff (2005), bei der eine subklinische BFDV-Infektionsrate von 39,2 % ermittelt wurde – in dieser Studie hingegen konnten gar keine subklinischen Infektionen nachgewiesen werden. Eine Erklärung könnten auch hier die verschiedenen Populationen sein. Den Großteil des erfassten Kliniklientels stellten private Vogelhalter dar, die ein oder zwei Vögel im Haus halten. Die meisten Vögel waren schon viele Monate in Besitz, bevor sie wegen einer Verletzung oder Erkrankung in der Klinik vorgestellt wurden. In diesen Monaten kann eine eventuell vorhandene Infektion wieder eliminiert worden sein oder sie führte bereits zu einer Erkrankung. Werden jedoch viele Tiere zusammen gehalten und es findet ein Viruseintrag in diesen Bestand statt, ist mit einer hohen Rate an Virusträgern zu diesem Zeitpunkt zu rechnen, die entweder transient infiziert sind

oder sich in der Inkubationsphase befinden. Neben diesem Aspekt ist zu bedenken, dass bei der Untersuchung von Einzelvögeln aus einem größeren Bestand immer die Gefahr von falsch-positiven PCR-Ergebnissen durch die Kontamination einer Federprobe mit virushaltigem Federstaub besteht. Einheitlich sind jedoch die Ergebnisse der Nachweishäufigkeit von BFPyV bei symptomlosen Vögeln. Weder bei Rahaus und Wolff (2005) noch in dieser Studie konnte virale DNA von BFPyV mit Hilfe der PCR in dieser Gruppe identifiziert werden.

5.2 BFPyV-Infektion und Federveränderungen

Während bei den untersuchten Einzelvögeln ohne Federveränderungen in dieser Untersuchung weder virale DNA von BFPyV noch von BFDV detektiert wurden, konnte bei den Vögeln mit Befiederungsstörungen sowohl eine Infektion mit BFDV (18,2%) als auch mit APV (10,7%) nachgewiesen werden. Bei den akut gestorbenen Papageien war der Anteil der BFDV-positiven bzw. BFPyV-positiven Vögeln sogar noch etwas höher (25,5% bzw. 21,9%).

Federänderungen treten bei Papageienvögeln sehr häufig auf und werden deshalb auch regelmäßig in der Fachliteratur beschrieben. Namen wie „cockatoo beak and feather disease, cockatoo beak rot, beak and feather rot, fungal dermatitis, cockatoo maturation syndrome, adrenal insufficiency, thyroid insufficiency, cockatoo picking syndrome and french moult“ (Ritchie et al., 1990 a) verdeutlichen die Vielzahl der Ursachen und die ursprünglich am häufigsten betroffene Spezies, den Kakadu. Differentialdiagnostisch sind bei den infektiösen Ursachen die beiden viral bedingten Erkrankungen zu nennen: die Schnabel- und Federkrankheit der Papageien und die Wellensittichnestlingserkrankung.

Während eine Infektion mit BFDV bei vielen Papageienarten Federanomalien hervorruft, ist jedoch bis heute unklar, bei welcher Spezies im Laufe einer BFPyV-Infektion Federänderungen auftreten können.

So ist bei Wellensittichen eine Infektion mit BFPyV als Ursache der Französischen Mauser schon lange bekannt (Davis et al. 1981; Bernier et al., 1981; Bozeman et al., 1981), bei anderen Spezies ist der ätiologische Zusammenhang nicht gesichert. Bei Kakadus werden Erkrankungen nach einer BFPyV-Infektion nicht beobachtet (Raidal et al., 1998), obwohl die Seroprävalenz in der Wildpopulation in Australien mit bis zu 64,4 % erstaunlich hoch ist. Bei anderen Papageienspezies wurden in verschiedenen Ländern virale DNA von BFPyV bei Vögeln nachgewiesen (Bert et al., 2005; Hsu et al., 2006), ohne dass diese Federanomalien aufwiesen. In der älteren Literatur lassen sich jedoch Hinweise auf Befiederungsstörungen im Zusammenhang mit einer BFPyV-Infektion finden: so trat in einem gemischten Papageienbestand mit Aras, Amazonen, Kakadus, Sonnensittichen (*Aratinga solstitialis*) und anderen die Wellensittichnestlingserkrankung auf (Clubb und Davis, 1984). Viele der Vögel starben und pathologisch-anatomisch sowie histologisch wurden Veränderungen wie bei der BFD nachgewiesen. Die überlebenden Tiere wiesen außerdem einen hohen Antikörpertiter gegen BFPyV auf. Während dieses Ausbruches wurden bei einem Sonnensittich, der sich von der Krankheit erholte, Federveränderungen beobachtet. Weiterhin wurde 1986 (Lester und Gerlach, 1986) von einem Mollukenkakadu (*Cacatua moluccensis*) mit Federverlust ein Virus isoliert, bei dem spekuliert wurde, ob es ein Parvovirus sein könnte. Weiterführende Untersuchungen ergaben ein unbehülltes, stark zellassoziertes Virus, kleiner als 100 nm. Die Eigenart, dass das isolierte Virus am Besten auf ganz frisch gesäten Zellen wächst, ist ein Hinweis dafür, dass es sich hierbei um BFPyV handeln könnte (Müller und Nitschke, 1986). Die morphologischen Charakteristika hingegen können sowohl für BFPyV als auch für BFDV sprechen. Allerdings kann BFDV bisher noch auf keinem Zellsystem kultiviert werden. Bei beiden oben genannten Beschreibungen ist eine Infektion mit BFPyV entweder bewiesen, wie im ersten Falle, oder zumindest sehr wahrscheinlich. Trotzdem bleibt unklar, ob das isolierte Virus auch ursächlich für den Federverlust verantwortlich ist. Da zu der Zeit beider Beschreibungen der Erreger der Schnabel- und Federerkrankung noch nicht bekannt war, kann eine Doppelinfektion von BFPyV und BFDV, die regelmäßig auftritt, nicht ausgeschlossen werden. In Taiwan zum Beispiel wurden bei 25 von 140 Vögeln virale DNA von BFPyV mit Hilfe der PCR detektiert, von denen 17 Tiere gleichzeitig mit BFDV infiziert waren (Hsu et al., 2006).

In der vorliegenden Untersuchung traten Federveränderungen ausschließlich bei BFPyV-PCR positiven Wellensittichen auf, Vertreter anderer Spezies wiesen ein physiologisches Federkleid auf. Die sechs betroffenen Wellensittiche fielen durch einen Federverlust auf, der sich vor allem an den langen Schwung- und Schwanzfedern manifestierte. Zwei der Wellensittiche waren zusätzlich mit dem Erreger der Schnabel- und Federkrankheit infiziert, der in unseren Untersuchungen beim Wellensittich ebenfalls zu einem Federverlust vorzugsweise der langen Schwung- und Schwanzfedern führte. Zusätzlich zum Federverlust wies einer der doppelt infizierten Vögel deformierte Federn auf.

Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass bei Wellensittichen mit Federveränderungen eine Infektion mit BFPyV bei fast einem Drittel der Tiere vorliegt und als ursächlich in Betracht zu ziehen ist. Auch bei Rosenköpfchen wurden Federveränderungen mit einer APV-Infektion in Zusammenhang gebracht (Cornelissen et al., 2001). Bei anderen Spezies ist ein Zusammenhang nicht bewiesen und wurde auch in dieser Studie nicht beobachtet.

5.3 BFDV-Infektion und Federveränderungen

Klassischerweise treten bei der chronischen Form der PBFD neben einem Federverlust Veränderungen an der Federtextur auf, die sich in zirkulären Einschnürungen am Federschaft, persistierenden Federhülsen, Farbveränderungen und Hämorrhagien in dem Federschaft äußern (Pass und Perry, 1984).

In dieser Untersuchung wurden nur bei neun der 24 BFDV-positiven Tiere die oben beschriebenen klassischen Symptome beobachtet. Die restlichen 15 Vögel fielen durch Federrupfen und Federverlust auf. Fünf der Vögel, die als Federrupfer vorgestellt wurden, zeigten auch nach genauer Adspektion des Restgefieders keine der genannten Veränderungen. Auf die Gefahr der Fehlinterpretation des Federverlustes im Laufe einer Circovirusinfektion als Verhaltensproblem wird auch in der Literatur hingewiesen (Loupal et al., 1990). Möglicherweise können die Federn

durch das Persistieren der Federhülsen oder durch viral bedingte entzündliche Veränderungen an der Federpulpa und der perifollikulären Dermis die Vögel so stark stören, dass die betroffenen Federn vom Vogel ausgezogen werden. In einer histologischen Arbeit (Trinkaus et al., 1998) konnte in 21 von 23 Hautbiopsien eine perifollikuläre Dermatitis beobachtet werden.

Überdurchschnittlich häufig vertreten waren bei den 24 BFDV-positiven Tieren mit Befiederungsstörungen die Wellensittiche mit einer Anzahl von zehn Vögeln (41,6 %). Sie fielen durch einen relativ plötzlich einsetzenden Verlust der langen Schwung- und Schwanzfedern auf. Aus Deutschland gibt es bisher keine Untersuchungen über die Häufigkeit der Erkrankung beim Wellensittich, jedoch wiesen in Italien (Bert et al., 2005) sieben von 34 (20,6 %) untersuchten Wellensittichen ein positives BFDV-PCR-Ergebnis auf. In Taiwan (Hsu et al., 2006) fand man einen ähnlich hohen Anteil an BFDV-positiven Wellensittichen von 18,8 % (3 der 13 Wellensittiche). In den beiden genannten Studien wurden Vögel mit und ohne Befiederungsstörungen untersucht. In dieser Studie waren zehn der 22 (45,5 %) Wellensittiche mit Befiederungsstörungen BFDV-positiv. Aufgrund der verschiedenen Auswahlkriterien der Vögel (in den beiden Studien aus Italien und Taiwan gesunde und erkrankte Tiere, hier nur erkrankte Vögel) sind die Ergebnisse nicht zu vergleichen. Bei den hier untersuchten Tieren waren jedoch die Wellensittiche die am häufigsten betroffene Vogelgruppe.

Eine Erklärung hierfür wäre der Unterschied im Handel und in der Haltung dieser sehr häufigen Stubenvögel im Vergleich zu Großpapageien. Wellensittichzüchter haben meist eine größere Anzahl an Zuchtpaaren als Züchter von Großpapageien und ihrer Vögel weisen eine höhere Fluktuation auf. Sie erhalten neue Tiere von außerhalb und gehen mit ihren Vögeln auf Ausstellungen, meist ohne Einhaltung von Quarantänezeiten, was leicht zu einem Viruseintrag in den Bestand führen kann. Die Jungvögel werden vom Züchter an Tierhandlungen geliefert, wo Tiere mehrerer Züchter gemeinsam in Volieren untergebracht werden und es so leicht zur Infektionsübertragung kommen kann. Von der Tierhandlung gelangt der Wellensittich in sein neues Heim, wo er mit einem oder mehreren bereits vorhandenen Vögeln

vergesellschaftet wird. Eine Infektion durch den neuen Vogel oder eine Reaktivierung einer latenten Infektion bei einem alten Tier durch den Stress der Vergesellschaftung ist hier möglich.

Basierend auf diesen Ergebnissen wäre es angeraten eine PBFDV-Infektion nicht nur bei Federanomalien sondern auch bei Symptomen wie Federverlust und Federrupfen differentialdiagnostisch abzuklären. Der hohe Anteil an Wellensittichen unterstreicht die Bedeutung der Infektion bei dieser Vogelart.

5.4 Akute Todesfälle bei einer Infektion mit BFPyV oder BFDV

Da beide untersuchten Erkrankungen einen letalen Verlauf aufweisen können, wurden akut gestorbene Vögel ohne Federveränderungen in die Studie mit einbezogen. Hierdurch soll die Rolle der letalen Verläufe beider Erkrankungen in dem untersuchten Patientenkontext geklärt werden.

Eine Infektion mit BFPyV führt neben Federveränderungen bei Wellensittichen klassischerweise zu einer Erkrankung mit hoher Mortalität bei Jungvögeln verschiedener Spezies (Graham und Calnek, 1985), teilweise auch bei Adulttieren (Rosenköpfchen, *Agapornis pullaria*) (Enders et al., 1997). Demgegenüber scheint eine Infektion mit BFDV zu einer Erkrankung mit eher schleichendem Verlauf zu führen. Todesfälle gehen im Gegensatz zur BFD nicht direkt mit virusinduzierten Gewebeschäden einher, sondern resultieren aus Sekundärinfektionen aufgrund einer starken Immunsuppression (Richie et al., 1989; Wylie und Pass, 1987; Latimer et al., 1991) bei Jungvögeln. Deshalb sterben in einem erkrankten Bestand meist nur Einzelvögel: während eines natürlichen Ausbruches von PBF in einem Wellensittichbestand starben nur zwei der 15 untersuchten Tiere (Hess et al., 2005). Bei einem Infektionsversuch, bei dem zwölf Wellensittiche und drei Rosakakadus (*Cactua roseicapilla*) im Alter von einem bis zu 14 Tagen infiziert wurden und erkrankten, traten in dem Beobachtungszeitraum keine Todesfälle auf (Wylie und

Pass, 1987). Einzig ein Rosakakadu starb in einem Alter von elf Wochen an einer durch *Escherichia coli* ausgelösten Septikämie.

In dieser Untersuchung konnte bei sieben toten Vögeln eine BFPyV-Infektion nachgewiesen werden. Alle Vögel hatten ein Alter von unter einem Jahr und waren Vertreter verschiedener Spezies. Bei den BFDV-PCR-positiven Tieren, die ohne Federveränderungen akut starben, waren hingegen – bis auf einen vierjährigen Wellensittich, bei dem zusätzlich eine Streptokokkenseptikämie nachweisbar war – alle anderen 13 Vögel junge Graupapageien.

Insgesamt wurden 19 Graupapageien aufgrund eines akuten Todes untersucht, von denen 13 (68,4 %) BFDV-positiv waren. Die von Schoemaker beschriebene perakute Verlaufsform der PBFD bei jungen Graupapageien (Schoemaker et al., 2000) scheint auch in dem untersuchten Patientenklientel der Klinik für Vögel eine sehr bedeutende Rolle zu spielen. Betroffene Vögel sterben (per)akut, meist mit gutem Ernährungszustand. Wenn überhaupt vorhanden, stehen unspezifische Symptome wie Vomitus, Kropfstase, Anorexie und Schwäche im Vordergrund.

Bei akuten Todesfällen bei Jungvögeln verschiedener Spezies sollte zuerst an eine Infektion mit BFPyV gedacht werden, bei Graupapageien hingegen erst an eine Infektion mit BFDV.

5.5 Verlässlichkeit der *intra vitam* Proben in der Diagnostik

Da sich beide Viren in den Federfollikeln replizieren, sind für die *intra vitam* Diagnostik Federn bei Vögeln mit Befiederungsstörungen als die Probe der Wahl zu sehen (Johne et al., 2003; Raue et al., 2003). Bei Verdacht auf eine akute Infektion erscheint Blut geeigneter, da sich beide Infektionserreger erst nach einer Virämie an den Zielorganen ansiedeln (Johne et al., 2003). Jedoch variieren die Angaben in der Literatur über das verlässlichste Probenmaterial bei verschiedenen Papageienspezies. So wurde bei Wellensittichen virale DNA von BFDV am

häufigsten in Federn, gefolgt von Kloakentupfern gefunden, am Seltensten waren Blutproben PCR-positiv (Hess et al., 2005). Bei Pfirsichköpfchen waren die Blutproben häufiger BFDV-PCR positiv als die Federn (Khalesie et al., 2005). Auch zur Diagnostik einer BFPyV-Infektion gibt es verschiedene Angaben: Dahlhausen beurteilte den Virusnachweis aus Blut bei verschiedenen Papageienvögeln am verlässlichsten, gefolgt von Federn, wohingegen der Kloakentupfer selten positiv war (Dahlhausen und Radabaugh, 1996). Phalen gibt an, dass der Nachweis aus dem Blut im Laufe einer Virämie kürzer möglich ist als der Nachweis aus einem Kloakentupfer (Phalen, 2006).

Bei der Auswertung der Einzelergebnisse der BFDV-PCR-positiven Vögel fiel auch hier auf, dass Kloakentupfer in drei Fällen und Blutproben in zwei Fällen falsch-negative Ergebnisse lieferten. Um die Sicherheit der Virusdiagnostik zu steigern, sollte deshalb bei beiden Verdachtsdiagnosen der Nachweis viraler DNA durch eine PCR aus den drei Proben Feder, Kloakentupfer und Blut versucht werden.

5.6 Perakute PBFD bei jungen Graupapageien

Als Sonderform tritt bei jungen Graupapageien die „perakute Form der PBFD“ auf, bei der kaum Federveränderungen erscheinen und die innerhalb von wenigen Wochen zum Tod der Tiere führt (Schoemaker et al., 2000). Bei allen 14 von Schoemaker untersuchten Tieren war eine Hepatomegalie auffällig. Diese Tiere entstammten einem Untersuchungszeitraum von zwei Jahren, was darauf hindeutet, dass es sich hierbei um Einzelvögel handelte.

In den Jahren 2002 und 2003 kam es in einem großen Bestand zu einem Ausbruch der Schnabel- und Federkrankheit mit einer Mortalität von 35,4 % (56 Tiere von 158). Dies ist nach Wissen des Autors die erste Beschreibung eines seuchenhaften Ausbruchs der Erkrankung in einem Papageienbestand.

Zur näheren Untersuchung wurden 34 Tierkörper eingesandt. Die meisten Vögel hatten einen guten Ernährungszustand, was auf einen schnellen Krankheitsverlauf schließen lässt. Eine gleichzeitige Infektion mit dem BFPyV oder dem „psittacine herpesvirus“ (Erreger der Pacheco'schen Krankheit) konnte über eine PCR ausgeschlossen werden. Leider waren viele der Tierkörper wegen der fortgeschrittenen Autolyse nur sehr eingeschränkt zu beurteilen. Weiterhin wurden sie in gefrorenem Zustand geliefert, was eine bakteriologische und eine histologische Untersuchungen nicht sinnvoll erscheinen ließ. Bei den gut beurteilbaren Tierkörpern fiel als häufige Veränderung eine Hepatomegalie auf, die in Einklang mit den von Schoemaker beschriebenen Veränderungen steht (Schoemaker et al., 2000).

Obwohl Einschlusskörperchen bei der PBFD histologisch in verschiedenen Organen nachgewiesen werden können (Latimer et al., 1990), scheinen sie regelmäßig nur in der Haut, in dem Federepithel und in den lymphatischen Organen Bursa Fabricii, Milz und Thymus vorzukommen (Wylie und Pass, 1987). Die Replikation des Virus in Haut, Federepithel und den lymphatischen Organen führt demnach zu den Federveränderungen einerseits und zu einer teils ausgeprägten Immunsuppression (Richie et al., 1989; Wylie und Pass, 1987; Latimer et al., 1991) andererseits, die bei der akuten und chronischen Verlaufsform letztlich zum Tod durch Sekundärinfektionen führen kann.

Bei der perakuten Form bei jungen Graupapageien hingegen werden histologische Veränderungen neben den beschriebenen Organen sehr häufig in der Leber in Form einer Zellnekrose beobachtet (Schoemaker et al., 2000). Diese Veränderungen führen zu einer direkten Schädigung des Organs, was sich in einem Anstieg der Leberenzyme GGT, GLDH und AST sowie den Gallensäuren äußert. Elektronenmikroskopisch können auch hier Viren nachgewiesen werden. Diese durch das BFDV induzierte Leberzellzerstörung bei jungen Graupapageien scheint die Erklärung für den perakuten bis akuten Verlauf der Erkrankung bei dieser Spezies zu sein.

5.7 *Post mortem* Diagnostik bei jungen Graupapageien

Um Kenntnisse über die verlässlichsten Proben für die *post mortem* Diagnostik der perakuten PBFd bei jungen Graupapageien zu erlangen, wurden 34 afrikanische Graupapageien aus einem Bestand, der an der akuten Form der PBFd erkrankt ist, auf das Vorhandensein viraler DNA von BFDV in verschiedenen Organen mit Hilfe der konventionellen PCR untersucht.

Die pathologischen Befunde der untersuchten Vögel beschränkten sich größtenteils auf eine Hepato- und Splenomegalie, wie bei Schoemaker et al. (2000) beschrieben. Eine histologische Untersuchung ermöglicht über den Nachweis viraler Einschlusskörperchen die Diagnose einer produktiven Infektion. Diese Untersuchung war jedoch aufgrund des schlechten Zustandes der Tierkörper (tiefgefroren, teilweise autolytisch) nicht möglich. Mit Hilfe der PCR gelang es jedoch, virale DNA von BFDV bei 29 der Vögel zu detektieren, wohingegen bei fünf Vögeln eine BFDV-Infektion nicht nachgewiesen werden konnte.

Da keine Informationen vorliegen, wie lange die einzelnen Tiere in dem Bestand lebten, kann nicht mit Bestimmtheit gesagt werden, dass diese fünf Tiere dem Virus ausgesetzt waren oder ob der negative Status auf eine Infektion mit anschließender Elimination des Erregers bzw. auf eine Infektion mit Virusmengen unter der Nachweisgrenze der PCR hindeutet. In diesem Zusammenhang wäre eine erneute Untersuchung von Vögeln, die das Krankheitsgeschehen im Bestand überlebten, sowohl im Hinblick auf eine Virusausscheidung als auch auf eine Serokonversion sehr interessant (Johns et al., 2004). Leider haben wir keinen Zugang zu diesen Vögeln und können somit auch die Frage nicht beantworten, wie viele Tiere uninfiziert blieben.

In dieser Untersuchung konnte virale DNA von BFDV in Haut-mit-Feder-Proben, in den lymphatischen Geweben Bursa Fabricii und Milz sowie in der Leber nachgewiesen werden. Gerade weil die perakute PBFd selten mit Befiederungsstörungen einhergeht (Schoemaker et al., 2000), ist der regelmäßige

Nachweis von BFDV-DNA in Haut-mit-Feder-Proben überraschend, obwohl bereits bekannt ist, dass Federn auch ohne klinisch manifeste Federveränderungen das Virus beherbergen können: in einer Studie über BFDV-infizierte Wellensittiche (*Melopsittacus undulatus*) konnte virale DNA in Federn klinisch gesunder Vögel über mindestens 38 Wochen nachgewiesen werden (Hess et al., 2004). Da jedoch eine Kontamination des Gefieders über virushaltigen Federstaub zu falsch-positiven PCR-Ergebnissen führen kann, ist eine alleinige PCR-Untersuchung von Federn bei Vögeln aus Paar- oder Gruppenhaltung immer als kritisch zu erachten. In dieser Studie wurde die Kontaminationsgefahr dadurch reduziert, dass nur der in der Haut steckende Teil der Feder untersucht wurde. Diese Untersuchungstechnik scheint erfolgreich zu sein, da kein Vogel ein isoliert positives PCR-Ergebnis in der Haut-mit-Feder-Probe aufwies. Um jedoch die Sicherheit der PCR-Diagnostik zu erhöhen, sollten innere Organe parallel getestet werden.

Von den 29 Vögeln, die in der Haut-mit-Feder-Probe ein PCR-positives Ergebnis aufwiesen, wurde in 28 Fällen zusätzlich lymphatisches Gewebe untersucht: alle untersuchten Vögel waren auch in der Bursa Fabricii oder der Milz PCR-positiv. Dies stimmt mit histologischen Untersuchungen überein, in denen virale Einschlusskörperchen vor allem in lymphatischen Organen beobachtet werden. Eine virusbedingte Nekrose in diesen Organen kann so zu einer deutlichen Immunsuppression führen (Latimer et al., 1990; Todd, 2000). Zusätzlich deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass die lymphatischen Organe eine hohe Viruslast tragen. In rund zwei Drittel der Proben von Milz und Bursa Fabricii konnte virale DNA von BFDV nur nach vorangegangener Verdünnung der isolierten DNA nachgewiesen werden. Die PCR zur Amplifikation aviärer mitochondrialer DNA (Bert et al., 2005) wurde einerseits als Positiv-Kontrolle für die DNA-Isolierung verwendet, andererseits schließt diese PCR das Vorhandensein von generellen PCR-Inhibitoren aus. Weiterhin schließt der Nachweis zugesetzter viraler BFPyV-DNA durch die BFPyV-PCR („Spiking-PCR“) Polymerase-spezifische Inhibitoren aus.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse auf eine „template“-abhängige kompetitive Hemmung der BFDV-PCR hin. Dieses Phänomen ist abhängig von der

Konzentration der verwendeten DNA. Die photometrische Bestimmung der Gesamt-DNA kann jedoch falsch-negative Ergebnisse nicht verhindern, wie die Bursa Fabricii-Probe mit der höchsten Konzentration an Gesamt-DNA (979,7 ng/μl) zeigt, die bereits in unverdünnter Form BFDV-PCR-positiv war. Im Gegensatz hierzu musste eine weitere Bursa Fabricii-Probe mit einem DNA-Gehalt von 113 ng/μl erst stark verdünnt werden (1:100), bevor die PCR ein positives Ergebnis lieferte (Abb. 12). Bei der photometrischen Bestimmung der DNA-Konzentration wird die Gesamt-DNA gemessen, also die virale DNA ebenso wie die zelleigene DNA. Vergleicht man die Qualität der Proben durch Bestimmung der Ratio der Absorption bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge und der Verdünnungen bis zum Erhalt von PCR-positiven Befunden, kann man keine Korrelation zwischen diesen Größen aufstellen.

Zusätzlich zu den klassischen lymphatischen Organen konnte virale DNA von BFDV in 27 von 28 Leberproben positiver Vögel detektiert werden. Es bleibt jedoch unklar, ob die positiven PCR-Ergebnisse eine Virusreplikation in der Leber widerspiegeln oder Ausdruck einer Virämie sind. Vorangegangene Studien bei jungen Graupapageien, die an der perakuten Form der PBFD starben, belegen histologisch eine Leberzellnekrose, die sich klinisch in einem Anstieg der Leberenzyme manifestiert (Schoemaker et al., 2000). Zieht man den Tropismus von BFDV zu Makrophagen in die Überlegung mit ein, scheint eine Replikation in den Kupferschen Sternzellen der Leber wahrscheinlich. Um diese Vermutung zu untermauern, wären die Immunfärbung oder DNA *in situ*-Hybridisierung geeignete Methoden. Beide erlauben den spezifischen Nachweis von BFDV in Geweben und sind sehr wertvolle Techniken zur Bestätigung von PCR-Ergebnissen. Die Grundlage beider Techniken wie auch der gewöhnlichen histologischen Untersuchung ist eine strukturelle Integrität des zu untersuchenden Gewebes, wohingegen die PCR virale DNA auch in (z. B. durch einen Gefriervorgang oder Autolyse) zerstörtem Gewebe nachweisen kann. Ein weiterer großer Vorteil der PCR ist die kurze Dauer von wenigen Stunden bis zum Erhalt des Ergebnisses.

Diese Untersuchung unterstreicht die Wichtigkeit geeigneter Kontrollen und nimmt besonders Bezug auf PCR-Inhibitoren. Interne Kontrollen mit den gleichen

Primersequenzen aber PCR-Produkten, die sich in der Größe unterscheiden, könnten in Zukunft verwendet werden, um eine kompetitive Hemmung zu erkennen und so falsch-negative Ergebnisse auszuschließen. Es wurde gezeigt, dass die inneren Organe Bursa Fabricii, Milz und Leber große Mengen an viraler DNA enthalten. Da bei Haut-mit-Feder-Proben von Tieren aus Gruppenhaltung mit einer Kontamination zu rechnen ist, kann die Verwendung dieser inneren Organe in der PCR zusätzlich zu den Haut-mit-Feder-Proben die Sicherheit der PCR erhöhen.

5.8 Die PCR als Diagnostikum der Wahl?

Die Polymerasekettenreaktion ist eine relativ neue Untersuchungsmethode, die innerhalb weniger Jahre praktisch alle Diagnostiklabore erreicht hat. Mit ihrer Hilfe wird für die untersuchten Infektionen Teile des viralen Genoms nachgewiesen, nicht jedoch der Erreger selbst. So kann inaktiviertes Virus als virale DNA in der PCR zu einem positiven Testergebnis führen, darf aber nicht mit einer produktiven Infektion gleichgesetzt werden. Andersherum ist ein negatives Testergebnis kein Garant für eine Erregerfreiheit. Wie jeder andere Labortest ist auch die PCR nur so gut wie ihr Interpret und in die Interpretation müssen Informationen über die klinischen Symptome des Patienten, die Probenart und das Umfeld des Vogels (Alter, Gruppenhaltung) einfließen.

Bei einem BFDV-positiven Testergebnis einer Federprobe eines klinisch unauffälligen Wellensittichs aus einer kleinen Gruppenhaltung würde man ggf. zur Wiederholung in drei Monaten raten (transiente Infektion), wohingegen bei einem jungen Graupapagei mit hochgradig gestörtem Allgemeinbefinden, erhöhten Leberwerten und einem positiven BFDV-PCR-Befund im Blut eher eine Euthanasie des Tieres in Erwägung gezogen werden kann (manifeste PBFD). Ähnliches gilt für negative Testergebnisse: ein negatives BFDV-PCR-Ergebnis einer Feder von einem Vogel aus einem Bestand, in dem nie zuvor Federveränderungen auffielen, ist sicherlich höher zu werten als ein negatives Ergebnis einer Blutprobe von einem Wellensittich mit akutem Verlust der Schwung- und Schwanzfedern.

Die letzten zwei Beispiele führen zu der Frage – Was hat die PCR eigentlich für einen Nutzen?

Mit einer sinnvollen Vorauswahl der Patienten und geeigneten Proben ist die PCR ein sehr guter und schneller Test zur Diagnostik einer Krankheit. Zur Absicherung der Diagnose kann eine histologische Untersuchung und ggf. eine DNA *in situ*-Hybridisierung angeschlossen werden.

Zum Ausschluss einer Infektion ist die PCR jedoch nur bedingt tauglich. In einer Gruppenhaltung kann eine negative Untersuchung des Federstaubes oder einer Sammelprobe von Federn oder Kloakentupfern (evtl. auch Blutproben) mehrerer Vögel die Wahrscheinlichkeit deutlich senken, dass dieser Bestand infiziert ist. Bei einem neu erworbenen Einzelvogel kann man über eine negative PCR-Testung von Kloakentupfer und Federn eine momentane Ausscheidung nahezu ausschließen, der Vogel kann jedoch infiziert sein und in Zukunft zum Ausscheider werden.

Oben genanntes gilt nicht nur für die Schnabel- und Federkrankheit sondern auch für die Wellensittichnestlingserkrankung. Bevor ein neu erworbener Vogel in den Bestand integriert wird, kann ein Nachweis viraler DNA aus Feder, Kloakentupfer und Blut mit Hilfe der PCR versucht werden. PCR-positive Vögel sollten aufgrund der Infektionsgefahr nicht behalten werden. PCR-negative Vögel können einer Untersuchung auf Antikörper unterzogen werden.

Vögel mit einem hohen Antikörpertiter gegen BFDV stellen ein geringes Infektionsrisiko dar (Khalesi et al., 2005). BFPyV-AK-positive Tiere können jedoch latent infiziert sein und bei Stress oder Krankheit zum Virusausscheider werden (Phalen, 2006). Alle Vögel sollten eine Quarantänezeit von mindestens 2 Wochen einhalten und zu Beginn und am Ende der Quarantäne auf virale DNA und auf die Höhe der Antikörper untersucht werden.

6 Zusammenfassung

In dieser Studie wurden verschiedene Teilaspekte der Schnabel- und Federkrankheit der Papageien (psittacine beak and feather disease, Pbfd) und der Wellensittichnestlingserkrankung (budgerigar fledgling disease, Bfd) näher untersucht, um Kenntnisse über die Verbreitung in unserem Patientengut sowie die klinische Manifestation bei verschiedenen Spezies zu erlangen. Zusätzlich wurden verschiedene Organproben auf deren Verlässlichkeit in der Routinediagnostik der Pbfd bei jungen Graupapageien geprüft.

Bei den lebend untersuchten Papageienvögeln ohne Federänderungen konnte im Patientengut aus dem süddeutschen Raum weder virale DNA von BFPyV (n = 47) noch von BFDV (n = 79) detektiert werden. Bei den Vögeln mit Befiederungsstörungen wurde jedoch regelmäßig sowohl eine Infektion mit BFPyV (10,7 %) als auch mit BFDV (18,2 %) nachgewiesen. Bei den Tieren mit Federänderungen gelang der BFPyV-Nachweis ausschließlich bei Wellensittichen. Die sechs betroffenen Wellensittiche wiesen einen Federverlust auf, der sich vor allem an den langen Schwung- und Schwanzfedern manifestierte. Bei zwei Wellensittichen war zusätzlich virale DNA von BFDV nachweisbar und bei einem dieser doppelt infizierten Vögel waren deformierte Federn vorhanden. Klassische Veränderungen der Pbfd an der Federtextur mit zirkulären Einschnürungen am Federschaft, persistierenden Federhülsen, Farbveränderungen oder Hämorrhagien in den Federschaft konnten in dem untersuchten Patientengut nur bei neun der 24 BFDV-positiven Vögel beobachtet werden. Die restlichen 15 Vögel fielen alleine durch Federrupfen und Federverlust auf. Die BFDV-infizierten Papageien mit Befiederungsstörungen waren Vertreter verschiedener Spezies. Bei der Untersuchung der *intra vitam* Proben konnten bei vier der BFDV-positiven Vögel nicht in allen gewonnenen Proben virale DNA nachgewiesen werden (2 x Kloakentupfer, 1 x Blut, 1 x Blut und Kloakentupfer). Um die Sicherheit des Virusnachweises zu steigern, sollten deshalb für die Diagnostik am lebenden Vogel

die drei Proben Feder, Kloakentupfer und Blut für eine PCR-Untersuchung eingeschickt werden.

Bei den akut gestorbenen Tieren war der Anteil der BFDV-positiven bzw. BFPyV-positiven Vögel mit 25,5 % bzw. 21,9 % etwas höher als bei den Vögeln mit Befiederungsstörungen. Eine BFPyV-Infektion konnte bei sieben toten Vögeln nachgewiesen werden. Alle Vögel hatten ein Alter von unter einem Jahr und waren Vertreter verschiedener Spezies. Bis auf einen vierjährigen Wellensittich mit einer Streptokokkenseptikämie waren alle anderen 13 BFDV-positiven Tiere, die ohne Federänderungen akut starben, junge Graupapageien.

Die Untersuchung verdünnter DNA verschiedener Organe (Haut-mit-Federn, Milz, Bursa Fabricii und Leber) aus einer detailliert untersuchten Gruppe akut gestorbener Graupapageien ergab eine BFDV-Infektion bei 29 von 34 Tieren. Von den BFDV-positiven Tieren wurde außer in drei Einzelproben (2 x Bursa Fabricii und 1 x Leber) virale DNA bei allen 29 Vögeln in allen vier Organen detektiert. Bei der Verwendung unverdünnter isolierter DNA kam es allerdings vor allem bei Milz- (19 von 28) und Bursa Fabricii-Proben (13 von 25), seltener auch bei Leber- (6 von 28) und Haut-mit-Feder-Proben (3 von 29), zu falsch-negativen PCR-Ergebnissen. Diagnostiklabore sollten deshalb geeignete interne Kontrollen anstreben.

Beide viralen Infektionserreger kommen in unserem Patientenkontext regelmäßig sowohl bei Vögeln mit Befiederungsstörungen als auch bei letal erkrankten Jungvögeln vor.

7 Summary

Study on detection of viral DNA of the agents causing psittacine beak and feather disease and budgerigar fledgling disease in different psittacine species

In this study, certain aspects of psittacine beak and feather disease and budgerigar fledgling disease were investigated to gather information about the distribution and the clinical manifestation of the diseases in patients of the “Klinik für Vögel der LMU München”. Furthermore different organ samples were compared for their reliability of routine *post mortem* PCR-diagnoses of peracute Pbfd in young african grey parrots.

Regarding *intra vitam* detection of the aetiological agents of both diseases (BFDV and BFPyV), following observations were made: while in birds with physiological plumage, DNA of neither virus could be detected (BFDV: n = 79; BFPyV: n = 47), birds with feather disorders were regularly BFDV (18.2 %) and BFPyV (10.7 %) positive. In psittacines with feathering disorders an BFPyV-infection was only seen in budgerigars. The six affected budgerigars show acute loss of flight and tail feathers. In two birds a concurrent infection of BFPyV and BFDV could be detected and in one of the two birds a deformation of feathers could be seen. Characteristic feather disorders, as described for chronic Pbfd, like constriction in feather sheaths, remaining feather sleeves, discolouration as well as hemorrhages in the feather shaft, were only present in nine of the 24 BFDV-positive birds. The clinical signs of the remaining 15 BFDV-infected birds were only feather loss and feather picking. In contrast to BFPyV-infection, which could only be detected in budgerigars, the BFDV-positive birds belong to different species of the order *Psittaciformes*. The testing of *intra vitam* samples showed, that in four of the BFDV-positive birds viral DNA could not be detected in all samples tested (2 x cloacal swab, 1 x blood, 1 x blood and cloacal swab). To increase the reliability of *intra vitam* diagnosis all three samples should be taken for virus detection.

Within the group of birds presented for necropsy, the share of BFDV- and BFPyV-positive birds was even higher (25.5 % and 21.9 %) as in birds with feather disorders. In these birds a BFPyV-infection could be demonstrated in samples of seven birds of different species under the age of one year. Besides one budgerigar, who died of a streptococcus septicemia, all 13 BFDV-positive birds, who died with physiological plumage, were young african grey parrots.

By testing DNA dilutions of different organ samples (skin-with-feather, spleen, bursa of Fabricius and liver) of young grey parrots suffering from peracute PBFD, an infection could be proven in 29 of 34 birds. In positive birds viral DNA of BFDV could be detected in all organ samples except for three single samples (2 x bursa of Fabricius and 1 x liver). But using undiluted isolated DNA, a great part of the spleen- (19 of 28) and bursa of Fabricius-samples (13 of 25) and a smaller part of liver- (6 of 28) and skin-with-feather-samples (3 of 29) gave a negative result. Because of the high number of false negative PCR-tests the laboratories need to establish reliable internal controls PCR-diagnostic.

Both viral infections appear regularly in our patients: in birds with feather disorders, as well as in young birds suffering from a lethal infection.

8 Literaturverzeichnis

1. Ashby E. Parakeets moulting. 1907. Emu. 6: 193-194
2. Bassami MR, Berryman D, Wilcox GE, Raidal SR. Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circoviruses and chicken anaemia virus. Virology 1998; 249: 453-459
3. Bassami MR, Ypelaar I, Berryman D, Wilcox GE, Raidal SR. Genetic diversity of beak and feather disease virus detected in psittacine species in Australia. Virology 2001; 279(2): 392-400
4. Bernier G, Morin M, Marsolais G. A generalized inclusion body disease in the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*) caused by a papovavirus-like agent. Avian Diseases 1981;25 (4): 1083-1092
5. Bert E, Tomassone L, Peccati C, Navarrete MG, Sola SC. Detection of beak and feather disease virus (BFDV) and avian polyomavirus (APV) DNA in psittacine birds in Italy. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2005; 52(2): 64-68
6. Bozeman LH, Davis RB, Gaudry D, Lukert PD, Fletcher OJ, Dykstra MJ. Characterization of a papovavirus isolated from fledgling budgerigars. Avian Diseases 1981; 25 (4): 972-980
7. Clubb SL, Davis RB. Outbreak of a papova-like viral infection in a psittacine nursery – a retrospective view. Proc. An. Con. Assoc. Avian. Vet 1984: 121-129
8. Cooper JE, Harrison GJ. Dermatology. In: Avian Medicine: Principles and application. Ritchie BW, Harrison GJ, Harrison LR. Lake Worth, Florida: Wingers Publishing 1994: 618-621
9. Cornelissen JMM, Gerlach H, Müller H, Johne R, Kübber-Heiss A. An investigation into the possible role of circo and avian polyomavirus infection in the aetiology of three distinct skin and feather problems (chronic ulcerative dermatitis, feather loss syndrome and polyfolliculitis in the Rose-Faced

-
- Lovebird (*Agapornis roseicollis*). Proc 4th Sci ECAMS Meeting, Munich, Germany, 2001; 3-4
10. Dahlhausen B, Radabaugh S. Update on psittacine beak and feather disease and avian polyomavirus testing. Proc. An. Con. Assoc. Avian. Vet., AAV Florida, USA, 1993; 5-7
 11. Dahlhausen B, Radabaugh CS. Improved detection and management of avian polyoma virus infection in psittacine birds. Proc. An. Con. Assoc. Avian. Vet. 1996: 291-298
 12. Davis RB, Bozeman LH, Gaudry D, Fletcher OJ, Lukert PD, Dykstra MJ. A Viral disease of fledgling budgerigars. Avian Diseases 1981; 25 (1): 179-183
 13. De Kloet E, de Kloet SR. Analysis of the beak and feather disease viral genome indicates the existence of several genotypes which have a complex psittacine host specificity. Arch Virol 2004; 149: 2393-2412
 14. Eisenberg SWF, van Asten AJAM, van Ederen AM, Dorrestein GM. Detection of circovirus with a polymerase chain reaction in the ostrich (*Strutio camelus*) on a farm in The Netherlands. Vet. Microbiology 2003; 95: 27-38
 15. Enders F, Gravendyck M, Gerlach H, Kaleta EF. Fatal avian polyomavirus infection during quarantine in adult wild-caught red-faced lovebirds (*Agapornis pullaria*). Avian Diseases 1997; 41: 496-498
 16. Gerlach H, Leipold R. Über das Federverlust-Syndrom bei Kakadus. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 1986; 93: 24-26
 17. Gerlach H, Enders F, Casares M, Müller H, Johne R, Hänichen T. Membranous glomerulopathy as an indicator of avian polyomavirus infection in psittaciformes. J Avian Med and Surg. 1998; 12 (4): 248-254
 18. Graham DL, Calnek BW. Papovavirus infection in hand-fed parrots: virus isolation and pathology. Avian Diseases. 1985; 31 (2): 398-410
 19. Halami MY, Nieper H, Müller H, Johne R. Detection of a novel circovirus in mute swans (*Cygnus olor*) by using nested broad-spectrum PCR. Virus Research 2008; 132: 208–212
 20. Hattermann K, Schmitt C, Soike D, Mankertz A. Cloning and sequencing of Duck circovirus (DuCV). Arch Virol 2003; 148: 2471-2480

21. Heath L, Martin DP, Warburton L, Perrin M, Horsfield W., Kingsley C, Rybicki EP, Williamson A. Evidence of unique genotypes of beak and feather disease virus in southern africa. *J Virol.* 2004; 78(17): 9277-9284
22. Heath L, Williamson AL, Rybicki EP. The capsid protein of beak and feather disease virus binds to the viral DNA and is responsible for transporting the replication-associated protein into the nucleus. *J Virol.* 2006, 7219-7225
23. Hess H, Scope A, Heincz U. Comparative sensitivity of polymerase chain reaction diagnosis of psittacine beak and feather disease on feather samples, cloacal swabs and blood from budgerigars (*Melopsittacus undulates*, Shaw 18005). *Avian Pathology* 2004; 33(5), 477-481
24. Hou J, Jens PJ, Major EO, zur Hausen HJ, Almeida J, van der Noordaa D, Walker D, Lowy D, Bernard U, Butel JS, Cheng D, Frisque RJ, Nagashima K. Polyomaviridae. In: *Virus taxonomy. Eighth Report of the ICTV.* Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Academic Press 2005: 231-238
25. Hsu C-M, Ko C-Y, Tsai H-J. Detection and sequence analysis of avian polyomavirus and psittacine beak and feather disease virus from psittacine birds in Taiwan. *Avian Diseases* 2006; 50: 348-353
26. IVH, Industrieverband Heimtierbedarf e.V. Düsseldorf 2006/2007. <http://www.ivh-online.de>
27. Johne R, Müller H. Avian Polyomavirus in wild birds: genom analysis of isolates from Falconiformes and Psittaciformes. *Arch Virol* 1998; 143: 1501-1512
28. Johne R, Müller H. The genome of goose hemorrhagic polyomavirus, a new member of the proposed subgenus Avipolyomavirus. *Virology* 2003; 308 (2): 291-302
29. Johne R, Raue R, Krautwald-Junghanns M-E, Müller H. Papillomvirus- und Polyomavirus-Infektionen bei Zier- und Wildvögeln: eine Übersicht. *Tierärztl. Praxis* 2003; 31 (K): 188-193
30. Johne R, Raue R, Grund C, Kaleta EF, Müller H. Recombinant expression of a truncated capsid protein of beak and feather disease virus and its application in serological tests. *Avian Pathology* 2004; 33(3): 328-336

31. Johne R, Wittig W, Fernandez-de-Luco D, Höfle U, Müller H. Characterization of two novel polyomaviruses of birds by using multiply primed rolling-circle amplification of their genomes. *J Virol* 2006 a; 80 (7): 3523-3531
32. Johne R, Fernández-de-Luco D, Höfle U, Müller H. Genome of a novel circovirus of starlings, amplified by multiply primed rolling-circle amplification. *Journal of General Virology* 2006 b; 87: 1189-1195
33. Johne R and Müller H. Polyomaviruses of Birds: Etiologic agents of inflammatory diseases in a tumor virus family. *J. Virol.* 2007: 11554-11559
34. Kaaden OR, Mahnel H. Papovaviridae in *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. Stuttgart: Enke 1993: 239-245
35. Khalesi B, Bonne N, Stewart M, Sharp M, Raidal S. A comparison of haemagglutination, haemagglutination inhibition and PCR for the detection of psittacine beak and feather disease infection and a comparison of isolates obtained from lorids. *Journal of general virology* 2005; 86: 3039-3046
36. Khan MSR, Johne R, Beck I, Pawlita M, Kaleta EF, Müller H. Development of a blocking enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of avian polyomavirus-specific antibodies. *J of virological methods* 89, 2000: 39-48
37. König HE, Reese S, Mülling C, Korbelt R. *Allgemeine Körperdecke (Integumentum commune)*. In: *Anatomie der Vögel*. Stuttgart: Schattauer GmbH 2009: 270-276
38. Korbelt R, Reese S, König HR. *Klinischer Untersuchungsgang*. In: *Anatomie der Vögel*. Stuttgart: Schattauer GmbH 2009: 280
39. Krautwald-Junghanns M-E. Nichtinfektiöse Erkrankungen von Gefieder und Haut. In: *Kompendium der Ziervogelkrankheiten*. Kaleta EF, Krautwald-Junghanns M-E. Hannover: Schlütersche GmbH und Co. KG 1999: 126-139
40. Lafferty SL, Fudge AM, Schmidt RE, Wilson van G, Phalen DN. Avian Polyomavirus infection and disease in a green aracaris (*Pteroglossus viridis*). *Avian Diseases* 1999; 43: 577-585
41. Latimer KS, Rakich PM, Kircher IM, Ritchie BW, Niagro FD, Steffens WL, Lukert PD. Extracutaneous viral inclusions in psittacine beak and feather disease. *J. Vet Diagn. Invest.* 1990; 2: 204-207

42. Latimer KS, Rakich PM, Niagro FD, Ritchie BW, Steffens WL, Campagnoli RP, Pesti DA, Lukert D. An updated review of psittacine beak and feather disease. *Journal of AAV* 1991; 5: 211-220
43. Latimer KS, Niagro FD, Steffens WL, Ritchie BW, Campagnoli RP. Polyomavirus encephalopathy in a Ducorps cockatoo (*Cacatua ducorpsii*) with psittacine beak and feather disease. *J. Vet Diagn. Invest.* 1996; 8: 291-295
44. Lester T, Gerlach H. Isolation of a virus from feathers of a cockatoo with feather loss syndrome. *J Vet Med* 1986; 42 (2): 120-123
45. Literak I, Smid B, Dubska L, Bryndza L, Valicek L. An outbreak of the polyomavirus infection in budgerigars and cockatiels in slovakia, including a genome analysis of an avian polyomavirus isolate. *Avian Diseases* 2006; 50: 120-123
46. Liu Q, Hintz M, Li J, Linder M, Geyer R, Hobom G. Recombinant expression and modification analysis of protein agno-1b encoded by avian polyomavirus BFDV. *Arch. Virol.* 2000 (a); 145: 1211-1223
47. Liu Q, Hobom G. Agnoprotein-1a of avian polyomavirus budgerigar fledgling disease virus: identification of phosphorylation sites and functional importance in the virus life-cycle. *Journal of General Virology* 2000 (b); 81: 359-367
48. Loupal G, Schilcher F, Hochleithner M, Nowotny N. Psittacine Beak and Feather Disease (Pbfd) bei Kakadus in Österreich. *Wien. Tierärztl. Mschr.* 1990; 77: 319-326
49. McNabb FM. Thyroids. In: *Sturkie's Avian Physiology*. Whittow GC. San Diego, Kalifornien: Academic Press 2000: 468
50. Müller H, Nitschke R. A polyoma-like virus associated with an acute disease of fledgling budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Med Microbiol Immunol* 1986; 175: 1-13
51. Niagro FD, Forsthoefel AN, Lawther RP, Kamalanathan L, Ritchie BW, Latimer KS, Lukert PD. Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. *Arch. Virology* 1998; 143: 1723-1744
52. Özmen Ö, Dorrestein GM. Avian polyomavirus infection in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) in Turkey. *Turk J Vet Amin Sci* 2004; 28: 409-414

53. Ogawa H, Yamaguchi T, Fukushi H. Duplex shuttle PCR for diagnosis of budgerigar fledgling disease and psittacine beak and feather disease. *Microbiol. Immunol.* 2005; 49 (3): 227-237
54. Ogawa H, Chahota R, Hagino T, Ohya K, Yamaguchi T, Fukushi H. A survey of avian polyomavirus (APV) infection in imported and domestic bred psittacine birds in Japan. *J Vet Med Sci* 2006; 68 (7): 743-745
55. Pass DA, Perry RA. The pathogenesis of psittacine beak and feather disease. *Proc. An. Con. Assoc. Avian. Vet* 1984; 113-119
56. Perez-Losada M, Christensen RG, McClellan DA, Adams BJ, Viscidi RP, Demma JC and Crandall KA, Comparing phylogenetic codivergence between polyomaviruses and their hosts. *J. Virol.* 2006; 5663-5669
57. Phalen DN, Wilson VG, Graham DL. Epidemiology and diagnosis of avian polyomavirus infection. *Proceedings Annu Conf Avian Vet* 1991; 27-31
58. Phalen DN, Wilson VG, Graham DL. A Practitioner`s guide to avian polyomavirus testing and disease. *Proceedings Annu Conf Avian Vet* 1994; 251-257
59. Phalen DN, Wilson VG, Gaskin JM, Derr JN, Graham DL. Genetic diversity in twenty variants of the avian Polyomavirus. *Avian Dis.* 1999; 43: 207-218
60. Phalen DN. Implication of viruses in clinical disorders. In: *Clinical Avian Medicine – Vol II.* Harrison GJ, Lightfoot TL. Florida: Spix Publishing, 2006: 721-732
61. Potti J, Blanco G, Lemus JA, Canal D. Infectious offspring: How birds acquire and transmit an avian polyomavirus in the wild. *Plos One* 2007; 12: 1-5
62. Rahaus M, Wolff MH. Psittacine beak and feather disease: a first survey of the distribution of beak and feather disease virus inside the population of captive psittacine birds in Germany. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2003; 50 (8): 368-371
63. Rahaus M, Wolff MH. A survey to detect subclinical polyomavirus infections of captive psittacine birds in Germany. *Vet Microbiol.* 2005; 105(1):73-76
64. Rahaus M, Desloges N, Probst S, Loebbert B, Lantermann W, Wolff MH. Detection of beak and feather disease virus DNA in embryonated eggs of psittacine birds. *Veterinarni Medicina*, 2008; 53 (1): 53-58

65. Raidal SR, Cross GM, Tomaszewski E, Graham DL, Phalen DN. A serologic survey for avian polyomavirus and Pacheco's disease virus in Australian cockatoos. *Avian Pathology* 1998; 27: 263-268
66. Raidal SR, Cross GM. The haemagglutination spectrum of psittacine beak and feather disease virus. *Avian Pathology* 1994; 23: 621-630
67. Raue R, Johne R, Krautwald-Junghanns M-E, Müller H. Circovirus-Infektion bei Ziervögeln und Tauben: eine Übersicht. *Tierärztl Prax* 2003; 31 (K): 251-256
68. Raue R, Johne R, Crosta L, Bürkle M, Gerlach H, Müller H. Nucleotide sequence analysis of a C1 gene fragment of psittacine beak and feather disease virus amplified by real-time polymerase chain reaction indicates a possible existence of genotypes. *Avian Pathol.* 2004; 33 (1): 41-50
69. Reynolds D, Pomeroy BS. Enteric viruses. In: A laboratory manual for isolation and identification of avian pathogens. Purchase HG, Arp LH, Domermuth CH, Pearson JE. Iowa: Kendall Hunt publishing company. 1989; 128 -134
70. Ritchie BW, Niagro FD, Lukert PD, Steffens WL, Latimer KS. Characterisation of a new virus from cockatoos with psittacine beak and feather disease. *Virology* 1989; 171: 83-88
71. Ritchie BW, Niagro FD, Latimer KS, Lukert PD, Steffens WL, Pest D. Advances in understanding the PBFV virus. *Proceedings AAV* 1990 a: 12-24
72. Ritchie BW, Niagro FD, Latimer KS, Lukert PD, Steffens WL, Rakich PM, Pritchard N. Ultrastructural, protein composition, and antigenic comparison of psittacine beak and feather disease virus purified from four genera of psittacine birds. *J. Wildlife Dis* 1990 b; 26: 196-203
73. Ritchie BW, Niagro FD, Latimer KS, Steffens WL, Pesti D, Ancona J, Lukert PD. Routes and prevalence of shedding of psittacine beak and feather disease virus. *Am J Vet Res* 1991; 52 (11): 1804-1809
74. Richie PA, Anderson IL, Lambert DM Evidence for specificity of beak and feather disease viruses among avian hosts. *Virology* 2003; 306: 109-115
75. Riddoch PA, Raidal SR, Cross GM. Psittacine circovirus antibody detection and a update on the methods for diagnosis of psittacine beak and feather disease. *Aust. Vet Practit.* 1996; 26 (3): 134-139

76. Rodgers RED, Consigli RA. Charaterisation of a calcium binding domain in the VP1 protein of the avian polyomavirus, budgerigar fledgling disease virus. *Virus Research* 1996; 44: 123-135
77. Rossi G, Taccini E, Tarantino C. Outbreak of avian polyomavirus infection with high mortality in recently captured Crimson`s Seedcrackers. *Journal of Wildlife Diseases* 2005; 41 (1): 236-240
78. Rott O, Kröger M, Müller H, Hobom G. The genome of budgerigar fledgling disease virus, an avian polyomavirus. *Virology* 1988; 165 (1): 74-86
79. Sanada Y, Sanada N, Kubo M. Electron microscopical observations of psittacine beak and feather disease in an umbrella cockatoo (*Cacatua alba*). *J Vet Med Sci* 1999; 61: 1063-1065
80. Sanada N, Sanada Y. The sensitivities of various erythrocytes in a haemagglutination assay for the detection of psittacine beak and feather disease virus. *J Vet Med B* 2000; 47: 441-443
81. Sandmeier P, Gerlach H, Johne R, Müller H. Polyomavirusinfektionen bei exotischen Vögeln in der Schweiz. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 1999; 141: 223-229
82. Schoemaker NJ, Dorrestein GM, Latimer KS, Lumeij JT, Kik MJL, van der Hage MH, Campagnoli RP. Severe leukopenia and liver necrosis in young afirican grey parrots (*Psittacus erithacus erithacus*) infected with psittacine circovirus. *Avian Dis* 2000; 44: 470-478
83. Shivaprasad HL, Hill D, Todd D, Smyth JA. Circovirus infection in a Gouldian finch (*Chloebia gouldiae*). *Avian Pathology* 2004; 33(5): 525-529
84. Soike D, Albrecht K, Hattermann K, Schmitt C, Mankertz A. Novel circovirus in mulard with developmental and feathering disorders. *Veterinary Record* 2004; 154: 792-793
85. Stewart ME, Perry R and Raidal SR. Identification of a novel circovirus in Australian ravens (*Corvus coronoides*) with feather disease. *Avian Pathology* 2006; 35(2): 86-92
86. Todd D. Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review. *Avian Pathology* 2000; 29: 373-394

87. Todd D, Bendinelli M, Biagini P, Hino S, Mankertz A, Mishiro S, Niel C, Okamoto H, Raidal S, Ritchie BW, Teo GC. Family Circoviridae. In: Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses – Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. California, USA, Elsevier Academic Press, 2005; 231-238
88. Todd D, Scott ANJ, Fringuelli E, Shivraprasad HL, Gravier-Widen D, Smyth JA. Molecular characterisation of novel circoviruses from finch and gull. Avian pathology 2007; 36 (1): 75-81
89. Tomaszewski EK, Kaleta EF, Phalen DN. Molecular phylogeny of the psittacine herpesvirus causing Pacheco's Disease: Correlation of genotyp with phenotypic expression. J Virol. 2003; 77 (20): 11260-11267
90. Trinkaus K, Wenisch S, Leiser R, Gravendyck M, Kaleta EF. Psittacine beak and feather disease infected cells show a pattern of apoptosis in psittacine skin. Avian Pathology 1998; 27: 555-561
91. Vollmerhaus B, Sinowatz F. Haut und Hautgebilde in: Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band V, Anatomie der Vögel. Nickel R, Schummer A, Seiferle E. Berlin und Hamburg: Parey 1992; 29-42
92. Wolters HE. Die Vogelarten der Erde. Eine systematische Liste mit Verbreitungsangaben sowie deutschen und englischen Namen. Berlin und Hamburg: Parey 1982
93. Wylie SL, Pass DA. Experimental reproduction of psittacine beak and feather disease/french moult. Avian Pathology 1987; 16: 269-281
94. Ypelaar I, Bassami MR, Wilcox GE, Raidal SR. A universal polymerase chain reaction for the detection of psittacine beak and feather disease virus. Vet Microbiol. 1999; 68: 141-147

Danksagung

Mein Dank gilt Prof Dr. R. Korbel für die Überlassung des Arbeitsplatzes sowie für die Ermöglichung des Nebenverdienstes in verschiedenen Bereichen der Klinik für Vögel während der praktischen Arbeit an der Dissertation.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Priv.-Doz. C. H. Grund für die Überlassung des Themas und für seine fachliche und menschliche Unterstützung und für die vielen (guten) Ideen rund um das Thema der Dissertation.

Katrin Schmidbauer und Dana Härtner möchte ich meinen Dank aussprechen für die praktische Einführung in das Laborleben und die unterhaltsamen Tee-Pausen.

Meinen Mitstreitern Iris Daum und Ulrich Mohn sowie allen anderen Doktoranden der virologischen Abteilung möchte ich für die mentale Unterstützung und die Hilfsbereitschaft im Labor sowie die Ablenkung neben der Arbeit durch diverse Kickerabende danken.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. H. Reball für den klinischen Kenntniserwerb in der Vogelmedizin und allen klinischen Doktoranden, insbesondere Stefanie Tacken und Nadine Bohnet, für das Sammeln der Proben und für die monatlichen Doktorandentreffen und Cocktailabende.

Herzlich danke ich auch Martina Rzepka und Susanne Schlemmer für die praktische Einführung in die Ziervogelabteilung und für die mittäglichen Hundespaziergänge.

Und natürlich gilt mein besonderer Dank meinen Eltern, denen diese Arbeit gewidmet ist, für die mentale und finanzielle Unterstützung während der gesamten Studienzeit und während der Doktorarbeit sowie meinen Geschwistern.