

4. Ergebnisse

4.1 ETABLIERUNG EINER POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR) ZUM NACHWEIS VON GEFLÜGELPOCKEN

4.1.1 Überprüfung der Spezifität

Es wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Nachweis spezifischer DNA vom Hühnerpockenvirus (FWPV) etabliert. Durch die verwendeten Primer FP 1 und FP 2 wurde ein Bereich von 578 bp innerhalb des FWPV-Core Protein 4b Gens amplifiziert. Als initiale Untersuchung wurde in dieser FP 1/FP 2-PCR zunächst DNA eingesetzt, die aus Hühnerpockenimpfstoff (HP-B) extrahiert wurde. Es konnte ein Amplifikat der erwarteten Größe von 578 bp nachgewiesen werden (Abb. 6).

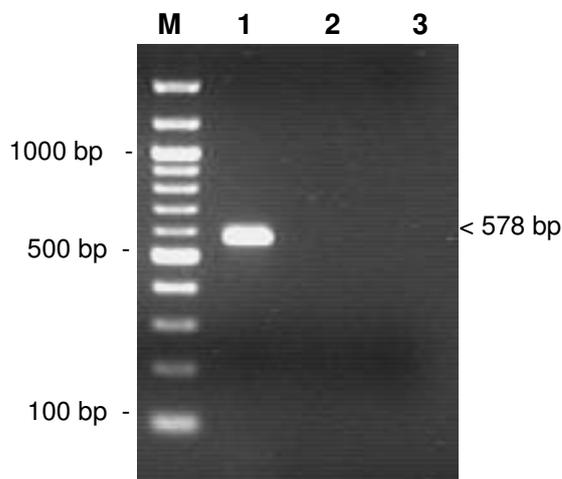


Abb. 6 Nachweis von FWPV-spezifischer DNA im Hühnerpockenimpfstoff (HP B) mittels FP 1/FP 2-PCR

Das PCR-Produkt wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die Größen des 100 bp-DNA-Größenmarkers sind angegeben. Spur M: 100 bp-DNA-Größenmarker, Spur 1: Impfstoff HP-B, Spur 2: Präparationskontrolle, Spur 3: PCR-Negativkontrolle.

Zur Überprüfung der Spezifität wurde das entstandene PCR-Produkt mittels Restriktionsenzymanalyse (REA) unter Verwendung der Restriktionsenzyme *EcoRV* und *NlaIII* untersucht. Die zu erwartenden Fragmentgrößen wurden auf Grundlage der FWPV-Sequenz des Stammes HP444 berechnet (Tab. 14).

Tab. 14 Für FWPV (HP444) errechnete Fragmentgrößen (bp) nach Spaltung des FP 1/FP 2-PCR-Produktes durch Restriktionsenzyme

Enzym	Fragmentgrößen (bp)
<i>EcoRV</i>	252, 177, 149
<i>NlaIII</i>	185, 132, 112, 96, 53

Es konnten die Fragmente der jeweils errechneten Größen nachgewiesen werden (Abb. 7).

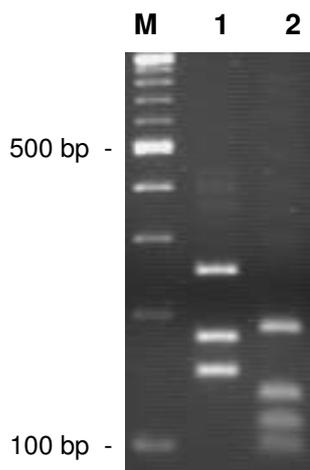


Abb. 7 REA des FP1/FP2-PCR-Produktes HP-B

Spur M: 100bp-DNA-Größenmarker, Spur 1: PCR-Produkt (HP-B) mit *EcoRV*, Spur 2: PCR-Produkt (HP-B) mit *NlaIII*.

Das 578bp große Amplifikat aus dem Hühnerpockenimpfstoff (HP-B) wurde sequenziert und zeigte zur veröffentlichten FWPV-Core Protein 4b Gensequenz eine Homologie von 100% (s. 4.3.3.3.1).

Unabhängig von der überprüften Nutzungsrichtung (Hühner unterschiedlicher Nutzungsrichtungen sowie Puten) waren bei der Untersuchung der Feldisolate, bei denen eine Geflügelpockeninfektion mittels konventioneller Verfahren nachgewiesen werden konnte (s. Tab. 16), in der FP 1/FP 2-PCR nach gelelektrophoretischer Auftrennung Amplifikate der errechneten Größe von 578 bp nachweisbar (Abb. 8).

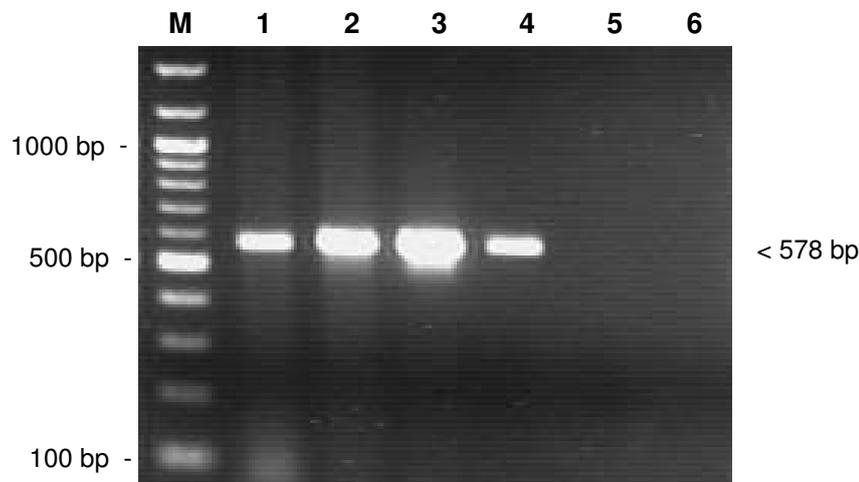


Abb. 8 Untersuchung von Pockenvirusfeldisolaten verschiedener Nutzungsrichtungen mittels FP 1/FP 2-PCR

Spur M: 100 bp-DNA-Größenmarker, Spur 1: Legehennen GB 64-01, Spur 2: Legehennen GB 415-01, Spur 3: Mastelertier GB 48-01, Spur 4: Putenelertier GB 134-01, Spur 5: Präparationskontrolle, Spur 6: PCR-Negativkontrolle.

Bei der Restriktionsenzymanalyse der Amplifikate unabhängig von der Nutzungsrichtung und Geflügelart entstanden Fragmente, die den für die FWPV-Sequenz (HP444) berechneten und für den Stamm HP-B erhaltenen Fragmentgrößen entsprachen. Das 578 bp große Amplifikat vom Isolat des Putenelertieres GB 134-01 wurde anschließend sequenziert und zeigte zur veröffentlichten FWPV-Core Protein 4b Gensequenz eine Homologie von 100 % (s. 4.3.3.3.1).

Hingegen wurde bei der Untersuchung proviraler DNA des Retikuloendotheliosevirus (REV) und der DNA des Virus der Infektiösen Laryngotracheitis (ILT), des Virus der Infektiösen Anämie der Küken (CAV) und des Hühneradenovirus 1 (FAV1) mittels FP 1/FP 2-PCR kein Amplifikat der spezifischen Größe von 578 bp nachgewiesen (Abb. 9).

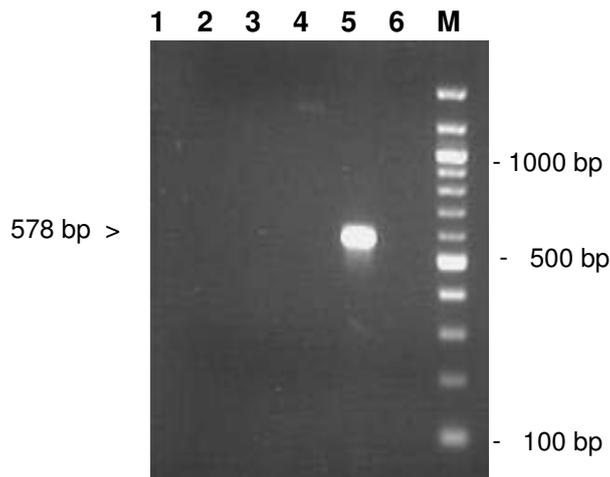


Abb. 9 Untersuchung unterschiedlicher aviärer Viren mittels FP 1/FP 2-PCR

Spur 1: Retikuloendotheliosevirus (REV), Spur 2: Virus der Infektiösen Laryngotracheitis (ILT), Spur 3: Virus der Infektiösen Anämie der Küken (CAV), Spur 4: Hühneradenovirus 1 (FAV1), Spur 5: Hühnerpockenvirus (FWPV), Spur 6: PCR-Negativkontrolle, Spur M: 100 bp DNA-Größen-marker.

4.1.2 Bestimmung der Sensitivität

Bei der Untersuchung einer Virus-DNA-Verdünnungsreihe (HP-1) mittels FP 1/FP 2-PCR zeigte sich ein positiver Nachweis bis zu der Verdünnungsstufe mit mindestens 0,05 pg DNA (Abb. 10 a). Dies entsprach etwa 150 Genomäquivalenten (Tab. 15).

Zum Vergleich wurde die Sensitivität der FP1/FP2-PCR parallel durch das Dot Blot-Verfahren bestimmt (XL 1/XL 2-Sonde). In der Abbildung 10 b und der Tabelle 15 wird gezeigt, dass im Dot Blot (nach 16 Stunden Exposition) mindestens 0,025 pg DNA bzw. etwa 75 Genomäquivalente nachweisbar waren.

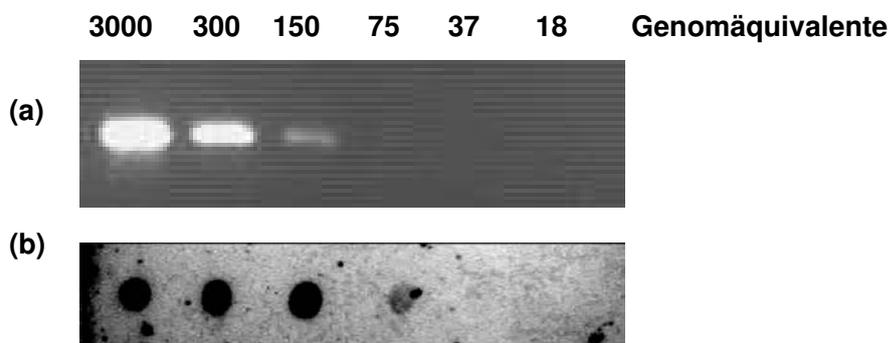


Abb. 10 Nachweisgrenzen von Virus-DNA in der FP 1/FP 2-PCR
(a) im Agarosegel und (b) im Dot Blot-Verfahren

(a) Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der FP 1/FP 2-PCR-Produkte der Virus-DNA-Verdünnungsreihe (HP-1) zeigte sich ein positiver Nachweis von mindestens 0,05 pg Virus-DNA. (b) Das Dot Blot-Verfahren ergab unter Verwendung einer mittels des Produktes der XL 1/XL 2-PCR hergestellten Sonde nach 16 Stunden Exposition einen positiven Nachweis von mindestens 0,025 pg Virus-DNA.

Tab. 15 Nachweisgrenzen der FP 1/FP 2-PCR, detektiert im Agarosegel sowie im Dot Blot-Verfahren

Eingesetzte Virus-DNA-Menge	Nachweisverfahren		Genom- Äquivalente
	Agarosegel	Dot Blot	
1,000 pg	Positiv	Positiv	3000
0,100 pg	Positiv	Positiv	300
0,050 pg	Positiv	Positiv	150
0,025 pg	Negativ	Positiv	75
0,012 pg	Negativ	Negativ	37
0,006 pg	Negativ	Negativ	18

4.1.3 Vergleich der FP 1/FP 2-PCR mit konventionellen Diagnostikverfahren

Die Ergebnisse der FP 1/FP 2-PCR und der parallel dazu durchgeführten konventionellen Diagnostikverfahren sind in der Tabelle 16 zusammengefasst.

Tab. 16 Durchgeführte Vergleichsuntersuchungen zur PCR

Feldisolat	Nutzungs- richtung	Ausgangsmaterial		Virusisolierung und Identifizierung	CAM-Material	
		PCR	EM		PCR	
GB 48-01	MET	Positiv	Positiv	P ₀ : Positiv, AGP: Positiv	Positiv	Positiv
GB 49-01	MET	Positiv	Negativ	P ₀ : Negativ, AGP: Negativ	Positiv	Positiv
GB 50-01	MET	Positiv	Positiv	P ₀ : Positiv, AGP: Positiv	n.d.	n.d.
GB 64-01	LH	Positiv	n.d.	P ₁ : fraglich, AGP: Positiv	Positiv	Positiv
GB 79-01/1	MET	Positiv	n.d.	P ₁ : Positiv, AGP: Positiv	Positiv	Positiv
GB 134-01	PET	Positiv	n.d.	P ₀ : fraglich, AGP: Positiv	Positiv	Positiv
GB 156-01	LH	Negativ	n.d.	P ₁ : Negativ, AGP: Negativ	Negativ	Negativ
GB 304-01	LH	Positiv	n.d.	P ₁ : Positiv, AGP: Positiv	Positiv	Positiv
GB 320-01	LH	Positiv	n.d.	P ₁ : Positiv, AGP: Positiv	Positiv	Positiv
GB 404-01	LH	Negativ	Negativ	n.d.	n.d.	n.d.
GB 415-01	LH	Positiv	Positiv	P ₁ : fraglich, AGP: Negativ	Positiv	Positiv
GB 439-01	LH	Positiv	Positiv	P ₁ : fraglich, AGP: Negativ	Positiv	Positiv

PCR: FP1/FP2-PCR, EM: Elektronenmikroskopie, CAM: Chorioallantoismembran,
 AGP: Agargelpräzipitationstest, MET: Mastelertiere, LH: Legehennen, PET: Putenelertiere,
 P₀: Anzucht, P₁: 1. Passage, n.d.: nicht durchgeführt

4.1.3.1 Elektronenmikroskopische Untersuchung (EM)

Sechs eingesandte Gewebeproben wurden parallel mittels Elektronenmikroskopie (EM) untersucht. Darunter befand sich Untersuchungsmaterial von fünf Proben, in denen in der FP1/FP2-PCR pockenvirus-spezifische DNA nachgewiesen werden konnte (Tab.16). In vier Untersuchungen der fünf FP1/FP2-PCR-positiven Proben wurden Geflügelpockeninfektionen durch das Vorhandensein von Pockenvirionen mit quaderförmiger Gestalt bestätigt (Abb. 11). In dem Untersuchungsmaterial GB404-01, das in der PCR keine FWPV-spezifische DNA aufwies, konnten auch keine Pockenvirionen nachgewiesen werden.

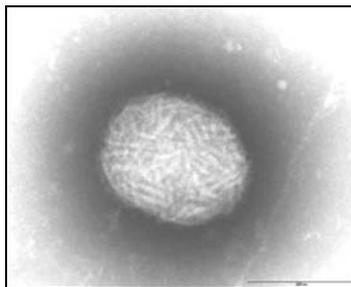


Abb. 11 Pockenvirion in der Elektronenmikroskopie (EM) Foto: Dr. Soike

4.1.3.2 Virusisolierung auf der Chorioallantoismembran (CAM)

Bei elf Proben wurden Versuche der Virusisolierung durch Beimpfung auf der Chorioallantoismembran (CAM) von SPF-Hühnerembryonen mit homogenisiertem Untersuchungsmaterial vorgenommen. Hierunter waren zehn Proben, bei denen zuvor in der FP1/FP2-PCR FWPV-spezifische DNA nachgewiesen worden war (Tab.16). Von diesen zehn Proben ergaben fünf Isolierungsversuche pockenvirus-typische Veränderungen in Form von Verdickung der CAM und Bildung proliferativer nekrotischer

Herde (Abb. 12). Vier Isolierungsversuche führten zu keinen eindeutigen Ergebnissen. Die Probe GB49-01 führte zu gar keinen erkennbaren Veränderungen der CAM. In der anschließend durchgeführten Untersuchung von neun der zehn CAM-Homogenate konnte mittels FP 1/FP 2-PCR wiederum jeweils FWPV-spezifische DNA nachgewiesen werden. Der Versuch der Virusisolierung der Probe GB156-01, die zuvor in der FP 1/FP 2-PCR keine FWPV-spezifische DNA aufwies, führte zu keinen Veränderungen auf der CAM. In diesem Fall konnte anschließend mittels der FP 1/FP 2-PCR in dem CAM-Homogenat auch keine hühnerpockenvirus-spezifische DNA detektiert werden.

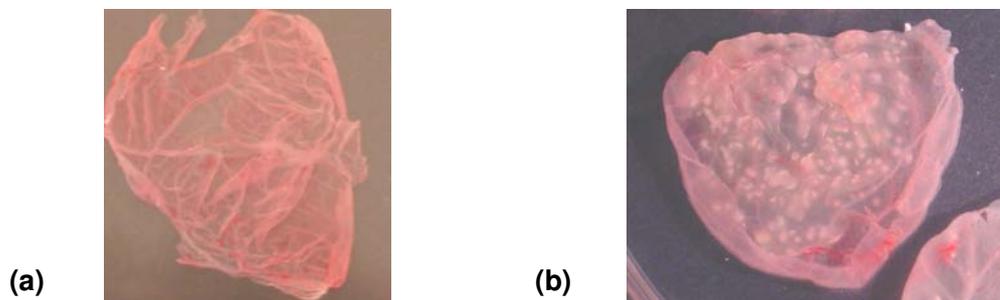


Abb. 12 Chorioallantoismembranen (CAM):
(a) nicht infizierte CAM, (b) Pockenvirusanzucht auf der CAM

Als typische, durch Pockenviren verursachte Veränderungen auf der CAM sind Verdickung der Membran und proliferative Nekroseherde zu erkennen.

4.1.3.3 Agargelpräzipitationstest (AGP)

Bei zehn Feldisolaten, bei denen mittels FP 1/FP 2-PCR FWPV-spezifische DNA detektiert werden konnte, wurde nach der Virusisolierung zusätzlich der Agargelpräzipitationstest (AGP) durchgeführt (Tab. 16). In sieben Fällen wurde das PCR-Ergebnis bestätigt, indem Virus-Antigen durch auftretende Präzipitationsbanden nachgewiesen wurde (Abb. 13). Bei den Proben GB49-01, GB415-01 und GB439-01 verlief der Nachweis von Virus-Antigen im AGP negativ. Des Weiteren wurde das Material einer Einsendung mittels AGP untersucht, in dem keine hühnerpockenvirus-spezifische DNA nachgewiesen werden konnte und das in der Anzucht zu keinen Veränderungen der CAM geführt hatte (GB 156-

01). Der AGP bestätigte dieses Ergebnis. Insgesamt führten der AGP und die PCR in acht von elf Untersuchungen zu identischen Ergebnissen (72,7%) (Tab. 17).

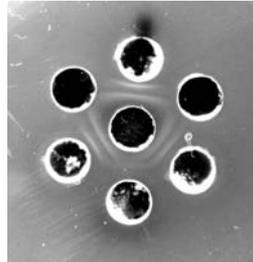


Abb. 13 Agargelpräzipitationstest (AGP)

Antigennachweis durch Bildung von Präzipitationsbanden.

Tab. 17 Übereinstimmungen der Ergebnisse von konventionellen Diagnostikverfahren und FP1/FP2-PCR (in %)

Diagnostikverfahren	Übereinstimmung mit FP1/FP2-PCR
EM	83,3 %
Virusisolierung und AGP	72,7 %

4.2 UNTERSUCHUNGEN ZUR EPIDEMIOLOGIE VON GEFLÜGELPOCKEN

4.2.1 FP1/FP2-PCR im Rahmen der Diagnostik

In dem Material von 56 der 110 Einsendungen (50,9 %) konnte FWPV-spezifische DNA durch Bildung eines Amplifikates der erwarteten Größe von 578 bp nachgewiesen werden. Bei anschließender Spaltung der PCR-Produkte mit den Restriktionsenzymen *EcoRV* und *NlaIII* konnten die entsprechenden Fragmente wie bei FWPV nachgewiesen werden (4.1.1).

Bei den weiteren 54 Einsendungen führte die FP1/FP2-PCR zu einem negativen Ergebnis. Die DNA dieser Einsendungen führte in der A1/A2-PCR zum Nachweis des β -Aktin-Gens zur Bildung der zu erwartenden, spezifischen Bande (398 bp), sodass diese Proben endgültig negativ beurteilt werden konnten (Abb. 14).

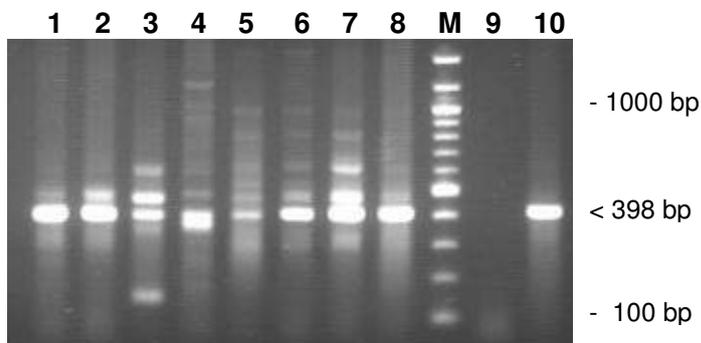


Abb. 14 Nachweis von β -Aktin-spezifischer DNA in Proben, die in der FP1/FP2-PCR negativ verliefen

Spur 1: GB 180-02, Spur 2: GB 208-02, Spur 3: GB 376-02, Spur 4: GB 395-02, Spur 5: GB 396-02, Spur 6: GB 450-02, Spur 7: GB 607-02, Spur 8: GB 673-02, Spur 9: Negativkontrolle, Spur 10: Positivkontrolle, Spur M: 100 bp-DNA-Größenmarker

4.2.2 Häufigkeiten der Verlaufsformen

Bei 31 von 59 Einsendungen mit Verdacht der Hautform der Geflügelpocken (Abb. 15) wurde FWPV-spezifische DNA nachgewiesen. Bei neun von 27 Einsendungen mit Verdacht der Schleimhautform (Abb. 16) wurde in Trachealmaterial, Schleimhautgewebe der Schnabelhöhle oder in Tupferproben Pockenvirus-DNA nachgewiesen. Des Weiteren bestätigte sich der Verdacht der Mischform bei 15 Untersuchungen von 21 Einsendungen. Darüber hinaus konnte bei einer von drei Kontrolluntersuchungen von neueingestellten Tieren ohne Verdacht auf eine Geflügelpockeninfektion eine Pockeninfektion nachgewiesen werden (Abb. 17).



Abb. 15

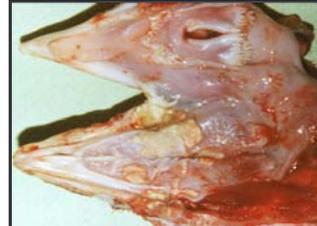


Abb. 16

Abb. 15 Hautform der Pocken bei einer Legehennen

Abb. 16 Schleimhautform der Pocken bei einer Legehennen

Anzahl

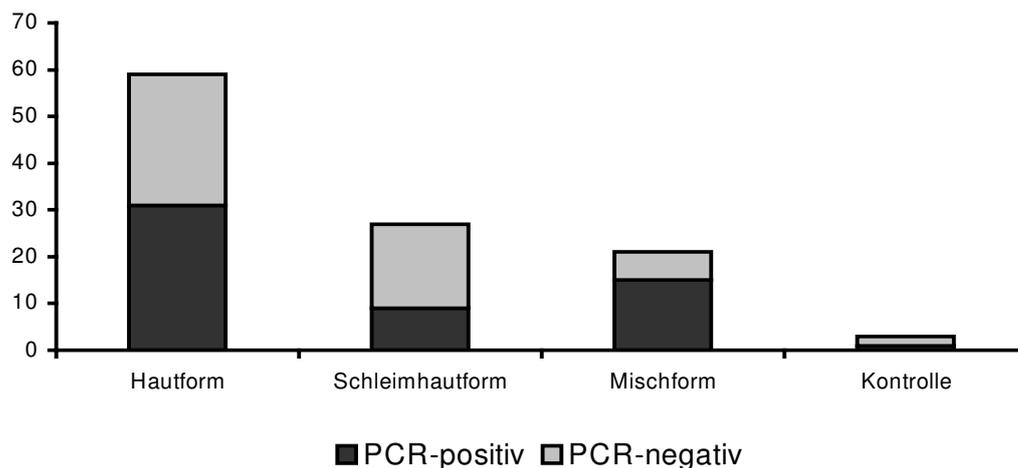


Abb. 17 Anzahl Einsendungen und FP1/FP2-PCR-Ergebnisse pro Verlaufsform bzw. Kontrolluntersuchung

4.2.3 Nutzungsrichtungen des untersuchten Wirtschaftsgeflügels

Das Spektrum an Nutzungsrichtungen des untersuchten Wirtschaftsgeflügels umfasste Legehennen, Mastelertiere, Mastputen und Putenelertiere. Bei den Einsendungen, bei denen FWPV-spezifische DNA nachgewiesen wurde, handelte es sich in den meisten Fällen um Einsendungen von Beständen mit Legehennen (67,8%) und Mastelertieren (10,7%). Einen geringeren Anteil an allen Einsendungen mit nachgewiesener Hühnerpockenvirus-DNA nahmen die Einsendungen von Putenelertieren (5,4%) und Mastputenbeständen (3,6%) ein (Tab. 18).

Tab. 18 Anzahl der Einsendungen und bestätigter Geflügelpockeninfektionen pro Nutzungsrichtung sowie Anzahl positiver Einsendungen pro Verlaufsform

Nutzungsrichtung	Anzahl Einsendungen		Anteil an allen positiven Einsendungen	Anzahl positiver Einsendungen			
	insgesamt	PCR-positiv		Hautform	Schleimhautform	Mischform	Kontrolle
LH	68	38	67,8%	22	4	11	1
MET	9	6	10,7%	3	3	0	0
Hobby	9	4	7,1%	2	1	1	0
PET	13	3	5,4%	3	0	0	0
MP	5	2	3,6%	0	0	2	0
o.A.	6	3	5,4%	1	1	1	0
Summe	110	56	100%	31	9	15	1

LH: Legehennen, MET: Mastelertiere, Hobby: Hühner in Hobbyhaltungen, PET: Putenelertiere, MP: Mastputen, o.A.: ohne Angaben

4.2.4 Herkunftsregionen des Untersuchungsmaterials

Die 110 Einsendungen im Zeitraum Januar 2001 bis Dezember 2003 stammten aus zwölf verschiedenen Bundesländern Deutschlands. Insgesamt betrachtet stammten 16 aller 56 nachgewiesenen Fälle aus Niedersachsen (28,6%), 11 Fälle aus Baden-Württemberg (19,6%) und 8 Fälle aus Brandenburg (14,3%). Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass

aus diesen Ländern auch die meisten Einsendungen stammten. Die erzielten Ergebnisse sind in der Abbildung 18 im Einzelnen dargestellt.

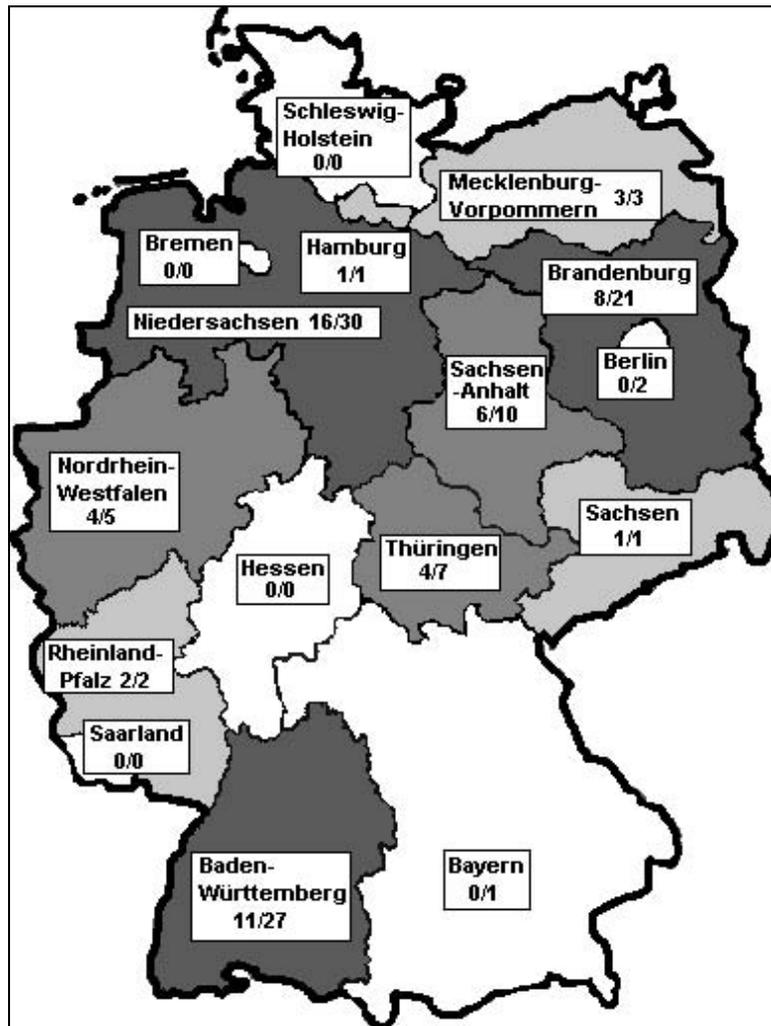


Abb. 18 Nachweis von Geflügelpocken mittels FP1/FP2-PCR, differenziert nach Bundesland

X/Y: Anzahl PCR-positiver Einsendungen / Anzahl Einsendungen

4.2.5 Häufigkeit des Auftretens der Pockeninfektionen pro Betrieb

Soweit die entsprechenden Daten vorlagen, traten bei 24 Legehennenbetrieben und drei Masteltern-tierbetrieben Geflügel-pocken in nur einer Herde auf (Tab. 19). Ebenso stellten die Geflügel-pockeninfektionen bei zwei Mastputen- und den drei Puteneltern-tierherden Einzelfälle von Geflügel-pockeninfektionen in den Betrieben dar. Bei zwei Legehennenbetrieben wurde die Infektion in jeweils zwei zeitlich getrennten Herden, im Abstand von drei bzw. fünf Monaten festgestellt. Bei einem Masteltern-tierbetrieb traten Geflügel-pocken zeitgleich in drei räumlich getrennten Herden mit unterschiedlichen Altersgruppen auf.

Tab. 19 Anzahl an Betrieben, differenziert nach Anzahl an Geflügel-pockeninfektionen pro Betrieb und Nutzungsrichtung

Nutzungsrichtung	Anzahl der Betriebe	Geflügel-pockeninfektionen pro Betrieb
Legehennenbestände	24	1
	2	2
Masteltern-tierbestände	3	1
	1	3
Mastputenbestände	2	1
Puteneltern-tierbestände	3	1

4.2.6 Legehennenhaltungsformen bei nachgewiesenen Pockeninfektionen

38 Einsendungen, bei denen FWPV-spezifische DNA nachgewiesen werden konnte, stammten aus wirtschaftlich genutzten Legehennenbeständen. Bei 12 dieser 38 Einsendungen lagen Daten zur Haltungsform vor. Die Auswertung ergab, dass in sechs wirtschaftlich genutzten Beständen in Alternativhaltung Geflügel-pockeninfektionen nachgewiesen werden konnten. Dies betraf fünf Bestände in Freiland- und einen Bestand in Bodenhaltung, wobei die ersten Fälle in Betrieben mit Freilandhaltung aufgetreten sind. Darüber hinaus wurde die Infektion auch in sechs Tierbeständen in Käfighaltung

festgestellt. In den Jahren 2002 und 2003 wurde auch bei vier Hühnerbeständen in Hobbyhaltung hühnerpockenvirus-spezifische DNA mittels FP 1/FP 2-PCR nachgewiesen.

4.2.7 Alter der Tiere mit nachgewiesenen Geflügelpockeninfektionen

Die Nutzungsdauer von wirtschaftlich gehaltenen Legehennen beträgt 72 bis 75 Lebenswochen (LW). Bei 23 Einsendungen aus diesem Bereich lagen Altersangaben zum Zeitpunkt der Infektionen vor. Die Daten mit nachgewiesener Pockeninfektion bei Legehennenbeständen variierten von der 8. bis zur 75. LW (Abb. 19).

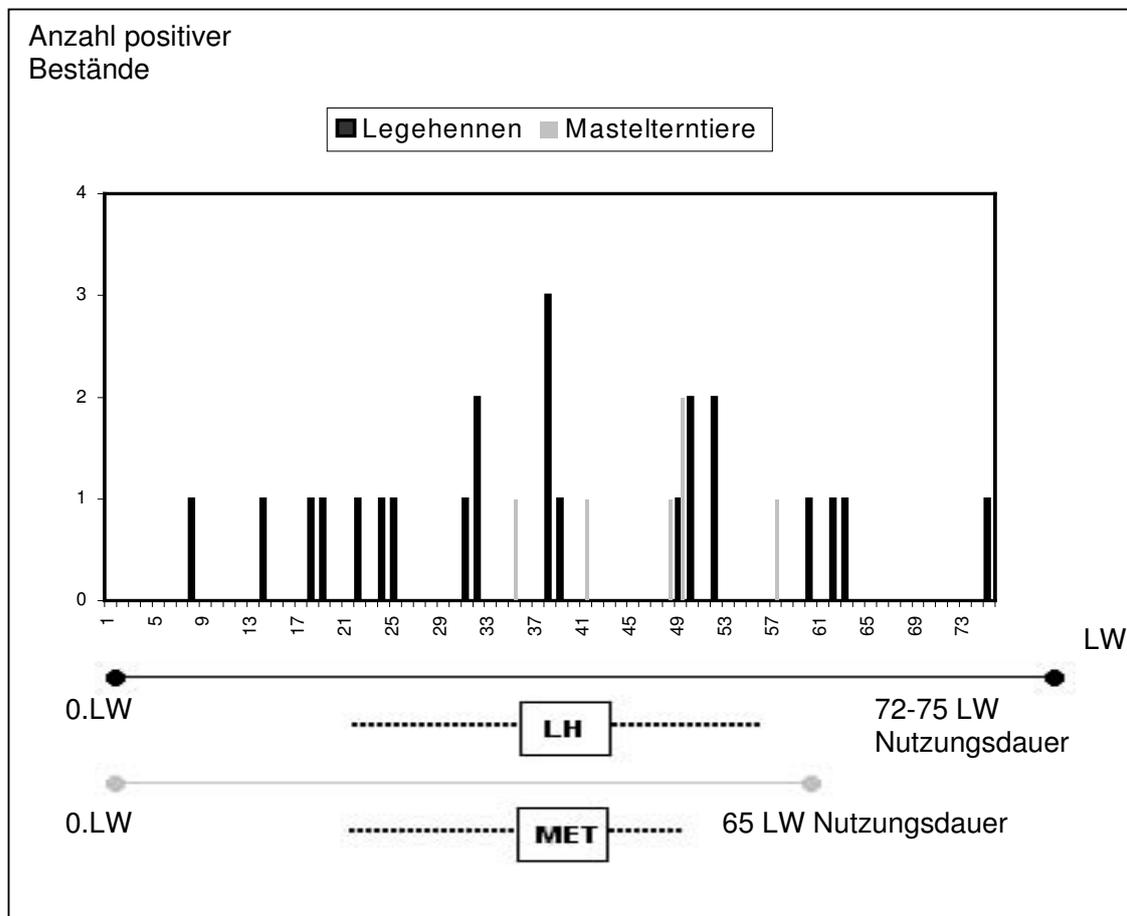


Abb. 19 Anzahl positiver Legehennen- (LH) und Mastelertierbestände (MET) in Bezug auf das Alter der Tiere in Lebenswochen (LW) bei Infektion im Vergleich zur wirtschaftlichen Nutzungsdauer

Mastelertiere werden bis zur 65. LW gehalten. Die Angaben zum Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Pockeninfektionen bei den sechs Mastelertierbeständen reichten von der 35. bis zur 57. LW. Des Weiteren lagen die Altersgaben bei einer Einsendung von den zwei Einsendungen von Mastputenbeständen (13. LW) sowie bei einer von drei Einsendungen von Putenelertierbeständen (37. LW) vor.

4.2.8 Impfstatus der Tiere

Es wurden die soweit vorliegenden Daten von 22 Einsendungen zum Impfstatus der Tiere gegen Hühnerpocken ausgewertet. Demnach stammten 19 Einsendungen aus ungeimpften Beständen und drei Einsendungen aus Beständen, bei denen eine prophylaktische Impfung gegen Pocken durchgeführt worden war (Tab. 20).

Tab. 20 PCR-Ergebnisse, differenziert nach Nutzungsrichtung und Impfung

Bestand	Impfung	Anzahl Einsendungen	
		PCR-positiv	PCR-negativ
Legehennen	+	0	2
	-	10	6
Mastelertiere	+	0	0
	-	0	1
Putenelertiere	+	0	1
	-	1	0
Mastputen	+	0	0
	-	1	0

+: Tiere wurden gegen Hühnerpocken geimpft, -: Tiere wurden nicht gegen Hühnerpocken geimpft

16 Einsendungen stammten von ungeimpften Legehennenbeständen, von denen zehn in der FP1/FP2-PCR zu einem positiven Ergebnis führten. In der einen Einsendung, die von einem Mastelertierbestand ohne Durchführung prophylaktischer Impfung stammte, konnte keine hühnerpockenvirus-spezifische DNA nachgewiesen werden. Bei einem

ungeimpften Puteneltern-tierbestand sowie einem ungeimpften Mastputenbestand wurden hingegen Geflügelpocken festgestellt.

Darüber hinaus stammten die drei Einsendungen von geimpften Beständen aus zwei Beständen mit Legehennen- und einem mit Puteneltern-tierhaltung. In dem Probenmaterial der geimpften Tiere konnte keine FWPV-spezifische DNA mittels FP1/FP2-PCR nachgewiesen werden.

4.2.9 Jährliches Auftreten von Geflügelpocken und jahreszeitliche Verteilung

Anhand der jährlichen Anzahl von den seit 1999 im Institut für Geflügelkrankheiten der Freien Universität Berlin nachgewiesenen Geflügelpockeninfektionen konnte 1999 ein vereinzelttes Auftreten und in den Folgejahren bis 2001 ein deutlicher Anstieg beobachtet werden (Abb. 20). Anschließend lässt sich über 2002 bis 2003 wieder eine abnehmende Tendenz erkennen.

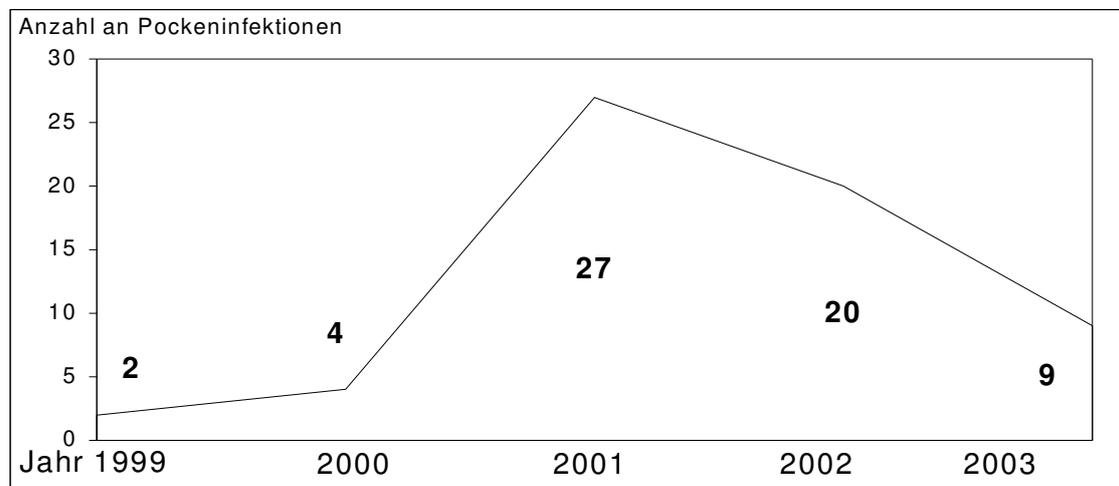


Abb. 20 Jährliche Anzahl von Fällen mit Geflügelpocken (nachgewiesen im Institut für Geflügelkrankheiten, Freie Universität Berlin)

Im Institut für Geflügelkrankheiten der Freien Universität Berlin wurden im Jahr 1999 zwei und im Jahr 2000 vier Geflügelpockeninfektionen mittels konventioneller Pockendiagnostik nachgewiesen (HAFEZ et al., 2001b). Im Jahr 2001 wurden mittels der entwickelten FP1/FP2-PCR 27 Infektionen mit Geflügelpocken diagnostiziert, von denen acht in den Wintermonaten Januar und Februar, fünf in den Frühjahrsmonaten März und April, sechs in den Sommermonaten Juni bis August und acht in den Herbstmonaten Oktober und November auftraten. Im darauf folgenden Jahr 2002 wurden bei 20 Untersuchungen Geflügelpockeninfektionen nachgewiesen, von denen eine im Januar, zwei im März und zwei im August auftraten. In den Herbstmonaten September bis November traten 13 und im Dezember zwei Infektionen auf. Im Jahr 2003 wurden neun Infektionen festgestellt: jeweils zwei im Winter (je eine im Januar und Februar), im Frühjahr (je eine im März und Mai) sowie im Sommer (Juli). Im Herbst (Oktober) wurden eine, und im Dezember zwei Pockeninfektionen bei Wirtschaftsgeflügel festgestellt (Abb.21).

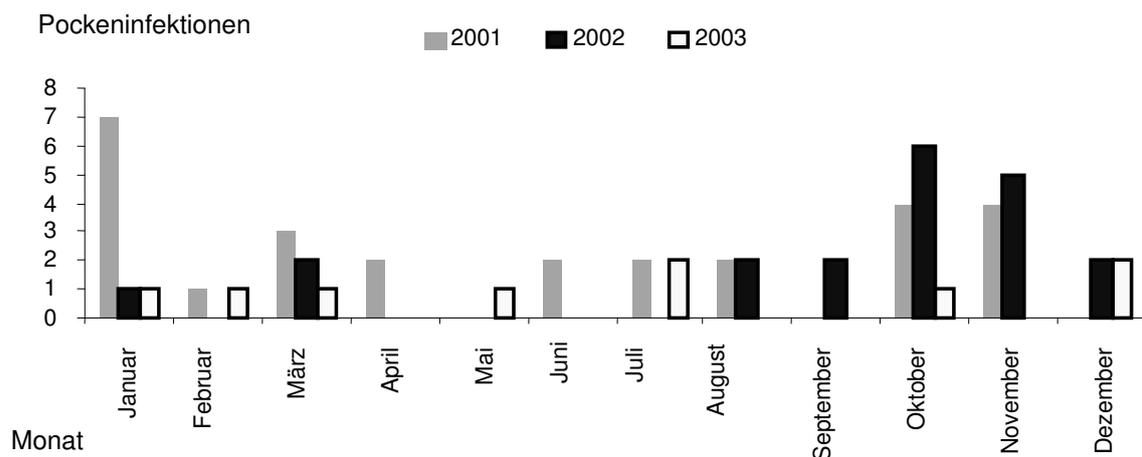


Abb. 21 Monatliche Zuordnung der Geflügelpockeninfektionen (2001 - 2003)

Bei Betrachtung des gesamten Untersuchungszeitraumes zeigt sich ein gehäuftes Auftreten von Geflügelpocken während der Herbstmonate.

4.2.10 Untersuchungen zur Übertragbarkeit von Geflügelpocken durch Milben

Bei drei Legehennenbeständen lag gleichzeitig Milbenbefall vor. Um zu überprüfen, ob in den Milben FWPV-spezifische DNA nachweisbar ist, wurden diese ebenfalls mittels FP1/FP2-PCR untersucht. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte zeigte sich ein Amplifikat der erwarteten Größe von 578bp (Abb. 22a). Bei anschließender Spaltung der PCR-Produkte mit den Restriktionsenzymen *EcoRV* und *NlaIII* konnten die entsprechenden Fragmente wie bei FWPV nachgewiesen werden (Abb. 22b). Mit dem homogenisierten Milbenmaterial wurde eine Virusanzucht mittels Beimpfung der CAM von SPF-Hühnerembryonen versucht. Obwohl in dem Material mittels der FP1/FP2-PCR FWPV-DNA nachgewiesen werden konnte, gelang die Isolierung nicht.

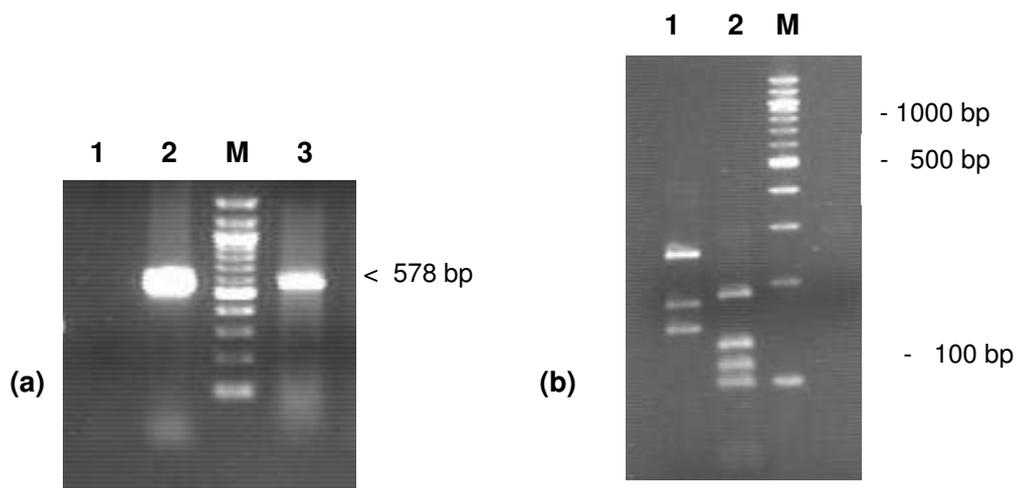


Abb. 22 (a) Nachweis von FWPV-spezifischer DNA im Milbenmaterial mittels FP 1/FP 2-PCR und (b) REA des FP1/FP2-PCR-Produktes

(a) Aus dem gesammelten Milbenmaterial zu der Probe GB 989-02 extrahierte DNA wurde mittels der FP 1/FP 2-PCR untersucht, das PCR-Produkt gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

Spur 1: Präparationskontrolle, Spur 2: Hühnerpockenimpfstoff HP-B als Positivkontrolle, Spur 3: Milbenmaterial zu GB 989-02, Spur M: 100 bp-DNA-Größenmarker.

b) Nach Spaltung wurden die entstandenen Fragmente in einem 3%igen Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die Größen des 100 bp-DNA-Größenmarkers sind angegeben.

Spur 1: *EcoRV* von GB 989-02/Milbenmaterial, Spur 2: *NlaIII* von GB 989-02/Milbenmaterial, Spur M: 100 bp-DNA-Größenmarker.

4.3 NACHWEIS UND DIFFERENZIERUNG VON AVIPOCKENVIRUSSPEZIES

4.3.1 Untersuchung weiterer Avipockenviruspezies mittels FP1/FP2-PCR

Das Spektrum der Vögel, von denen im Untersuchungsmaterial mittels der FP1/FP2-PCR avipockenvirus-spezifische DNA nachgewiesen werden konnte, umfasste die acht Ordnungen *Accipitriformes*, *Charadriiformes*, *Columbiformes*, *Falconiformes*, *Passeriformes*, *Phasianiformes*, *Psittaciformes* und *Struthioniformes*.

Mittels der etablierten PCR konnte bei allen untersuchten Stämmen und Feldisolaten durch die Primerkombination FP1 und FP2 avipockenvirus-spezifische DNA nachgewiesen werden. Unabhängig von der Vogelart wurde ein PCR-Produkt von etwa 580 bp gebildet (Abb. 23). Diese Größe entsprach dem 578 bp großen Bereich des FWPV-Core Protein 4b Gens.

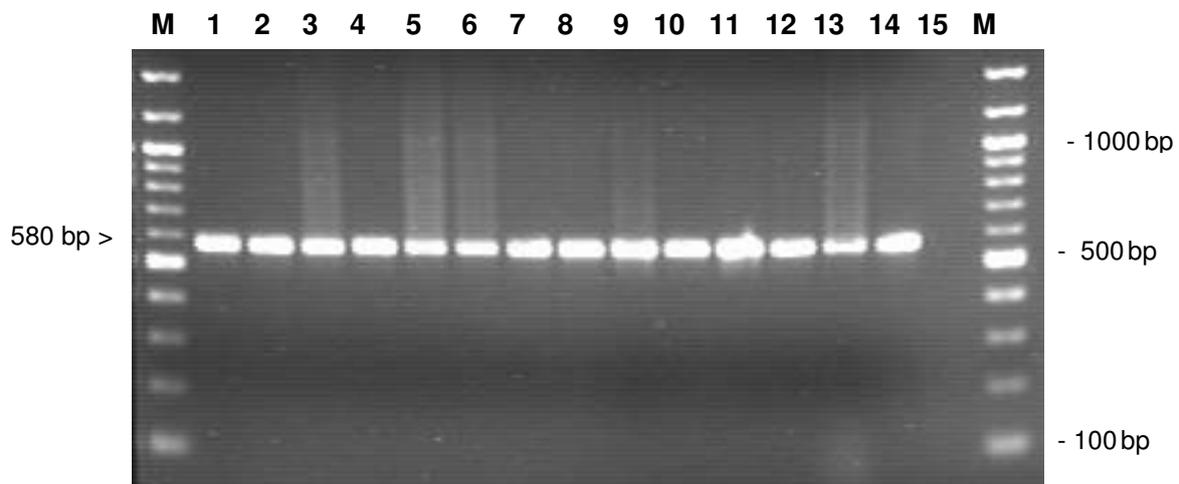


Abb. 23 Nachweis avipockenvirus-spezifischer DNA bei verschiedenen Vogelspezies in der FP 1/FP 2- PCR

Analyse der PCR-Produkte durch gelelektrophoretische Auftrennung und Sichtbarmachung durch Ethidiumbromid. Die Fragmentgrößen des Größenmarkers sind angegeben. M:100 bp-DNA-Größenmarker, 1:Huhn HP-B, 2:Pute GB 134-01, 3:Sperling HS-DD, 4: Strauß GB724-01/20, 5: Taube TP-2, 6:Falke GB362-02/6, 7:Kanarienvogel GB724-01/22, 8:Kanarienvogel GB1007-02, 9:Sperling GB 320-02, 10:Rabenkrähe GB1115-02, 11: Triel GB 182-98, 12: Habicht, 13: Hakengimpel GB 1170-02, 14: Agapornide ApIII, 15: Negativkontrolle.

4.3.2 REA zur Differenzierung weiterer Avipockenviruspezies

Um zu untersuchen, ob sich die verschiedenen Avipockenviren differenzieren lassen, wurden die PCR-Produkte mittels Restriktionsenzymanalyse (REA) untersucht. Bei zwei Feldisolaten von Falken (GB 362-02/5, GB 405-02/3) ließ sich zwar mittels der PCR eine schwache Bande der erwarteten Größe nachweisen, die amplifizierte DNA-Menge war jedoch für eine weitere Untersuchung in der REA nicht ausreichend. Innerhalb einer Vogelart zeigte sich ein einheitliches Spaltbild. Ausnahmen bildeten die PCR-Produkte von Kanarienvögeln und Sperlingen, bei denen die REA jeweils zu zwei unterschiedlichen Spaltbildern führte. Bei der folgenden Erläuterung wird das Falkenisolat GB 405-02/4 ausgenommen, weil in der REA mittels *EcoRV*, *NlaIII* und *MseI* jeweils ein Spaltbild entstand, das gleichzeitig sowohl die Fragmente der anderen Falkenisolat als auch die Fragmente des Isolates vom Strauß (GB 724-01/20), von der Taube (Z 125-03) bzw. von den Taubenpockenstämmen (TP-2 und Peristin) zeigte und angenommen wird, dass entweder eine Doppelinfektion vorlag oder die Probe kontaminiert wurde. Da die Virusisolierung in diesem Fall mit negativem Ergebnis verlief, konnte es nicht weiter geklärt werden.

4.3.2.1 *EcoRV*-Spaltung des PCR-Produktes der Primerkombination FP1 und FP2

Bei der Spaltung der PCR-Produkte der Feldisolate vom Sperling HS-DD und von der Taube Z 125-03 sowie dem Isolat vom Strauß GB 724-01/20 ergab sich mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* wie bei den beiden Taubenpockenstämmen (TP-2 und Peristin) ein identisches Spaltbild zu den FWPV-Stämmen (HP-B und HP-1) und den Isolaten von Hühnern und Puten (GB 724-01/1-18, GB 134-01). Die PCR-Produkte von den Feldisolaten der Falken (GB 362-02/1-4, GB 362-02/6, GB 405-02/1-2, FalkenIII/1-4, Z 59-02 und Z 95-02) wiesen ein Spaltbild auf, das sich von den Spaltbildern der anderen Spezies unterschied. Bei der Analyse der Avipockenviren, die von Kanarienvögeln stammten, zeigten sich zwei verschiedene Spaltbilder: Bei den beiden Kanarienvockenstämmen KP-1 und KP-1-V557 sowie dem Isolat des Kanarienvogels GB 724-01/22 zeigte sich ein Spaltbild mit zwei Fragmenten, bei der Analyse der weiteren drei Feldisolate von Kanarienvögeln (GB 411-02, GB 1007-02 und GB 1400-02) wurde hingegen das PCR-Produkt durch *EcoRV* nicht gespalten. Damit zeigten sie ein

identisches Spaltbild zu den Pockenvirusisolaten von zwei Sperlingen (GB 727-02 und GB 320-02), von der Rabenkrähe GB 1115-02, vom Hakengimpel GB 1170-02, vom Triel GB 182-98, vom Habicht sowie vom Agapornidenisolat ApIII, die ebenfalls keine Spaltstelle für das Enzym *EcoRV* besaßen (Abb. 24).

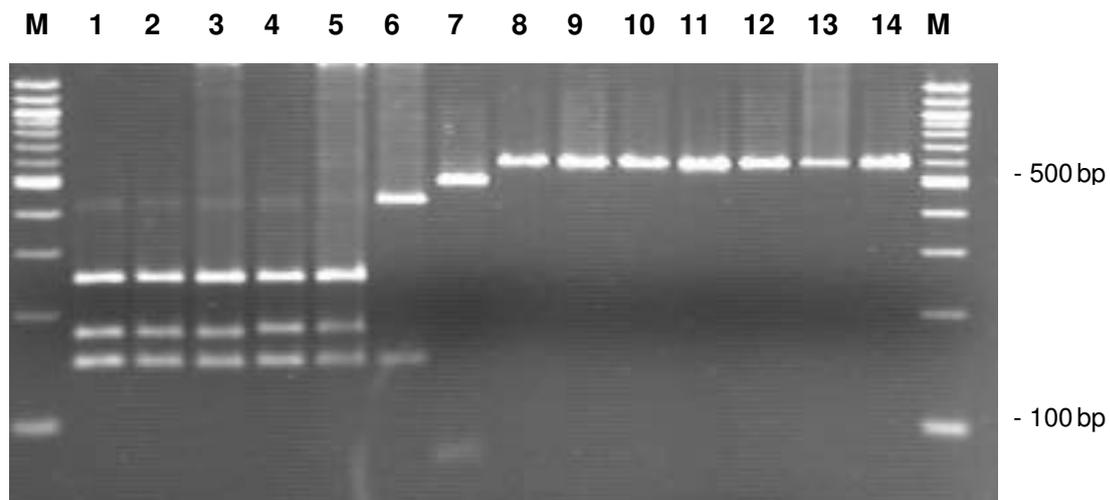


Abb. 24 *EcoRV*-Spaltung der PCR-Produkte von verschiedenen Avipockenviren

Die PCR-Produkte der FP1/FP2-PCR von verschiedenen Avipockenviren wurden durch das Restriktionsenzym *EcoRV* gespalten, die entstandenen Fragmente in einem 3%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die Fragmentgrößen (in bp) eines Größenmarkers sind angegeben. 1:Huhn HP-B, 2:Pute GB 134-01, 3:Sperling HS-DD, 4: Strauß GB 724-01/20, 5: Taube TP-2, 6:Falke GB 362-02/6, 7:Kanarienvogel GB 724-01/22, 8:Kanarienvogel GB 1007-02, 9:Sperling GB 320-02, 10:Rabenkrähe GB 1115-02, 11:Triel GB 182-98, 12:Habicht, 13:Hakengimpel GB 1170-02, 14:Agapornide ApIII.

4.3.2.2 *NlaIII*-Spaltung des PCR-Produktes der Primerkombination FP1 und FP2

Das *NlaIII*-Spaltbild des PCR-Produktes des Feldisolates vom Sperling HS-DD war identisch zu den FWPV-Stämmen (HP-1 und HP-B) und den Isolaten von Hühnern und Puten (GB 724-01/1-18, GB 134-01). Das Isolat vom Strauß GB 724-01/20 sowie das Feldisolat und die Pockenstämmen von Tauben (Z 125-03, TP-2 und Peristin) zeigten ein weiteres Spaltbild. Die Feldisolate der Falken (GB 362-02/1-4, GB 362-02/6, GB 405-02/1-2, FalkenIII/1-4, Z 59-02 und Z 95-02) wiesen ein drittes Spaltbild auf, wobei ein Großteil

dieser Isolate ein schwaches weiteres Fragment von etwa 380 bp aufwies, das rechnerisch als unspezifisch eingeordnet werden konnte. Ein weiteres Bild ergaben die Fragmente der Kanarienvogelstämme und -isolate (KP-1, KP-1-V557, GB 724-01/22, GB 411-02, GB 1007-02 und GB 1400-02), der zwei Sperlingsisolate GB 727-02 und GB 320-02, der Rabenkrähe GB 1115-02, des Hakengimpels GB 1170-02, des Triels GB 182-98 und des Habichts. Bei Spaltung des PCR-Produktes des Agapornidenisolates ApIII ergab sich ein fünftes Spaltbild (Abb. 25).

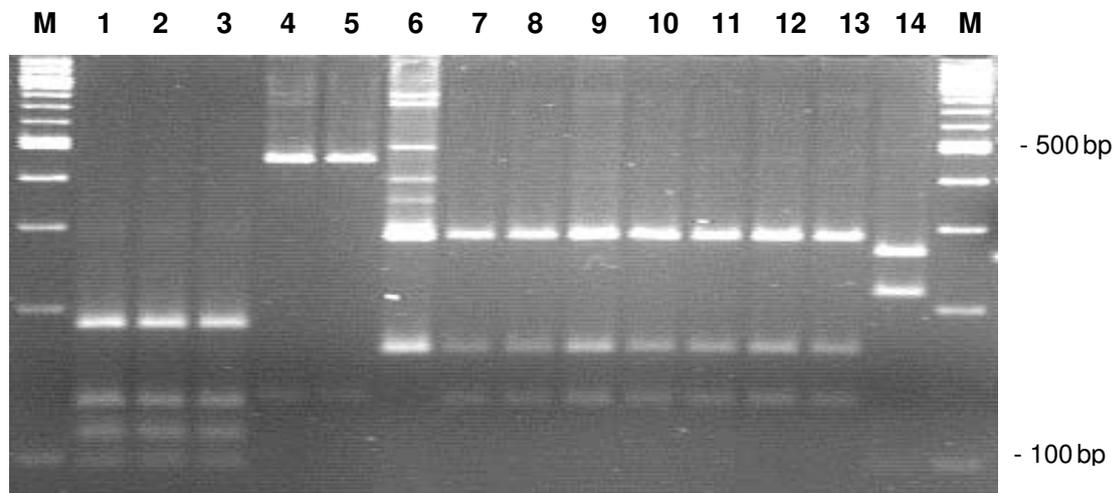


Abb. 25 *NlaIII*-Spaltung der PCR-Produkte von verschiedenen Avipockenviren

Die PCR-Produkte der FP1/FP2-PCR von verschiedenen Avipockenviren wurden durch das Restriktionsenzym *NlaIII* gespalten, die entstandenen Fragmente in einem 3%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die Fragmentgrößen (in bp) eines Größenmarkers sind angegeben. 1: Huhn HP-B, 2: Pute GB 134-01, 3: Sperling HS-DD, 4: Strauß GB 724-01/20, 5: Taube TP-2, 6: Falke GB 362-02/6, 7: Kanarienvogel GB 724-01/22, 8: Kanarienvogel GB 1007-02, 9: Sperling GB 320-02, 10: Rabenkrähe GB 1115-02, 11: Triel GB 182-98, 12: Habicht, 13: Hakengimpel GB 1170-02, 14: Agapornide ApIII.

4.3.2.3 *Mse*I-Spaltung des PCR-Produktes der Primerkombination FP1 und FP2

Die Untersuchung mittels des Restriktionsenzym *Mse*I ermöglichte eine Differenzierung der Avipockenviren wie die Spaltung durch *Nla*III, jedoch wiesen die PCR-Produkte mehr Spaltstellen für *Mse*I auf (Abb. 26).

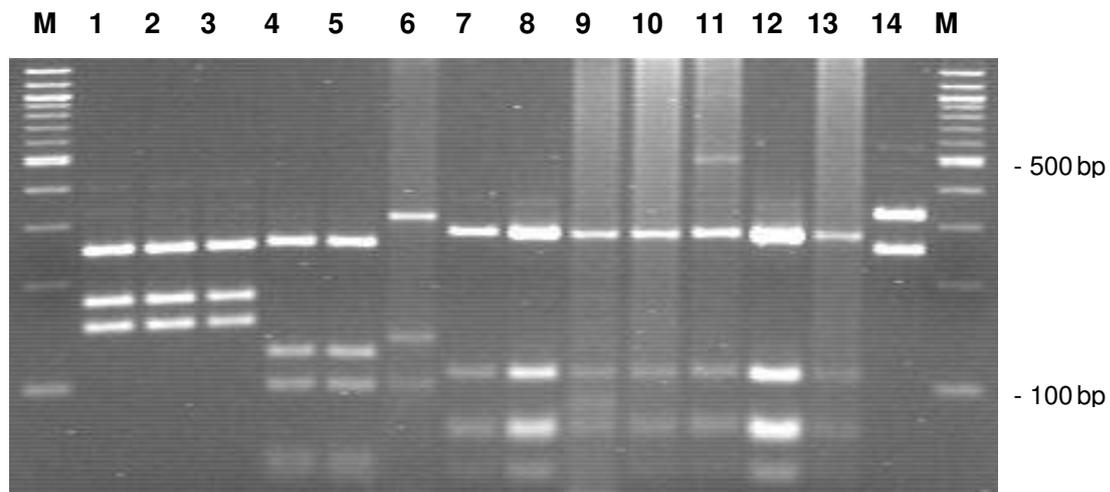


Abb. 26 *Mse*I-Spaltung der PCR-Produkte von verschiedenen Avipockenviren

Die PCR-Produkte der FP1/FP2-PCR von verschiedenen Avipockenviren wurden durch das Restriktionsenzym *Mse*I gespalten, die entstandenen Fragmente in einem 3%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die Fragmentgrößen (in bp) eines Größenmarkers sind angegeben. 1: Huhn HP-B, 2: Pute GB 134-01, 3: Sperling HS-DD, 4: Strauß GB 724-01/20, 5: Taube TP-2, 6: Falke GB 362-02/6, 7: Kanarienvogel GB 724-01/22, 8: Kanarienvogel GB 1007-02, 9: Sperling GB 320-02, 10: Rabenkrähe GB 1115-02, 11: Triel GB 182-98, 12: Habicht, 13: Hakengimpel GB 1170-02, 14: Agapornide ApIII.

4.3.2.4 *Dpn*II-Spaltung des PCR-Produktes der Primerkombination FP1 und FP2

Durch die Spaltung mit *Dpn*II ließen sich die Avipockenviren wie mit den Enzymen *Nla*III und *Mse*I differenzieren, jedoch fehlte die Unterscheidung des Straußenisolates bzw. der Taubenpocken von den Falkenisolaten. Sie zeigten ein gemeinsames Spaltbild (Abb. 27).

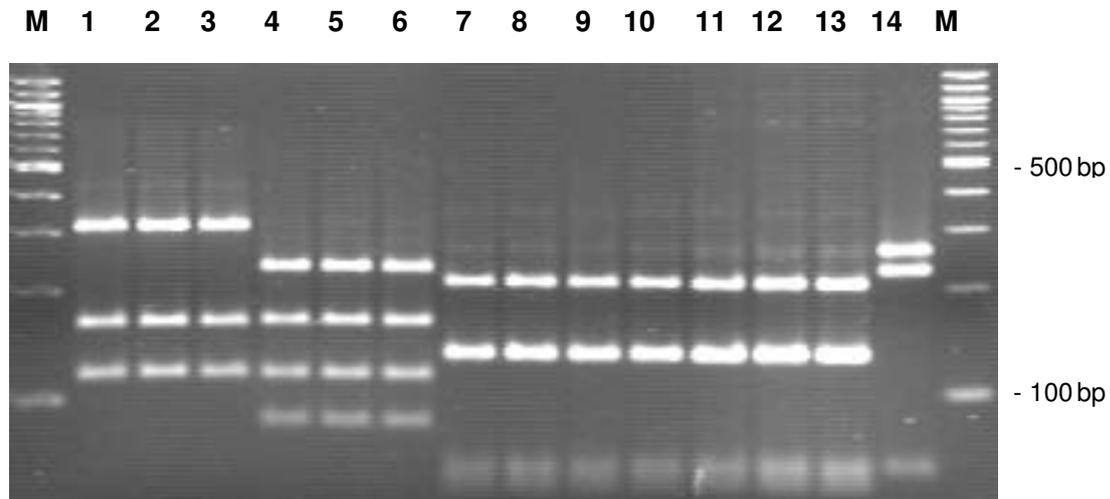


Abb. 27 *DpnII*-Spaltung der PCR-Produkte von verschiedenen Avipockenviren

Die PCR-Produkte der FP1/FP2-PCR von verschiedenen Avipockenviren wurden durch das Restriktionsenzym *DpnII* gespalten, die entstandenen Fragmente in einem 3%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die Fragmentgrößen (in bp) eines Größenmarkers sind angegeben. 1: Huhn HP-B, 2: Pute GB 134-01, 3: Sperling HS-DD, 4: Strauß GB 724-01/20, 5: Taube TP-2, 6: Falke GB 362-02/6, 7: Kanarienvogel GB 724-01/22, 8: Kanarienvogel GB 1007-02, 9: Sperling GB 320-02, 10: Rabenkrähe GB 1115-02, 11: Triel GB 182-98, 12: Habicht, 13: Hakengimpel GB 1170-02, 14: Agapornide ApIII.

Zur Auswertung dieser Daten wurden die vier verschiedenen Spaltbilder bei *EcoRV* mit römischen Zahlen (I-IV) und die fünf verschiedenen Spaltbilder bei *NlaIII* mit arabischen Buchstaben (A-E) bezeichnet (Tab.21). Die Untersuchungen mittels *MseI* und *DpnII* ermöglichten keine weitergehende Differenzierung. Die untersuchten Avipockenviren von unterschiedlichen Vogelarten aus acht Ordnungen konnten durch Kombinationen der Spaltbilder von *EcoRV* und *NlaIII* in sechs Gruppen differenziert werden. Diese sechs Gruppen wurden anschließend nach einem Vertreter (FWPV-Spaltbild, PGPV-Spaltbild, Falken-Spaltbild, CNPV-Spaltbild, Agaporniden-Spaltbild) bzw. nach der anzahlmäßig vorherrschenden Ordnung der *Passeriformes* (Sperlingsvögel-Spaltbild) benannt.

Tab. 21 Differenzierbarkeit der untersuchten Avipockenviren mittels REA

Die Bezeichnung Sperlingsvögel-Spaltbild wurde für die Kombination des Agaporniden-Spaltbildes bei *EcoRV* und des CNPV-Spaltbildes bei *NalIII* gewählt.

Ordnung	Vogelart	Bezeichnung	REA-Spaltbild		Weitgehende Zuordnung durch REA-Kombination
			<i>EcoRV</i>	<i>NalIII</i>	
Phasianiformes	Huhn	HP-1, HP-B GB 724-01/1-3	I	A	FWPV-Spaltbild
	Pute	GB 724-01/4-18 GB 134-01		B	FWPV-Spaltbild
Struthioniformes	Strauß	GB 724-01/20	II	C	PGPV-Spaltbild
Columbiformes	Taube	TP- 2, Peristin Z 125-03			PGPV-Spaltbild
Falconiformes	Falke	GB 362-02/1-4, 6 GB 405-02/1-2, 4 Falken III/1-4 Z59-02, Z 95-02	III	D	Falken- Spaltbild
Passeriformes	Kanarienvogel	KP-1, KP1- V557 GB 724-01/22			IV
	Sperling	GB 411-02, GB 1007-02, GB 1400-02	I	Sperlingsvögel-Spaltbild	
		HS-DD		FWPV-Spaltbild	
		GB 727-02, GB 320-02		Sperlingsvögel-Spaltbild	
Charadriiformes	Rabenkrähe	GB 1115-02	IV	D	Sperlingsvögel-Spaltbild
Haken-gimpel	GB 1170-02	Sperlingsvögel-Spaltbild			
Triel	GB 182-98	Sperlingsvögel-Spaltbild			
Accipitriformes	Habicht	Habicht	E		Sperlingsvögel-Spaltbild
Psittaciformes	Agapornide	ApIII			Agaporniden-Spaltbild

Insgesamt betrachtet konnten dadurch alle untersuchten Isolate weitgehend den Ordnungen der Vogelarten, von denen das Probenmaterial stammte, zugeordnet werden. Die Isolate, die zu dem Falken-Spaltbild (II/C) geführt hatten, gehörten zu der Ordnung *Falconiformes*. Ebenso gehörte das Agapornidenisolat ApIII, das das Agaporniden-Spaltbild (IV/E) gezeigt hatte, der eigenen Ordnung *Psittaciformes* an. Die untersuchten Isolate, die zum PGPV-Spaltbild (I/B) geführt hatten, gehörten nach der Ordnung entweder zu den *Struthioniformes* oder zu den *Columbiformes*. Zum FWPV-Spaltbild (I/A) führten die Isolate, die von Vogelarten aus der Ordnung *Phasianiformes* stammten – mit Ausnahme des ebenfalls dieses Spaltbild aufweisenden Sperlingsisolates HS-DD. Die anderen Sperlingsisolate (Ordnung *Passeriformes*) ergaben das Sperlingsvögel-Spaltbild (IV/D). Dieses Spaltbild zeigten ebenfalls die untersuchten Isolate aus den Ordnungen *Charadriiformes* (Triel GB 182-98) und *Accipitriformes* (Habicht) sowie auch die anderen untersuchten Isolate der Ordnung *Passeriformes* (Rabenkrähe, Hakengimpel, Kanarienvögel) – jedoch mit der weiteren Ausnahme einiger Kanarienvogelisolates (KP-1, KP1-V557, GB 724-01/22), die durch eine zusätzliche Spaltstelle zu einem eigenen CNPV-Spaltbild (III/D) geführt hatten.

4.3.3 Sequenzanalyse verschiedener Avipockenviren

4.3.3.1 Sequenzierungen

Um die erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen wurden als jeweiliger Vertreter für das Spaltbild bzw. die Vogelart zehn Feldisolate aus acht verschiedenen Ordnungen sowie die zwei Virusstämme HP-B und TP-2 sequenziert. Da die REA der PCR-Produkte von Kanarienvögeln und Sperlingen zu jeweils zwei unterschiedlichen Spaltbildern geführt hatten, wurden von diesen beiden Vogelarten je zwei repräsentative Isolate gewählt (Tab.22). Die gewählten Bezeichnungen für die Avipockenviren zur vereinfachten Darstellung in Tabellen in dieser Arbeit sind ebenfalls in der Tabelle 22 angegeben. Die Nukleotidsequenzen der amplifizierten Region der verschiedenen untersuchten Avipockenvirusstämme und -isolate wurden mit den veröffentlichten Sequenzen des Core-Proteins 4b Gens von FWPV (HP-444) und CNPV (Wheatley C93) verglichen (Tab. 23). Mit Ausnahme der Berechnung der Fragmente, die bei der REA zu erwarten sind, erfolgte die Auswertung der Sequenzen ohne die Primerbindungsstellen.

Tab. 22 Sequenzierte Avipockenviren als ausgewählte Vertreter für die jeweilige Vogelart bzw. das Spaltbild und gewählte Bezeichnungen für die Darstellungen in dieser Arbeit

Pockenvirus	Vertreter für		Gewählte Bezeichnung
	Vogelart	Spaltbild	
Hühnerpockenstamm HP-B	Huhn	FWPV	FWPV-HP-B
Putenisolat GB 134-01	Pute	FWPV	Pute-134-01
Straußenisolat GB 724-01/20	Strauß	PGPV	Strauß-724-01
Taubenpockenstamm TP-2	Taube	PGPV	PGPV-TP-2
Falkenisolat GB 362-02/6	Falke	Falken	Falke-362-02
Kanarienvogelisolat GB 724-01/22	Kanarienvogel	CNPV	Kanarie-724-01
Kanarienvogelisolat GB 1007-02	Kanarienvogel	Sperlingsvögel	Kanarie-1007-02
Sperlingsisolat HS-DD	Sperling	FWPV	Sperling-HSDD
Sperlingsisolat GB 320-02	Sperling	Sperlingsvögel	Sperling-320-02
Rabenkrähenisolat GB 1115-02	Rabenkrähe	Sperlingsvögel	Rabenk.-1115-02
Hakengimpelisolat GB 1170-02	Hakengimpel	Sperlingsvögel	Hakeng.-1170-02
Trielisolat GB 182-98	Triel	Sperlingsvögel	Triel-182-98
Habichtisolat	Habicht	Sperlingsvögel	Habicht
Agapornidenisolat ApIII	Agapornide	Agaporniden	Agaporn.-ApIII

Tab. 23 Ermittelte Sequenzen der Avipockenviren (Core Protein 4b-Genfragment) im Vergleich zu den veröffentlichten Sequenzen von FWPV und CNPV

	1			50
FWPV-HP444	<u>CAGCAGGTGC TAAACAACAA</u>	CGACCTATGC	GTCTTCGTAG	TA---AACCA
FWPV-HP-B	---.....
Pute-134-01	---.....
Sperling-HSDD	---.....
Strauß-724-01		..G.....GTA.....
PGPV-TP-2		..G..CG...GTA.....
Falke-362-02	T.A.	.C.....	..GTA.....
Kanarie-724-01		..T.....A.	.C.CC....A	C.---G...T
Kanarie-1007-02		..T.....A.	.C.CC....A	C.---G...T
Sperling-320-02		..T.....A.	.C.CC....A	C.---G...T
CNPV-C93		..T.....A.	.C.CC....A	C.---G...T
Rabenk.-1115-02		..T.....A.	.C.CC....A	C.---G...T
Triel-182-98		..T.....A.	.C.CC....A	C.---G...T
Habicht		..T.....A.	.C.CC....A	C.---G...T
Hakeng.-1170-02		..T.....A.	.C.CC....A	C.---G...T
Agaporn.-ApIII	T.	...C...CTA	..---.G...T

Fortsetzung Tab. 23

	51				100
FWPV-HP444	AAACCTGATA	TATGTAAAGG	AGTTTCAGAT	TCTGTAAAAC	AAAAAAACAC
FWPV-HP-B
Pute-134-01
Sperling-HSDD
Strauß-724-01C.....T.....G.....T..
PGPV-TP-2C.....T.....G.....T..
Falke-362-02	..T.C.....	C...C..G..A.....G.....
Kanarie-724-01	..GT.A...C	CT.....A.	C.A.A...GA	AA..AT....GT..
Kanarie-1007-02	..GT.A...C	CT.....A.	C.A.A...GA	AA..AT....GT..
Sperling-320-02	..GT.A...C	CT.....A.	C.A.A...GA	AA..AT....GT..
CNPV-C93	..GT.A...C	CT.....A.	C.A.A...GA	AA..AT....GT..
Rabenk.-1115-02	..GT.A...C	CT.....A.	C.A.A...GA	AA..AT....GT..
Triel-182-98	..GT.A...C	CT.....A.	C.A.A...GA	AA..AT....GT..
Habicht	..GT.A...C	CT.....A.	C.A.A...GA	AA..AT....GT..
Hakeng.-1170-02	..GT.A...C	CT.....A.	C.A.A...GA	AA..AT....GT..
Agaporn.-ApIIIC..CG	CC.....GG..	..A.ATG...	..AAT....G...
	101				150
FWPV-HP-444	AATTATCAAC	ATAGATGAAA	TTACATCTAC	TCATGACTGG	CAATATAATC
FWPV-HP-B
Pute-134-01
Sperling-HSDD
Strauß-724-01TA
PGPV-TP-2TA
Falke-362-02	G.....TC...A..	G.....T...
Kanarie-724-01	T..AG.T..TC.....	C.....T...	..G....C.
Kanarie-1007-02	T..AG.T..TC.....	C.....T...	..G....C.
Sperling-320-02	T..AG.T..TC.....	C.....T...	..G....C.
CNPV-C93	T..AG.T..TC.....	C.....T...	..G....C.
Rabenk.-1115-02	T..AG.T..TC.....	C.....T...	..G....C.
Triel-182-98	T..AG.T..TC.....	C.....T...	..G....C.
Habicht	T..AG.T..TC.....	C.....T...	..G....C.
Hakeng.-1170-02	T..AG.T..TA...	...C.....	C.....T...	..G....C.
Agaporn.-ApIII	T.CC..A...	..C.....	..A..G.....	A..C..T...G...
	151				200
FWPV-HP-444	TTAGAAAAGA	CGCAGATGCT	ATAGTAAGAT	ATCTCATGGA	TAGAAAATGT
FWPV-HP-B
Pute-134-01
Sperling-HSDD
Strauß-724-01	.C.....	T.....T.....
PGPV-TP-2	.C.....	T.....T.....
Falke-362-02	T..G..CA.A	..T..T..C	.C..T.....	...G.....
Kanarie-724-01	.A.....	..GCA.....T.A..	...T.....	..AG.....
Kanarie-1007-02	.A.....	..GCA.....T.A..	...T.....	..AG.....
Sperling-320-02	.A.....	..GCA.....T.A..	...T.....	..AG.....
CNPV-C93	.A.....	..GCA.....T.A..	...T.....	..AG.....C
Rabenk.-1115-02	.A.....	..GCA.....T.A..	...T.....	..AG.....C
Triel-182-98	.A.....	..GCA.....T.A..	...T.....	..AG.....C
Habicht	.A.....	..GCA.....T.A..	...T.....	..AG.....C
Hakeng.-1170-02	.A.....	..GCA.....T.A..	...T.....	..AG.....C
Agaporn.-ApIII	.GC.T.....	..G.....	.C..CG.A..	...G.....	C.AT.....

Fortsetzung Tab. 23

	201				250
FWPV-HP-444	GATATAAATA	ACTTTACGAT	ACAAGACCTT	ATTCGCGTTA	TGAGGGAATT
FWPV-HP-B
Pute-134-01
Sperling-HSDD
Strauß-724-01	..C.....G..T...	...A.A....	...A.....
PGPV-TP-2	..C.....G..T...	...A.A....	...A.....
Falke-362-02T..	...G..T...	...A.A....
Kanarie-724-01GA.T..	G.....TT.A	..CA....G.	...A.ACGC.
Kanarie-1007-02GA.T..	G.....TT.A	..CA....G.	...A.ACGC.
Sperling-320-02GA.T..	G.....TT.A	..CA....G.	...A.ACGC.
CNPV-C93GA.T..	G.....TT.A	..CA....G.	...A.ACGC.
Rabenk.-1115-02GA.T..	G.....TT.A	..CA....G.	...A.ACGC.
Triel-182-98GA.T..	G.....TT.A	..CA....G.	...A.ACGC.
HabichtGA.T..	G.....TT.A	..CA....G.	...A.ACGC.
Hakeng.-1170-02GA.T..	G.....TT.A	..CA....G.	...A.ACGC.
Agaporn.-ApIIIG.	..T.....C..	G..G..T..C	..AA.AA.A.	...AA..GC.
	251				300
FWPV-HP-444	AAATATTATT	AGAAATGAAA	GACAAGAGTT	ATTCGAGTTA	CTATCTCATG
FWPV-HP-B
Pute-134-01
Sperling-HSDD
Strauß-724-01G..C....C.
PGPV-TP-2G..C....C.
Falke-362-02	G.....C....A..	...T.....
Kanarie-724-01TCA..G.AC.	...T..A..G	T..G.A....
Kanarie-1007-02TCA..G.AC.	...T..A..G	T..G.A....
Sperling-320-02TCA..G.AC.	...T..A..G	T..G.A....
CNPV-C93TCA..G.AC.	...T..A..G	T..G.A....
Rabenk.-1115-02TCA..G.AC.	...T..A..G	T..G.A....
Triel-182-98TCA..G.AC.	...T..A..G	T..G.A....
HabichtTCA..G.AC.	...T..A..G	T..G.A....
Hakeng.-1170-02TCA..G.AC.	...T..A..G	T..G.A....
Agaporn.-ApIII	T.....A	...TCA..G.AC.	T.....	T.GG.G..C.
	301				350
FWPV-HP-444	TCAAAGGATC	ACTTTCTAGT	AATAGCGTTT	CGGTAAAAAC	GAGTCATCCT
FWPV-HP-B
Pute-134-01
Sperling-HSDD
Strauß-724-01	.T.....	G.....T...	.T..C....	T.....A
PGPV-TP-2	.T.....	G.....T...	.T..C....	T.....A
Falke-362-02	.T.....	T.....T.....	T.....A
Kanarie-724-01	.T..G..G..	T..A.....T..AG	.T....G.G.	C.....
Kanarie-1007-02	.T..G..G..	T..A.....T..AG	.T....G.G.	C.....
Sperling-320-02	.T..G..G..	T..A.....T..AG	.T....G.G.	C.....
CNPV-C93	.T..G..G..	T..A.....T..AG	.T....G.G.	C.....
Rabenk.-1115-02	.T..G..G..	T..A.....T..AG	.T....G.G.	C.....
Triel-182-98	.T..G..G..	T..A.....T..AG	.T....G.G.	C.....
Habicht	.T..G..G..	T..A.....T..AG	.T....G.G.	C.....
Hakeng.-1170-02	.T..G..G..	T..A.....T..AG	.T....G.G.	C.....
Agaporn.-ApIII	.A.....T..	T..C..C...	.CC.....A.	.C.....G..	T.C.....A

Fortsetzung Tab. 23

	35				400
FWPV-HP-444	CTAATGGTTA	TTTATTTCGCA	CTCAGATAAT	AAGATAGGAG	AACAGTTAAA
FWPV-HP-B
Pute-134-01
Sperling-HSDD
Strauß-724-01A.	T.....CG.
PGPV-TP-2A.	T.....CG.
Falke-362-02C..A.	T..G...G.A.....
Kanarie-724-01	...T.A.C..ATA.	TA.....G.	.GA.....	.T...A.G..
Kanarie-1007-02	...T.A.C..ATA.	TA.....G.	.GA.....	.T...A.G..
Sperling-320-02	...T.A.C..ATA.	TA.....G.	.GA.....	.T...A.G..
CNPV-C93	...T.A.C..ATA.	TA.....G.	.GA.....	.T...A.G..
Rabenk.-1115-02	...T.A.C..ATA.	TA.....G.	.GA.....	.T...A.G..
Triel-182-98	...T.A.C..ATA.	TA.....G.	.GA.....	.T...A.G..
Habicht	...T.A.C..ATA.	TA.....G.	.GA.....	.T...A.G..
Hakeng.-1170-02	...T.A.C..ATA.	TA.....G.	.GA.....	.T...A.G..
Agaporn.-ApIII	T.G...A.A.T.CT.C.G..
	401				450
FWPV-HP-444	ACTACTAGAA	AATACATATG	ATCCATCCAG	ATATCAAGCG	TTGATAGATA
FWPV-HP-B
Pute-134-01
Sperling-HSDD
Strauß-724-01T.C.T.G..T	C.....
PGPV-TP-2T.C.T.G..T	C.....
Falke-362-02	GT.....T..A.....C.
Kanarie-724-01	G..TT.....	.C.....T.A	TC..T..T..	...C.....	C.T..T....
Kanarie-1007-02	G..TT.....	.C.....T.A	TC..T..T..	...C.....	C.T..T....
Sperling-320-02	G..TT.....	.C.....T.A	TC..T..T..	...C.....	C.T..T....
CNPV-C93	G..TT.....	.C.....T.A	TC..T..T..	...C.....	C.T..T....
Rabenk.-1115-02	G..TT.....	.C.....T.A	TC..T..T..	...C.....	C.T..T....
Triel-182-98	G..TT.....	.C.....T.A	TC..T..T..	...C.....	C.T..T....
Habicht	G..TT.....	.C.....T.A	TC..T..T..	...C.....	C.T..T....
Hakeng.-1170-02	G..TT.....	.C.....T.A	TC..T..T..	...C.....	C.T..T....
Agaporn.-ApIII	GG.T..T..G...A	CC..T.....	G.....T	C.C.....
	451				500
FWPV-HP-444	CGACTAGGTT	TCAATCAACA	AACTTTGTTG	ACATGTCAAC	ATCTAGTGAT
FWPV-HP-B
Pute-134-01
Sperling-HSDD
Strauß-724-01	.T..G.....T..G.	.T.....	G.....
PGPV-TP-2	.T..G.....T..G.	.T.....	G.....
Falke-362-02	.T.....A..T..T.A.	.T.....G.
Kanarie-724-01	.T..A..A..	C.....T..TA.	.T.....T..	G...TC....
Kanarie-1007-02	.T..A..A..	C.....T..TA.	.T.....T..	G...TC....
Sperling-320-02	.T..A..A..	C.....T..TA.	.T.....T..	G...TC....
CNPV-C93	.T..A..A..	C.....T..TA.	.T.....T..	G...TC....
Rabenk.-1115-02	.T..A..A..	C.....T..TA.	.T.....T..	G...TC....
Triel-182-98	.T..A..A..	C.....T..TA.	.T.....T..	G...TC....
Habicht	.T..A..A..	C.....T..TA.	.T.....T..	G...TC....
Hakeng.-1170-02	.T..A..A..	C.....T..TA.	.T.....T..	G...TC....
Agaporn.-ApIIIA..	...G..T..TA.T..	T...TCA...

Fortsetzung Tab. 23

	501				550
FWPV-HP-444	ATGTTATTTA	GATTCAAAGA	CCAGGATTCC	ATAGGCTACG	TTCATCCTAT
FWPV-HP-B
Pute-134-01
Sperling-HSDD
Strauß-724-01G....T....T....
PGPV-TP-2G....T....T....
Falke-362-02G.C..TT..T.
Kanarie-724-01	..CC.G....	T..A.....TT..TA	.A.....A..
Kanarie-1007-02	..TC.G....	T..A.....TT..TA	.A.....A..
Sperling-320-02	..TC.G....	T..A.....TT..TA	.A.....A..
CNPV-C93	..TC.G....	T..A.....TT..TA	.A.....A..
Rabenk.-1115-02	..TC.G....	T..A.....TT..TA	.A.....A..
Triel-182-98	..TC.G....	T..A.....TT..TA	.A.....A..
Habicht	..TC.G....	T..A.....TT..TA	.A.....A..
Hakeng.-1170-02	..TC.G....	T..A.....TT..TA	.A.....A..
Agaporn.-ApIII	..TC.T..C.	.G.....	T..A.....TT..T.	.A.....C..
	551			581	
FWPV-HP-444	ATTAGTTGCT	<u>TTATTCGGCG</u>	<u>TTAAGCTACC</u>	G	
FWPV-HP-B	
Pute-134-01	
Sperling-HSDD	
Strauß-724-01	
PGPV-TP-2	
Falke-362-02	
Kanarie-724-01	...G..A...	.	.	.	
Kanarie-1007-02	...G..A...	.	.	.	
Sperling-320-02	...G..A...	.	.	.	
CNPV-C93	...G..A...	.	.	.	
Rabenk.-1115-02	...G..A...	.	.	.	
Triel-182-98	...G..A...	.	.	.	
Habicht	...G..A...	.	.	.	
Hakeng.-1170-02	...G..A...	.	.	.	
Agaporn.-ApIII	.A.G..A..G	.	.	.	

4.3.3.2 Berechnung der mittels REA zu erwartenden Fragmente

Anhand der Sequenzen konnten die jeweiligen Fragmentgrößen errechnet werden, die durch die Restriktionsenzyme *EcoRV*, *NlaIII*, *MseI* bzw. *DpnII* bei den einzelnen Avipockenviren zu erwarten sind. Es zeigte sich, dass die durch die REA für die jeweiligen Avipockenviren erhaltenen Spaltbilder in allen Fällen mit den errechneten Fragmentgrößen übereinstimmen (Tab. 24 und Tab. 25).

Tab. 24 Darstellung der Spaltbilder und Fragmentgrößen der 14 sequenzierten Avipockenvirusstämme bzw. -isolate bei Verwendung der Enzyme *EcoRV* und *NlaIII*.

	FWPV-HP-B Pute-134-01 Sperling-HSDD	Strauß-724-01 PGPV-TP-2	Falke-362-02	Kanarie-724-01	Kanarie-1007-02 Sperling-320-02 Rabenk.-1115-02, Triel-182-98, Habicht, Hakeng.-1170-02	Agaporn.- ApIII
<i>EcoRV</i>				497	578	
			432			
	252					
	177	180				
	149					
			81			
<i>NlaIII</i>		446				
			281			
						264
						218
	185		156	165		
	132	135		132		
	112					
	96					96
53		64 + 71				

Die unterlegten Felder stellen die durch die Fragmente entstandenen Banden im Agarosegel nach der Elektrophorese dar. Die Zahlen entsprechen den nach der Sequenzierung errechneten Fragmentgrößen (in bp) und wurden in abnehmender Größe von oben nach unten eingezeichnet. Durch Anwendung der REA nicht weiter differenzierbare Virusstämme und -isolate wurden in den Spalten zusammengefasst.

Tab. 25 Darstellung der Spaltbilder und Fragmentgrößen der 14 sequenzierten Avipockenvirusstämme bzw. -isolate bei Verwendung der Enzyme *Msel* und *DpnII*.

	FWPV-HP-B Pute-134-01 Sperling-HSDD	Strauß-724-01 PGPV-TP-2	Falke-362-02	Kanarie-724-01	Kanarie-1007-02 Sperling-320-02 Rabenk.-1115-02, Triel-182-98, Habicht, Hakeng.-1170-02	Agaporn.- ApIII
<i>Msel</i>						321
			301			
				270		
	246	249				247
	175					
	147		130			
		118				
		95		103		
		52 + 57	45	53 + 69 + 73		
10						
<i>DpnII</i>	303					
						257
		224		205		221
		162				
		113		128 + 129		
		82		63		
				53		37

Die unterlegten Felder stellen die durch die Fragmente entstandenen Banden im Agarosegel nach der Elektrophorese dar. Die Zahlen entsprechen den nach der Sequenzierung errechneten Fragmentgrößen (in bp) und wurden in abnehmender Größe von oben nach unten eingezeichnet. Durch Anwendung der REA nicht weiter differenzierbare Virusstämme und -isolate wurden in den Spalten zusammengefasst.

4.3.3.3 Homologien der Avipockenvirus-Sequenzen auf Nukleotidebene

4.3.3.3.1 Homologien der Avipockenvirus-Sequenzen zur FWPV-Sequenz

Der Hühnerpockenimpfstoff HP-B und die Feldisolate der Pute GB 134-01 sowie des Sperlings HS-DD zeigten eine zur veröffentlichten FWPV-Sequenz (Stamm HP-444) identische Nukleotidabfolge der 538 bp (100 % Homologie). Das Feldisolat vom Strauß GB 724-01/20, der Taubenpockenstamm TP-2 und der Falke GB 362-02/6 wiesen eine Insertion von drei aufeinanderfolgenden Nukleotiden (insgesamt 541 bp) auf. Während das Feldisolat vom Strauß GB 724-01/20 und der Taubenpockenstamm TP-2 beide eine Homologie von 91 % zur FWPV-Sequenz besaßen, zeigte die für den Falken GB 362-02/6 erhaltene Sequenz eine Homologie von 88 % zur FWPV-Sequenz. Die Homologie zur FWPV-Sequenz der weiteren untersuchten und sequenzierten Isolate (Kanarienvogel GB 724-01/22, Kanarienvogel GB 1007-02, Sperling GB 320-02, Rabenkrähe GB 1115-02, Triel GB 182-98, Habicht, Hakengimpel GB 1170-02 und Agapornidenisolat ApIII) betrug jeweils 74 % (Tab. 26 und 28).

4.3.3.3.2 Homologien der Avipockenvirus-Sequenzen untereinander

Das Feldisolat vom Strauß GB 724-01/20 und der Taubenpockenstamm TP-2 zeigten zueinander 99% Homologie. Die Feldisolate des Kanarienvogels GB 1007-02 und des Sperlings GB 320-02 besaßen in Nukleotidebene 100 % Homologie. Ebenfalls zeigten die Feldisolate der Rabenkrähe GB 1115-02, des Triels GB 182-98 und des Habichts eine zu der veröffentlichten CNPV-Sequenz identische Nukleotidabfolge. Diese beiden Sequenzen unterschieden sich untereinander sowie zum Hakengimpel GB 1170-02 und zum Kanarienvogel GB 724-01/22 in 1% Divergenz. Die Sequenzen des Falkenisolates GB 362-02/6 bzw. des Agapornidenisolates ApIII ließen deutlich geringere Homologiegrade zu den anderen Sequenzen erkennen (73-88 % bzw. 73-75 %) (Tab. 28).

Tab. 26 Homologiegrade (in %) verschiedener Avipockenviren zu den Sequenzen von FWPV (Stamm HP-444) und CNPV (Stamm Wheatley C93) im Core Protein 4b Gen-Abschnitt und die Registrierungsnummern der Gen-Datenbank im Internet (GenBank Accession-Nr.)

Homologie zu		Sequenz	GenBank Accession Nr.
FWPV	CNPV		
100 %	74 %	FWPV-HP-B	AY530302
100 %	74 %	Pute-134-01	AY530304
100 %	74 %	Sperling-HSDD	AY530307
91 %	74 %	Strauß-724-01	AY530305
91 %	72 %	PGPV-TP-2	AY530303
88 %	75 %	Falke-362-02	AY530306
74 %	99 %	Kanarie-724-01	AY530309
74 %	99 %	Kanarie-1007-02	
74 %	99 %	Sperling-320-02	AY530308
74 %	100 %	Rabenk.-1115-02	
74 %	100 %	Triel-182-98	AY530310
74 %	100 %	Habicht	
74 %	99%	Hakeng.-1170-02	
74 %	74%	Agaporn.-ApIII	AY530311

4.3.3.4 Homologien der Avipockenvirus-Sequenzen auf Aminosäurenebene

Nach Ableitung der Nukleinsäuresequenzen in Aminosäuresequenzen konnten die Homologiegrade der Avipockenviruspezies auf Aminosäurenebene ermittelt werden (Tab. 27 und 28).

Tab. 27 Aminosäuresequenzen durch Ableitung der Avipockenvirussequenzen im amplifizierten Bereich des Core Protein 4b Gens

FWPV-HP-B	RPMRLRS-KPKPDICKGVSDSVKQKNTIINIDEITSTHDWQYNLRKDADA
Pute-134-01-.....
Sperling-HSDD-.....
Strauß-724-01S.....L..G.....
PGPV-TP-2	..V....S.....L..G.....
Falke-362-02	..L....S...S.T...T.....T
Kanarie-724-01	..I.P.N-R..S.P..SDTGND...S..V.....GN.
Kanarie-1007-02	..I.P.N-R..S.P..SDTGND...S..V.....GN.
Sperling-320-02	..I.P.N-R..S.P..SDTGND...S..V.....GN.
Rabenk.-1115-02	..I.P.N-R..S.P..SDTGND...S..V.....GN.
Triel-182-98	..I.P.N-R..S.P..SDTGND...S..V.....GN.
Habicht	..I.P.N-R..S.P..SDTGND...S..V.....GN.
Hakeng.-1170-02	..I.P.N-R..S.P..SDTGND...S..V...K.....GN.
Agaporn.-ApIII	..I.P.Y-.....A.R.DM..N...S.T.....S...G..
FWPV-HP-B	IVRYLMDRKCDINNFTIQDLIRVMRELNIIRNERQELFELLSHVKGSLSS
Pute-134-01
Sperling-HSDD
Strauß-724-01
PGPV-TP-2
Falke-362-02	...H....E.....
Kanarie-724-01	..K....K....R...M....S..KT.....S.....A.....
Kanarie-1007-02	..K....K....R...M....S..KT.....S.....A.....
Sperling-320-02	..K....K....R...M....S..KT.....S.....A.....
Rabenk.-1115-02	..K....K....R...M....S..KT.....S.....A.....
Triel-182-98	..K....K....R...M....S..KT.....S.....A.....
Habicht	..K....K....R...M....S..KT.....S.....A.....
Hakeng.-1170-02	..K....K....R...M....S..KT.....S.....A.....
Agaporn.-ApIII	TAK....N....K...M....I.K.....S.....A.....

Fortsetzung Tab. 27

FWPV-HP-B	NSVSVKTSHPMLVIYSHSDNKIGEQKLLLENTYDPSRYQALIDTTRFQST
Pute-134-01
Sperling-HSDD
Strauß-724-01
PGPV-TP-2
Falke-362-02S.....
Kanarie-724-01	..A.RA...LA..YNT.SR..D.M...T.FI.....
Kanarie-1007-02	..A..A...LA..YNT.SR..D.M...T.FI.....
Sperling-320-02	..A..A...LA..YNT.SR..D.M...T.FI.....
Rabenk.-1115-02	..A..A...LA..YNT.SR..D.M...T.FI.....
Triel-182-98	..A..A...LA..YNT.SR..D.M...T.FI.....
Habicht	..A..A...LA..YNT.SR..D.M...T.FI.....
Hakeng.-1170-02	..A..A...LA..YNT.SR..D.M...T.FI.....
Agaporn.-ApIII	T.....T...I.....V.....T.....
FWPV-HP-B	NFVDMSTSSDMLFRFKDQDSIGYVHPILVA
Pute-134-01
Sperling-HSDD
Strauß-724-01
PGPV-TP-2
Falke-362-02	..L..A.....S.....
Kanarie-724-01I.....I.....
Kanarie-1007-02I.....I.....
Sperling-320-02I.....I.....
Rabenk.-1115-02I.....I.....
Triel-182-98I.....I.....
HabichtI.....I.....
Hakeng.-1170-02I.....I.....
Agaporn.-ApIIII.....M..

Das Isolat vom Strauß GB 724-01/20 und der Taubenpockenstamm TP-2 wiesen zum FWPV-Genom eine Homologie von 98% bzw. 97% der Aminosäurenabfolge auf (Tab. 28). Ihre Sequenzen verfügten wie das Isolat vom Falken GB 362-02/6 durch die Insertion der drei Nukleotide über eine zusätzliche Aminosäure an derselben Lokalisation. Das Falkenisolat besaß eine Homologie von 93% zur FWPV-Sequenz. Die Aminosäuresequenzen der Isolate vom Kanarienvogel GB1007-02, vom Sperling

Die durch Anwendung der FP1/FP2-PCR in Kombination mit REA als Sperlingsvögel-Spaltbild bezeichneten und nicht weiter differenzierbaren Avipockenvirusisolate (Kanarienvogel GB 1007-02, Sperling GB 320-02, Rabenkrähe GB 1115-02, Triel GB 182-98, Habicht sowie Hakengimpel GB 1170-02) zeigten beim Vergleich der Aminosäuresequenzen untereinander eine Homologie von 100%, mit Ausnahme des Hakengimpelisolates, zu dem die anderen Isolate eine Homologie von 99 % aufwiesen.

4.3.4 Phylogenetische Analyse

Zur Ermittlung der phylogenetischen Beziehungen der untersuchten Avipockenviren wurde mit den Sequenzen mittels der neighbor-joining Methode ein Stammbaum erstellt. Neben den 14 erhaltenen Sequenzen wurden die veröffentlichten Sequenzen von FWPV (Stamm HP-444) und CNPV (Stamm Wheatley C93) mit einbezogen.

Der Stammbaum zeigt neben den einzelnen Aufzweigungen des Falken GB 362-02/6 und des Agaporniden ApIII eine Aufteilung in drei weitere Gruppen (Abb. 28). Gruppe 1 enthält den FWPV-Stamm HP444, den Hühnerpockenstamm HP-B, das Putenisolat GB 134-01 sowie den Sperling HS-DD. Gruppe 2 enthält den Strauß GB 724-01/20 und den Taubenpockenstamm TP-2. Gruppe 3 enthält den CNPV-Stamm Wheatley C93 sowie die Pockenvirusisolate von den Kanarienvögeln GB 724-01/22 und GB 1007-02, dem Sperling GB 320-02, der Rabenkrähe GB 1115-02, dem Triel GB 182-98, dem Habicht und dem Hakengimpel GB 1170-02. Bei Zuordnung der Spaltbilder, die durch die REA erzielt wurden, zeigte sich, dass alle Pockenvirusisolate, die in der REA zu dem FWPV-Spaltbild (I/A) geführt haben, in der Gruppe 1 zu finden sind. Die Gruppe 2 enthält das Isolat vom Strauß GB 724-01/20 und den Taubenstamm TP-2, die mittels REA ebenfalls nicht voneinander, aber von den weiteren Pockenvirusisolaten unterschieden werden konnten (PGPV-Spaltbild, I/B). In der Gruppe 3 sind die Pockenviren zusammengefasst, die entweder zu dem CNPV- (III/D) oder zum Sperlingsvögel-Spaltbild (IV/D) geführt haben. Die Einzelaufzweigungen des Falken GB 362-02/6 bzw. des Agaporniden ApIII haben in der REA zu eigenständigen Spaltbildern geführt (Falken- (II/C) bzw. Agaporniden-Spaltbild (IV/D)). Die Einteilung der Gruppen durch die phylogenetische Analyse entspricht somit den Ergebnissen, die mittels REA erzielt wurden.

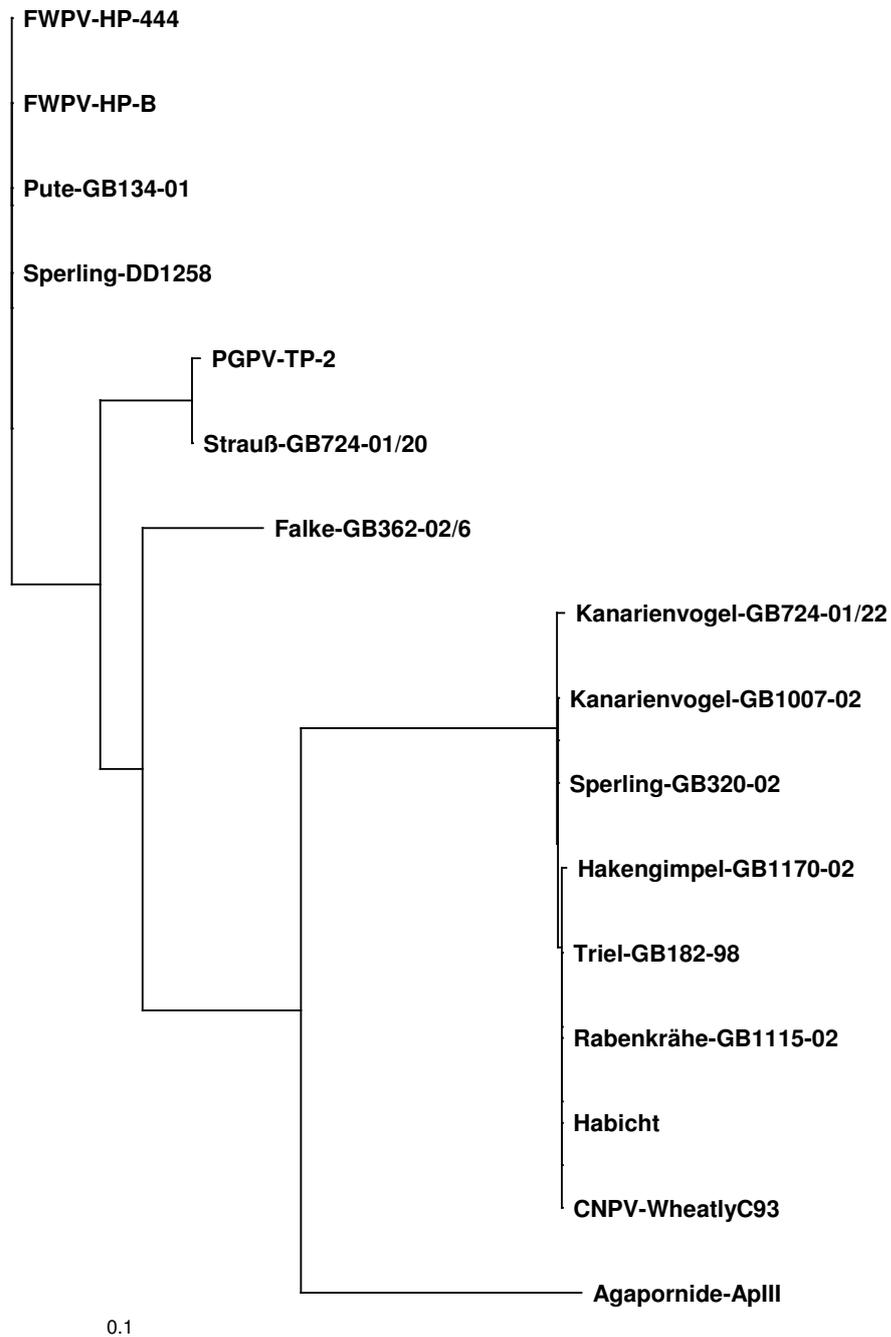


Abb. 28 Phylogenetischer Stammbaum der in dieser Arbeit untersuchten Avipockenviren und der publizierten Stämme FWPV HP-444 und CNPV Wheatley C93, verwurzelt in FWPV HP-444. Die Erstellung erfolgte mittels neighbor-joining Methode und basierte auf einem 538 - 541 bp großen Core Protein 4b Gen-Abschnitt. Die Skalierung 0.1 entspricht 0.1 Nukleotid-Austausche pro Position.