

5 Diskussion

Die gezielte Diagnostik von Virusinfektionen spielt bei großen Nutzgeflügelbeständen eine wichtige Rolle, denn die hohe Tierbesatzdichte begünstigt die Ausbreitung von Krankheitserregern. Ausbruch und Verbreitung einer viralen Erkrankung wie Geflügelpocken können durch Leistungsabfall und erhöhte Mortalität innerhalb kurzer Zeit zu großen wirtschaftlichen Verlusten führen. Daher ist eine schnelle Diagnostik mit genauer Erregeridentifizierung wichtig. Im ersten Abschnitt der vorliegenden Dissertation wurde aus diesem Grund eine Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Nachweis von Geflügelpocken unter Verwendung der von LEE und LEE (1997) beschriebenen Primer für das FWPV-Core Protein 4b Gen (HP444) etabliert.

Es wurde anfangs Hühnerpockenimpfstoff (HP-B) und Material von Hühnern und Puten in der PCR eingesetzt, in dem mittels Elektronenmikroskopie (EM) und Agargelpräzipitationstest (AGP) Pockenvirus nachgewiesen wurde. Die Spezifität der PCR wurde durch die konstante Amplifikatgröße von 578 bp sowie durch die Restriktionsenzymanalyse (REA) und durch die vollständige Übereinstimmung des sequenzierten Amplifikates vom Hühnerpockenimpfstoff (HP-B) und vom Putenisolat GB 134-01 mit der veröffentlichten FWPV-Sequenz (HP444) bestätigt. In der PCR überprüfte DNA anderer aviärer Viren führte zu keiner Amplifikatbildung.

LEE und LEE (1997) verwendeten die beschriebenen Primer lediglich für den Nachweis von FWPV-DNA in Hühnerpockenimpfstoffen sowie in Isolaten von Hühnern, wobei sich die ausgewählten Primersequenzen als gut konserviert zeigten. Es sollte hier jedoch eine PCR zur Anwendung im Wirtschaftsgeflügelbereich entwickelt werden, der neben verschiedenen Nutzungsrichtungen von Hühnern (z. B. Legehennen oder Mastelertiere) vor allem auch Puten (Mastputen, Putenelertiere) umfasst. Die in dieser Arbeit etablierte FP1/FP2-PCR wurde im Rahmen der Diagnostik für Geflügelpocken bei Hühnern und Puten verschiedener Nutzungsrichtungen eingesetzt. Es zeigte sich, dass der Nachweis von Geflügelpocken hiervon unabhängig erfolgte. Für weitere Arten an Wirtschaftsgeflügel, wie zum Beispiel Enten, Gänse oder Wachteln, von denen in den Jahren 2001 bis 2003 keine Proben mit Verdacht einer Pockeninfektion an das Institut für

Geflügelkrankheiten der FU Berlin eingesandt wurden, muss die PCR noch überprüft werden. Ein Nachweis von Geflügelpocken bei diesen Arten wäre im Hinblick auf die im Weiteren dieser Arbeit gewonnene Erkenntnis, dass mittels dieser PCR noch andere verschiedene Avipockenvirusstämme und –isolate erfasst werden konnten, zu erwarten.

Die Bestimmung der Sensitivität ergab unter Verwendung einer gereinigten Virus-DNA (HP-1) eine Mindestanzahl von 150 Genomäquivalenten bei Analyse der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese. Die Sensitivität der PCR wurde im Vergleich auch mittels Dot Blot-Verfahren ermittelt. Hier zeigte sich ein Nachweis ab mindestens 75 Genomäquivalenten. Eine gesteigerte Sensitivität steht im Einklang mit den von LEE (1992) erzielten Ergebnissen. Die durchgeführte Vergleichsuntersuchung zeigte jedoch, dass dieses Verfahren aufgrund von Zeitintensivität und Kosten nicht für die routinemäßige Diagnostik geeignet ist. Mittels der PCR kann der Nachweis hühnerpockenvirus-spezifischer DNA ohne vorherige Virusanzucht spezifisch und aufgrund der einfachen und schnellen Durchführung routinemäßig innerhalb von ein bis zwei Tagen erfolgen. Damit bietet diese PCR Vorteile gegenüber den bisher konventionell angewendeten Verfahren zum Nachweis von Geflügelpocken (EM, histopathologische Untersuchung, Immunfluoreszenztest, AGP und Virusisolierung mit anschließender Erregeridentifizierung). Durch die im Weiteren der Arbeit gezeigte einfache und schnelle Differenzierungsmöglichkeit hat die PCR einen weiteren Vorteil gegenüber den bisher konventionell angewendeten Nachweisverfahren. Darüber hinaus stellt die PCR eins der sensitivsten Verfahren dar, das zur Routinediagnostik geeignet ist (PAULI et al., 1991). Eigene, parallel durchgeführte Untersuchungen mittels AGP zeigten die für dieses Verfahren beschriebene geringere Sensitivität (TADESE et al, 2003). In nur 7 von 10 AGP-Untersuchungen wurde das positive PCR-Ergebnis bestätigt. LEE und LEE (1997) stellten für die PCR mit dem hier gewählten Primerpaar eine im Vergleich zur Virusisolierung zehnfach höhere Sensitivität fest. Die in dieser Arbeit durchgeführten Vergleichsuntersuchungen mittels Virusisolierung (bis zur 1. Passage) mit anschließender Erregeridentifizierung zeigten ebenfalls, dass dieses Verfahren in seiner Sensitivität der PCR unterlegen ist: 4 von 10 Virusisolierungen führten zu keinen eindeutigen Ergebnissen und bei einer Untersuchung konnte kein Virus isoliert werden, während mittels der FP1/FP2-PCR hühnerpockenvirus-spezifische DNA nachgewiesen wurde. Die positiven

PCR-Ergebnisse wurden durch mindestens ein weiteres konventionelles Nachweisverfahren (EM, AGP) bestätigt. Eine Ausnahme stellte nur die Einsendung GB 49-01 dar, bei der im Gegensatz zur PCR mittels konventioneller Verfahren keine Pockenvirusinfektion nachgewiesen werden konnte. Im Nachhinein kann bei dieser Probe eine Kontamination nicht ausgeschlossen werden. Um diese Fehlerquelle zu minimieren, wurden viele Maßnahmen zur Verhinderung von Kontaminationen getroffen, wie separierte Arbeitsräume für die einzelnen Arbeitsstufen (DNA-Extraktion, Zugabe der Primer, Zuführen der DNA, PCR-Produktanalyse, Herstellung von Reagenzien und Lösungen), arbeitsraumabhängige Laborkleidung und Benutzung von gestopften Einmalpipettenspitzen. Um dennoch möglicherweise aufgetretene Kontaminationen nachweisen zu können, wurden bei jeder Untersuchung eine DNA-Präparationskontrolle und eine PCR-Reagenzienkontrolle mitgeführt.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit Untersuchungen zur Epidemiologie von Geflügelpocken. Bis zum Jahr 1999 wurde über einen Zeitraum von 25 Jahren von keinen Pockeninfektionen mehr beim intensiv gehaltenen Wirtschaftsgeflügel in Deutschland berichtet. Seit 1999 wurden jedoch wieder Pockeninfektionen in verschiedenen Geflügelhaltungen in Deutschland festgestellt (HAFEZ et al., 2001a, 2001b; KALETA et al., 2001). Die Erkrankungen traten zuerst bei Legehennen in alternativen Haltungssystemen (Bodenhaltung mit Auslauf, Freilandhaltung), im Jahr 2000 auch in Käfighaltungen auf. Die weitere zeitliche Verteilung der Geflügelpocken sollte anhand der Auswertung der vorberichtlichen Angaben zum Probenmaterial, das mit der Verdachtsdiagnose Geflügelpocken in den Jahren von 2001 bis 2003 eingesandt wurde, untersucht werden. Falsch-negative Ergebnisse der PCR aufgrund nicht erfolgreicher DNA-Extraktion oder in der Probe vorliegender Inhibitoren wurden durch Nachweis Hühner- β -Aktin-spezifischer DNA in der extrahierten DNA ausgeschlossen.

Im Jahr 2001 wurden in 27 Beständen Geflügelpockeninfektionen festgestellt. In den darauffolgenden Jahren zeigte sich eine deutlich abnehmende Tendenz von 2002 mit 20 Pockeninfektionen bis 2003 mit nur noch 9 Infektionen. Diese Tendenz ist vermutlich auf die in vielen Betrieben durchgeführte Impfung zurückzuführen.

Das FWPV-Wiederauftreten seit 1999 betraf hauptsächlich Hühner (85,7%), insbesondere Legehennen, und nur in geringem Maße Putenbestände. Ob Puten tatsächlich zu einem geringeren Anteil betroffen waren, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht festgestellt werden, weil auf die Anzahl der eingesandten Proben der jeweiligen Nutzungsrichtung kein Einfluss genommen werden konnte. Darüber hinaus konnte nicht unterschieden werden, ob bei den betroffenen Puten die Infektionen durch FWPV oder TKPV verursacht worden sind, sodass diese Beobachtung möglicherweise bei alleinigem FWPV-Wiederauftreten durch die geringere Empfänglichkeit der Puten für FWPV (MAYR, 1992) begründet sein kann.

Möglicherweise steht die Ursache des Wiederauftretens von Geflügelpocken im Zusammenhang mit der zunehmenden Umstellung von Käfighaltung auf alternative Haltungssysteme (Freiland-, Boden-, intensive Auslauf-, Volierenhaltung) bei Legehennen (HAFEZ et al., 2001b). In den Jahren 1994 bis 2000 sank der Anteil an Legehennen in Käfighaltung kontinuierlich von 94,5 % auf 86,5 %. Zeitgleich stieg der Anteil an Legehennen in Freilandhaltung von 0,9 % auf 6,2 % (ZMP 2001). Die These wird unterstützt durch die Feststellung, dass Geflügelpocken zuerst bei Legehennen in Freilandhaltung beobachtet wurden. Die eigenen Untersuchungen zeigten, dass von allen Nutzungsrichtungen vorrangig bei Legehennen (67,8 %) Geflügelpockeninfektionen auftraten. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass auch am häufigsten Proben von dieser Nutzungsrichtung eingesandt wurden.

Die durch die EU-Richtlinie 1999/74/EG und deren Umsetzung (Erste Verordnung zur Änderung der Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung vom 28.02.2002, „Legehennen-Haltungsverordnung“) geforderte Gewährung von Auslauf bietet durch Witterungen und Kontakt mit freilebenden Wildvögeln sowie Insekten ein größeres Übertragungspotential verschiedener Krankheitserreger als die bisherige Käfighaltung. In diesem Zusammenhang wurde auch das Wiederauftreten der Erkrankungen Rotlauf und Schwarzkopfkrankheit in Legehennenbeständen mit alternativen Haltungssystemen beobachtet (HAFEZ, 2002). Erkrankungen, die durch Faktoren begünstigt auftreten, die auf klimatischen Einflüssen und lebenden Vektoren beruhen, zeigen eine saisonale Rhythmik (GRATZL und KÖHLER, 1968; MAYR, 1993). Durch vermehrtes Auftreten in

den Herbstmonaten Oktober und November konnte eine saisonale Rhythmik festgestellt werden. Avipockenvirus-spezifische DNA konnte in Proben von Legehennen sowohl in Freiland- als auch in Käfighaltung nachgewiesen werden.

Die Übertragung von Geflügelpockeninfektionen über Milben wird diskutiert, wobei den Milben eine mechanische Vektorrolle zugesprochen wird (DORN, 1971; SHIRINOV et al., 1972). DAMASSA (1966) konnte in Arthropoden keine Virusvermehrung nachweisen. Aus diesem Grund wurden Milben von drei Beständen, die zeitgleich Milbenbefall und Geflügelpocken aufwiesen, gesammelt und zur Befreiung von Feder-, Haut- und Staubpartikeln in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Milben wie Gewebeproben der DNA-Extraktion unterzogen sowie in der FP1/FP2-PCR untersucht. In allen drei Fällen wurde auf diese Weise FWPV-DNA nachgewiesen. Trotz der angewandten Vorgehensweise mit Waschen der Milben in PBS kann allerdings nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass noch Reste an virushaltigen Fremdpartikeln vorhanden waren. Versuche der Virusanzucht in Hühnerembryonen auf der CAM durch Inokulation von Milbenmaterial verliefen negativ. Zur Beantwortung der Frage nach der Übertragung durch Milben sind weitere Untersuchungen notwendig, wie etwa zur potentiellen Infektiosität der Viren in den Milben.

Ein Grund für das Wiederauftreten der Geflügelpocken könnte die weitgehende Einstellung der prophylaktischen Pockenimpfung beim Wirtschaftsgeflügel gewesen sein (MAYR, 1992). Bei Betrachtung des Auftretens in den einzelnen Betrieben lässt sich erkennen, dass hauptsächlich nur ein Bestand pro Betrieb an Pocken erkrankte. Getroffene Maßnahmen werden einen Ausbruch der Geflügelpocken bei einem weiteren Bestand des Betriebes verhindert haben. In den eigenen Untersuchungen konnten in geimpften Beständen keine Geflügelpocken nachgewiesen werden, sodass die Impfung einen ausreichenden Schutz gegen Feldinfektionen zu bieten scheint. Das plötzliche Auftreten 1999 könnte also in der Impfmüdigkeit begründet sein. Die These wird gestützt durch die Beobachtung der abnehmenden Tendenz an Infektionen seit 2002 und die in vielen Betrieben wieder durchgeführten Schutzimpfungen gegen Geflügelpocken.

In den USA traten dagegen Geflügelpocken in pockengeimpften Beständen auf (SINGH et al., 2000). Als mögliche Erklärung wird das Auftreten von Variantstämmen diskutiert. Die Größe des FWPV-Genoms und das Vorhandensein vieler nicht essentieller Proteine begünstigen das Entstehen von Virusvarianten durch zum Beispiel genetischen Austausch mit anderen Viren (SINGH et al., 2000).

Die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit von 2001 bis 2003 im Gegensatz zu den Angaben von MAYR (1992) die Hautform häufiger als die Mischform beobachtet wurde, könnte ein Hinweis darauf sein, dass in den letzten Jahren andere Stämme für die Feldinfektionen verantwortlich waren. Solange aber nähere Zusammenhänge nicht geklärt sind, bleiben solche Überlegungen jedoch Spekulation. Außerdem wurde die Zuordnung der Verlaufsform häufig anhand des eingesandten Probenmaterials vorgenommen, was nicht unbedingt den tatsächlichen Gegebenheiten entsprechen muss.

SINGH et al. (2000) stützten ihre These der Variantstämmen durch genetische und antigenetische Unterschiede zwischen Impf- und Feldvirus, welche auch andere Arbeitsgruppen feststellten (SCHNITZLEIN et al., 1988; GHILDYAL et al., 1989). Als weiteren Anhaltspunkt führen sie die genetische Integration von Retikuloendotheliosevirus (REV) an. Im Gegensatz zu Impfstoffen konnten bei FWPV-Feldisolaten vollständige REV-Sequenzen nachgewiesen werden (HERTIG et al., 1997; DIALLO et al., 1998; GARCIA et al., 2003). Des Weiteren führen SINGH et al. (2000) an, dass FWPV-Infektionen in den USA eventuell durch eine erhöhte Virulenz aufgrund der REV-Integration, insbesondere der immunsuppressiven Wirkung von REV, entstanden sein könnten. Als weitere nicht auszuschließende Möglichkeit könnten die beobachteten FWPV-Feldinfektionen in prophylaktisch geimpften Beständen auch durch Fehler bei der Impfstoffanwendung, durch geringe Immunogenität des Impfstoffes oder Interferenzen zwischen Impfstoffwirkung und passiver Immunität begründet sein (FATUNMBI und REED, 1996; BOYLE et al., 1997). Der Überlegung, dass das Wiederauftreten der Geflügelpocken auch in Deutschland aufgrund der Entstehung neuer Varianten beruhen könnte, widerspricht jedoch die Beobachtung, dass in geimpften Beständen keine Geflügelpocken beobachtet wurden. Des Weiteren konnten mittels REA keine Unterschiede in Abhängigkeit von der Herkunft des Untersuchungsmaterials (Feldisolate

oder FWPV-Stämme) festgestellt werden. Darüber hinaus zeigte die Sequenzanalyse keine Unterschiede zu der publizierten FWPV-Sequenz, sodass eine hohe Sequenzkonservierung innerhalb FWPV angenommen werden kann.

Über die Frage, ob bei der zunehmenden Umstellung von der Käfigform auf Freilandhaltung eine gleichzeitige Wiederaufnahme der prophylaktischen Impfung das Wiederauftreten von FWPV verhindert hätte, kann nur spekuliert werden. Da bei den Untersuchungen von geimpften Beständen in Deutschland keine Pockeninfektionen beobachtet wurden, erscheint dies durchaus denkbar. Für diese These spricht die beobachtete abnehmende Tendenz an Infektionen seit 2002 durch in vielen Betrieben durchgeführte Schutzimpfungen gegen Geflügelpocken.

Neben der Untersuchung der zeitlichen Verteilung und der Ursachen befassen sich epidemiologische Studien mit der Untersuchung der Häufigkeit des Auftretens und der räumlichen Verteilung (MAYR, 1993). Aufgrund der unterschiedlichen Anzahlen von Einsendungen pro Art des Geflügels und Herkunft der Einsendung lassen sich die ermittelten Anteile jedoch nur bedingt bewerten. Trotzdem sind anhand der Auswertung zwei Grundaussagen festzustellen:

Es zeigte sich keine vorrangig von Geflügelpocken betroffene Altersklasse. Bei Legehennen, die wirtschaftlich bis zur 72.-75. Lebenswoche gehalten werden, traten Geflügelpocken von der 8. bis zur 75. Woche auf. Bei Mastelertieren, die bis zur 65. Lebenswoche zur Zucht genutzt werden, wurden Geflügelpocken von der 35. bis zur 57. Woche festgestellt. Von Tieren, die jünger als acht Wochen waren, wurde kein Untersuchungsmaterial eingesandt. Diese Feststellungen stimmen mit den Literaturangaben überein: Nach TRIPATHY und REED (2003) erkrankten die Tiere unabhängig von der Altersklasse an Pocken und GRZIMEK (1957) beobachtete die Erkrankung bei Jungtieren unter sechs Wochen seltener. Die kurze Mastzeit von 4 bis 5 Wochen für Masthühner könnte somit eine Erklärung für die Tatsache sein, dass bei dieser Nutzungsrichtung kein Verdacht auf Geflügelpocken beobachtet wurde.

Geflügelpocken scheinen in Deutschland kein regional begrenztes Geschehen darzustellen, denn die Infektionen traten in zehn verschiedenen Bundesländern in unterschiedlicher Anzahl auf. Aufgrund der Zusammenarbeit mit Tierärzten und Geflügelgesundheitsdiensten sind in dieser Arbeit die Anzahlen von Einsendungen pro Bundesland jedoch vorsichtig zu bewerten. Die Auswertung der Daten zeigte eine Abhängigkeit von der Anzahl an Einsendungen, sodass in den Bundesländern mit den meisten Einsendungen auch die meisten Geflügelpockeninfektionen nachgewiesen wurden und aus den jeweiligen Bundesländern, in denen in dieser Arbeit keine Geflügelpockeninfektionen nachgewiesen wurden, wurden auch höchstens zwei Proben eingesandt.

Im dritten Teil sollte ein Verfahren zum Nachweis und zur Differenzierung von verschiedenen Avipockenviren entwickelt werden. Die Namen der Avipockenviruspezies basieren in erster Linie auf dem Namen der Vogelart, von der sie isoliert wurden und auf dem ermittelten Infektionsspektrum. Über verwandtschaftliche Beziehungen zwischen den einzelnen Spezies im Genus *Avipoxvirus* ist relativ wenig bekannt. Enge, antigene Kreuzbeziehungen sind für FWPV und TKPV beschrieben, sodass Impfstoffe, die auf TKPV basierten, bei Hühnern eingesetzt wurden (MAYR, 1992). Mittels PGPV konnten WINTERFIELD und HITCHNER (1965) Kreuzimmunität bei Hühnerküken erreichen. Andere Spezies, wie das Wachtelpockenvirus, zeigten dahingegen weniger Kreuzreaktionen (WINTERFIELD und REED, 1985).

Unter Verwendung der von LEE und LEE (1997) beschriebenen Primer führte die PCR bei 53 Avipockenviren von zwölf verschiedenen Vogelarten aus acht Ordnungen zu einem positiven Ergebnis. Es zeigte sich, dass die Sequenz für die Primerbindung bei den Avipockenviren einen ausreichend konservierten Bereich darstellten und alle untersuchten Avipockenviren in dieser FP1/FP2-PCR zur Bildung eines Amplifikates mit einer Größe von etwa 580bp führten. Jüngste Arbeiten zeigten, dass unter Verwendung dieser PCR neben FWPV, TKPV, SPPV und PGPV auch QUPV sowie Isolate von Kohlmeisen zur Bildung des zu erwartenden Amplifikates führten (TADESE und REED, 2003b; WELI et al., 2004b). Mittels der von BURCK (1999) entwickelten FWPV-PCR, die auf einem Genombereich des 39 kDa Proteins basierte, konnten zwar Hühner- und

Putenpockenvirus sowie Pockenvirus, das von einem Bussard isoliert wurde, nachgewiesen werden, aber weder PGPV, CNPV noch Pockenviren von anderen Vogelarten. In der vorliegenden Arbeit konnten bei Anwendung der REA Unterschiede zwischen den Spaltbildern der einzelnen Avipockenviren festgestellt werden. Der Einsatz von Restriktionsenzymen bei viraler Gesamt-DNA als Makrorestriktionsanalyse zum anschließendem Vergleich der Genomprofile wurde bereits auch für Avipockenviren durchgeführt, zeigte aber Schwierigkeiten durch geringfügige Unterschiede bei verschiedenen Isolaten innerhalb einer Avipockenviruspezies (BOYLE et al., 1997; WELI et al., 2004a). SCHNITZLEIN et al. (1988) verglichen mittels Makrorestriktionsanalyse verschiedene Hühnerpockenvirusisolate sowie Tauben- und Finkenpockenviren. Die Hühnerpockenviren waren zueinander identisch und zeigten Divergenzen zu den Tauben- und Finkenpockenviren. GHILDYAL et al. (1989) untersuchte mit diesem Verfahren Hühner-, Finken-, Tauben- und Wachtelpockenvirus. Sie stellten große Ähnlichkeiten zwischen Hühner-, Finken-, und Taubenpockenvirus und nur zum Wachtelpockenvirus deutliche Unterschiede fest. Bei der Makrorestriktionsanalyse ist keine feinstufige Differenzierung möglich. Darüber hinaus ist dieses Verfahren aufgrund der Genomgröße der Avipockenviren nicht für die routinemäßige Diagnostik geeignet. Dahingegen können PCR und REA ohne großen Aufwand zur Differenzierung von Avipockenviren durchgeführt werden. Durch die Kombination von der FP1/FP2-PCR mit der REA anhand der beiden Enzyme *EcoRV* und *NlaIII* ließen sich in der vorliegenden Arbeit die Avipockenviren von acht verschiedenen Vogelordnungen anhand sechs speziesabhängiger Spaltbilder unterscheiden. Die Avipockenvirusstämme und -isolate aus den Ordnungen *Phasianiformes*, *Columbiformes*, *Falconiformes* und *Psittaciformes* führten durch die REA jeweils zu eigenen Spaltbildern. Die Pockenviren, die von Vogelarten der Ordnung *Struthioniformes* stammten, zeigten ein identisches Spaltbild zu den Pockenviren der *Columbiformes*. Die Pockenviren, die von *Passeriformes* isoliert wurden, konnten mit zwei weiter unten erläuterten Ausnahmen von den anderen Ordnungen unterschieden werden. Ebenfalls führte die REA bei den beiden Isolaten aus den Ordnungen *Charadriiformes* und *Accipitriformes* zu einem identischen Spaltbild zu den *Passeriformes*.

Die Kombination von PCR und REA wurde auch bei anderen eng verwandten Viren zum Nachweis und zur Differenzierung angewendet, wie z. B. bei Hühneradenoviren (MEULEMANS et al., 2001).

Durch die Sequenzierungen zeigte sich, dass die untersuchten Spezies auf Nukleotidebene 71 bis 100% Homologie aufwiesen. Im phylogenetischen Stammbaum wurden die Sequenzen von *Phasianiformes*, *Columbiformes*, *Falconiformes* und *Psittaciformes* in eigenen Aufzweigungen dargestellt. Die Sequenzen von *Passeriformes* wurden einer fünften Aufzweigung zugeordnet. Ebenfalls analog zu den REA-Ergebnissen wurde die Sequenz des Isolates der Ordnung *Struthioniformes* in einer Aufzweigung mit den *Columbiformes* und die Sequenzen der Isolate aus den Ordnungen *Charadriiformes* und *Accipitriformes* in einer Aufzweigung mit den *Passeriformes* eingeordnet.

Zu der Ordnung der *Phasianiformes* gehören Hühner (empfindlicher für FWPV) und Puten (empfindlicher für TKPV). Für FWPV und TKPV haben MAYR und KALCHER (1960, 1961) einen engen Verwandtschaftsgrad beschrieben. Darüber hinaus ist nicht auszuschließen, dass die untersuchten Puten mit FWPV infiziert waren. In einer ihrer jüngsten Arbeiten beschreiben TADESE und REED (2003b) die Differenzierbarkeit von FWPV und TKPV durch REA anhand eines 1409-bp großen Amplifikates innerhalb des FWPV-Core Protein 4b mittels *EcoRV*. Dies konnte in gesonderten Untersuchungen jedoch nicht bestätigt werden; die Untersuchungen dieses 1409-bp großen Amplifikates durch REA mittels *EcoRV* und *NlaIII* brachten keine weiterführenden Erkenntnisse (Lüschow, nicht veröffentlicht).

PGPV und Pockenvirus, das von einem Strauß isoliert wurde, konnten ebenfalls nicht differenziert werden. Ihre Sequenzen zeigten 99% Homologie. Auch durch die phylogenetische Analyse wurden diese beiden Avipockenviren einer Aufzweigung zugeordnet. Vermutlich gehörten die Isolate einer Virusspezies mit Wirtsspektrum für Tauben und Strauße an oder es handelt sich um eigenständige, eng verwandte Pockenviruspezies - mit 99 % Übereinstimmung in diesem Sequenzbereich auf Nukleotidebene. PGPV besaß auf Aminosäureebene eine Homologie von 97% zur veröffentlichten FWPV-Sequenz. Eine antigenetische Verwandtschaft ist zwischen PGPV

und FWPV beschrieben (WINTERFIELD und HITCHNER, 1965). Das Pockenvirus vom Strauß zeigte auf Aminosäureebene in diesem Bereich sogar 98% Homologie zu FWPV. Diese enge Verwandtschaft erklärt die belastbare Immunität, die bei Straußen durch Impfung mit FWPV beobachtet wurde (PERELMAN et al., 1988) sowie die antigenetischen, genetischen und biologischen Ähnlichkeiten, die SHIVAPRASAD et al. (2002) für Pockenvirusisolate von Straußen und FWPV beschrieben haben.

Bei Untersuchung der Isolate von Falken zeigte sich ein eigenständiges Spaltbild, allerdings mit zwei Abweichungen: das Spaltbild des Isolates GB 405-02/4 wies bei Anwendung der Restriktionsenzyme *EcoRV*, *NlaIII* und *MseI* im Vergleich zu den anderen Falkenisolaten zusätzliche Fragmente auf. Da die Summe der Fragmente in diesem Fall jedoch die Größe von etwa 580bp überstieg, musste angenommen werden, dass das Material zwei Pockenviruspezies beinhaltete. Es stellte sich heraus, dass bei allen drei Spaltbildern von GB 405-02/4 die jeweiligen Fragmente von PGPV bzw. dem Pockenisolat des Straußes zusätzlich vorhanden waren. Bei Spaltung mittels *DpnII* führen diese Spezies zu demselben Spaltbild. Hierbei kann es sich um eine natürliche Doppelinfection des Falkens handeln. Auf der anderen Seite ist eine Kontamination nicht auszuschließen. Zur Klärung wurde eine Virusisolierung versucht, die jedoch mit negativem Ergebnis verlief. Schwierigkeiten bei der Anzucht von Pockenviren, die von Falken isoliert wurden, sind beschrieben (AKRAE, 1980; KRONE et al., 2004). Die andere Abweichung war ein zusätzliches Fragment (etwa 380bp) bei einem Großteil der Falkenisolate bei Untersuchung mittels des Restriktionsenzymes *NlaIII*. Es wurde rechnerisch als unspezifisch eingeordnet. Eine Kontamination kann in diesem Fall ausgeschlossen werden, weil keine andere Spezies diese Fragmentgröße aufwies. Das eigenständige Spaltbild für die Isolate von Falken korreliert mit den Ergebnissen der Sequenzierungen und der phylogenetischen Analysen: die Nukleotidabfolge zeigt eine Homologie von 73 bis 88% zu den anderen Avipockenviren und die Falken nehmen eine eigene Aufzweigung im phylogenetischen Stammbaum ein. Darüber hinaus ist anzumerken, dass bei den drei Avipockenviren, nämlich PGPV, dem Isolat vom Strauß und dem Isolat vom Falken, die drei zusätzlichen Basen zu keiner Verschiebung des Leserasters geführt haben.

Die Untersuchung der Isolate von Vögeln, die der Ordnung *Passeriformes* angehören (Sperlinge, Rabenkrähe, Hakengimpel, Kanarienvogel), zeigten ein einheitliches Spaltbild – mit zwei Ausnahmen. Die eine Ausnahme bestand darin, dass nur zwei der drei untersuchten Sperlingsisolate bei Durchführung mittels REA das entsprechende Spaltbild der Sperlingsvögel zeigten. Bei dem dritten Isolat (Sperling HS-DD) ergab sich ein identisches Spaltbild zu den Sequenzen der *Phasianiformes*, was dafür spricht, dass vermutlich beide Virusspezies Sperlinge infizieren können und der untersuchte Sperling mit FWPV infiziert war. GOODPASTURE und ANDERSON (1962) beschrieben, dass Wildvogelarten wie Sperlinge und Finkenvogel Träger von FWPV sein können. Durch die Sequenzierung zeigte sich eine vollständige Übereinstimmung zwischen der veröffentlichten FWPV-Genomsequenz (Stamm HP444), dem sequenzierten Hühnerpockenvirusstamm HP-B, dem Putenisolat GB 134-01 und dem Sperlingsisolat HS-DD. Diese Avipockenviren wurden bei der phylogenetischen Analyse in einer Aufzweigung zusammengefasst. Die andere Ausnahme bei der REA der Isolate aus der Ordnung der *Passeriformes* bestand darin, dass auch die Isolate der Kanarienvogel zu zwei verschiedenen Spaltbildern führten. Die Kanarienvogelisolat unterschieden sich durch eine einzige Spaltstelle für das Enzym *EcoRV*, wodurch sich entweder das CNPV-Spaltbild oder das in dieser Arbeit sogenannte Sperlingsvögel-Spaltbild zeigte. Zwischen diesen beiden Spaltbildern der Kanarienvogel ergab sich jedoch nur eine Abweichung von 1 %, die auf zwei Nukleotidaustauschen bzw. einem Aminosäureaustausch beruhte.

Für Pockenviren der Ordnung *Passeriformes*, zu denen die Kanarienvogel zählen, wird eine große Übertragbarkeit beschrieben: EBERBECK und KAYSER (1932) konnten einen Sperling mit einem Kanarienvogelisolat infizieren. MCGAUGHEY und BURNET (1945) entdeckten umgekehrt drei Pockenisolat von Sperlingen, die auf Kanarienvogel übergingen. HARTWIGK und LANGE (1964) beobachteten einen Seuchenzug unter Kanarienvögeln, der unter anderem auch einen Sperling erkranken ließ, und GIDDENS et al. (1971) beschrieben einen Kanarienvogelausbruch bei Finkenvögeln und Sperlingen. In den elektronenmikroskopischen Untersuchungen von LOUPAL et al. (1985) wurden identische Virionenmaße häufig bei Pockenviren verschiedener Singvogelarten festgestellt, sodass die Autoren nicht ausschließen konnten, dass es sich um ein identisches Virus handelte. Morphologisch konnten sie aber die Virionen der

Singvogelarten vom Kanarienvogel unterscheiden. In der phylogenetischen Analyse wurden die Viren der *Passeriformes* (Sperlingsvögel-Spaltbild und CNPV-Spaltbild) in einer Aufzweigung des Stammbaumes zusammen eingeordnet. Daher lässt sich vermuten, dass CNPV und die Isolate der Sperlingsvögel enger verwandt sind als zu den weiteren untersuchten Avipockenviren.

Des Weiteren zeigten die beiden Isolate von den Vogelarten Triel und Habicht das Sperlingsvögel-Spaltbild, obwohl sie anderen Ordnungen angehören. Ihre Sequenzen zeigten jedoch Homologiegrade von 99 bis 100 % zu den Sequenzen der *Passeriformes* und im phylogenetischen Stammbaum wurden diese Isolate ebenfalls zusammen in eine Aufzweigung eingeordnet. Die Sequenz des Triels war darüber hinaus identisch zu der Sequenz der Rabenkrähe und zur veröffentlichten CNPV-Genomsequenz (Stamm Wheatley C93).

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen legen nahe, dass die Isolate, die zu dem Sperlingsvögel-Spaltbild führten, eine Virusspezies darstellen, die verschiedene Vogelarten der *Passeriformes* (Sperling, Kanarienvogel, Rabenkrähe und Hakengimpel) und darüber hinaus den Triel und den Habicht infizieren kann. Es kann sich hier um eine Pockenvirusspezies handeln, die sich in der Evolution mit der Wirtsvogelart entwickelt hat (Co-Evolution). Ergebnisse phylogenetischer Analysen von 20 verschiedenen Vertretern der *Chordopoxvirinae* lassen vermuten, dass viele genomische Mutationen der Pockenviren mit einer Wirt-Erreger-Co-Evolution verbunden sind (MCLYSAGHT et al., 2003). Nukleotidvariationen innerhalb des Core Protein 4b Gens bei Isolaten von Avipockenviren in Abhängigkeit von der Wirtsvogelart, im besonderen für die Ordnung *Passeriformes*, wurden auch in jüngsten Untersuchungen von WELI et al. (2004b) festgestellt, in der Hühnerpockenimpfstoff und Avipockenisolaten von drei Kohlmeisen, einem Sperling und einer Taube untersucht wurden. Es zeigte sich, dass die Isolate von den Vögeln der Ordnung *Passeriformes* (Kohlmeisen und Sperling) aufgrund ihrer Homologiegrade in einem Nukleotidbereich von 426 bp einer eigenen phylogenetischen Aufzweigung zugeordnet werden konnten. Der Hühnerpockenimpfstoff und das Taubenisolat wurden jeweils weiteren Aufzweigungen zugeteilt. Die Autoren geben als mögliche Erklärungen für die genetischen Variationen in der festgestellten Abhängigkeit

von der Wirtsvogelart den genetischen Drift (allmähliche Änderung des viralen Erbguts), die Wirtsadaptation oder das Zusammenspiel von beidem zusammen an.

Die Untersuchung des Agapornidenisolates ApIII führte bei *NaIII*, *MseI* und *DpnII* zu jeweils individuellen Spaltbildern. Die Eigenständigkeit bestätigten auch die Untersuchungen zu den Eigenschaften in der Eikultur und zum Wirtsspektrum von KRAFT (1971) sowie KRAFT und TEUFEL (1971). Darüber hinaus zeigten die Nukleotidsequenzen nur einen Homologiegrad von 73 bis 75% zu den anderen Avipockenviren. Das Agapornidenisolat ist im phylogenetischen Stammbaum in einer eigenen Aufzweigung eingeordnet.

Eine Differenzierung der Avipockenviren erfolgte in der Vergangenheit vor allem durch Infektionsversuche an verschiedenen Vogelarten und Kaninchen über das Wirtsspektrum (MAYR, 1960, 1963; MAYR et al., 1972). Diese Verfahren sind heutzutage aus tierschutzrelevanten Gründen nicht mehr zu vertreten. Des Weiteren wurden biologische Eigenschaften, wie unterschiedliches Wachstum bei der Virusisolierung, Ausprägung der pockentypischen Läsionen sowie das Verhalten im Neutralisationstest herangezogen (MAYR und KALCHER, 1960, 1961; MORITA, 1973a, 1973b). Durch Unterschiede im Verhalten in verschiedenen Zellkulturen belegte MOUSA (1979) die Eigenständigkeit eines Falkenpockenisolates und eines PSPV. JAKOBY et al. (1990) gelang es hingegen nicht, Isolate von Amazonen anhand der Veränderungen bei der Anzucht eindeutig zuzuordnen. Darüber hinaus benötigen diese Verfahren eine vorangegangene Virusisolierung, die zeitintensiv ist und bei verschiedenen Avipockenviren nicht auf den zur Verfügung stehenden Zellkulturen (HEF, Wachtelzelllinie QMT-35) gelingt (KIM et al., 2003). Zur Differenzierung wurden darüber hinaus morphologische Unterschiede in der EM herangezogen. Die ermittelten Virionenmaße können aber infolge präparationsabhängiger Quellungs- und Schrumpfungsvorgänge und aufgrund von Unterschieden in der Präparation nicht mit anderen Untersuchungsergebnissen verglichen werden (LOUPAL et al., 1985). Darüber hinaus zeigte sich zum Beispiel bei einem Sperlingpockenisolat die Schwierigkeit, dass es auf diese Weise nicht eindeutig zu einer Pockenviruspezies zugeordnet werden konnte (HERBST und KRAUSS, 1989). Ein modernes Differenzierungsverfahren stellt der ELISA dar, wie BURCK (1999) mittels

monoklonaler Antikörper zur Unterscheidung von FWPV, PGPV und CNPV gezeigt hat. Nachteilig war bei diesem Verfahren jedoch eine starke Abhängigkeit von der Viruskonzentration des Untersuchungsmaterials (BURCK, 1999).

In der vorliegenden Arbeit ließen sich unter Verwendung eines Primerpaares verschiedene Avipockenviruspezies nachweisen, obwohl die Sequenzanalyse eine Nukleotidübereinstimmung in dem Bereich der 578bp von 71 bis 100% zwischen FWPV und den weiteren untersuchten Avipockenviren ergab. Die Viruspezies FWPV, CNPV, SRPV und PGPV, die in der Taxonomie als eigene Spezies definiert sind, konnten durch die REA differenziert werden. Hierbei ist jedoch anzumerken, dass es sich -außer bei den Avipockenvirusstämmen von FWPV (HP-1, HP-B), PGPV (TP-2, Peristin) sowie CNPV (KP-1, KP1-V557)- um Feldisolate handelte, die zwar der Vogelart zugeordnet werden konnten, von der sie isoliert wurden, aber keinen Referenzstamm darstellten. Auf diese Weise nicht weiter differenzierbare Viruspezies wiesen in ihren Nukleotidsequenzen eine Homologie von 99-100% auf. Die 40bp Primerbindungsstellen zeigten eine für die PCR ausreichende Homologie, während der dazwischenliegende Bereich von etwa 538bp durch die ausreichende Variabilität zur Differenzierung der Avipockenviruspezies geeignet war. Die Arbeit zeigte, dass der Sequenzabschnitt des Core Protein 4b Gens innerhalb des Genus *Avipockenvirus* zu phylogenetischen Analysen herangezogen werden kann.

In dieser Arbeit wurde eine PCR kombiniert mit einer REA beschrieben, die sowohl die Identifizierung als auch eine weitgehende Differenzierung des Erregers erlaubt. Die in dieser Arbeit angewandten Verfahren verbinden die Spezifität und Sensitivität der PCR mit der Möglichkeit zur Differenzierung in der anschließenden REA zu einer schnellen und effizienten Diagnostik der Vogelpockenviren.