

# 1 Literatur

## 1.1 Definition

Die Rhinotracheitis der Puten (turkey rhinotracheitis, TRT) ist eine akute, hochkontagiöse Viruserkrankung der oberen Atemwege und wird durch ein aviäres Pneumovirus (APV) verursacht. Dasselbe Virus kann auch Hühner infizieren und das so genannte "Swollen Head Syndrom" (SHS) auslösen, wobei es aber nicht als primäres Pathogen wirkt. Die charakteristische Auftreibung im Kopfbereich hat der Erkrankung bei Hühnern ihren Namen gegeben.

## 1.2 Vorkommen und Bedeutung

Tabelle 1 und 2 zeigen das Vorkommen der APV Infektionen beim Geflügel in verschiedenen Ländern.

**Tabelle 1 Vorkommen von APV (nach Hafez, 1994; ergänzt)**

Vorkommen	Erkrankung	Autor	Jahr
Südafrika	TRT	Buys und DuPreez	1980
England	TRT	Anon Wilding et al.	1985 1986
Frankreich	TRT	Andral et al. Giraud et al.	1985a 1986a
Deutschland	TRT	Hafez	1987
Israel	TRT	Weisman et al.	1988
Österreich	TRT	Pollan et al.	1990
Ungarn	TRT	Lantos	1990
USA	TRT	Grow	1992
Japan	TRT	Otsuki et al.	1996
Zentral Amerika	TRT	Jones	1996
Colorado	TRT	Senne et al.	1997
Chile	TRT u. SHS	Toro et al.	1998
Belgien	TRT	Van de Zande et al.	1998
Brasilien	TRT	d'Arce et al.	2005
Israel	TRT u. SHS	Banet-Noach et al.	2005

**Tabelle 2 Vorkommen von SHS (nach Hafez, 1994; ergänzt)**

<b>Land</b>	<b>Tier</b>	<b>Autor</b>	<b>Jahr</b>
Südafrika	Broiler	Morley und Thomson	1984
Spanien	Mastelertiere Broiler Legehennen	Diaz de Espada und Perona	1984
Frankreich	Hühner Perlhühner	Drouin et al. Goater et al.	1985 1985
England	Mastelertiere Broiler	O'Brian Wyeth et al.	1985 1987
Niederlande	Mastelertiere Broiler Legehennen	Goren	1985
Kanada	Broiler	Zellen	1988
Israel	Mastelertiere	Perelman et al.	1988
Deutschland	Mastelertiere Broiler	Hafez	1988
Japan	Broiler	Uramoto et al.	1990
Marokko	Broiler	Wyeth El-Houadfi et al.	1990 1991
Mexiko	Mastelertiere	Decanini et al.	1991
Brasilien	Mastelertiere Broiler Legehennen	Arns und Hafez	1992
Zimbabwe	Strauß	Cadman et al.	1994
Taiwan	Broiler	Lu et al.	1994
Japan	Broiler Broiler und Legehennen Broiler	Tanaka et al. Tanaka et al. Mase et al.	1995 1996 2003
Griechenland	Broiler	Georgiades et al.	2001

Bisher konnte in Australien noch kein Nachweis des APV erbracht werden. In Nordamerika, speziell den USA beschränkt sich die Ausbreitung auf Colorado, Minnesota und auf einige Herden in Nord Dakota, Süd Dakota, Iowa und Wisconsin. Außerdem waren einige Herden in Kanada betroffen (Goyal et al., 2003).

Die APV-Infektion führt zusammen mit sekundären Pathogenen zu erheblichen wirtschaftlichen Verlusten durch erhöhte Todesfälle, verringerte Gewichtszunahme, schlechtere Futtermittelverwertung, zusätzliche Arzneimittelkosten, erhöhte Anzahl beanstandeter Tiere bei der Schlachtung sowie durch einen Rückgang der Legetätigkeit und verminderte Eischalenqualität bei Elterntieren und Legehennen.

### 1.3 Geschichte

Die ersten respiratorischen Probleme, die bei Puten auftraten, wurden mit unterschiedlichen Namen beschrieben, so z. B.:

1. „Coryza der Puten“ (Hofstad et al., 1975)
2. „Adenovirus- assoziierte respiratorische Erkrankung“ (Dillman und Simmons, 1977)
3. „Bordetellose der Puten“ (Hinz et al., 1978)
4. „Akutes respiratorisches Syndrom oder Rhinotracheitis“ (Simmons et al., 1979) „
5. „Alkaligene Rhinotracheitis“ (Simmons et al., 1981).

Heute wird die Krankheit als Rhinotracheitis der Puten bezeichnet.

Bei den Hühnern wurde die Krankheit als „Dicker Kopf“ (Goren, 1985) bezeichnet. Heute hat sich der Name „Swollen Head Syndrome“ (SHS) durchgesetzt, obwohl nur 1 bis 4 % der Vögel diese geschwollene Haut im Bereich des Kopfes aufweisen (Wyeth et al., 1987).

## Puten

Buys und DuPreez berichteten 1980 über das Vorkommen einer akuten Atemwegserkrankung bei Puten in Südafrika. Eine hohe Kontagiosität und eine außerordentlich hohe Mortalität (25%) waren Kennzeichen der Erkrankung.

Im Sommer 1981 beobachteten Andral et al. (1985a) bei zahlreichen Putenbeständen in der Bretagne, Frankreich, eine ähnliche Erkrankung. Wieder wurden hohe Mortalitätsraten - diesmal bis zu 30 % - festgestellt. Legeputen zeigten geringfügige Atemgeräusche. Bei allen Herden war ein deutlicher Abfall der Legeleistung zu verzeichnen. Innerhalb kurzer Zeit breitete sich die Krankheit in allen Putenbeständen im Umkreis von 250 km aus.

Im Juni 1985 wurde über eine ähnliche Erkrankung bei Putenherden in Norfolk, England, berichtet, die sich schnell in weiten Teilen Englands und Wales ausbreitete (Anon, 1985).

Ein ursächlicher Erreger konnte für diese als Rhinotracheitis bezeichnete Infektion zunächst nicht gefunden werden. Schließlich wurde für die Infektion das Virus der hämorrhagischen Enteritis der Puten (Adenovirus) als primärer Wegbereiter verantwortlich gemacht, begleitet von einer Fülle von sekundären Erregern (Andral et al., 1985c).

Anschließend gelang in England, Frankreich und Deutschland die Isolierung eines Virus, das als primärer Erreger eingestuft wurde (Giraud et al., 1986a; McDougall und Cook, 1986; Wilding et al., 1986; Hafez und Weiland, 1990). Damit bestätigten sich die Annahmen jener Wissenschaftler in England, die aufgrund des Erscheinungsbildes und der raschen Ausbreitung der Krankheit stets eine Virusätiologie vermuteten.

Aviäre Pneumoviren wurden bisher in zahlreichen Ländern und seit 1997 auch in den USA isoliert (siehe Tab. 1 und Tab. 2). Anhand von Studien der monoklonalen Antikörper, polyklonaler Antiseren aus ELISAs und Virus-Neutralisationstests wurden Unterschiede zwischen Isolaten verschiedener Herkunft festgestellt (Hafez, 1992; Collins et al., 1993; Cook et al., 1993a). Sie teilten diese Isolate in zwei Gruppen ein. Durch molekulare Studien und die Entwicklung einer Polymerase Chain Reaction (PCR, Polymerase-Kettenreaktion) konnten 1994 Juhasz und Easton dieses Ergebnis bestätigen. Sie nannten die zwei Gruppen „Subtyp A“ und „Subtyp B“. Beide können Hühner sowie Puten infizieren (Cook et al., 1993a,b). Diese Subtypen traten in Europa sowie weltweit auf. So ließ sich das Virus, welches 1980 in Südafrika isoliert wurde, dem Subtypen A zuordnen. In England wurde zunächst der Subtyp A (Juhasz und Easton, 1994), dann der Subtyp B (Naylor et al., 1997a) nachgewiesen. In Frankreich, Spanien, Ungarn, Italien und den

Niederlanden wurde der Subtyp B nachgewiesen (Cook et al., 1993a; Juhasz und Easton, 1994; Naylor et al., 1997a). In Belgien und Deutschland wurden die Subtypen A und B nachgewiesen (Van de Zande et al., 1998; Hafez et al., 2000a).

In Colorado und Minnesota ist der Subtyp C isoliert worden (Senne et al., 1997; Jirjis et al., 2000). Er wurde durch Studien des M-Gens (Seal, 1998) bestimmt. Das Virus trat bisher nur in Colorado, Minnesota und North Dakota auf und befiel keine Hühner. Experimentell konnten Hühner mit dem Virus infiziert werden. Sie zeigten klinische Symptome und spezifische Antikörper ließen sich nachweisen (Shin et al., 2000a).

Durch den Virusneutralisationstest sowie den Immunfluoreszenztest zeigte sich eine schwache Verwandtschaft zu Subtyp A und keine Reaktion bei Subtyp B (Panigraphy et al., 2000). Es besteht nur eine schwache Kreuzneutralisation zwischen dem Subtyp C und den Subtypen A und B (Cook et al., 1998a). Der phylogenetische Vergleich der Subtypen A, B, und C zeigt, dass die Subtypen A und B stärker miteinander verwandt sind (Shin et al., 2002c).

In Frankreich wurde von einem nicht-A-nicht-B APV bei Puten (Bäyon-Auboyer et al., 1999; Toquin et al., 2000) berichtet, der als Subtyp D klassifiziert wurde. Bei Moschusenten wurde ein Subtyp C ähnliches Virus beschrieben (Toquin et al., 1999a).

## Hühner

Im Jahr 1967 beobachtete man in Südafrika sporadisch eine Erkrankung bei Hühnern, die mit Schwellungen im Kopfbereich einherging (Van Blerk, 1985). 1971 und 1972 wurde in Südafrika in Folge einer Newcastle-Pandemie über ähnliche Symptome bei Hühnern berichtet (Morley und Thomson, 1984). Zunächst wurde ein Zusammenhang mit der Newcastle Krankheit vermutet, dann wurde ein sekundäres Management Problem vermutet und schließlich sah man das SHS als eigenständige Krankheit an.

Seit 1984 wurden in mehreren Ländern der Welt teils massive Krankheitsausbrüche des SHS bei Hühnern beobachtet. Außerhalb Europas trat das SHS in Kanada (Zellen, 1988) und Israel (Perelman et al., 1988), in Japan (Uramoto et al., 1990) und Marokko (Wyeth, 1990), in Mexiko (Decanini, 1991) und in Brasilien (Arns und Hafez, 1992) und North Carolina, USA (Grow, 1992) auf. Gelegentlich wurden auch in Geflügelbeständen Australiens Krankheitserscheinungen beobachtet, die dem SHS ähnlich sind. Es konnten dort jedoch bislang keine Antikörper gegen das APV nachgewiesen werden (Bell und Alexander, 1990).

Ein Zusammenhang zwischen den Erkrankungen wurde anfangs nicht vermutet, obwohl das Auftreten der Rhinotracheitis der Puten und des Swollen Head Syndroms der Hühner zeitlich und räumlich eine parallele Entwicklung nahm (O'Brien, 1985).

1984 wurde ein Coronavirus, begleitet von sekundären E.-coli-Infektionen, für das SHS verantwortlich gemacht (Diaz de Espada und Perona, 1984; Morley und Thomson, 1984). Im Jahr 1987 isolierten Picault et al. (1987a) ein APV-ähnliches Virus aus den Atemwegen von Broilern, die an SHS erkrankt waren. Das Homogenisat aus Gewebe des Respirationstraktes erkrankter Broiler konnte bei SPF-Puten eine typische Rhinotracheitis und bei SPF-Hühnerküken die klinischen Anzeichen des SHS hervorrufen. Auch Buys et al. (1989a) gelang die Isolierung eines Virus aus Broilern, die in den Jahren vor 1980 an SHS erkrankt waren. Das Virus schien verwandt mit dem APV-Virus der Puten zu sein.

Nach der Isolierung des APV aus Puten (Giraud et al., 1986 a, b; McDougall und Cook, 1986; Wilding et al., 1986) und dem serologischen Nachweis von Antikörpern gegen das APV aus Hühnern (Wyeth et al., 1987) wurde schließlich eine Verbindung zwischen der Rhinotracheitis der Puten und dem SHS der Hühner vermutet (Picault et al., 1987a; Buys et al., 1989a, b).

## 1.4 Ätiologie

### 1.4.1. Klassifikation

Im Rückblick wurde das Virus den unterschiedlichsten Virengruppen zugeordnet bis es zur heutigen Klassifizierung kam.

1984 wurde es den Coronaviren zugeordnet (Morley und Thomson, 1984), dann wurden Ähnlichkeiten mit den Orthomyxoviren (McDougall und Cook, 1986) festgestellt. Andere Autoren ordneten es als Myxo-Virus-ähnlich (Giraud et al., 1986b) oder Pseudomyxo-Virus ein (Giraud et al., 1988).

Die ersten Klassifizierungen von APV-Isolaten beruhten auf molekularen Eigenschaften des Virions (Collins et al., 1986; Collins und Gough, 1988), Elektrophoreseeigenschaften der viralen Proteine (Ling und Pringle, 1988) und der Anzahl von mRNS-Arten, die in infizierten Zellen entdeckt wurden (Cavanagh und Barrett, 1988). Dadurch ließ sich das Virus in die Familie der Paramyxoviridae, Genus Pneumovirus zuordnen.

Die aktuelle Klassifizierung unterteilt die Familie der Paramyxoviridae in zwei Subfamilien, die Paramyxovirinae und die Pneumovirinae. Beide Subfamilien sind jeweils in zwei Genera unterteilt. Die Pneumovirinae gliedern sich in das Genus Pneumovirus, zu dem das Respiratorische Syncytialvirus (RSV), das Bovine respiratorische Syncytialvirus und das Pneumovirus der Maus gehören, und in das Genus Metapneumovirus (Pringle, 1998), dem das aviäre MPV und das hMPV (humane Metapneumovirus) angehören. Das hMPV wurde 2001 in den Niederlanden aus Kindern isoliert, existiert jedoch schon seit 50 Jahren (van den Hoogen et al.; 2001). Es folgten Isolierungen in Australien (Nissen et al., 2002), Kanada (Peret et al., 2002) und Frankreich (Freymuth et al., 2002).

### 1.4.2. Morphologie

Im elektronenmikroskopischen Bild zeigt der Erreger annähernd runde, häufig jedoch auch pleomorphe Gestalt. Der Durchmesser kann 80-700 nm betragen, liegt aber durchschnittlich bei 80-200 nm. Isolate aus Organkulturen können sogar eine Länge bis zu 1000 nm erreichen (Collins und Gough, 1988; Gough, 2003).

Das Virus ist empfindlich gegenüber Hitze (56°C, 30 min), pH-Werten kleiner als 3,0 und gegen Äther und Chloroform. Durch Lipidlösungsmittel, nichtionische Detergentien, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Formalin wird die Infektiosität aufgehoben. Es ist jedoch stabil zwischen den pH-Werten 3 und 9 (Collins et al., 1986; Giraud et al., 1986a, Hafez und Weiland, 1990). Das Virus kann im Labor zwei Wochen bei Raumtemperatur oder vier Wochen im Kühlschrank überleben. Der Subtyp C des APV erwies sich im Versuch als sehr stabil: bei -20 °C



überlebte es mehr als sechs Monate, bei 4 °C 12 Wochen, bei 20 °C vier Wochen und bei 50 °C weniger als sechs Stunden. Das Virus konnte sich nach sieben Tagen Trocknung bei Raumtemperatur wieder auf einer Zellkultur vermehren und die Infektiosität blieb nach 12 Gefrier- und Auftauzyklen voll erhalten (Townsend et al., 2000). Bei einem Versuch konnte das APV Subtyp C bis zu 60 Tage im Einstreu von Puten bei -12 °C überleben (Velayudhan et al., 2003).

Der Erreger weist keine haemagglutinierenden Eigenschaften mit Erythrozyten von Huhn, Pute, Meerschweinchen, Kaninchen, Ente, Gans, Schwein, Pferd, Kuh, Maus, Schaf und Mensch (Blutgruppe O) auf, obwohl das Pneumovirus auch ein F-Protein besitzt, welches die Zellfusion unterstützt. Die Neuraminidase-Aktivität des G-attachment Proteins fehlt im Gegensatz zu anderen Genera der Paramyxoviren (Collins et al., 1986; Giraud et al., 1986a; Wyeth et al., 1986; Cook et al., 1987; Hafez und Weiland, 1990).

#### **1.4.3. Struktur**

Die Oberfläche der lipidhaltigen Hülle (Envelope) ist mit Projektionen (Spikes) besetzt. Die Spikes sind 13 bis 15 nm lang. Der Raum zwischen den Spikes beträgt 2-3 nm (Giraud et al., 1986a; McDougall und Cook, 1986; Buys et al., 1989b; Hafez und Weiland, 1990).

Das Genom des APV besteht aus einsträngiger, nicht segmentierter RNS mit negativer Polarität. Das Nukleokapsid ist helikalsymmetrisch aufgebaut und hat einen Strangdurchmesser von 14-15 nm und eine Ganghöhe von 7 nm.

Die Isodichte liegt im Rohrzuckergradient nach den Angaben von Collins und Gough (1988) bei 1,21 - 1,22 g/ml bzw. 1,18 g/ml (Giraud et al., 1988).

#### **1.4.4. Virusproteine**

Das Genom ist 13,3 kb lang und beinhaltet acht verschiedene Bereiche, die jeweils ein Protein kodieren. Durch intensive Erforschung der Proteine des APV sind Unterschiede zu den anderen Pneumoviren zutage getreten, die Pringle 1998 veranlassten, die Pneumovirinae in zwei Genera aufzuteilen, die Pneumoviren und die Metapneumoviren.

Im Unterschied zu den Pneumoviren der Säugetiere besitzt das APV keine nichtstrukturellen Proteine NS1 und NS2 (Randhawa et al., 1997). Die Reihenfolge der aviären Gene (3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5') differiert in der Anordnung (3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5') (Ling et al., 1992) und das L-Gen ist kleiner (Randhawa et al., 1996b). Hierdurch wurde 1998 das aviäre Pneumovirus von Pringle als das neue Genus Metapneumovirus klassifiziert.

Das G-Protein und das F-Protein an der Oberfläche des APV sind die wichtigsten antigenetischen Faktoren der Virusgruppe. Über das G-Protein bindet sich das Virus an die Wirtszelle (Levine et al., 1987). Jedoch ist weder das SH-Protein noch das G-Protein für die Lebensfähigkeit des Virus zuständig (Naylor et al., 2004). Das F-Protein ist für die Aufnahme des Virus durch die Fusion der Zellmembran mit der Virusmembran bei physiologischem pH zuständig (Hernandez et al., 1996). Die Replikation des Virus erfolgt im Cytoplasma (Collins, 1991). Fertige Virions werden durch Keimen (budding) freigesetzt.

### **Subtypen der APV**

Das APV lässt sich in 4 Subtypen aufteilen: Subtyp A und B, die unter anderem in Europa vorkommen, den Subtyp D, der in Frankreich zweimal isoliert wurde (Bäyon-Auboyer et al., 1999), und den Subtyp C, der in Nordamerika nachgewiesen wurde.

Durch Sequenzierung konnten die Aminosäuren verschiedener Proteine einiger APV-Isolate ermittelt werden:

#### Subtyp A (vollständig):

Nukleoprotein N (Li et al., 1996 ; Pringle et al., 1996),  
Phosphoprotein P (Ling et al., 1995),  
Matrixprotein M (Randhawa et al., 1996a; Yu et al., 1992b)  
Fusionsprotein F (Yu et al., 1991),  
zweites Matrixprotein M2 (Yu et al., 1992a),  
Small Hydrophobic Protein SH (Ling et al., 1992),  
Glykoprotein G (Ling et al., 1992; Juhasz und Easton; 1994)  
RNS-Polymeraseprotein L (Randhawa et al., 1996b).

#### Subtyp B :

Nukleoprotein N (Li et al., 1996 ; Pringle et al., 1996)  
Phosphoprotein P (Jacobs et al., 2003)  
Matrixprotein M (Randhawa et al., 1996a)  
Fusionsprotein F (Naylor et al., 1998)  
zweites Matrixprotein M2 (Jacobs et al., 2003)  
Small Hydrophobic Protein SH (Jacobs et al., 2003)  
Glykoprotein G (Juhasz und Easton, 1994)

#### Subtyp C (vollständig):

Nukleoprotein N (Dar et al., 2001)

Phosphoprotein P (Dar et al., 2001)

Matrixprotein M (Seal et al., 1998)

Fusionsprotein F (Seal et al., 2000a)

zweites Matrixprotein M2 (Dar et al., 2003)

Small Hydrophobic Protein SH (Toquin et al., 2003; Yunus et al., 2003),

Glykoprotein G (Toquin et al., 2003; Alvarez et al., 2003; Govindarajan et al., 2004)

RNS-Polymeraseprotein L (Toquin et al., 2003; Govindarajan und Samal, 2004)

#### Subtyp D:

Oberflächen-Glykoprotein G und

Teile des F und L Proteins (Bäyon-Auboyer et al., 2000)

Beim Vergleich der Aminosäuresequenzen des G-Proteins wurden zwei Cluster gefunden, die untereinander zu 98,5 bis 99,7 % ähnlich waren, aber gegeneinander nur zu 38 % gleiche Sequenzen aufwiesen. Bei diesen Clustern handelte es sich um **Subtyp A und B** (Juhász und Easton, 1994), die schon durch Neutralisationstest mit monoklonalen Antikörpern des G-Proteins detektiert worden waren (Cook et al., 1993a). Diese Funde wurden durch die Sequenzierung des F-Proteins (Naylor et al., 1998) und des M-Gens (Randhawa et al., 1996a) bestätigt.

Das M-Protein ist unter den Paramyxoviren hochkonserviert (Rima et al., 1989) und kann für die molekulare Epidemiologie herangezogen werden (Seal, 1998). Europäische M-Proteine weisen eine 89-%ige Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz auf. In Bezug auf das M-Protein hat das APV aus Colorado eine Übereinstimmung von nur 60 % mit der Aminosäuresequenz von Subtyp A und Subtyp B. Es ist phylogenetisch einzigartig (Seal, 1998) und unterscheidet sich auch serologisch von den europäischen Isolaten (Kleven, 1997; Senne et al., 1997). Anhand des F-Proteins ließen sich die Isolate aus Amerika als neuer **Subtyp C** definieren (Seal et al., 2000b). Studien des F-Protein Gens zeigten, dass nur der Subtyp C in den USA vorkommt (Dar et al., 2002).

Zwei französische Isolate teilen 54,2 -56,6 % der Nukleotid- und 31,2 -42,9 % der Aminosäuresequenz des G-Proteins und 76,1 % der Aminosäuresequenz des L-Proteins mit Subtyp A und B und haben 70-80,5 % übereinstimmende Nukleinsäuren des F-Genes mit dem Subtyp C. Damit wurden die Isolate dem **Subtyp D** zugeordnet (Bäyon-Auboyer

et al., 2000). Ein Subtyp C ähnliches Pneumovirus bei Moschusenten ist bisher nicht subtypisiert worden (Toquin et al., 1999a).

Der Subtyp C und das **hMPV** grenzen sich durch den Nukleotidsequenzvergleich und Aminosäurevergleich des G-Proteins vom Subtyp A, B und Subtyp D und des SH-Proteins vom Subtyp A und Subtyp B ab (Toquin et al., 2003; Lwamba et al., 2002a; Njenga et al., 2003; Alvarez et al., 2003; Yunus et al., 2003). Auch das P-Protein, N-Protein, F-Protein und das M2 Protein sind bei Subtyp C und hMPV ähnlicher als zu dem Subtyp A und Subtyp B (van den Hoogen et al., 2002; Jacobs et al., 2003; Alvarez et al., 2003). Die Aminosäuresequenz des L-Proteins ist bei Subtyp C zu 80 % dem des hMPV und zu 68 % dem des Subtyps A ähnlich (Govindarajan und Samal, 2004).

#### **1.4.5. Antigenespektrum**

Untersuchungen mit den APV-Isolaten zeigten, dass Antigenverwandtschaften zu anderen bekannten geflügelpathogenen Viren wie Adenoviren (FAV 1, HE, EDS 76), "Respiratory Enteric Orphan Virus" (REO - S1133), Infektiöses Bursitis Virus (IBD), Virus der infektiösen Bronchitis (IB - Mass.), Influenza-A-Virus (H1, H3 bis H12) und Paramyxoviren (PMV - Typen 1 bis 4 und 6 bis 9) sowie zu Viren anderer Tiere und des Menschen nicht vorhanden sind (Giraud et al., 1988). Experimentell wurde festgestellt, dass eine APV Infektion die Effektivität einer HEV-Impfung senkt (Chary et al., 2002a).

Die APV-Isolate aus unterschiedlichen Ländern bzw. Instituten wurden untersucht und verglichen. Baxter-Jones et al. (1987) forschten mit Hilfe von Immunfluoreszenz, ELISA und Kreuzneutralisationstest, Gough und Collins (1989) und Hafez (1992) verglichen mittels Elektronenmikroskopie, SDS-PAGE-Analyse, Kreuzneutralisationstest und/oder mit doppeltem Immundiffusionstest. Die Ergebnisse zeigten, dass die Isolate morphologisch und antigenetisch ähnlich waren.

In einem Kreuzserumneutralisationstest wurde die antigenetische Verwandtschaft des französischen Putenisolates mit einem Virusisolat von Hühnern, die an SHS erkrankt waren, nachgewiesen (Giraud et al., 1988).

Das SHS-Virus (2381/88) aus Südafrika führte nach experimenteller Infektion bei Hühnerküken zu respiratorischen Symptomen und bei Putenküken zu TRT-ähnlichen Erscheinungen. Im Gegensatz dazu besaß das Putenisolat (91/78) aus Südafrika nur die Fähigkeit, bei Puten Krankheitserscheinungen auszulösen (Buys et al., 1989a). Aufgrund der beobachteten Eigenschaften kamen die Autoren zu dem Schluss, dass es sich bei

dem Hühnerisolat um eine Subpopulation dieses Virus handelt, das sich an Hühner adaptiert hat, aber auch noch bei Puten pathogen wirkt.

Zwischen den Subtypen A, B, C und D besteht eine unterschiedlich ausgeprägte antigenetische Verwandtschaft. Im Kreuzneutralisationstest zeigten Subtyp A und B eine gute Neutralisation während der Subtyp C sich nur schwach mit dem Subtyp A-Antiserum und nicht mit dem Subtyp B-Antiserum neutralisieren ließ (Cook et al., 1999). Ähnliche Ergebnisse zeigt eine Studie, bei der das M oder N-Protein des Subtypes C als Antigen im ELISA eingesetzt wurde und gegen Seren von infizierten Puten getestet wurde. Der ELISA-Test mit dem M-Protein zeigte bei den Subtypen A, B und C eine starke Kreuzreaktion während mit dem N-Protein Subtyp A und C kreuzreagierten und sich keine Reaktion bei Subtyp B und C zeigte (Lwamba et al., 2002b). In einem anderen Versuch konnte weder im ELISA noch mit der Virusneutralisation eine Kreuzreaktion zwischen dem Subtyp C und einem europäischen Isolat beobachtet werden (Toquin et al., 2000). Nach einer Impfung mit Subtyp A- oder B-Impfstoff ist ein Schutz gegen eine Infektion mit dem Subtyp C gegeben, aber eine Impfung mit dem Subtyp C bietet keinen Schutz gegen eine Infektion mit dem Subtyp A oder B (Cook et al., 1999).

Das APV, welches bei Moschusenten in Frankreich isoliert wurde, zeigte im IF und im ELISA eine stärkere Reaktion zum Subtyp C als zu den Subtypen A, B oder D (Toquin et al., 1999a).

Polyklonale und Monoklonale Antikörper aus einer konservierten Region des N-Proteins des APV bilden eine Kreuzreaktion mit dem N-Protein des hMPV im ELISA, Western Blot und in der Immunhistochemie (Alvarez et al., 2004).

#### **1.4.6. Pathogenese**

Die Vermehrung des Virus findet hauptsächlich im oberen Atmungstrakt statt und schwächer in den Luftsäcken und der Lunge (Jones et al., 1988, Majo et al., 1995, Cook et al., 1991, 1993 Catelli et al., 1998). Bei Legehennen kann sich das Virus mit Ausnahme des Subtypes C auch im Eileiterepithel replizieren (Jones et al., 1988; Jirjis et al., 2002; Chary et al., 2002b).

## 1.5 Virusvermehrung in verschiedenen Kulturverfahren

### 1.5.1. Trachealringkulturen

Die Virusvermehrung der Subtypen A und B führt in Trachealringkulturen von SPF-Hühner- oder Putenembryonen nach einigen Passagen zur Hemmung der Zilientätigkeit, der so genannten "Ziliostase", wie die Untersuchungen von Buys und DuPreez (1980) sowie Wilding et al. (1986) zeigten. Die Ziliostase trat bei Trachealringkulturen von Putenembryonen innerhalb von 4 bis 6 Tagen p.i. und in Trachealringkulturen von Hühnerembryonen nach 6 bis 8 Tagen p.i. auf (Baxter-Jones et al., 1989). Die Ringkulturen von Hühner- oder Putenembryonen weisen eine ähnliche Sensitivität auf (Naylor und Jones, 1993). In Trachealringkulturen wird ein Titer von bis zu  $10^{6,4}$  KID<sub>50</sub>/ml erreicht.

Das Subtyp C- Virus ist nicht ziliostatistisch (Cook et al., 1999).

### 1.5.2. Zellkulturen

Die Virusisolierung gelang Giraud et al. (1986a) sowie Buys et al. (1989b) in Affennierenzelllinien (VERO).

Das APV konnte erfolgreich auf Chicken Embryo Rough (CER) -Zellen isoliert werden (Hafez, 1994). Diese permanente Zelllinie entstand bei zufälliger Vermischung von Hühnerembryozellen mit Babyhamsternierenzellen (Smith et al., 1977).

Nach der Erstisolierung in Trachealringkultur oder Embryonen konnte das Virus auch an Hühnerembryofibroblasten (CEF) (Baxter-Jones und Jones, 1989) und Hühnernierenzellen (CK) adaptiert werden. Das zellkulturadaptierte Virus vermehrte sich auch in Hühnerembryoleberzellen (CEL) (Jones et al., 1988) sowie in BS-C-1 und QT-35-Zellen (D'Aprile, 1989).

Die Virusvermehrung führte innerhalb von 48 - 72 Stunden p.i. zu einem cytopathischen Effekt (CPE) mit Synzytiumbildung. Nach 5 bis 6 Tagen p.i. blieben nur wenige Zellen intakt (Grant et al., 1987, Williams et al., 1991a, b).

### 1.5.3. Hühnerembryonen

1986 gelang es Alexander et al. nach der Injektion von verdächtigem Fremdmaterial in den Dottersack von Hühnerembryonen die Isolierung von verschiedenen embryoletalen

Agenzien. Nach 3-5 Blindpassagen führte die Virusvermehrung zu Embryomortalität (Wyeth und Alexander, 1989).

Nach der primären Virusisolierung in Trachealringkulturen vermehrt sich nach BUYS et al. (1989b) das APV in Hühnerembryonen, wobei der höchste Titer nach der Injektion auf die Chorio-Allantoismembran erreicht wurde. Nach 3-5 Blindpassagen starben die Embryonen nach 4-5 Tagen ab. In Hühnerembryonen wurde nur ein Titer bis  $10^{3,5}$  ID<sub>50</sub>/ml erreicht.

## 1.6 Epizootiologie

Der APV breitet sich in Puten- und Hühnerbeständen horizontal durch direkten Kontakt mit infizierten Tieren oder indirekt durch kontaminierte Gegenstände aus (Jones et al., 1987; Giraud et al., 1986b, c; Cook et al., 1991). Die Übertragung über das Ei ist bisher nicht bewiesen. In Minnesota wurde nach einer APV Infektion von Elterntieren während der Legezeit eine Infektion von deren Jungputen im Alter von 3-16 Tagen beobachtet. Damit wird eine solche Übertragung als wahrscheinlich angesehen (Shin et al., 2002b). Stuart (1989) vermutete, dass die Ausbreitung über das Trinkwasser oder den Futtertransport stattfindet. Eine Übertragung über die Luft ist in einem Versuch nachgewiesen (Nagaraja et al., 2001) und in einem anderen widerlegt worden (Alkhalaf et al., 2002). In der Einstreu kann das Virus bei -12 °C bis zu 2 Monaten, bei 8 °C bis zu einem Monat und bei Raumtemperatur 3 Tage überleben (Velayudhan et al., 2003). Daher ist besonders im Winter Sorgfalt bei der Hygiene der Ställe nach APV Infektionen geboten, um keine weiteren Tiere zu infizieren.

Eine vertikale Übertragung des Virus über das Brutei ist bislang nicht festgestellt worden, obwohl die APV-Infektionen zu Legeleistungsabfall, verminderter Eischalenqualität und embryonaler Sterblichkeit führten. Jones et al. (1988) stellten jedoch fest, dass das APV bei Putenelterntieren kurze Zeit (bis 9 Tage p.i.) im Eileiter experimentell infizierter Tiere nachzuweisen ist.

Einige Studien zeigten den Virusnachweis bei kanadischen Wildgänsen, Sperlingen, Schwalben, Staren und Stockenten, die jedoch nicht klinisch erkrankten (Shin et al., 2000b; Bennett et al., 2002). Es ist nahe liegend, dass Wildvögel bei der Übertragung des APV eine Rolle spielen. Allein der Umstand, dass die Infektion nacheinander in Südafrika, Frankreich und der Ostküste von England entlang der Hauptflugrouten der Zugvögel auftraten, lässt einen solchen Schluss zu. Die große Anzahl von Zugvögeln an den Seen in Minnesota könnte ebenfalls eine Ursache der endemischen Infektionen dort sein (Shin et al., 2000b; Shin et al., 2001; Bennett et al., 2002). Eine Studie in Minnesota über 4 Jahre zeigte, dass im Herbst und im Frühling, wenn die Zugvögel dort waren, eine größere Anzahl der Herden AK gegen das APV im ELISA zeigten als im Winter und Sommer (Goyal et al., 2003).



## 1.7 Wirtsspektrum

Vorwiegend sind Puten betroffen. Doch auch bei drei Wochen alten Broilern rief eine intranasale experimentelle Infektion innerhalb von 7 Tagen respiratorische Symptome wie Rhinitis, Konjunktivitis und Nasenausfluss sowohl bei den infizierten, als auch bei den nicht infizierten Kontaktieren hervor (Jones et al. 1987). Ähnliche Ergebnisse konnten auch nach experimenteller Infektion von Eintags-SPF-Hühnerküken erzielt werden. Die Virusreisolierung sowie der Antikörpernachweis gelangen in beiden Gruppen (Jones et al., 1987). Ferner ließen sich Antikörper gegen das APV bei Mastelertieren (Wyeth et al., 1987) sowie bei Broilern, Legehennen und Perlhühnern, die am SHS erkrankt waren, nachweisen (Picault et al., 1987a, b; Cook et al., 1988; Litjens et al., 1989). Picault et al. (1987 a, b) isolierten aus Broilern mit SHS ein ziliostatisches Virus, das dem APV ähnlich war. Diese Angaben konnten von Buys et al. (1989a) in Südafrika bestätigt werden. Dieses Virus rief bei Puten und Hühnern die gleichen klinischen Erscheinungen nach experimenteller Infektion hervor.

Vogelarten, die neben Puten und Hühnern mit dem APV infiziert werden können, sind Enten (Toquin et al., 1999a; Shin et al., 2000b; Shin et al., 2001, Shin et al., 2002a), Rebhühner (Picault et al., 1987b) Fasane (Catelli et al., 2001; Gough et al., 2001), kanadische Wildgänse, Blauflügelenten (Bennett et al., 2002) und Perlhühner (Gough et al., 1988). APV-Antikörper wurden schon in Straußen in Zimbabwe (Cadman et al., 1994) und in Seemöven aus dem Baltikum (Heffels-Redmann et al., 1998) nachgewiesen. In den USA hatte Shin et al. (2000b) APV-RNS in Gänsen, Sperlingen, Staren und markierten Enten detektiert. Eine experimentelle Infektion von wilden Fasanen und Perlhühnern induzierte eine AK-Bildung; die Tiere blieben aber klinisch symptomfrei (Gough et al. 1988).

In einem Gebiet mit einem hohen Anteil an Wasservögeln wurden experimentell APV-negative Stockenten in der Nähe einer Putenfarm gehalten. Zwei Wochen später konnte infektiöses APV/MN-12 aus den Choanen der klinisch unauffälligen Enten isoliert werden. Nach vier Wochen wurden Antikörper detektiert. Zur selben Zeit wurden bei den Puten vier APV Isolate isoliert, die eine 95-99 %ige Übereinstimmung der DNA und 97-99 % Übereinstimmung der Aminosäuresequenz mit den Isolaten der Enten aufwiesen. Im Gegenversuch wurden die Puten mit dem APV/MN-12 Isolat infiziert. Aus den Nasenhöhlen der Puten wurde virale RNA identifiziert und im Serum wurde APV spezifisches IgG detektiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass diese Spezies sich untereinander infizieren können (Shin et al; 2002a).

Die Rolle der Zugvögel als Krankheitsträger ist noch nicht geklärt (Bennett et al., 2005).

## 1.8 Verlauf

Krankheitsverlauf und Mortalität variieren bei TRT und SHS sehr stark und werden hauptsächlich durch Faktoren wie Management, Stress, Luftumsatzrate, Besatzdichte, sonstige Krankheiten und die Art der bakteriellen Begleitinfektionen beeinflusst (Morley und Thomson, 1984; Anon, 1985; Stuart, 1986). Cook et al. (1991) konnte nachweisen, dass *Bordetella avium* und *Pasteurella* ähnliche Keime sich nach einer APV Infektion ansiedeln können. Naylor et al. (1992) und Ganapathy et al. (1998) wiesen *Mykoplasma galliseptikum* oder *Mykoplasma imitans* im unteren Respirationstrakt nach. Eine Infektion mit *E. coli* kann eine APV Infektion bei 3-6 Wochen alten Puten verschlimmern (Van de Zande et al., 1998). Die klinischen Symptome nehmen bei einer zusätzlichen Infektion mit *Escherichia coli*, *Ornithobacterium rhinotracheale* und besonders bei einer Infektion mit *Bordetella avium* deutlich zu (Jirjis et al., 2004). In Belgien und Frankreich wurde festgestellt, dass es einen Zusammenhang von *Chlamydia psittaci*-, APV- und ORT-Infektionen in der Putenhaltung gibt (Loock et al., 2005).

In den USA konnte eine saisonale Häufung der Infektionen beobachtet werden. Im Frühling (April und Mai) sowie im Herbst (Oktober bis Dezember) stieg die Anzahl der infizierten Herden an (Shin et al., 2002c; Goyal et al., 2003).

### 1.8.1. Puten

Es können Puten jeden Alters infiziert werden. Nach einer kurzen Inkubationszeit von 3-7 Tagen (Jones et al., 1987) folgt eine Krankheitsdauer von 7-14 Tagen, vorausgesetzt, es folgen keine Komplikationen. Die Morbidität beträgt bis zu 100 % innerhalb von 12 bis 24 h. Die Mortalität schwankt zwischen 3 und 40 % (Anon, 1985). Eine sekundäre bakterielle Infektion verstärkt die Symptomatik erheblich (Cook et al., 1991; Naylor et al., 1992; Khehra und Jones, 1999; Van de Zande et al., 1999; Jirjis et al., 2004).

### 1.8.2. Hühner

**Broiler** jeden Alters sind infektionsempfänglich, jedoch wird das SHS am häufigsten zwischen der 4. und 6. Lebenswoche beobachtet. Die Krankheitsdauer liegt in der Regel bei 1-2 Wochen. Sie ist jedoch, ebenso wie die Mortalitätsrate, abhängig von den allgemeinen äußeren Bedingungen. Maximal erreicht die Morbiditätsrate 60 %. Die Mortalität schwankt zwischen 1 und 5 %, wobei sie beim Einwirken zusätzlicher negativer Faktoren in Einzelfällen 20 bis 30 % erreichen kann (Diaz de Espada und Perona, 1984).

Bei **Mastelertieren** tritt die Krankheit am häufigsten um die 30. Woche auf, also zwischen Legebeginn und dem Erreichen der Legeleistungsspitze. Die Krankheitsdauer kann sich auf bis zu 21 Tage erstrecken. Die Morbiditätsrate liegt mit 8 bis 10 % relativ niedrig. Ebenso die Mortalität, die in unkomplizierten Fällen 1 bis 3 % betragen kann (Morley und Thomson, 1984; O'Brien, 1985).

## 1.9 Klinische Erscheinungen

### 1.9.1. Rhinotracheitis der Puten

Bei der Rhinotracheitis der Puten beobachtet man Husten, Niesen, Kopf -schütteln, Sinusitis mit katarrhalischem bis eitrigem Nasenausfluss, Konjunktivitis mit vermehrtem schaumigem Tränenfluss und geschwollene Sinus infraorbitales. Atemgeräusche treten auf. Zusätzlich wird auf ein Ödem der Unterhaut im Submandibularbereich hingewiesen (Anon, 1985; Giraud et al., 1986a; Stuart, 1986; Pollan et al., 1992).

Vier Wochen alte Puten wurden mit Gewebe-kultiviertem APV (APV/Minnesota/turkey/2a/97) okular und nasal beimpft. Anschließend wurden über 14 Tage alle zwei Tage Blut, Trachealtupfer und Gewebe entnommen. Vom Tag 2 p.i. bis Tag 12 p.i. traten klinische Symptome auf wie Nasenausfluss, Schwellungen der infraorbitalen Sinus und schaumiges Augensekret. Eine leichte Entzündung der Mukosa der Nasenhöhlen und der infraorbitalen Sinus trat zwischen Tag 2 und 10 p.i. auf. Die Puten hatten leicht entzündliche Veränderungen der Luftröhre von Tag 4-10 p.i.. Antikörper gegen das APV wurden am 7. Tag isoliert. Das Virus konnte zwischen Tag 2 bis Tag 6 p.i. in den Tupferproben bzw. bis Tag 10 p.i. in den Gewebeproben mittels PCR, Virus Isolation oder durch Immunhistochemie detektiert werden. In diesem Versuch zeigten die Puten ähnliche Symptome wie bei einer Feldinfektion (Jirjis et al., 2002).

Bei Legeputen läuft die respiratorische Infektion etwas milder ab. Es werden geringfügige Atemgeräusche verbunden mit Legeleistungsabfall bis zu 40 % beschrieben (Anon, 1985; Stuard, 1989; Cook et al., 1996; Cook et al., 2000a). Die Herde benötigt, abhängig vom Infektionszeitpunkt und der Produktionsphase, drei bis fünf Wochen, um wieder die übliche Leistung zu erreichen. In dieser Zeit legen die Tiere einen erhöhten Anteil dünnschaliger Eier, die auch deformiert und unpigmentiert sein können. Die Küken aus unveränderten Eiern sind symptomfrei. Eine Infektion zu Legebeginn führt in der Regel zur drastischen Reduzierung der Legeleistung (Jones und Wilding, 1990).

### 1.9.2. Swollen Head Syndrom (SHS)

Die Anfangssymptome des SHS bei **Broilern** sind Niesen, Nasenausfluss, Husten und verstärkte Atemgeräusche und allgemeine Depression (Morley und Thomson, 1984; Goren, 1985; Pattison et al., 1989). Fortschreitend entwickeln sich eine Konjunktivitis sowie ein Unterhautödem, welches um die Augen herum einseitig oder zweiseitig beginnt und sich dann bis über den Kopf in den Bereich des Unterkiefers ausbreiten kann. Durch

die Schwellungen kann es in schweren Fällen zum Verschluss der Augen kommen, so dass die Tiere Futter und Wasser nicht mehr finden können. Die Tiere entwickeln einen lokalen Pruritus im Kopfbereich und erschaffen dort durch Kratzen Eintrittspforten für bakterielle Sekundärinfektionen (Morley und Thomson, 1984).

Die ersten Anzeichen einer Infektion bei **Masteltern** sind oft ein leichter Anstieg der Mortalität und eine reduzierte Futteraufnahme. Die Krankheitssymptome äußern sich durch Apathie, Niesen, Atemgeräusche und Konjunktivitis mit vermehrtem Tränenfluss. Dazu kommen Ödeme, die sich über die gesamte Kopfregion ausbreiten können. Schließlich wurden Störungen des ZNS wie Torticollis und Opisthotonus, Zwangsbewegungen und Festliegen beobachtet. Die Tiere waren dadurch unfähig, Wasser und Futter aufzunehmen, so dass sie später verendeten (Prous, 1984; Goren, 1985; O'Brien, 1985; Perelman et al., 1988; Pattison et al., 1989). Meist waren die klinischen Symptome verbunden mit einem Legeleistungsabfall (1–10 %) über 2 bis 3 Wochen. In manchen Herden war der Legeleistungsabfall sogar das einzige Krankheitsanzeichen (Morley und Thomson, 1984). Die Befruchtungs- und die Schlupfrate waren in vielen Fällen ungemindert (Perelman et al., 1988, Hafez und Löhren, 1990). Nach Angaben von Prous (1984); Goren (1985) und Wyeth et al. (1987) wurde jedoch durch eine erhöhte embryonale Sterblichkeit (3 bis 10 %) eine geringere Schlupfrate festgestellt. In einer Nutzungsperiode können bis zu zwei Reinfektionen stattfinden (Prous, 1984).

**Legehennen** zeigten ähnliche klinische Symptome wie Masteltern mit einer Morbidität bis zu 8 % und einer Mortalitätsrate von 0 bis 2 %. Die klinischen Symptome waren im Allgemeinen begleitet von einem Abfall der Legeleistung (2 bis 4 %) und in manchen Fällen von verminderter Eischalenqualität (Arns und Hafez, 1992). Bei intravenöser Inokulation fiel die Legeleistung nach zwei Wochen um 26,7 % (Cook et al. 1999). Die Qualität der Eier war bis zu fünf Wochen p.i. schlecht.

## **1.10 Pathologisch-anatomische Veränderungen**

### **1.10.1. Rhinotracheitis der Puten**

An TRT verendete Puten zeigen nach Anon (1985) bei der Zerlegung mehr oder weniger ausgeprägt Rhinitis, Tracheitis und Sinusitis. Unter Beteiligung von bakteriellen Sekundärinfektionen wurden oft auch Perikarditis, Aerosacculitis und Pneumonie festgestellt. Experimentell infizierte Legeputen zeigten zusätzlich Eileiterentzündung sowie Rückbildung des Eierstocks und des Eileiters (Jones et al., 1988).

### **1.10.2. Swollen Head Syndrom (SHS)**

Bei Hühnern sieht man bei der Zerlegung Rhinitis und gelegentlich Sinusitis. Im Bereich des Kopfes sind fibrinöse bis blutige Einlagerungen in der Unterhaut zu finden. Unter Beteiligung bakterieller Sekundärinfektionen können Aerosacculitis und Perikarditis auftreten. Bei Tieren mit zentralnervösen Störungen werden fast immer Entzündungen des Mittelohrs mit Ansammlungen von eitrigem Exsudat festgestellt. Zusätzlich wird bei Legehennen auf entzündliche Veränderungen des Eierstocks, des Eileiters sowie des Bauchfells hingewiesen (Morley und Thomson, 1984; Goren, 1985; Perelman et al., 1988; Pattison et al., 1989; Peleteiro, 1991; Arns und Hafez, 1992). Leichter Durchfall kann auftreten (Cook, 1999).

## 1.11 Histopathologische Veränderungen

### 1.11.1. **Rhinotracheitis der Puten**

Jones et al. (1986) beschrieb nach experimenteller intrakonjunktivaler Infektion bei vier Wochen alten Puten die histopathologischen Veränderungen. Am 2. Tag p.i. trat eine runde Läsion der oberflächlichen Zilienschicht auf. Ab dem 4. Tag p.i. waren die Zilienverluste noch ausgeprägter und die Schleimhautoberfläche war infolge des Verlustes von Epithelzellen unregelmäßig. Im Epithel waren vakuolisierte Zellen und gelegentlich Zelltrümmer sichtbar. Zusätzlich traten subepithelial Hyperämie und intraepithelial Heterophile und Lymphozyten auf. In diesem Stadium fand sich reichlich entzündliches Exsudat im Lumen der Trachea. Diese degenerativen und entzündlichen Veränderungen verstärkten sich bis zum 10. Tage p.i. Es gab subepitheliale Ansammlungen von Lymphozyten. Mikroskopische Veränderungen in der Lunge natürlich infizierter Puten waren während der akuten Phase nicht nachweisbar (McDougall und Cook, 1987). Die Tracheen wiesen Zilienverluste mit geringgradiger mononukleärer Zellinfiltration auf. Im späteren Stadium traten eine vollständige Zerstörung der Zilien mit extensiver mononukleärer Zellinfiltration der Mukosa und eine Zerstörung der Schleimdrüsenzellen auf.

Pollan et al. (1992) stellten bei Puten nach einer APV Infektion im Feld neben Tracheitis mit Zilienverlusten und lymphozytärer Infiltration auch eine interstitielle Pneumonie fest. Giraud et al. (1988) beschrieben eosinophile zytoplasmatische Einschlusskörperchen in den Ziliarzellen der Nasenhöhle.

Majo et al. führten 1995 einen Versuch durch, bei dem Hühner (3 Wochen), Puten (3 Wochen) und Legehennen (27 Wochen) per Augentropfen intranasal und intratracheal (mit CVL 14/86/1) beimpft wurden. Im Unterschied zu bisherigen Beobachtungen waren in der Lunge Läsionen der Mukosa und Submukosa der Bronchien mit heterophiler Infiltration in der Submukosa zu sehen. In den Zilien konnte das APV nachgewiesen werden. In den Nasenhöhlen wurden die stärksten Veränderungen beobachtet. Nach ein bis zwei Tagen wurden Zilienverlust, Hyperämie und eine leichte Infiltration der Submukosa durch Monozyten festgestellt. Nach drei bis fünf Tagen trat mukopurulenten Exsudat (heterophil) auf. Nach sechs bis zehn Tagen wurden die Läsionen des Epithels größer und Hyperplasien bildeten sich. Die Trachea zeigte ähnliche Veränderungen.

Bei einer Infektion mit dem Subtyp C wurde in einer Studie die Zerstörung von Zilien im oberen Atmungstrakt am 3.-10. Tag p.i. beobachtet (Panigraphy et al., 2000). Dies konnte

nicht bei einer Infektion mit Subtyp C bei Tieren, die in Isolatoren gehalten wurden, bestätigt werden (Jirjis et al., 2002). Eine zusätzliche Infektion mit *Escherichia coli*, *Bordetella avium* oder *Ornithobacterium rhinotracheale* führt zu einem Verlust der Zilien (Jirjis et al., 2004). Die Harder'sche Drüse, eine sekundäre Lymphdrüse des Auges, ist bei einer Infektion mit dem Subtyp C anfangs mit heterophilen und mononukleären Zellen infiltriert. In den Konjunktiven, Lungen, Luftsäcken, Leber, Milz, Nieren, Darmtonsillen und Bursa Fabricii wurden keine pathologischen Veränderungen gefunden.

Bei Infektionen mit dem Subtyp A oder B konnte nach 7 bis 9 Tagen p.i. im Eileiterepithel das Virus nachgewiesen werden. Dies war bei Subtyp C nicht möglich (Chary et al., 2002b).

### **1.11.2. Swollen Head Syndrom**

Bei den histopathologischen Untersuchungen der von SHS betroffenen Tiere wurden mikroskopisch eine Abflachung des Trachealepithels sowie eine verringerte Zilienaktivität und schließlich ein fortschreitender Verlust der Zilien festgestellt. Zusätzlich lagen eine subepitheliale Blutstauung und eine lymphoide Hyperplasie vor (Morley und Thomson, 1984). In Zilienzellen waren azidophile, zytoplasmatische Einschlusskörperchen zu beobachten (Picault et al., 1987a).

Oft wurden Zellulitis, Periostitis und eine purulente Entzündung der Schädelknochen festgestellt. In manchen Fällen waren auch eine Otitis externa, eine Otitis interna und Meningitis vorhanden (Pattison et al., 1989).

Im zerebralen Gewebe zeigten sich Gliosis mit Hyperämie, perivaskuläre Ansammlung von Leukozyten und geringgradige Blutungen. Degenerative Veränderungen konnten nur in den Purkinje-Zellen des Cerebellums gesehen werden (San Gabriel, 1984). Ebenso berichtet dieser Autor von renalen Hyperämien und Glomerulonephritiden als pathologische Befunde.

Catelli et al. (1998) führten einen Versuch an SPF- (24d) und kommerziellen (1d) Hühnerküken durch. Nach einer okulonasal oder nasalen Infektion mit einem Isolat des Subtypes B zeigten die Tiere nach zwei Tagen eine mononukleäre Zellinfiltration und Ödeme im Zilienepithel mit einer erhöhten Sekretion. Nach vier Tagen lösten sich die Zellen ab und die Lamina propria zeigte eine Hyperämie. Bis zum 18. Tag erholten sich die Tiere wieder. Nach 4-7 Tagen flachte sich das Epithel der Trachea ab. Mononukleäre Zellen und Ödeme traten auf. Im Sinus traten mononukleäre Zellen vom 4. bis 18. Tag auf. Daraus folgt: Die Virusreplikation findet im Sinus statt und verursacht ab Tag 4 p.i.



durch mikroskopische Veränderungen eine Eintrittspforte für Sekundärerreger. Im Eierstock traten Epitheldefekte auf und der Erreger konnte nachgewiesen werden. Im Unterschied zu anderen Versuchen wurde hier keine heterophile Infiltration der Lamina propria (Jones et al., 1987) oder kein purulentes Exsudat (Majo et al., 1995) beobachtet. Nur der obere Respirationstrakt war betroffen - ohne Befall der Bronchien (Majo et al., 1995).

## 1.12 Immunologie

Ab dem 5. Tag nach Auftreten der ersten Symptome bei APV Infektionen können mittels serologischer Untersuchungen Antikörper nachgewiesen werden. Eine Reinfektion war meistens mit einem Titeranstieg ohne klinische Erscheinungen verbunden. Unabhängig davon, ob die Tiere Krankheitssymptome zeigten oder klinisch unauffällig waren, konnten in Seren von Elterntier-, Broiler-, Legetier- und Perlhuhnherden Antikörper gegen das APV festgestellt werden (Picault et al., 1987a, b; Cook et al., 1988; Pattison et al., 1989).

Nach den Angaben von Jones et al. (1988) persistieren die Antikörper gegen APV bei älteren Puten länger (96. Tag p.i.) als bei jungen Puten (35. Tag p.i.).

Die Untersuchungen von Hafez et al. (1993) sowie Pollan und Anrather (1993) zeigten, dass der Antikörpertiter der Mast- und Putenelterntiere direkt mit dem ihrer Nachkommen korreliert. So können Eintagsputenküken hohe Konzentrationen maternaler Antikörper besitzen. Die Halbwertszeit der Antikörper beträgt 5-6 Tage bei Hühnern.

Nach den Angaben von Le Gros et al. (1988) sowie Cook et al. (1989a, b) und Williams et al. (1991a, b) schützen die maternalen Antikörper nicht vor klinischen Symptomen. Andererseits vermuteten Cook et al. (1989a), dass die maternalen Antikörper gegen das APV die Schäden reduzieren, die durch die Virusvermehrung verursacht werden können. Untersuchungen von Jones et al. (1992) mit Cyclophosphamid-B-Zell-Immunsupprimierten Tieren deuten daraufhin, dass die Schutzwirkung gegen die APV Infektion vorwiegend durch die zellgebundene Immunität vermittelt wird.

Das APV führt nach den Angaben von Timms et al. (1986) zu einer temporären Immunsuppression und kann sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunität negativ beeinflussen. Chary et al. (2002b) zeigte, dass in der akuten Phase der Infektion 3.-7. Tag p.i., Splenozyten durch eine Concanavalin A Stimulation langsamer proliferierten und damit einen Anstieg der Nitridoxid-induzierenden Faktoren und Interferone zur Folge hatte. Nitridoxide hemmen die Proliferation von T-Zellen (Van der Veen, 2001).

## **1.13 Diagnose**

Die klinischen Erscheinungen sowie die pathologischen Befunde lassen keine eindeutige Diagnose zu. Es sollte ein Erregernachweis oder eine serologische Untersuchung durchgeführt werden (Jones und Wilding, 1990).

### **1.13.1. Direkter Nachweis**

#### **Antigennachweis**

Der unmittelbare Antigennachweis in der Trachealschleimhaut (2. und 4. Tag p.i.) oder Eileiterschleimhaut und Uterus (7. und 9. Tag p.i.) frisch infizierter Tiere kann mit Hilfe des direkten Immunfluoreszenztestes (IF) durchgeführt werden (Jones et al., 1986). Während der gesamten Untersuchungen war das Virus im Eierstock nicht nachweisbar (Jones et al., 1988).

Der direkte Virusnachweis in infiziertem Gewebe gelang auch mit dem Immunperoxidasetest (IP) (O'Loan und Allan, 1990; Majo et al., 1995; Catelli et al., 1998; Cook et al., 2000b) und mit dem Immunogold Staining (O'Loan et al., 1992). Bei Hühnern ließ sich das APV mit IF und IP nachweisen (Jones et al., 1987; Majo et al., 1995; Catelli et al., 1998).

Mit der Reversen Transkriptase -Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) kann das Virus bis zu 19 Tage p.i. aus trockenen oder feuchten Tracheal- und Oesophagustupfern oder einem Homogenisat der Nasenmuschel nachgewiesen werden (Jing et al., 1993).

Für die europäischen Isolate wurden verschiedene RT-PCRs entwickelt. Eine RT-PCR anhand des G-Proteins mit anschließender Restriktionsenzymanalyse (Juhász und Easton, 1994) sowie eine nested RT-PCR (Naylor et al., 1997a) können die Subtypen A und B unterscheiden. Anhand des F-Proteins wurden eine semi-nested RT-PCR (Jing et al., 1993), eine Immunochemiluminizenz Southernblot RT-PCR (Dani et al., 1999) und eine RT-PCR (Mase et al., 1996) entwickelt, die den Subtyp A detektieren können. Einer auf dem N-Gen basierende RT-PCR, die das APV detektiert, folgt eine RT-PCR, die auf dem G-Gen basiert und den Subtyp spezifiziert (Bäyon-Auboyer et al., 1999).

Für den Nachweis des Subtypes D wurde eine RT-PCR des G-Proteins entwickelt (Bäyon-Auboyer et al., 2000).

Eine RT-PCR, die den Subtyp C detektieren kann (Ali und Reynolds, 1999; Pedersen et al., 2000) und zugleich das Isolat aus Minnesota differenzieren kann (Shin et al., 2000c), wurde aus dem M-Protein entwickelt. Eine multiplex RT-PCR kann das Newcastle disease Virus und das APV Subtyp C detektieren (Ali und Reynolds, 2000). Anhand des F-Proteins detektiert eine RT-PCR den Subtyp C (Dar et al., 2001). Es gelang mit der Gensequenz des M-Proteins eine Echtzeit-RT-PCR (taqman-RT-PCR) zu entwickeln, die den Colorado Virus identifizieren kann (Bennett et al., 2002).

Eine auf dem N-Gen basierende RT-PCR kann die Subtypen A, B, D und das Virus der Moschusente amplifizieren (Toquin et al., 1999a) und wahrscheinlich auch den Subtyp C (zitiert nach Cook und Cavanagh, 2002).

Um APV, aviäre Influenza Virus und NDV bei Puten oder Hühnern zu detektieren, wurde eine single tube multiplex RT-PCR hergestellt (Malik et al., 2004).

### **Virusisolierung**

Zur Virusisolierung hat sich die Inokulation einer Suspension, gewonnen aus Sinus, Nasotrachealexsudaten, Larynx, Trachea oder Trachealabstrichen in ein geeignetes Indikatorsystem bewährt (Cook et al., 1991).

Die APV-Isolierung im **Hühnerembryo** konnte nach den Angaben von Alexander et al. (1986) und Wyeth und Alexander (1989) durch Beimpfung von SPF-Bruteiern am 7. Tag via Dottersack durchgeführt werden. Die Embryonen zeigen Minderwuchs, der von einer niedrigen Mortalitätsrate begleitet wird, die durch passagieren gesteigert werden kann (Wyeth und Alexander, 1989).

Für die primäre Isolierung werden **Trachealringkulturen** verwendet. Nach 5-7 Tagen kann eine Ziliostase beobachtet werden, die durch viermaliges passagieren verstärkt wird. Der Subtyp C verursacht jedoch keine Ziliostase (Cook et al., 1999). Der Vorteil der Trachealringkulturen gegenüber den anderen Zellkulturen ist die Vermeidung antigener Veränderungen des isolierten Virus und damit der Erhalt der Pathogenität des Virus (Baxter-Jones und Jones, 1989; Williams et al., 1991a,b).

Die primäre APV-Isolierung gelang nach einer Adaptionsphase auch in **VERO-Zellkulturen** (Giraud et al., 1986a; Buys et al., 1989b). Als ein weiteres Indikatorsystem ist die **CEF- Zellkultur** (Chicken Embryo Fibroblasts) (Jirjis et al., 2000; Panigraphy et al., 2000) zu nennen. D'Aprile (1989) stellte fest, dass in der **QT-35-Zelllinie** (Fibrosarkom-Zelllinie der japanischen Wachtel) ein deutlicher CPE entsteht, welcher eine exakte

Ablesung ermöglicht. Diese Methode wurde in Amerika zur Isolierung des Virus angewendet (Chiang et al., 1998; Goyal et al., 2000).

Die **CER Zelllinie** (Chicken Embryo Rough, CER) entstand durch zufällige Vermischung von Hühnerembryozellen und Babyhamsternierenzellen (Smith et al., 1977). Die Zellen sind mykoplasmenfrei. Diese Zelllinie eignet sich gut für die Isolierung und Vermehrung einer großen Anzahl aviärer Virusarten und wurde von Hafez (1994) für die APV-Isolierung verwendet.

Eine Virusisolierung ist selten erfolgreich, da das Material für die Virusisolierung bis spätestens 24 Stunden nach Auftreten der ersten klinischen Symptome entnommen werden muss (McDougall und Cook, 1987).

### **1.13.2. Indirekter Nachweis**

Zum Antikörpernachweis liegen Untersuchungsergebnisse mit dem Neutralisationstest, dem Immunperoxidasetest, dem ELISA und dem indirekten Immunfluoreszenztest vor.

Der **Serumneutralisationstest (NT)** zum Nachweis von Antikörpern gegen das APV bei Puten und Hühnern wurde von mehreren Autoren beschrieben (Giraud et al., 1986a; McDougall und Cook, 1986; Cook et al., 1988; Baxter-Jones et al., 1989; Kamphausen, 1990). Die  $\beta$ -Methode (konstante Virusverdünnung) wird am häufigsten angewendet. Der Test kann auf Trachealringkulturen (Cook et al., 1988), auf Hühnerembryofibroblasten (Baxter-Jones et al., 1989; Kamphausen, 1990), auf Hühnerleberzellen (Baxter-Jones et al., 1989) oder auf VERO-Zellen (Giraud et al., 1986a) ausgeführt werden. O'Loan et al. (1989) verbesserten den bisher beschriebenen Serumneutralisationstest durch Einführung des indirekten **Immunperoxidasetests (IP)**. Nach den Angaben von O'Loan et al. (1989) erhöht dieses Verfahren die Spezifität des Antikörpernachweises und verkürzt im Vergleich zum Neutralisationstest die Testdauer von 7 auf 2 Tage.

Der **Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)** gehört zu den Routineuntersuchungsmethoden der Laboratoriumsdiagnostik. Das ELISA-Antigen kann aus Zellkulturüberstand oder Zell-Lysaten (Hühnerembryofibroblasten oder VERO-Zellen) als ungereinigtes oder gereinigtes Antigen hergestellt werden (Giraud et al., 1986a; Grant et al., 1987; Chettle und Wyeth, 1988; Hafez und Löhren, 1990). Es sind drei verschiedene kommerzielle ELISA-Kits erhältlich.

1. Pathasure Avian Rhinotracheitis ( Antigen aus England); indirekt
2. Flockscreen Avian Rhinotracheitis ELISA (versch. AG, Guildhay Ltd, Guildford, Surrey, UK); indirekt

3. Svanovir Avian Pneumovirus EIA (Antigen aus Frankreich, Svanova Biotech, Uppsala, Schweden); blocking

Mekkes und De Wit haben 1998 diese drei ELISA- Kits miteinander verglichen. 14 Tage nach einer aktivierten oder einer inaktivierten Impfung von SPF- Küken mit Subtyp A oder Subtyp B Vakzinen konnten Flockscreen und Svanovir Antikörpertiter detektieren. Pathasure ELISA zeigte keine Reaktion bei Lebendvakzinen, aber einen Antikörpertiteranstieg acht Tage nach der 2. Impfung mit inaktivierten Vakzinen.

Hafez hat 1994 einen selbst hergestellten ELISA, welcher aus Subtyp A oder Subtyp B hergestellt wird, überprüft und detektierte zwei von vier Putenherden nach einer Trinkwasser Lebendimpfung (Rhone Merial).

Um z. B. den Subtyp C aus Amerika detektieren zu können, benötigt man eine Platte, die mit einem Antigen eines homologen Stammes beschichtet wurde (Turpin et al., 2003). Für die ersten APV Ausbrüche in Colorado 1996 wurde ein ELISA benutzt, der inaktiviertes APV Subtyp C als Antigen enthielt (Senne et al., 1997). Dieser Test wurde 2000 in Minnesota modifiziert (Chiang et al., 2000), gab jedoch teilweise falsch positive Ergebnisse aufgrund der Infektiosität des verwendeten Isolates als Antigen. Es folgte ein ELISA basierend auf einem rekombinanten M-Protein des Subtypes C (Gulati et al., 2000), der die Subtypen A, B und C detektieren, doch nicht unterscheiden kann (Lwamba et al., 2002b). Ein rekombinantes N-Protein wurde in einem Sandwich-ELISA und ein rekombinantes SH-Protein wurde in einem weiteren ELISA verwendet, welche spezifisch Antikörper gegen APV Subtyp C erkennen können (Gulati et al., 2001b; Luo et al., 2005). Das Subtyp C Virus wurde sieben Tage p.i. das erste Mal im ELISA detektiert und hatte zwischen der 5.-7. Woche die höchsten Antikörperwerte bei einigen Tieren (Jirjis et al., 2002) bzw. konnte zwischen dem 12.-21. Tag p.i. bei allen infizierten Tieren Antikörper nachweisen (Pedersen et al., 2001).

Das Subtyp C Virus kann bei verschiedenen Vogelarten durch einen blocking-ELISA-Test, bei dem das homologe Virus als Antigen eingesetzt wird, nachgewiesen werden (Turpin et al., 2003). Dabei ist zu bemerken, dass ein ELISA mit einem Anti-Puten Konjugat sensitiver für Putenseren ist als eines mit einem Anti-Hühner Konjugat (Chiang et al., 2000; Jirjis et al., 2000).

Der **indirekte Immunfluoreszenztest (IIF)** zum Nachweis von Antikörpern gegen das APV wurde erstmals von Baxter-Jones et al. (1986) beschrieben. Das Testsystem weist eine hohe Sensitivität auf (O'Loan et al., 1990). Bei der Untersuchung von Puten- und Hühnerseren, die im ELISA-Test negative Ergebnisse hatten, erwiesen sich 16,7 % der Puten- und 12,6 % der Hühnerseren aus Nordirland sowie 7 % der Putenseren aus England als positiv im IIF-Test.

Zwischen ELISA, NT und IIF werden in einigen Fällen Unterschiede beschrieben (Jones et al., 1988; Baxter-Jones et al., 1989; O'Loan et al., 1989, 1990). Diese werden einerseits mit der Antikörpertyp-Spezifität des NT erklärt, andererseits auch mit der Unfähigkeit des ELISA, die primäre IgM-Antwort zu erkennen und der Möglichkeit, mit dem IIF die größte Breite an Antigen darzustellen (O'Loan et al., 1989). Mit allen drei Testsystemen können nach Baxter-Jones et al. (1989) Antikörper gegen APV 5 Tage nach dem Auftreten der ersten Symptome nachgewiesen werden. Die höchsten Antikörpertiter wurden mit dem IIF und dem NT am 5. Tag nach Auftreten der klinischen Erscheinungen nachgewiesen. Im ELISA-Test erreichten die Antikörper erst am 11. Tag ihre Höchstwerte. Alle Verfahren zeigten eine hohe Korrelation bis zum 34. Tag nach dem Auftreten der ersten klinischen Symptome.

## 1.14 Differentialdiagnose

Verschiedene virusbedingte und bakterielle Atemwegserkrankungen verursachen ähnliche klinische Symptome, wie die durch Pneumoviren verursachten Infektionen TRT und SHS, so dass hier unterschieden werden muss (Lister und Alexander, 1986; Tabelle 3).

Pathogene bakterielle Ursachen, wie eine Infektion mit Chlamydien (*C. psittaci*), Pasteurellen (*P. multocida*), Mykoplasmen (*M. gallisepticum*, *M. imitans* und *M. meleagridis*), *E. coli* und *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) müssen in Betracht gezogen werden (Lister und Alexander, 1986; Yoder, 1984b; Peleteiro, 1991). Bei jungen Puten muss differentialdiagnostisch die Bordetellose (*Bordetella avium*) unterschieden werden (Hinz et al., 1978).

Bei den virologischen Ursachen muss man von den Adenoviren, der Newcastle Disease Krankheit, der infektiösen Bronchitis und der aviären Influenza A abstrahieren (Peleteiro, 1991).

**Tabelle 3 Zusammenfassung der Keime, die an einer Rhinotracheitis der Puten beteiligt sein können (Lister und Alexander, 1986, ergänzt)**

Bakterien	Mykoplasmen	Viren
<i>E. coli</i>	<i>M. gallisepticum</i>	Adenovirus
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>M. meleagridis</i>	PMV-2 (Yucaipa)
<i>Bordetella</i> sp.	<i>M. imitans</i>	PMV-1 (ND)
<i>Klebsiella</i> sp.		Reovirus
<i>Moraxella</i> sp.		Rotavirus
<i>Pasteurella multocida</i>		IBD-Virus
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		ziliostatisches Virus
<i>Staphylococcus</i>		IB
<i>Streptococcus</i>		Aviäre Influenza
<i>Eikenella corrodens</i>		
<i>Chlamydia psittaci</i>		
ORT		



## 1.15 Bekämpfungsmaßnahmen

### 1.15.1. Therapie

Sekundäre bakterielle Infektionen können durch wirksame antibakterielle Chemotherapeutika reduziert werden (Schricke, 1986; Stuart, 1989; Jones und Wilding, 1990; Hafez, 1990) und somit die Mortalitätsrate senken.

Gutes Management zur Verbesserung der hygienischen Bedingungen und Ausschaltung aller schwächenden Umwelteinflüsse kann helfen, die Einschleppung von Infektionen zu vermeiden und die Auswirkungen einer APV Infektion zu minimieren.

- *Ventilation optimieren* (hoher Ammoniakgehalt schwächt Abwehrsystem des Respirationtraktes)
- Bei Erkrankung *Belüftung verstärken*, da die Tiere in Gruppen zusammenhocken aber gleichzeitig die Temperatur mit erhöhen
- zuviel *Staub vermeiden* (Pattison, M. et al., 1989; Gough, 2003; Hafez, 1990)
- *Besatzdichte reduzieren* auf 300 Puten pro Standardstall; Anzahl der Tiere pro Stall entscheidender als Gewicht/m<sup>2</sup>; daher besondere Vorsicht bei jungen Tieren bis 6 Wo (Pattison, et al., 1989)
- *Hygiene verbessern* (Ställe, Einstreu, Trinkwasser)
- *vermischte Altersklassen vermeiden*
- *Impfungen zum richtigen Zeitpunkt durchführen* (Giraud et al., 1987; Buys et al., 1989b; Cook et al., 1989a; Williams et al., 1991b)

In Colorado (USA) hat sich erwiesen, dass absolute biologische Hygiene und gutes Management in der Lage sind, die Infektionssituation binnen kürzester Zeit erfolgreich zu ändern und die Krankheit auszulöschen (R.K. Edson, zitiert nach Cook, 2000b).

### 1.15.2. Immunprophylaxe

Durch eine sorgfältige Immunprophylaxe kann wirtschaftlichen Schäden durch Infektionen mit dem APV vorgebeugt werden (Buys et al., 1989b; Cook et al., 1989b; Giraud 1987; Williams et al., 1991b; Cook et al., 1995). Seit September 1989 können die Geflügelproduzenten mit einem Impfstoff gegen APV vorbeugen. Zwei Firmen, Merial GmbH (Hallbergmoos, Deutschland) und Intervet (Boxmeer, Niederlande) stellen Lebendimpfstoffe und inaktivierte Vakzine für Deutschland her.

## **Inaktivierte Vakzine**

Die ersten Impfversuche erfolgten bereits im Jahr 1987 in Frankreich durch Impfung von **SPF-Puten** mit formalin-inaktiviertem APV (Giraud et al., 1987).

Chettle (1991) berichtet über den Einsatz einer inaktivierten Ölemulsionvakzine aus APV von Puten bei zwei **Mastelertierherden**. Die Vakzine wurde 12 Wochen alten Tieren subkutan appliziert. Nach 16 Wochen trat bei der ungeimpften Gruppe, die in einem anderen Stall desselben Betriebs gehalten wurde, ein drastischer Abfall der Legeleistung auf, die von typischen SHS-Symptomen begleitet wurde. Die geimpften Tiere hingegen zeigten weder Legeleistungsabfall noch Krankheitssymptome. Die durchschnittliche Legeleistung und auch die Schlupfrate der geimpften Tiere lagen höher als die der ungeimpften und natürlich infizierten Herde. Ein vollständiger Schutz vor APV Infektionen der Tiere ist aber nicht gegeben.

Seit 2004 ist in Deutschland ein inaktivierter Impfstoff für Puten (Intervet, Boxmeer, Niederlande) und zwei inaktivierte Impfstoffe für Hühner (Merial GmbH Deutschland, Intervet, Boxmeer, Niederlande) zugelassen.

Gegen Infektionen mit dem Subtyp C schützen die inaktivierten Vakzine bisher nicht (Kapczynski und Sellers, 2003).

## **Lebendvakzine**

Lebendvakzine werden durch Attenuierung von Virusisolaten aus Puten oder Hühnern gewonnen. Sie werden genutzt, um Mastputen und Masthühner zu immunisieren und junge Legehennen zu primen. Wichtig ist dabei, jedem Tier eine adäquate Dosis am 1. Lebenstag zu impfen. Eine in ovo Impfung am 24. Tag stellte sich als gleichwertig zu den konventionellen Methoden dar (Worthington et al., 2003). Lebendvakzine stimulieren sowohl die lokale Immunität im Respirationstrakt (Khehra und Jones, 1998) als auch eine systemische Immunität. Alle Lebendimpfstoffe verursachen eine Impfreaktion nach ca. zwei Wochen. Die Vögel husten, schütteln den Kopf, haben geschwollene Sinus und Augenausfluss. Ohne bakterielle Sekundärinfektionen erholen sich die Tiere. Eine Sulfonamidgabe kann die Mortalität einschränken.

Die Immunprophylaxe mit attenuierten Vakzinen wurde zunächst in Laborversuchen geprüft. Im Jahr 1987 berichteten Giraud und Mitarbeiter über den Einsatz eines über 39 Passagen in VERO-Zellen attenuierten APV bei 10 Tage alten **SPF- Puten**. Eine einmalige Impfung via Augentropfen schützte die Puten am 18. Lebenstag gegen den

pathogenen Stamm. Bei einer inokulären Impfung oder Sprayimpfung am 1. und am 11. Tag war der Schutz bis zu 14 Wochen (Giraud et al., 1987) wirksam. Eine Immunität entwickelt sich bei sieben Tage alten SPF Küken nach der Impfung innerhalb von ca. 6 Tagen (Cook et al., 1989b).

Zwischen den Subtypen A und B besteht eine Kreuzimmunität. Zusätzlich ist ein Schutz vor Infektionen mit dem Subtyp C aus Colorado gegeben (Cook et al., 1999) und dem Subtyp D aus Frankreich (Toquin et al., 1999b). In Amerika wurde Lebendimpfstoff auf der Basis von Subtyp C hergestellt, der nach 41 Passagen in Vero Zellen noch klinische Symptome hervorrief, jedoch nach 61 Passagen ausreichend attenuiert war und den Puten Schutz vor virulentem Virus bot (Patnayak et al., 2002). Ein weiterer Impfstoff wurde auf VERO Zellen kalt-adaptiert (31 °C) und erwies sich als ebenso wirksam (Patnayak et al., 2003, Patnayak und Goyal, 2004a, b).

Über die Applikation attenuierter Lebendvakzine bei *Broilern* berichteten schon 1984 Morley und Thomson. Das aus Broilern mit SHS- Symptomen isolierte und als Coronavirus bezeichnete Virus wurde über 50 Embryopassagen attenuiert. Nach einer intraokulären Impfung am ersten Lebenstag konnten nach Gabe von pathogenem Virus in der vierten Lebenswoche keine Krankheitssymptome hervorgerufen werden.

Die ersten Feldversuche in französischen **Putenbeständen** mit dem attenuierten Lebendimpfstoff der Firma Rhône Mérieux ergaben keine lang anhaltende Immunität. Jedoch konnte eine zweimalige Impfung am 1. Lebenstag (Spray) und in der 3. Lebenswoche (Trinkwasser) oder eine dreimalige Impfung in der 1., 3. und 8. bis 9. Lebenswoche die Symptome bei einer APV-Infektion vermindern und die wirtschaftlichen Parameter des Betriebes verbessern. Die Mortalität und die Kosten für Medikamente verringerten sich deutlich (Le Gros et al., 1988; Vanmarcke und Le Gros, 1988; Gaudry, 1991; Hafez, 1994; Van de Zande et al., 2002).

Bei der Impfmethode nach dem „Ausscheider-Tiere“-Verfahren werden nur wenige Tiere in einer Herde geimpft, die durch Kontakt das Impfvirus weitergeben. Diese Methode reduziert auch die wirtschaftlichen Verluste bei einem Ausbruch von APV (Gulati et al., 2001a).

Lebendvakzine können durch 4-10 Passagen in nicht geimpften Tieren im Feld wieder virulent werden. DNA-Impfstoffe oder rekombinante Geflügelpocken-Impfstoffe bieten jedoch noch zu wenig Schutz (Naylor et al., 2002).

Nach Angaben von Gaudry (1991) führte die Impfung gegen das APV unter Praxisbedingungen im Vergleich zu durchgeführten Laborversuchen zu einer niedrigeren

Immunantwort. Trotzdem schien die Impfung einen ausreichenden Schutz gegen klinische Erscheinungen zu vermitteln. Es besteht demnach nur eine geringe Korrelation zwischen der Höhe der Antikörpertiter und dem Impfschutz (Gaudry, 1991). Maternale Antikörper schützen nicht vor Infektionen (Naylor et al., 1997b), noch verhindern sie die erfolgreiche Verabreichung von Impfstoffen (Cook et al., 1989b).

Eine Hemmung der Antikörperbildung bei einer Impfung gegen das APV tritt bei gleichzeitiger Impfung mit dem IB-Impfvirus H 120 und dem Newcastle-Disease-Impfvirus Hitchner B-1, jedoch nicht mit dem HE-Impfvirus auf. Vermutlich kommt es aufgrund einer kompetitiven Hemmwirkung zur Beeinträchtigung der Antikörperbildung (Gaudry, 1991; Cook et al., 2001).

In Putenbeständen in Deutschland hat sich ein Impfprogramm mit dem attenuierten Lebendimpfstoff aus Frankreich bewährt. Das Impfvirus wurde in der 1., 3. und 8. Lebenswoche allen Tieren über das Trinkwasser verabreicht, eine zusätzliche Impfung erfolgte für die Hähne in der 14. Lebenswoche (Heffels-Redmann et al., 1991). Es gibt in Deutschland kein vorgeschriebenes Impfprogramm, sondern nur Empfehlungen der Hersteller.

### **Kombiniertes Impfprogramm mit inaktiviertem Impfstoff und Lebendimpfstoff**

Durch Verwendung von attenuiertem Lebendimpfstoff wurden bei **Puten** nach der Impfung gelegentlich chronische Symptome einer APV-Infektion beobachtet (Gaudry, 1991). Der Autor führte Versuche mit einem kombinierten Impfprogramm unter Verwendung von Lebendvakzine und inaktivierter Ölemulsionsvakzine der Firma Rhône Mérieux durch. Puteneltern-tierherden wurden am 1. Lebenstag mit attenuierter Lebendvakzine (Spray) vorgeimpft und in der 2. Lebenswoche mit einer inaktivierten Ölemulsionsvakzine nachgeimpft. Die post vaccinationem auftretende chronische Form der Infektion mit APV trat zwar noch auf, jedoch erst zwei Wochen später als bei den nur mit Lebendimpfstoff geimpften Tieren.

Durch Versuche gelang es nachzuweisen, dass **Puten** durch eine Kombination von Lebendimpfstoff und inaktivierten Vakzinen wesentlich schwächere Symptome der Infektion mit APV zeigten (Cook et al., 1996). In der ersten Lebenswoche wurden Putenhennen mit einem Lebendimpfstoff (Spray) und in der 30. Lebenswoche mit einem inaktivierten Impfstoff geimpft. In der 38. Lebenswoche wurden die Tiere mit APV infiziert (okular und intranasal) und über 10 Tage beobachtet. Die klinischen Symptome waren bei den geimpften Tieren schwach und zeichneten sich durch Husten und Kopfschütteln aus. Die Eierproduktion sank jeweils nach der wiederholten Impfung in der 38. Woche. Bei

nicht geimpften Tieren sank die Legeleistung um 75 %. Bei Tieren, die nur mit dem Lebendimpfstoff geimpft waren, sank die Legeleistung um 36 %. Nach der Anwendung eines kombinierten Impfprogramms ging die Legeleistung um 17,5 % zurück. Die geimpften Herden zeigten im Vergleich zu Kontrollherden höhere Legeleistungen, geringere Mortalitätsraten und waren weniger anfällig gegen betriebsbedingte Störungen. Um eine vollständige Wirkung des inaktivierten Impfstoffs zu erhalten, sollten mindestens 6 Wochen Abstand zum vorher verabreichten Lebendvakzin eingehalten werden.

Bei mehr als zwei Millionen **Hühnereltern** wurde in Frankreich ein Impfprogramm zum Schutz vor SHS mit einem Lebend- und einem inaktiviertem Impfstoff der Firma Rhône Mérieux durchgeführt (Goater, 1991). Die Tiere wurden in der 12. Lebenswoche mittels Augentropf- oder Sprayverfahren mit einer Lebendvakzine geimpft und anschließend in der 16. Lebenswoche (Legetyp) oder in der 20. Lebenswoche (Masttyp) mit einer inaktivierten Ölemulsionsvakzine geboostert. Außer gelegentlichen respiratorischen Symptomen waren keine Nebenwirkungen bei den geimpften Tieren nachweisbar. Die geimpften Herden zeigten im Vergleich zu Kontrollherden eine höhere Legeleistung, geringere Mortalitätsraten und waren weniger anfällig gegen andere betriebsbedingte Störungen.

Cook et al. führten 1999 einen Impfversuch mit Legehennen durch. Eintagesküken wurden mit Lebendimpfstoff per Augentropfen geimpft. Nach 16 Wochen wurden sie intramuskulär mit inaktiviertem Impfstoff geimpft und in der 28. Woche wurden die Tiere mit APV intravenös infiziert und über fünf Wochen beobachtet. Die Ergebnisse waren ähnlich wie bei den Puten-Impfversuchen (Cook et al., 1996) mit dem Unterschied, dass bei dem kombinierten Impfprogramm die Tiere gar kein Legedefizit aufwiesen.

Bei **Broilerherden** ist es bislang noch nicht gelungen, eine wirksame Impfung durchzuführen. IB-Feld- oder Impfvirusstämme können die Vermehrung eines Impfpneumovirus im oberen Respirationstrakt verhindern (Gaudry, 1991).

### **DNS-Impfstoff**

Dieser Impfstoff ist effektiv um Tiere vor einer infektiösen Erkrankung zu schützen, indem es die humorale und zelluläre Immunität anregt. In einem Versuch wurden zwei DNS-Impfstoffe des Subtypes C miteinander verglichen. 7 Tage alte Puten wurden in Gruppen getrennt und zweimalig im Abstand von einer Woche mit DNS-Impfstoff geimpft. Eine Gruppe erhielt Impfstoff auf Basis des N-Gens und eine andere Impfstoff auf Basis des F-Gens. Nach 4 Wochen wurden die Tiere mit einem APV Subtyp C infiziert. Sowohl die

geringen klinischen Symptome als auch die höhere Anzahl an Antikörpern sprach für den DNS Impfstoff, der auf der Basis des F-Gens beruht (Kapczynski und Sellers, 2003). Ob eine Immunität gegen die anderen Subtypen des APV erreicht wird, wie lange diese anhält und wie hoch die Dosis sein muss, ist noch nicht geklärt. Kapczynski und Sellers entwickelten 2003 einen Virosom-Impfstoff, der das F- und G-Protein enthält. Bei einer intranasalen Verabreichung wurde eine Abschwächung der klinischen Symptome sowie eine erhöhte AK-Produktion bei den Puten beobachtet.