

Aus dem Institut für Tierpathologie
und dem
Institut für Geflügelkrankheiten
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Die Bedeutung der invasiven Aspergillose
für die aktuell regional gehäufte Nestlingssterblichkeit
deutscher Weißstörche**

Inaugural-Dissertation
zu Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Philipp Olias
Tierarzt aus Erlangen

Berlin 2010

Journal-Nr.: 3438

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Achim D. Gruber, Ph.D.
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Hafez M. Hafez
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Alex Greenwood

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Aspergillus, aspergillosis, mycoses, pneumonia, polymerase chain reaction, birds, Ciconiidae, epidemiology, ecosystems, climatic change, Germany

Tag der Promotion: 09.12.2010

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-902-6

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2010

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2011

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meiner Familie

Diese Arbeit wurde gefördert aus Mitteln des Naturschutzbund Deutschland (NABU), Regionalverband Calau e.V., Brandenburg, und des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF).

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab als Vortrag auf wissenschaftlichen Kongressen vorgestellt:

1. Microsatellite genotyping and virulence assessment of *Aspergillus fumigatus* isolates from white stork nestlings and their environment

Autoren: Olias P, Jacobsen ID, Slesiona S, Brock M, Lierz M, Hafez HM, Gruber AD

Datum: 11.09.2009

Kongress: 27th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology and European College of Veterinarinary Pathologists, Krakow, Polen

2. Genotypisierung invasiver *Aspergillus fumigatus*-Stämme bei mykotischer Pneumonie in Weißstorch-Nestlingen

Autoren: Olias P, Jacobsen ID, Slesiona S, Brock M, Lierz M, Hafez HM, Gruber AD

Datum: 14.03.2010

Kongress: 53. Jahrestagung der DVG-Fachgruppe Pathologie, Fulda

3. Molecular epidemiology and pathogenicity assessment of *Aspergillus fumigatus* isolates from white stork chicks

Autoren: Olias P, Gruber AD, Hafez HM, Lierz M, Slesiona S, Brock M, Jacobsen ID

Datum: 22.06.2010

Kongress: Jahrestagung der DVG-Fachgruppe Bakteriologie und Mykologie und des Friedrich-Löffler Instituts, Jena

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	VII
II LISTE DER PUBLIKATIONEN, DIE BESTANDTEIL DIESER DISSERTATION SIND UND BESCHREIBUNG DER EIGENEN BEITRÄGE.....	IX
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT	3
2.1 Die Weißstorchpopulation in Deutschland	3
2.2 Gefährdungsursachen von Weißstörchen	6
2.3 Pilze als Infektionserreger bei Vögeln	10
2.4 Pathophysiologie der aviären Aspergillose	12
2.5 Diagnostik der invasiven Aspergillose	14
2.6 Molekulare Epidemiologie von <i>Aspergillus fumigatus</i>	15
2.7 Virulenzeigenschaften von <i>Aspergillus fumigatus</i>	17
3. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	19
3.1 Die mykotische Pneumonie als eine Haupttodesursache von Weißstorch- Nestlingen (<i>Ciconia ciconia</i>)	19
3.2 Identifizierung der Pilzspezies aus aviären Lungenproben mittels Laser- mikrodissektion und PCR-Produkt Sequenzierung	23
3.3 Molekulare Epidemiologie und Virulenzbestimmung von <i>Aspergillus fumigatus</i> - Isolaten aus Weißstorch-Nestlingen und ihrer Umwelt	25
4. ÜBERGREIFENDE DISKUSSION	27
4.1 Die Entdeckung von Schimmelpilzen als Ursache einer erhöhten Sterblichkeit von Weißstorchnestlingen	27
4.2 Entwicklung einer neuen Methode zur präzisen Identifizierung der invasiven Pilzspezies	28
4.3 Mögliche Hintergründe zu dem plötzlichen Auftreten der Schimmelpilzmykosen ...	30
4.4 Die Bedeutung hochvirulenter <i>Aspergillus fumigatus</i> -Stämme	33
4.5 Ausblick	35
5. ZUSAMMENFASSUNG	39
6. SUMMARY	41

7.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	43
8.	AUSFÜHRLICHE DARSTELLUNG DER UNTERSUCHUNGEN	44
8.1	PUBLIKATION 1	45
8.2	PUBLIKATION 2	50
8.3	PUBLIKATION 3	56
9.	TABELLEN	64
10.	LITERATURNACHWEIS	70
11.	DANKSAGUNG	88
12.	SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	89

I VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

Abb.	<u>Ab</u> bildung
ABV	<u>A</u> viäres <u>B</u> ornav <u>i</u> rus
AFLP	engl. <u>A</u> mplified <u>F</u> ragment <u>L</u> ength <u>P</u> olymorphism
Bd	<u>B</u> atrachochytrium <u>d</u> endrobatidis
BLAST	engl. <u>B</u> asic <u>L</u> ocal <u>A</u> lignment <u>S</u> earch <u>T</u> ool
BB	<u>B</u> randen <u>b</u> urg
BL	<u>B</u> undes <u>l</u> and
BW	<u>B</u> aden- <u>W</u> ürttemberg
BY	<u>B</u> ayern
DDT	<u>D</u> ichlor <u>d</u> iphenyltrichlorethan
DHS	<u>D</u> ermatophyten- <u>H</u> efen- <u>S</u> chimmelpilze
engl.	<u>E</u> nglisch / aus dem Englischen
ePub	elektronische Publikation (engl. <i>electronic publication</i>)
H5N1	<u>H</u> ämagglutinin <u>5</u> , <u>N</u> euraminidase <u>1</u>
HCB	<u>H</u> exachlorobenzene
HCH	<u>H</u> exachlorocyclohexane
H&E	<u>H</u> ämatoxylin <u>E</u> osin
HE	<u>H</u> essen
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus (engl. <i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HPa	<u>H</u> orstpaare allgemein
HPAIV	<u>H</u> ochpathogenes <u>A</u> viäres <u>I</u> nfluenzav <u>i</u> rus
IA	<u>I</u> nvasive <u>A</u> spergillose
ID	<u>I</u> dentität
IFA	engl. <i>Indirect Immunofluorescence Assay</i>
ITS	Spacer-DNA-Sequenz (engl. <i>Internal Transcribed Spacer</i>)
JZa	Gesamtbruterfolg (<u>J</u> ungen <u>z</u> ahl)
LCM	Laser-gestützte Mikrodisektion (engl. <i>Laser Capture Microdissection</i>)
MAT	Kreuzungstyp (engl. <i>Mating Type</i>)
MLEE	engl. <i>Multilocus Enzyme Electrophoresis</i>
MLMT	engl. <i>Multilocus Microsatellite Typing</i>
MLP	engl. <i>Microsatellite Length Polymorphism</i>
MLST	engl. <i>Multilocus Sequence Typing</i>
MV	<u>M</u> ecklenburg- <u>V</u> orpommern
NDS	<u>N</u> ieders <u>s</u> achsen
Nr.	<u>N</u> ummer

NRW	<u>N</u> ord <u>r</u> hein- <u>W</u> estfalen
NT	<u>N</u> eu <u>t</u> ralisations- <u>T</u> est
p.i.	post <u>i</u> nfectionem
PAS	PAS-Reaktion (engl. <u>P</u> eriodic <u>A</u> cid- <u>S</u> chiff)
PCB	<u>P</u> oly <u>ch</u> lorierte <u>B</u> iphenyle
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl. <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
PMV	<u>P</u> aramyxo <u>v</u> irus
Publ.	<u>P</u> ubl <u>i</u> kation
RAPD	engl. <u>R</u> andomly <u>A</u> mplified <u>P</u> olymorphic <u>D</u> NA
RFLP	<u>R</u> estriktions <u>f</u> ragment <u>l</u> ängen <u>p</u> olymorphismus
RP	<u>R</u> heinland- <u>P</u> falz
RT-PCR	<u>R</u> everse <u>T</u> ranskription-Polymerase Kettenreaktion
SA	<u>S</u> achsen- <u>A</u> nhalt
SH	<u>S</u> chleswig- <u>H</u> olstein
SSDP	engl. <u>S</u> equence <u>S</u> pecific <u>D</u> NA <u>P</u> rimer
STR	repetitive DNA-Elemente (engl. <u>S</u> hort <u>T</u> andem <u>R</u> epeat)
STR ^{Af}	STR <u>A</u> sp <u>e</u> rgillus <u>f</u> umigatus
T _{max}	Mittlere Tageshöchsttemperatur
Tab.	<u>T</u> abelle
UPGMA	engl. <u>U</u> nweighted <u>P</u> air <u>G</u> roup <u>M</u> ethod with <u>A</u> rithmetic <u>M</u> ean
UV	<u>U</u> ltraviolett
WNS	engl. <u>W</u> hite <u>N</u> ose <u>S</u> ndrome
WNV	engl. <u>W</u> est <u>N</u> ile <u>V</u> irus

II LISTE DER PUBLIKATIONEN, DIE BESTANDTEIL DIESER DISSERTATION SIND UND BESCHREIBUNG DER EIGENEN BEITRÄGE

1. Fungal pneumonia as a major cause of mortality of white stork (*Ciconia ciconia*) chicks

Autoren: Olias P, Gruber AD, Böhmer W, Hafez HM, Lierz M
Jahr: 2010
Zeitschrift: Avian Diseases 54:94-98.
DOI: 10.1637/9088-092509-Reg.1

Eigener Anteil an der Publikation: Selbstständige Planung, Durchführung und Auswertung aller dargestellten Untersuchungen, eigenständiges Erstellen des gesamten Manuskripts.

2. Fungal species identification from avian lung specimens by single hypha laser microdissection and PCR product sequencing

Autoren: Olias P, Jacobsen ID, Gruber AD
Jahr: 2011
Zeitschrift: Medical Mycology 49:56-61
DOI: 10.3109/13693786.2010.497172

Eigener Anteil an der Publikation: Selbstständige Planung, Durchführung und Auswertung aller dargestellten Untersuchungen, eigenständiges Erstellen des gesamten Manuskripts.

3. Molecular epidemiology and virulence assessment of *Aspergillus fumigatus* isolates from white stork chicks and their environment

Autoren: Olias P, Gruber AD, Hafez HM, Lierz M, Slesiona S, Brock M, Jacobsen ID
Jahr: 2011
Zeitschrift: Veterinary Microbiology
DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.08.029

Eigener Anteil an der Publikation: Eigenständige Planung und Durchführung der Stammissolierung und morphologischen Charakterisierung. Eigenständige Planung, Durchführung und Auswertung der Multiplex-PCR. Eigenständige Planung und Auswertung des *Multilocus Microsatellite Typing* sowie Erstellen aller diesbezüglichen Manuskriptteile (Material und Methoden, Ergebnisse, Diskussion). Daneben inhaltliche und methodische Beiträge zur Planung und Durchführung der Virulenzuntersuchung im *in vivo*-Modell.

1 EINLEITUNG

Die jüngste Vergangenheit hat gezeigt, mit welcher Rasaniz eingeschleppte oder neu auftretende Infektionserreger Wildtierpopulationen in ihrer Existenz bedrohen können (Daszak et al. 2000). Oftmals stellt die schnelle Klärung ökologischer und pathophysiologischer Zusammenhänge als Grundlage für geeignete Gegenmaßnahmen eine große Herausforderung dar. Ein Beispiel hierfür ist das 1999 über New York in Nordamerika eingeschleppte West Nile Virus, das die amerikanische Krähenpopulation inzwischen bereits fast zur Hälfte dezimiert hat ohne dass bisher geklärt werden konnte, was die besondere Empfänglichkeit dieser Vogelart ausmacht (Brault et al. 2007; LaDeau et al. 2007). Ähnlich verheerende Konsequenzen hatte die Einschleppung der Vogel malaria für die naive Vogelwelt der hawaiianischen Inseln (van Riper III et al. 1986). Aber nicht nur Viren und Parasiten sondern auch Pilze können seuchenhafte Verläufe annehmen. Jüngstes Beispiel ist das erstmals 2006 in der Fledermauspopulation der nordöstlichen USA aufgetretene sogenannte *White Nose Syndrome* (WNS), welches eine Mortalitätsrate von bis zu 95% in betroffenen Fledermauspopulationen verursacht (Frick et al. 2010) und mit einem Befall des neu entdeckten Pilz *Geomyces destructans* einhergeht (Blehert et al. 2009; Wibbelt et al. 2010). Ein anderer, erst Ende der 1990er Jahre entdeckter Pilz, *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd; Berger et al. 1998; Longcore et al. 1999), zeigt sich mitverantwortlich für das derzeitige katastrophale, weltweite Amphibiensterben (Kilpatrick et al. 2009). Erst kürzlich konnten wichtige Erkenntnisse zum Verständnis der Pathophysiologie dieses Pilzes gewonnen werden (Voyles et al. 2009), die mögliche Ansätze für geeignete Gegenmaßnahmen bieten (Becker et al. 2009). Anhand von Bd zeigt sich exemplarisch, dass zum Verständnis der Epidemiologie von Mykosen zumeist die Betrachtung komplexer ökologischer Zusammenhänge notwendig ist. So wurden bei Amphibien Unterschiede in der Empfänglichkeit für Bd beobachtet, die auf klimabedingte Temperaturunterschiede (Berger et al. 2004; Rohr und Raffel 2010), die Immunabwehr (Harris et al. 2006; Woodhams et al. 2007), das Habitat (Kriger und Hero 2007; Rowley und Alford 2007) und die ökologische Nische (Lips et al. 2003) des Wirts zurückgeführt werden konnten. Zusammengefasst spiegeln sich diese Erkenntnisse in der gegenwärtigen wissenschaftlichen Diskussion, ob Bd erst kürzlich in naive Amphibienpopulationen eingeschleppt wurde (*Novel Pathogen Hypothesis*) oder ob es sich um ein bereits lange Zeit vorhandenes endemisches Pathogen handelt und der Populationsrückgang auf Veränderungen der Wirtsempfänglichkeit, der Erregervirulenz, Umweltveränderungen oder einer Kombination dieser Faktoren beruht (*Endemic Pathogen Hypothesis*; Kilpatrick et al. 2009).

Im Jahr 2005 erlebte die ostdeutsche Weißstorchpopulation einen dramatischen Einbruch, sowohl in der Anzahl der zurückkehrenden Altvögel als auch im Bruterfolg. Gleichzeitig wurde in der Presse von ungewöhnlichen Totalverlusten ganzer Bruten berichtet (Anonymous 2005a; Anonymous 2005b). Erste pathologische Untersuchungsergebnisse aus dem gleichen Jahr und aus 2006 zeigten, dass möglicherweise Pilzinfektionen der Atemwege der Nestlinge eine bisher nicht bekannte Rolle bei Brutaussfällen dieser Art spielen könnten. Die deutsche Weißstorchpopulation befindet sich seit den 1990er Jahren nach ihrem verheerenden Niedergang Mitte des letzten Jahrhunderts in einer fragilen Stabilisierungsphase und erreichte erst jüngst wieder eine Populationsstärke von etwa 4.000 Brutpaaren. Über die Bedeutung von mykotischen Pneumonien bei Weißstorchnestlingen war bisher nichts bekannt. Hinzu kommt, dass es gegenwärtig keine Vergleichsdaten über das Vorkommen von Pilzinfektionen bei Nestlingen anderer Wildvogelspezies gibt. Umso wichtiger war eine rasche Klärung, ob neue oder eingeschleppte Pilzspezies eine ursächliche Rolle spielen. Die vorliegende Arbeit befasst sich daher mit der Aufklärung der Ursachen dieser offenbar plötzlich aufgetretenen, erhöhten Nestlingssterblichkeit und soll einen Beitrag zum Verständnis der Bedeutung von Pilzinfektionen bei Weißstorchnestlingen leisten.

Der kumulativen Dissertation liegen drei wissenschaftliche Zeitschriften-Veröffentlichungen aus dem Jahr 2010 zugrunde, von denen Sonderdrucke beigelegt sind. In der Einleitung dieser Promotionsarbeit wird zunächst ein umfangreicher Grundriss über den derzeitigen Wissensstand zur Weißstorchpopulation und ihren bekannten Gefährdungsursachen gegeben. Eine allgemeine Besprechung von wissenschaftlichen Erkenntnissen zu Pilzinfektionen von Vögeln sowie ein detaillierter Überblick zum bedeutendsten aviären Infektionserreger unter den Pilzen, *Aspergillus fumigatus*, schließen sich an und sollen insgesamt eine Grundlage für das Verständnis und die Einordnung der eigenen wissenschaftlichen Ergebnisse dieser Promotionsarbeit liefern. In einer Zusammenfassung werden die experimentellen Strategien der drei eigenen Publikationen sowie die wesentlichen Ergebnisse und ihre Interpretationen erläutert. Die ausführlichen Darstellungen der experimentellen Protokolle sind aus den einzelnen Publikationen im Anhang zu entnehmen. Eine übergreifende Diskussion soll schließlich die Inhalte der einzelnen Publikationen miteinander zu einem Gesamtbild verknüpfen und deren Relevanz für die eingangs formulierten Ziele der Arbeit beleuchten.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Die Weißstorchpopulation in Deutschland

Der Weißstorch (*Ciconia c. ciconia* LINNÆUS 1758) gehört zur Gattung *Ciconia*, die in Europa zusammen mit dem Schwarzstorch (*Ciconia nigra*) mit zwei Arten vertreten ist (Hancock et al. 1992). Im Gegensatz zum scheuen Schwarzstorch ist der Weißstorch ein Kulturfolger, der typischerweise in offenen, ländlichen Gegenden vorkommt (Creutz 1988). Hier errichten die Vögel auf Gebäuden, Masten, Nistplattformen oder Bäumen eindrucksvolle Nester, welche zumeist jedes Jahr wiederbenutzt und lediglich ausgebessert werden. Mitteleuropäische Weißstörche kehren Ende Februar bis Mitte Mai aus ihren Überwinterungsgebieten in Afrika und dem südlichen Europa in ihre angestammten Nistreviere zurück. Ihr Gelege besteht aus drei bis fünf Eiern, die zwischen 31 und 34 Tage bebrütet werden (Bauer und Glutz von Blotzheim 1966). In den ersten drei Wochen nach dem Schlupf können die typischen Nesthocker (*Altricial Type Bird*; Skutch 1976) ihre Körpertemperatur noch nicht selbständig regulieren oder sich bewegen und sind gänzlich auf den Schutz und die Fütterung der Elternvögel angewiesen (Redondo et al. 1995; Tortosa und Castro 2003). Etwa acht bis neun Wochen nach dem Schlupf verlassen die Jungstörche das Nest und fliegen aus.

In Deutschland beträgt die Population des auf der Roten Liste als gefährdet eingestuften Vogels gegenwärtig etwa 4.000 Brutpaare (Kaatz 2008). Ab der Mitte des letzten Jahrhunderts kam es zu einem massiven Einbruch in der europäischen Weißstorchpopulation mit einem Rückgang auf teils kleine Restpopulationen (beispielsweise in Frankreich) oder dem gänzlichen Erlöschen der Art etwa in der Schweiz und Schweden und erst kürzlich in Dänemark (Bauer 2005; Rheinwald et al. 1989). Während bei der ersten umfangreichen Bestandszählung 1934 in Deutschland westlich der Oder und Neiße noch 9.035 Brutpaare gezählt wurden, war 1988 mit knapp 3.000 Brutpaaren ein historischer Tiefstand erreicht (Abb. 1). Der Niedergang der imposanten Stelzvogelart wurde dabei vornehmlich auf eine Intensivierung der Landwirtschaft mit verstärktem Pestizideinsatz und Trockenlegung geeigneter Feuchtgebiete als Nahrungsflächen zurückgeführt (Bairlein 1991; Bauer 2005). Anfang der 1990er Jahren kam es zu einer mäßigen Erholung des deutschen Bestandes, der sich bei etwa 4.000 Brutpaaren mit geringen jährlichen Schwankungen stabilisierte (Schulz 1999). Die jährliche Populationsdynamik ist maßgeblich von der Höhe der Überlebensrate der Altvögel (Anzahl der tatsächlich aktiv an der Reproduktion beteiligten Brutpaare = HPa) sowie von den erfolgreich aufgezogenen Jungvögeln (Gesamtbruterfolg: Jungenzahl pro HPa = JZa) abhängig. Zum Erhalt einer stabilen Population wird gegenwärtig von einer notwendigen jährlichen Reproduktionsrate von 2 bis 2,45 Jungvögeln pro HPa ausgegangen (Creutz 1988; Profus 1986; Schimkat 2004). Jahre, in denen diese Zahl deutlich unterschritten

wird, werden als Störungsjahre bezeichnet (Schüz 1959). Bekannte Beispiele hierfür sind die Jahre 1991 und 1997 (Abb. 1). Populationsschwankungen können bei Zugvögeln allgemein von Störungen in drei geographischen Bereichen ausgehen: (1) dem Brutgebiet, (2) dem Migrationsweg und (3) dem Winterquartier. Diese Bereiche sind im Zusammenhang zu sehen und bedingen sich gegenseitig (Saether et al. 2006). Beispielsweise führt ein Verlust an potentiellen Brutvögeln in den Überwinterungsgebieten zwangsläufig zu einer niedrigeren Reproduktionsrate in den Brutgebieten.

Im Störungsjahr 1997 wurden bei einem deutlichen Einbruch der Zahl der Brutpaare (HPa) und dem Gesamtbruterfolg (JZa; Abb. 1) diese weitreichenden Zusammenhänge deutlich. Für eine nähere Betrachtung ist zunächst zu berücksichtigen, dass quer durch Deutschland eine sogenannte Zugscheide verläuft (Schüz 1961; Abb. 4), wobei die kleine westdeutsche Population (etwa 300 Brutpaare) in ihr Überwinterungsgebiet über die Iberische Halbinsel bis nach Westafrika zieht und die bedeutend größere ostdeutsche Population (> 3.500 Brutpaare) über den Bosphorus bis nach Ost- und Südafrika (Kaatz 2008; van den Bossche et al. 1998).

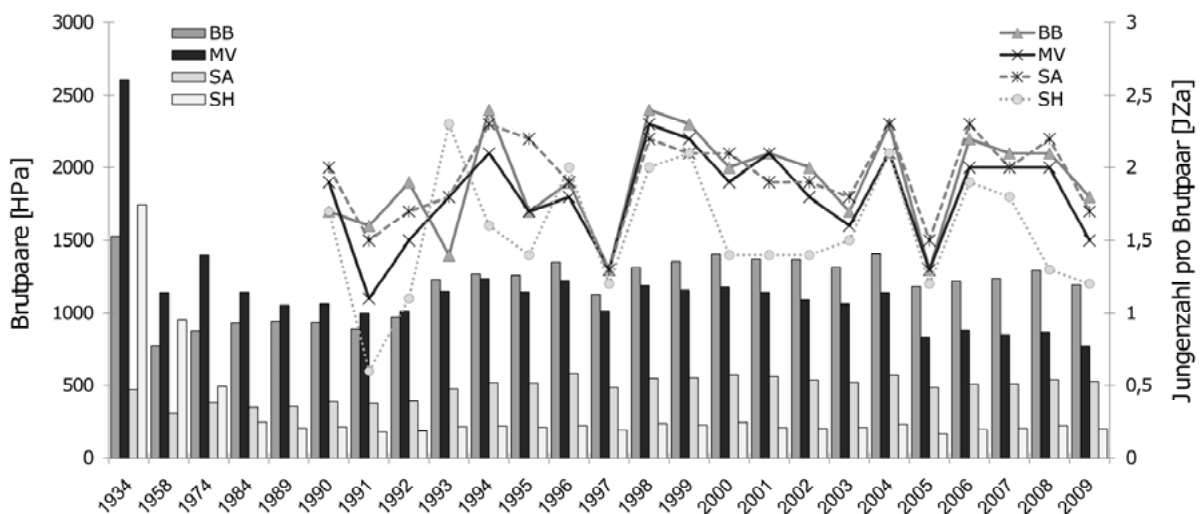


Abb. 1: Populationsdynamik ostziehender Weißstörche in Deutschland (1934 – 2009). Die Jahre 1991, 1997 und 2005 mit einem massiven Einbruch in der pro Brutpaar erfolgreich aufgezogenen Jungen (JZa) werden als Störungsjahre bezeichnet. Im Gegensatz zu den Störungsjahren 1991 und 1997 zeigte die ostziehende Weißstorchpopulation in ihren wichtigsten Brutgebieten Deutschlands (Brandenburg und Mecklenburg-Vorpommern) nach dem Störungsjahr 2005 keine Bestandserholung. Im Vergleich lässt die Weißstorchpopulation Schleswig-Holsteins deutliche Abweichungen der JZa erkennen, die einen starken lokalen Einfluss des atlantischen Klimas auf eine erfolgreiche Jungenaufzucht vermuten lassen (Löhmer und Beyerbach 1992). BB = Brandenburg; MV = Mecklenburg-Vorpommern; SA = Sachsen-Anhalt;

SH = Schleswig-Holstein. Details siehe auch Tab. 1. Grafik: eigene Zusammenstellung aus Rohdaten folgender Quellen: Kaatz 2008; C. Kaatz, K.-M. Thomsen, persönliche Mitteilung.

Der Großteil der ostziehenden Tiere kehrte 1997 etwa einen Monat später als gewöhnlich in ihr angestammtes Brutgebiet zurück (Berthold et al. 2002; Ptaszyk et al. 2003). Studien konnten zeigen, dass eine verspätete Ankunft von Weißstörchen im Brutgebiet und spät mit der Brut beginnende Paare einen geringeren Gesamtbruterfolg zur Folge haben (Profus 1986, Schulz 1998; Tryjanowski et al. 2004; Vergara et al. 2007). Hierfür wurden 1997 zwei mögliche Ursachen gefunden: (1) Ein verzögerter Abflug aus dem Überwinterungsgebiet, der mit hoher Wahrscheinlichkeit durch einem Mangel an Nahrung verursacht wurde (Berthold et al. 2002; Schüz 1971) und (2) zum anderen wurden Tiere auf ihrem Weg in der Türkei von einer Schlechtwetterfront aufgehalten und flogen teilweise wieder zurück Richtung Süden (Kaatz 1999). Zahlreiche Studien konnten einen signifikanten Zusammenhang von ungünstigen Wetterbedingungen im Überwinterungsgebiet und auf dem Zugweg mit einer darauf folgenden niedrigen Reproduktionsrate im Brutgebiet darstellen (Dallinga und Schoenmakers 1989; Kanyamibwa et al. 1993; Kanyamibwa et al. 1990; Schaub et al. 2005). Dabei sind langfristige Populationsrückgänge von südlich der Sahara überwinternden Zugvögeln aufgrund von globalen Klimaveränderungen und komplexen ökologischen Zusammenhängen bereits gezeigt worden (Both et al. 2006; Jonzen et al. 2006) und können Einflüsse auf die Weißstorchpopulation haben. Zahlreiche Studien gehen zudem davon aus, dass ungünstige Klimabedingungen mit kaltem und regnerischem Wetter im Brutgebiet zu einer niedrigen Reproduktionsrate führen können (Bert und Lorenzi 1999; Carrascal et al. 1993; Jakubiec 1991; Jovani und Tella 2004; Moritzi et al. 2001a). Anekdotisch wird bei einem beobachteten wetterbedingten Verlust häufig von einer Unterkühlung der Tiere ausgegangen (Haas 1966). Der kausale Zusammenhang des lokalen Klimas und der Mortalitätsursachen von Weißstorchnestlingen wurde bisher jedoch nicht genauer untersucht. Neben dem lokalen Klima hat auch das während der Brutzeit herrschende Futterangebot einen Einfluss auf die Höhe der Reproduktionsrate. Diese ist größer in Jahren mit einer hohen Dichte an Wühlmäusen (Tryjanowski und Kuzniak 2002) und bei Brutpaaren, die dichter an nahrungsreichen Biotopen brüten (Tortosa et al. 2002; Tortosa et al. 2003) und somit einen besseren Zugang zu Futterquellen besitzen (Tryjanowski et al. 2005). Denac konnte zudem zeigen, dass sich der Einfluss des lokalen Klimas und das Nahrungsangebot gegenseitig bedingen und so gemeinsam einen Einfluss auf die Reproduktionsrate haben können (Denac 2006).

In der ostdeutschen Weißstorchpopulation kam es im Jahr 2005 mit einem massiven Einbruch in der Anzahl der Brutvögel und der Reproduktionsrate zu dem Bild eines Störungsjahres (Abb. 1). Erste Hinweise aus Ringwiederfinden deuten auf Verluste in der vorherigen

Überwinterungsperiode hin (Herrmann 2007). Zeitgleich gab es erstmals Hinweise auf letal verlaufende Pilzinfektionen von Weißstorch-Nestlingen im Bundesland Brandenburg (M. Lierz, persönliche Mitteilung 2006). Anders als in den Störungsjahren 1991 und 1997 (Abb. 1) und gegenläufig zu anderen Ländern mit größeren ostziehenden Weißstorchpopulationen (Grishchenko 2010) hat sich der ostdeutsche Bestand von diesem Einbruch nicht mehr erholt und ging auch im Jahr 2009 bei einer wiederholt schlechten Reproduktionsrate weiter zurück (Abb. 1). Damit hat der Bestand des Weißstorchs im wichtigsten Brutgebiet Deutschlands, Mecklenburg-Vorpommern, einen Verlust von über 30% gegenüber dem Jahr 2004 verzeichnet und so die niedrigste je erfasste Populationsgröße erreicht (Tab. 1). Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Erfassung von Ursachen der offenbar plötzlich auftretenden, erhöhten Nestlingssterblichkeit in der deutschen Weißstorchpopulation während eines dreijährigen Untersuchungszeitraums von 2007 bis 2009 unter besonderer Berücksichtigung von Pilzinfektionen. Im Folgenden soll zunächst ein weiterer Überblick zu dem derzeitigen Wissenstand möglicher Gefährdungen des Weißstorchs gegeben werden.

2.2 Gefährdungsursachen von Weißstörchen

Neben den dargestellten klimatischen und agrarstrukturellen Ursachen haben Umweltkontaminanten wie Schwermetalle, Pestizide und chlororganische Verbindungen (unter anderem Polychlorierte Biphenyle; PCB) Mitte des letzten Jahrhunderts zu massiven Populationseinbrüchen zahlreicher Vogelarten geführt (Conrad 1977; Fairbrother et al. 2004). Neuere toxikologische Untersuchungen an adulten und juvenilen Weißstörchen in Ostdeutschland auf Blei, HCB, PCB, HCH, DDT, Chlordan und Nonachlor konnten jedoch keine kritisch erhöhten Werte feststellen (Büthe et al. 1989; van den Bossche et al. 2002). Baos und Mitarbeiter zeigten in toxikologischen Untersuchungen an Weißstorchnestlingen nach einem Minenunglück in Aznalcóllar in Spanien 1998 einen negativen Effekt von erhöhten Kupferwerten auf die zelluläre Immunabwehr der Jungstörche (Baos et al. 2006). Eine erhöhte Empfänglichkeit von Weißstörchen für Infektionserreger durch immuntoxische Substanzen erscheint daher möglich, ist jedoch bei Wildvögeln unter Feldbedingungen nur sehr schwer nachweisbar (Fairbrother et al. 2004).

Während Weißstörche kaum eine Bedrohung durch natürliche Feinde fürchten müssen, spielen Traumata als Todesursache für juvenile und adulte Weißstörche im Brutgebiet und auf dem Zugweg eine wesentliche Rolle. In der Nestlingsperiode werden Jungtiere sehr häufig von ihren Eltern getötet, indem sie aus dem Nest geworfen werden und aufgrund von inneren Verletzungen wie Leberrupturen oder Wirbelsäulenfrakturen verenden oder aber auch indem sie von den Elterntieren verzehrt werden (Kronismus; Schüz 1984). Diese Form der Brutreduktion wird als Infantizid bezeichnet und erfolgt anders als bei vielen anderen

Vogelarten nicht durch stärkere Geschwistertiere oder unterschiedlichen Futterzugang sondern aktiv durch die Elternvögel, wobei in der Mehrzahl die kleineren Geschwistertiere betroffen sind (Zielinski 2002). Interessanterweise variiert die beobachtete Häufigkeit dieses Verhaltens von Jahr zu Jahr (Tortosa und Redondo 1992). Die Steuerungsmechanismen, die hinter diesem Verhalten der Weißstörche liegen, sind noch weitgehend ungeklärt und bedürfen weiterer Forschung. Bei ausfliegenden, subadulten und adulten Weißstörchen hingegen stellt der Anflug gegen Stromleitungen eine der Hauptverlustursachen dar (Fiedler und Wissner 1980; Garrido und Fernández-Cruz 2003; Moritzi et al. 2001b; Riegel und Winkel 1971). Aktuelle eigene Auswertungen und Datenzusammenstellungen mehrerer Quellen über einen Zeitraum von 10 Jahren machen einen in konstanter Höhe fortbestehenden jährlichen Tierverlust durch Stromschlag und Leitungsanflug in Brandenburg deutlich (Abb. 2, Köhler 1999; Köhler und Langemach 2001).

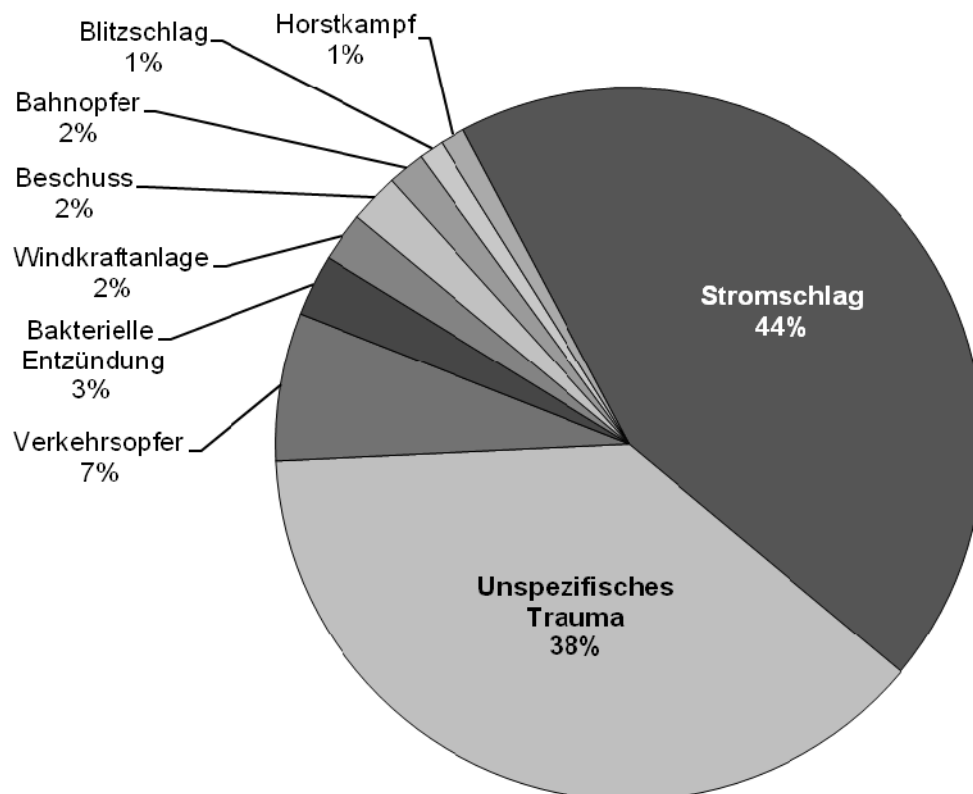


Abb. 2: Datenzusammenstellung der Todesursachen adulter und subadulter Weißstörche (n = 178) aus Brandenburg der Jahre 1998 bis 2007. (Quellen: Fundprotokolle der Staatlichen Vogelschutzwarte, Landesumweltamt Brandenburg; Sektionsprotokolle des Landeslabors Berlin-Brandenburg und des Instituts für Zoo- und Wildtierforschung, O. Krone; eigene pathologische Untersuchung von 32 adulten und subadulten Weißstörchen).

Aus den Auswertungen wird außerdem ersichtlich, dass Infektionskrankheiten als Mortalitätsursachen bei adulten und ausgeflogenen Weißstörchen in Brandenburg bislang kaum eine Rolle gespielt haben. Lediglich bei 3% der Tiere konnte eine bakterielle Infektion als Todesursache identifiziert werden. In fünf Fällen wurde eine Infektion mit *Escherichia coli* und in einem Fall mit *Erysipelothrix rhusiopathiae* diagnostiziert.

Dennoch sind Weißstörche, wie viele andere Wildvögel auch, durch zahlreiche Infektionserreger bedroht. Eine gute Übersicht möglicher Pathogene geben Thomas et al. (2007). Spezifisch pathogene bakterielle Erreger des Weißstorchs dagegen sind in der Literatur nicht bekannt. Gerlach identifizierte *Listeria* spp. bei drei juvenilen Weißstörchen mit Hepatitis und lymphoplasmazellulärer, teils heterophiler Vaskulitis größerer Gefäße (Gerlach 1981). Serologische Untersuchungen an 205 klinisch unauffälligen Nestlingen in Polen in den Jahren 2002 und 2003 identifizierten Antikörper gegen *Listeria monocytogenes* bei 121 (59%) der Tiere (Andrzejewska et al. 2004a). Rotlaufinfektionen durch *E. rhusiopathiae* wurden bereits bei über 60 verschiedenen Wildvogelarten nachgewiesen (Wolcott 2007). Meist handelt es sich um Einzeltierkrankungen, jedoch können auch große endemische Ausbrüche ähnlich wie in Nutzgeflügelbeständen auftreten (Jensen und Cotter 1976; Wolcott 2007). Von Weißstörchen existieren allerdings bisher nur Einzelnachweise (Creutz 1988; Hooimeijer 1993; Keymer 1958; Völm 1995). Weitere Einzelnachweise finden sich in der Literatur zu *Francisella tularensis* (Ezerskene et al. 1987), *Moraxella* spp. (Hooimeijer 1993), *Salmonella* spp. (Bosselmann 1972) sowie *Clostridium* spp. (Hooimeijer 1993). Im Gegensatz zu Wassergeflügel und Limikolen, bei denen es regelmäßig zu großen Massensterben mit bis zu einer Million verendeter Vögel durch Vergiftungen mit Botulismustoxin Typ C des Bakteriums *Clostridium botulinum* kommt (Rocke und Bollinger 2007), sind bei Weißstörchen dagegen nur wenige Einzelfälle beschrieben (Jensen und Price 1987). In einem anderen Fall wurde bei einem verendeten adulten Weißstorch β 2-Toxin positives *Clostridium perfringens* isoliert und eine Enterotoxämie als Todesursache vermutet (Boujon et al. 2005).

Weißstörche sind als Langstreckenzieher Infektionserregern nicht nur in ihrem Brutgebiet sondern auch in ihren südlichen Überwinterungsgebieten und auf dem Zugweg ausgesetzt und können zudem als Vektoren von Infektionserregern fungieren (Hubalek 2004). In Israel wurde 1998 das West Nile Virus (WNV) aus Gehirnen von vier auf dem Zug nach Süden verendeten Weißstörchen isoliert (Malkinson et al. 2002). Im darauffolgenden Jahr führte ein über New York eingeschlepptes WNV der *Lineage 1* zu einem Massensterben unter Krähenvögeln (Corvidae; Lanciotti et al. 1999) und verbreitete sich unter Wildvögeln rasch im ganzen Land (Komar 2003). Seitdem stellt es eine Bedrohung für Vögel, Pferde und den Menschen in der gesamten USA dar. Phylogenetische Untersuchungen zeigten eine sehr nahe Verwandtschaft zu dem in Israel aus Störchen isolierten Virusstamm (Bakonyi et al. 2006; Malkinson et al. 2002). Das WNV ist in der Wildvogelpopulation vieler afrikanischer Länder, des mittleren

Osten und der Mittelmeerländer endemisch. Seit einigen Jahren zeigt das durch Stechmücken übertragene WNV eine nördliche Ausbreitungstendenz in Europa (Bakonyi et al. 2006). Serologische Untersuchungen an Weißstörchen aus Deutschland in den Jahren 2000 und 2002 bis 2005 erbrachten 33/569 (5,8%) positive Tiere im *Indirect Immunofluorescence Assay* (IFA) beziehungsweise 13/556 (2,3%) im *Neutralization Test* (NT; Linke et al. 2007). Allerdings konnte mittels WNV-spezifischer Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) in allen 551 getesteten Proben kein Virusgenom detektiert werden. Während der Epidemie des hochpathogenen Aviären Influenza Virus (HPAIV) H5N1 (Orthomyxoviridae) unter Wildvögeln im Frühjahr 2006 in Deutschland wurde das HPAIV auch bei zwei tot aufgefundenen Weißstörchen in Brandenburg nachgewiesen. Umfangreiche serologische Untersuchungen an 600 Weißstorchnestlingen aus Brandenburg in den Jahren 2003 bis 2008 erbrachten jedoch keinen Hinweis auf eine Bedeutung des Virus in der deutschen Weißstorchpopulation (Müller et al. 2009). Obwohl bereits zahlreiche andere Viren bei Weißstörchen nachgewiesen wurden, liegen zu ihrer Virulenz kaum gesicherte Daten vor, so dass ihnen nach heutigem Kenntnisstand kein populationsgefährdendes Potential zugeschrieben werden kann. Kaleta und Kummerfeld konnten aus Weißstörchen für Hühnerküken velogenes und lentogenes Paramyxovirus (PMV) 1 (New Castle Disease Virus; Paramyxoviridae) isolieren sowie Antikörper gegen PMV-1, PMV-2 und PMV-3 detektieren (Kaleta und Kummerfeld 1983). Zudem fanden sie spezifische Herpesviren (Herpesviridae) sowie neutralisierende Antikörper gegen diese bei klinisch unauffälligen Tieren (Kaleta und Kummerfeld 1983). Außerdem konnten Gomex-Villamandos und Mitarbeiter intraläsionale Herpesviren bei fünf Jungstörchen mit tödlich verlaufender hämorrhagischer Enteritis nachweisen (Gomex-Villamandos et al. 1998). Zu einer Infektion von Jungstörchen mit einem Avipoxvirus (Poxviridae) kam es in einer Auswilderungsstation in der Schweiz (Zangger und Müller 1990), wobei sich ein milder, selbstlimitierender, kutaner Verlauf zeigte. Des Weiteren identifizierten Pult und Mitarbeiter ein neues Hepadnavirus (Hepadnaviridae) bei vier Weißstörchen (Pult et al. 2001) und Kaleta fand Antikörper gegen das Egg Drop Syndrom 76 Virus (Adenoviridae; Kaleta 1980).

Wie die meisten Wildtiere beherbergen Weißstörche eine zum großen Teil spezifische (stenoxene) Parasitenfauna, die sich für den Wirt resistenzmindernd auswirken kann, aber nur in seltenen Fällen eine direkte Virulenz entwickelt (Clayton und Moore 1997). Todesfälle durch parasitäre Infektionserreger in der Wildpopulation von Weißstörchen sind in der Literatur kaum beschrieben. Einen guten Überblick über die beim Weißstorch vorkommende Helminthen und Ektoparasiten gibt Schaffer (1996). Berichte über Todesfälle durch Trematodeninfektionen bei Jungstörchen finden sich für *Tylodelphys excavata*, *Alaria alata* und *Ligula intestinalis* (Grunberg und Kutzer 1964) sowie *Chaunocephalus ferox* (Fabian et al. 1979; Höfle et al. 2003). Unter den Nematoden wird *Syngamus trachea* für einzelne Todesfälle von Nestlingen verantwortlich gemacht (Frank 1976). Protozoäre Infektionserreger

von Weißstörchen sind dagegen bisher kaum untersucht. In serologischen Untersuchungen von 205 Weißstorchnestlingen in Polen fanden sich bei 5,8% der Tiere Antikörper gegen *Toxoplasma gondii* wobei weder klinische Symptome beschrieben wurden noch ein Erregernachweis erfolgte (Andrzejewska et al. 2004b).

Im Gegensatz zu den teils sehr umfangreichen wissenschaftlichen Studien zu bakteriellen, viralen und parasitären Infektionen von Weißstörchen finden Pilzinfektionen in der Literatur nur am Rande zweier Berichte über Wiederansiedelungsprojekte von Weißstörchen in ihrem westlichen Verbreitungsgebiet Erwähnung (Hooimeijer 1993; Oevermann et al. 2003) ohne jedoch nähere Angaben zur Pilzspezies, Art der Läsionen oder Häufigkeit des Vorkommens zu geben.

2.3 Pilze als Infektionserreger bei Vögeln

Einige wenige 100 der heute weltweit etwa 80.000 bekannten Pilzarten (Kirk et al. 2008) stellen für Tiere und Menschen Infektionserreger dar, die zu Mykosen führen können. In der Regel handelt es sich um obligat pathogene Pilzspezies. Nur sehr wenige dieser Pilze sind primäre Pathogene. Das bedeutet, dass im Gegensatz zu den vielen biotrophen und hemibiotrophen, pflanzenpathogenen Pilzen, welche sich in der Evolution bezüglich ihrer Virulenzfaktoren an spezifische Pflanzenspezies angepasst haben (van der Does und Rep 2007), die meisten humanpathogenen Pilze opportunistische Erreger darstellen, die zur Infektion in der Regel einen immunsupprimierten Wirt benötigen (Brock 2009). Die steigende Anzahl derer, die aufgrund von HIV-Infektionen, Organtransplantationen und Tumorbehandlungen immunsupprimiert sind, führte in den letzten zweieinhalb Jahrzehnten zu einem weltweit drastischen Anstieg der opportunistischen Pilzinfektionen in der Humanmedizin (Clark und Hajjeh 2002; Fleming et al. 2002; Hage et al. 2002). Dabei zeigten sich Hefen der Gattung *Candida* und Schimmelpilze der Gattung *Aspergillus* für über 90% der klinischen Fälle verantwortlich (Hennequin 1996; Müller 1994; Richardson und Lass-Flörl 2008).

Pilze (Fungi, Mycetes) sind heterotrophe, eukaryontische Lebewesen, die eine chitinhaltige, oft sehr widerstandsfähige Zellwand besitzen. Derzeit wird angenommen, dass das gesamte Reich der Pilze bis zu 1,5 Millionen Arten umfasst und nur etwa 5% bisher beschrieben sind (Hawksworth 1991). Klassisch werden fünf große Gruppen unterschieden: Tröpfchenpilze (Chytridiomycota), Jochpilze (Zygomycota), arbuskuläre Mykorrhizapilze (Glomeromycota), Schlauchpilze (Acomycota) und Basidienpilze (Basidiomycota). Nach neueren Erkenntnissen der molekularen Genetik lässt sich das Reich der Pilze in 195 Taxa einteilen (Hibbett et al. 2007). Provisorisch werden daher alle derzeit nicht klassifizierbaren Spezies zu den *fungi imperfecta* (Deuteromycota) gezählt und die heterogene Gruppe der Zygomycota wird auf mehrere Abteilungen verteilt. Für eine detaillierte Systematik sei auf

weiterführende Literatur verwiesen (Hibbett et al. 2007; de Hoog et al. 2009). Zur besseren Übersicht sollen hier die klinisch relevanten Pilze weiterhin klassisch in (1) Dermatophyten, (2) Hefepilze und (3) Schimmelpilze unterteilt werden (DHS-System; Rieth 1967).

Dermatophyten (1) sind keratinophile Pilze, welche die Haut besiedeln und zu Dermatomykosen führen können. Bekannte Genera sind *Microsporum*, *Epidermophyton* und *Trichophyton*. Auch die neu entdeckten Spezies *Geomyces destructans* und *Batrachochytrium dendrobatidis*, die für das *White Nose Syndrome* von Fledermäusen beziehungsweise die Chytridiomykose der Amphibien verantwortlich sind, lassen sich zu den Dermatophyten zählen (Blehert et al. 2009; Longcore et al. 1999). Zahlreiche keratinophile Pilzspezies wurden bereits von Federn unterschiedlicher Wildvogelspezies isoliert (Camin et al. 1998; Mandeel et al. 2011; Rees 1968a; Rees 1968b; Sarangi und Ghosh 1991). Dagegen sind manifeste Infektionen von Dermatophyten bei Vögeln in der Literatur kaum beschrieben (Hubalek 1994) und beziehen sich in der Regel auf seltene Hautinfektionen von Wirtschaftsgeflügel durch *Microsporium gallinae* (Droual et al. 1991; Fonseca und Mendoza 1984).

Infektionen durch Hefepilze (2) hingegen betreffen vor allem den Verdauungstrakt von Vögeln. Am häufigsten werden *Candida* spp. isoliert, wobei es sich in der Regel um Infektionen von Einzelvögeln handelt (Ainsworth und Austwick 1973; Kano et al. 2001; Tsai et al. 1992). Immer wieder kommt es jedoch auch zu Ausbrüchen in Nutzgeflügelbeständen mit Mortalitätsraten von bis zu 40% (Ainsworth und Austwick 1973; Jungherr 1933). Andere Hefen, die zu größeren Ausbrüchen von klinischer Relevanz führen können, sind *Macrorhabdus ornithogaster* (Jansson et al. 2008; Schulze und Heidrich 2001) und *Cryptococcus* spp. (Malik et al. 2003).

Schimmelpilze (3) sind eine heterogene Gruppe filamentöser Pilze. Im Gegensatz zu Dermatophyten und Hefen stellen sie für Vögel die größte Bedrohung dar. Maßgeblicher Infektionsort ist der Atmungstrakt. Anders als Menschen und Säugetiere scheinen Vögel von Natur aus eine höhere Empfänglichkeit für Schimmelpilzinfektionen zu haben (Tell 2005). Die Bedeutung einer Immunsuppression des Wirtsvogels für die Höhe des Virulenzpotentials des Pilzes ist in diesem Zusammenhang jedoch nicht hinreichend geklärt (Capilla et al. 2007). Aufgrund der großen Bedeutung für die Geflügelwirtschaft und Gefangenschaftshaltungen von Wildvögeln sind Atemwegsmykosen bereits seit mehr als einem Jahrhundert Gegenstand intensiver Berichterstattung (Barden et al. 1971). Dabei existieren die meisten Studien zu Infektionen mit Schimmelpilzen des Genus *Aspergillus*, welche die sogenannte Aspergillose verursachen. Von den etwa 180 bekannten *Aspergillus* spp. werden etwa 33 als potentiell humanpathogen angesehen (Samson 1999). Am weitaus häufigsten wird dabei mit ungefähr 90% *Aspergillus fumigatus* isoliert (Denning 1998; Latgé 1999). Weltweit wurde die Aspergillose bereits in einer sehr großen Zahl von Vögeln in Gefangenschaft und Freiland beschrieben (Kunkle 2003; Converse 2007). Über das Vorkommen und die Bedeutung der

Aspergillose und anderer Pilzkrankungen bei Wildvögeln in ihrer Nestlingsperiode ist in der zur Verfügung stehenden Literatur jedoch bisher nichts bekannt.

Im Gegensatz zur Aspergillose sind Infektionen von Vögeln mit anderen Schimmelpilzen kaum näher untersucht worden und blieben auf einzelne Fallberichte beschränkt (Barden et al. 1971; de Hoog et al. 2009). Eine als Zygomycose bezeichnete Erkrankung beruht dabei auf einer Infektion mit Schimmelpilzen aus der heterogenen Gruppe der Jochpilze (Zygomyceta). Zu den Zygomyceten mit klinischer Relevanz bei Vögeln zählen die Genera *Rhizopus*, *Mucor*, *Cunninghamella*, *Apophysomyces*, *Lichtheimia*, *Saksenae* und *Rhizomucor* (Roden et al. 2005). Andere filamentöse Pilze, die selten isoliert wurden, umfassen die Genera *Acremonium*, *Alternaria*, *Culvularia*, *Fusarium*, *Ochroconis*, *Paecilomyces*, *Penicilium*, *Stemphylium* und *Trichoderma* (de Hoog et al. 2009).

2.4 Pathophysiologie der aviären Aspergillose

Die invasive Aspergillose (IA) ist die häufigste und am besten untersuchte aviäre Mykose. Sie wird durch Infektionen mit Schimmelpilzen des Genus *Aspergillus* verursacht, wobei wie bei Humaninfektionen am häufigsten *Aspergillus fumigatus*, gefolgt von *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger* und *Aspergillus nidulans* isoliert werden (Morgan et al. 2005). Der Atmungstrakt ist die Haupteintrittspforte und der maßgebliche Infektionsort des Erregers (Kunkle 2003). Selten kommt es auch zu Infektionen über offene Wunden. In allen Fällen ist eine hämatogene Streuung und damit der Befall von anderen Organen möglich. Die Erkrankung wurde bereits bei allen Arten von Hausgeflügel und bei sehr vielen Wildvögeln beschrieben, so dass gegenwärtig davon auszugehen ist, dass jede Vogelspezies empfänglich ist (Barden et al. 1971; Converse 2007). Unter Wildvögeln liegen die meisten Berichte zu Wassergeflügel, Greifvögeln und Möwen vor, wobei in Gefangenschaft gehaltenes Wassergeflügel als besonders empfänglich gilt (Converse 2007). Aufgrund der überragenden Bedeutung von Infektionen mit *A. fumigatus* und der spärlichen wissenschaftlichen Erkenntnislage über andere Schimmelpilze als Infektionserreger von Vögeln soll im Folgenden näher auf Infektionen mit diesem Pilz eingegangen werden.

Grundsätzlich werden beim Vogel zwei Formen der IA unterschieden. Die akute Form der Erkrankung tritt maßgeblich bei Küken und juvenilen Vögeln auf und führt zu einer raschen disseminierten Bildung von Granulomen in den Lungen, die vornehmlich zu einer schweren Dyspnoe und zu einem Ersticken des Vogels führen. Erkrankungen dieser Art treten häufig in der Aufzuchtshaltung von Wirtschaftsgeflügel auf und können bei Wassergeflügel auch enzootische Züge annehmen (McDougle und Vaught 1968; Neff 1955; Rosen 1964). Die chronische Form der Erkrankung findet sich dagegen meist bei Einzelvögeln. Die Tiere bleiben häufig über einen langen Zeitraum latent infiziert, wobei es nicht selten zur Bildung von Pilzrasen mit Sporenbildung in den Luftsäcken der Vögel kommt (Richard et al. 1984).

Obwohl Lungenmykosen bei Nutzgeflügel und Ziervögeln eine große, auch wirtschaftliche Bedeutung haben (Dyar et al. 1984; Pollock 2003; Zafra et al. 2008) ist ihre zugrundeliegenden Pathophysiologie anders als beim Menschen und in Säugetiermodellen kaum erforscht (Tell 2005). Daher soll einleitend zunächst ein Überblick über Erkenntnisse aus der Humanmedizin gegeben werden. Grundsätzlich werden Pilzsporen wie andere Feinstaubpartikel inhaliert und größtenteils über die ziliäre Aktion des mukosalen Epithels geklärt. Die nur 2 bis 3 μm großen Sporen von *A. fumigatus* können dabei aufgrund ihrer geringen Größe im Gegensatz zu anderen größeren Pilzsporen wie etwa von *A. flavus* und *A. niger* tiefer in die Lungenalveolen gelangen. Durch die ubiquitäre Präsenz der Sporen in der Luft werden täglich einige hundert Sporen inhaliert (Hospenthal et al. 1998). Welche immunologischen Mechanismen die Abwehr von Infektionen bewirken und weshalb trotz andauernder Inhalation von Pilzsporen das Immunsystem nicht permanent aktiviert wird, ist gegenwärtig Gegenstand intensiver Forschung (Aimanianda et al. 2009). Bekannterweise spielt die nicht-spezifische oder angeborene Immunität bei der immunologischen Abwehr des Wirtsorganismus gegen eine Infektion mit *A. fumigatus* eine zentrale Rolle (Romani 2004). Die pulmonalen Immunabwehrmechanismen werden dabei von Alveolarmakrophagen, neutrophilen Granulozyten und dendritischen Zellen dominiert. Bei einer verhinderten zellulären Abwehr können eingeatmete Sporen im Bronchialepithel oder den Alveolen zu Hyphen auskeimen (Latgé 2003). Die Pilzhyphen zeigen dabei ein invasives Wachstum, wobei selbst hartes Gewebe wie Knorpel und Knochen kein Hindernis darstellt (Bodey und Vartivarian 1989; Olias et al. 2010). Im Gegensatz zum Menschen und Säugetier zeigt der Atmungstrakt der Vögel einige anatomische und immunologische Besonderheiten (Fedde 1998; Reese et al. 2006), welche mögliche Hinweise über die bei Vögeln offensichtlich vorliegende größere Empfänglichkeit für Pilzinfektionen geben. Vögel besitzen keine Alveolen sondern Parabronchen und Luftsäcke. Das Luftsacksystem ermöglicht einen kontinuierlichen Durchfluss sauerstoffreicher Luft durch die Lunge sowohl bei der Ein- als auch bei der Ausatmung. Dabei bieten die Luftsäcke aufgrund ihrer schlechten Vaskularisierung eine wichtige Angriffsfläche für Pathogene (Reese et al. 2006). Zusätzlich ist in den Lungen der Vögel verglichen mit dem Menschen die Blut-Gas Barriere um etwa 60% vermindert und die Fläche des respiratorischen Oberflächenepithels um etwa 15% erhöht (Maina et al. 1989), wobei das Verhältnis des Oberflächenepithels des gesamten Atmungstrakts zum Luftvolumen etwa um ein zehnfaches höher ist als beim Menschen (Powell 1999). Von besonderer Relevanz könnte zudem das Fehlen von zwei essentiellen Komponenten der bei Säugetieren identifizierten Immunantwort gegen Pilzinfektionen sein (Latgé 1999; Tell 2005). (1) Zahlreiche Studien an Hühnern, Puten, Wachteln, Haustauben und Schleiereulen zeigten eine bis zu zehnfach niedrigere Anzahl an phagozytierenden Immunzellen in der normalen Lunge im Vergleich zu Säugetieren (Ficken et al. 1986; Fulton et al. 1990; Klika et al. 1996; Toth und Siegel 1986) und deuten auf das Fehlen einer Oberflächenmigration von Makrophagen auf den Oberflächen der Parabronchen hin (Klika et

al. 1996). Nach der Infektion mit einem pathogenen Erreger beruht die zelluläre Immunantwort in der Vogellunge daher maßgeblich auf dem schnellen hämatogenen Zustrom von Immunzellen. Beim Vogel kommt dabei heterophilen Granulozyten eine bedeutende initiale Rolle bei einer Pilzinfektion zu (Toth 2000). (2) Durch das System der heterophilen Granulozyten, das mit der Produktion von kationischen Proteinen, Hydrolasen und Lysosomen einhergeht, fehlt dem Vogel jedoch die den Säugetieren eigene Abwehr der neutrophilen Granulozyten, die Myeloperoxidase und oxidative Mechanismen besitzen (Harmon 1998). Möglicherweise gleicht hingegen die bei Vögeln erhöhte Körpertemperatur als Barrierefunktion die offenbar existierenden immunologischen Defizite zum Säugetier in der Infektionsabwehr von Pilzen bis zu einem gewissen Grad aus (Robert und Casadevall 2009).

2.5 Diagnostik der invasiven Aspergillose

Die Diagnostik pulmonaler Pilzinfektionen stellt in der Humanmedizin und Veterinärmedizin eine große Herausforderung dar. Mittels röntgenologischer und anderer bildgebender Verfahren können erste Hinweise auf Krankheitsprozesse in den Atmungsorganen gewonnen werden, ohne dass sich diese jedoch sicher als Pilzinfektion identifizieren ließen. Endoskopische Verfahren bieten die Möglichkeit minimalinvasiv aus betroffenem Lungengewebe Biopate zu entnehmen, die dann im Anschluss weiter untersucht werden können. Das Luftsacksystem der Vögel bietet dabei im Gegensatz zu dem beim Säugetier und Menschen oft risikoreichen Eingriff die Möglichkeit eines einfachen Zugangs und eine Identifizierung von Pilzmyzelwachstum auf den Luftsackwänden schon während der Endoskopie (Lierz 2008).

Allen weiterführenden diagnostischen Verfahren zur Identifizierung der invasiven Pilzspezies ist die Unsicherheit eigen, auch nichtinvasive, kolonisierende Pilze, eingeatmete Pilzsporen oder Kontaminanten zu bestimmen und damit falsch-positive Ergebnisse zu generieren (Rickerts et al. 2007). Eine falsche Speziesdiagnose kann jedoch zu fatalen Fehlentscheidungen im medikamentellen Behandlungsregime eines Patienten führen (Chandrasekar 2009; Sangoi et al. 2009). Darüber hinaus ergibt sich in der Diagnostik die Gefahr falsch-positiver Ergebnisse aufgrund von post mortalem Wachstum einer *in vivo* nicht invasiven Pilzspezies. Grundsätzlich werden in der weiterführenden Diagnostik indirekte von direkten Verfahren unterschieden. Zu den indirekten Verfahren zählen serologische Methoden, die Markermoleküle wie pilzspezifische monoklonale Antikörper, Antigene oder Pilzmetaboliten aus dem Blut nachweisen (Hope et al. 2005). Gegenwärtig stellen beispielsweise Galactomannan, Galactomannoprotein und Mitogillin solche Markermoleküle zur Diagnostik einer invasiven Aspergillose dar (Thornton 2010). Zeitintensiver, jedoch in vielen Fällen genauer, erscheint dagegen die Pilzanzucht aus Abstrich- oder Gewebeproben

auf unterschiedlichen Kulturmedien (Gams 1987). Die Pilzspezies kann dabei anhand ihrer makroskopischen und mikroskopischen Morphologie bestimmt werden (de Hoog et al. 2009). Zur weiteren Absicherung der morphologischen Diagnose werden molekularbiologische Methoden wie etwa die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit speziesspezifischen Primern eingesetzt (Mengoli et al. 2009). Dabei eignet sich die PCR auch als direktes Verfahren, um mittels panfungaler Primer und nachgeschalteter Sequenzierung die invasive Pilzspezies anhand ihrer DNA-Sequenz zu bestimmen (White et al. 1990). Zumeist werden für den Sequenzabgleich ribosomale oder mitochondriale Sequenzabschnitte herangezogen (Hope et al. 2005). Zur Differenzierung zwischen *Aspergillus*-Spezies haben sich die beiden *Internal Transcribed Spacer* (ITS)-Regionen zwischen den ribosomalen Genen 18S, 5,8S und 28S bewährt (Henry et al. 2000; Hinrikson et al. 2005).

Die oben erwähnten Unsicherheiten bei der Pilzbestimmung führten zu internationalen Bemühungen, standardisierte Kriterien zur Diagnostik von invasiven Mykosen aufzustellen (Ascioglu et al. 2002; de Pauw et al. 2008; White et al. 2010). Hierbei wird die Bedeutung der histopathologischen Absicherung des invasiven Wachstums einer Pilzspezies zur Diagnose einer invasiven Mykose besonders hervorgehoben (Ascioglu et al. 2002). Zur Identifizierung eines invasiven Pilzwachstums in Gewebsschnitten dienen verschiedene Spezialfärbungen (Romeis 1989). In der Regel werden hierzu, neben der standardmäßigen Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung, Färbungen mittels *Periodic Acid Schiff* (PAS)-Reaktion oder eine Versilberung nach Grocott angewandt. Dabei stellen sich in der PAS-Reaktion Pilze dunkelviolett und in der Grocott-Versilberung schwarz dar. Trotz einiger spezifischer morphologischer Charakteristika ihres Wachstums im Gewebe ist eine eindeutige Bestimmung der Pilzspezies jedoch nicht sicher möglich (Hope et al. 2005; Sangoi et al. 2009). Ein Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es deshalb, eine verlässliche Methode zu entwickeln, die es erlaubt, aus Gewebeschnitten intraläsionale Pilzspezies mittels PCR und nachgeschalteter Sequenzierung zu bestimmen und diese von einer Besiedlung und Kontamination zu unterscheiden. Das hierzu entwickelte neue Verfahren stützt sich auf die *Laser Capture Microdissection* (LCM) einzelner fluoreszenzmarkierter invasiv wachsender Pilzhyphen direkt aus infiziertem Gewebe. Die Technik der LCM entwickelte sich in den letzten Jahren zu einem wichtigen labortechnischen Verfahren vor allem in der Tumorforschung, mit dem einzelne Zellen aus einem Gewebsverband gelöst werden können um diese unabhängig und kontaminationsfrei zu untersuchen (Espina et al. 2006).

2.6 Molekulare Epidemiologie von *Aspergillus fumigatus*

Unter den Aspergillen kommt *A. fumigatus* Fresenius 1863 als weltweit verbreiteter, saprophytärer, filamentöser Schimmelpilz in der Klinik und Epidemiologie die größte Bedeutung zu. Seine primäre ökologische Nische sind der Boden und verrottende

Pflanzenteile, wo er bei den natürlichen Zersetzungsprozessen in der Umwelt eine entscheidende Rolle beim Recycling von Kohlenstoff und Stickstoff spielt (Latgé 2003). Kürzlich konnte die Arbeitsgruppe um O'Gorman fast 150 Jahre nach der Erstbeschreibung des Pilzes durch Georg Fresenius (Schmidt 1998) erstmals eine sexuelle Vermehrung nachweisen (O'Gorman et al. 2009), worüber nach der Entzifferung des kompletten Genoms des Pilzes (Nierman et al. 2005) und die Identifizierung des *MAT-1* α -Box-Kreuzungstyp-Gens bereits einige Zeit spekuliert worden war (Paoletti et al. 2005). Eine asexuelle Vermehrung des Pilzes erfolgt dagegen über die Bildung von hydrophoben Konidien und eine aerogene Verbreitung über teils sehr weite Distanzen bis in die obere Atmosphäre (Bardana und Silva-Hutner 1980; Kück et al. 2009). Die Konidien (echinulate Sporen) sichern dem Pilz ein ubiquitäres Vorkommen und stellen eine resistente Dauerform für das Überleben auch unter extremen Umweltbedingungen dar. Sie entstehen als lange Sporenketten an den Konidiophoren, die dem Nährmyzel entspringen (Abb. 3). Dabei zeigt der Pilz eine ausgeprägte Sporenbildung, die zu einer Belastung von 1-100 Konidien/m³ Luft im Freien und in Innenräumen führt (Falvey und Streifel 2007; Morris et al. 2000). Menschen und Tiere atmen dadurch täglich eine Größenordnung von mehreren hundert Konidien ein, die jedoch bei einer intakten Immunabwehr zu keiner Infektion führen (Goodley et al. 1994; Hospenthal et al. 1998).

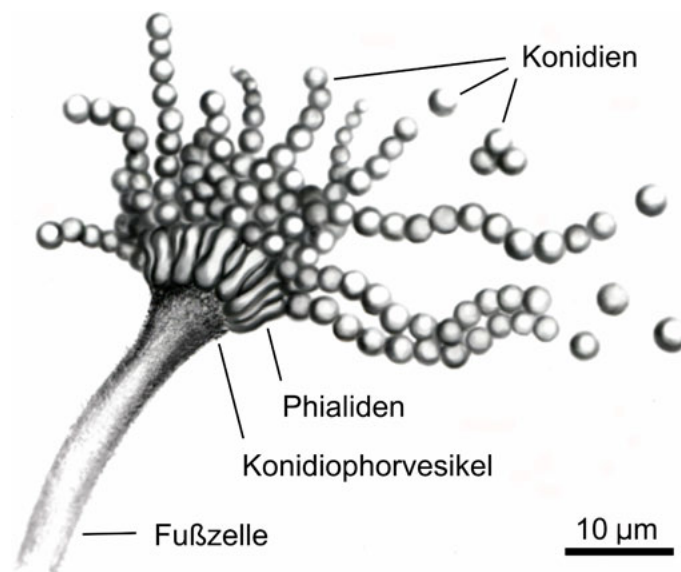


Abb. 3: Morphologie von einem Konidiophor von *Aspergillus fumigatus*. Grafik: P. Olias

Die zunehmende Häufung nosokomialer Infektionen durch *A. fumigatus* in den letzten 20 Jahren hat in der Humanmedizin zur Entwicklung zahlreicher molekularbiologischer Methoden geführt, die dem Verständnis der epidemiologischen Zusammenhänge dieser

Ausbrüche dienen sollten (Bertout et al. 2001; Chazalet et al. 1998; de Valk et al. 2007a; Lair-Fuller et al. 2003). Anfang der 1990er Jahre begann mit dem Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) der Einzug von molekularen Typisierungsmethoden in die Mykologie (Birch et al. 1995a; Birch et al. 1995b; Denning et al. 1990), die erstmals die Erhebung verlässlicher Daten zur stammspezifischen Genetik des Pilzes erlaubten. Gleichzeitig wurde das Verfahren der *Randomly Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) eingeführt (Anderson et al. 1996; Loudon et al. 1993; van Belkum et al. 1993) und lange Zeit für epidemiologische Studien verwendet (Mellado et al. 2000). Weitere Verfahren wie *Sequence Specific DNA Primer* (SSDP), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), *Multi-Locus Enzyme Electrophoresis* (MLEE), *Multilocus Sequence Typing* (MLST) sowie Methoden, die auf den Unterschieden von Mikrosatelliten wie *Microsatellite Length Polymorphism* (MLP) und *Multilocus Microsatellite Typing* (MLMT) basieren und teils auch in Kombination angewandt wurden, erhöhten die Diskriminierungsrate zwischen verschiedenen *A. fumigatus*-Stämmen weiter (Bart-Delabesse et al. 1998; Bertout et al. 2001; Vanhee et al. 2009). Die höchste Diskriminierungsrate zwischen *A. fumigatus*-Stämmen erlaubt gegenwärtig ein von der Arbeitsgruppe um de Valk entwickelter MLMT-Assay (de Valk et al. 2005), der auf neun *Short Tandem Repeats* (STRs) basiert (Balajee et al. 2008; de Valk et al. 2009; de Valk et al. 2007b; Vanhee et al. 2009). In der Veterinärmedizin hingegen wurden die epidemiologischen Zusammenhänge der IA nur in Ansätzen untersucht. In einer Studie konnte die Arbeitsgruppe um Lair-Fuller et al. mittels MLP-Analyse eine genetische Übereinstimmung zahlreicher *A. fumigatus*-Isolate aus den Atemwegen nicht erkrankter und histopathologisch unauffälliger Puten und der Stallluft darstellen (Lair-Fuller et al. 2003). Dabei zeigte sich eine hohe genetische Diversität der Isolate, tatsächlich aber auch neun Genotypen, die sowohl in den Luftwegen als auch in der Stallluft detektiert wurden. Jedoch fand sich nur ein Umweltisolat, das auch in einem an IA erkrankten Vogel identifiziert werden konnte.

2.7 Virulenzeigenschaften von *Aspergillus fumigatus*

Ein genetischer Vergleich von klinischen Isolaten und Umweltisolaten von *A. fumigatus* aus verschiedenen geographischen Regionen deutet darauf hin, dass potentiell jedes Umweltisolat obligat pathogen ist (Debeaupuis et al. 1997), obgleich Virulenzunterschiede zwischen klinischen und Umweltisolaten vielfach vermutet werden (Aufauvre-Brown et al. 1998; Mondon et al. 1996). Peden und Rhoades fanden bei Infektionsversuchen von Putenküken Hinweise auf solche Virulenzunterschiede auch zwischen Vogelisolaten und Umweltisolaten (Peden und Rhoades 1992). Jedoch konnten trotz einer Fülle an Studien zu den Pathogenesemechanismen von *A. fumigatus* bisher keine spezifischen Virulenzfaktoren identifiziert werden (Dagenais und Keller 2009). Vielmehr scheinen grundlegende metabolische

Eigenschaften des Pilzes, die sich in seiner eigentlichen ökologischen Nische, der Beteiligung an natürlichen Zersetzungsprozessen, entwickelt haben, sein Virulenzpotential zu bestimmen (Askew 2008). Aufgrund der bei Zersetzungs- und Fäulnisprozessen entstehenden hohen Temperaturen ist *A. fumigatus* extrem thermotolerant ($> 50^{\circ}\text{C}$; Robert und Casadevall 2009). Bei Körpertemperaturen von 37 und 42°C zeigt er eine 50-60% höhere Germinationsrate als *A. flavus* und *A. niger* ($< 40\%$; Araujo und Rodrigues 2004). Neben der notwendigen Evolution von Genen für eine Thermotoleranz wird angenommen, dass sich viele Eigenschaften als Überlebensstrategie entwickelt haben um sich gegen Bodenräuber wie Amöben und Nematoden zu schützen (Casadevall 2005; Mylonakis et al. 2007; Steenbergen et al. 2001). Das Fehlen von identifizierbaren, spezifischen Virulenzfaktoren macht gegenwärtig jedoch die Anwendung von *in vivo*-Modellen zur Unterscheidung des Virulenzpotentials einzelner *A. fumigatus*-Stämme unverzichtbar (Capilla et al. 2007). In der Regel werden hierfür nagerbasierte Modelle benutzt. Aber auch verschiedene Vogelspezies wurden bereits als Modelltiere benutzt (Clemons und Stevens 2005). Vogelisolate wurden bisher jedoch nicht systematisch untersucht. Ein wichtiges Ziel war deshalb die Evaluation von Vogelisolaten auf ihre potentiell erhöhte Virulenz in einem Vogelmodell. Zu diesem Zweck wurde ein neu entwickeltes, alternatives Infektionsmodell basierend auf embryonierten Hühnereiern verwendet (Jacobsen et al. 2010).

3 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

3.1 Die mykotische Pneumonie als eine Haupttodesursache von Weißstorch-Nestlingen (*Ciconia ciconia*)

Publikation 1: Olias P, Gruber AD, Böhmer W, Hafez HM, Lierz M (2010) Fungal pneumonia as a major cause of mortality in white stork (*Ciconia ciconia*) chicks. Avian Diseases 54:94-98. DOI:10.1637/9088-092509-Reg.1

In dieser Arbeit wurden im Rahmen einer Kasuistik die Erkrankungs- und Todesursachen von Weißstorchnestlingen anatomisch-pathologisch, histopathologisch, mikrobiologisch und molekularbiologisch untersucht. Ziel dieser Untersuchungen war es, die Bedeutung der mykotischen Pneumonie für Nestlinge der deutschen Weißstorchpopulation zu klären und bisher unbekannte Pilzspezies zu identifizieren. Die zur Untersuchung gelangten Tiere stammten maßgeblich aus den Brutgebieten der ostziehenden Population mit einem Schwerpunkt auf Brandenburg (Abb. 4 und Tab. 1). Im Ergebnis wurde überraschenderweise bei 45 (44,6%) der 101 untersuchten Nestlinge der Jahre 2007 und 2008 eine multifokale, granulomatöse Pneumonie mit intraläsionalen Schimmelpilzhyphen diagnostiziert. Bei etwa der Hälfte dieser Tiere konnte die mykotische Pneumonie eindeutig als unmittelbare Todesursache identifiziert werden. Weitere infektiöse Todesursachen waren eine bakterielle Infektion bei fünf und eine parasitäre Infektion bei drei Tieren. Traumata stellten die häufigste unmittelbare Todesursache der untersuchten Tiere dar. Eine Übersicht der Todesursachen gibt Tab. 1 in Publ. 1 sowie Tab. 2 unter Punkt 9.

Die Nestlinge mit mykotischer Pneumonie zeigten entzündliche Veränderungen, die 10 bis 80% der Lunge betrafen. Sie wurden je nach Schweregrad in zwei Kategorien unterteilt. Tiere mit einer Pneumonie vom Grad I hatten keine makroskopischen Läsionen des Respirationstrakts. Histopathologisch zeigten sich multifokale Aggregate von Epitheloidmakrophagen und Riesenzellen neben filamentösen Pilzstrukturen, die zum Teil durch die Immunzellen phagozytiert wurden. Dagegen zeigten Tiere mit einer Pneumonie vom Grad II makroskopisch sichtbare, weiße oder gelbe Granulome von 0,5 bis 4 mm Durchmesser (Abb. 1, Publ. 1) sowie in einigen Fällen eine Verdickung der Luftsackwände mit käsigen und teils granulomatösen Auflagerungen. Histopathologisch war die Pneumonie vom Grad II gekennzeichnet durch multifokale, heterophile Granulome mit zentraler Nekrose und degenerierten heterophilen Granulozyten umgeben von einem Wall intakter heterophiler Granulozyten sowie Epitheloidmakrophagen und vielkernigen Riesenzellen. Schimmelpilzstrukturen zeigten sich maßgeblich im Zentrum der Granulombildung (Abb. 2, Publ. 1). Bedingt dadurch die massive Entzündungsreaktion zeigte sich eine Obstruktion luftführender Wege und eine Destruktion von umliegendem Lungengewebe. Lediglich bei zwei Tieren mit

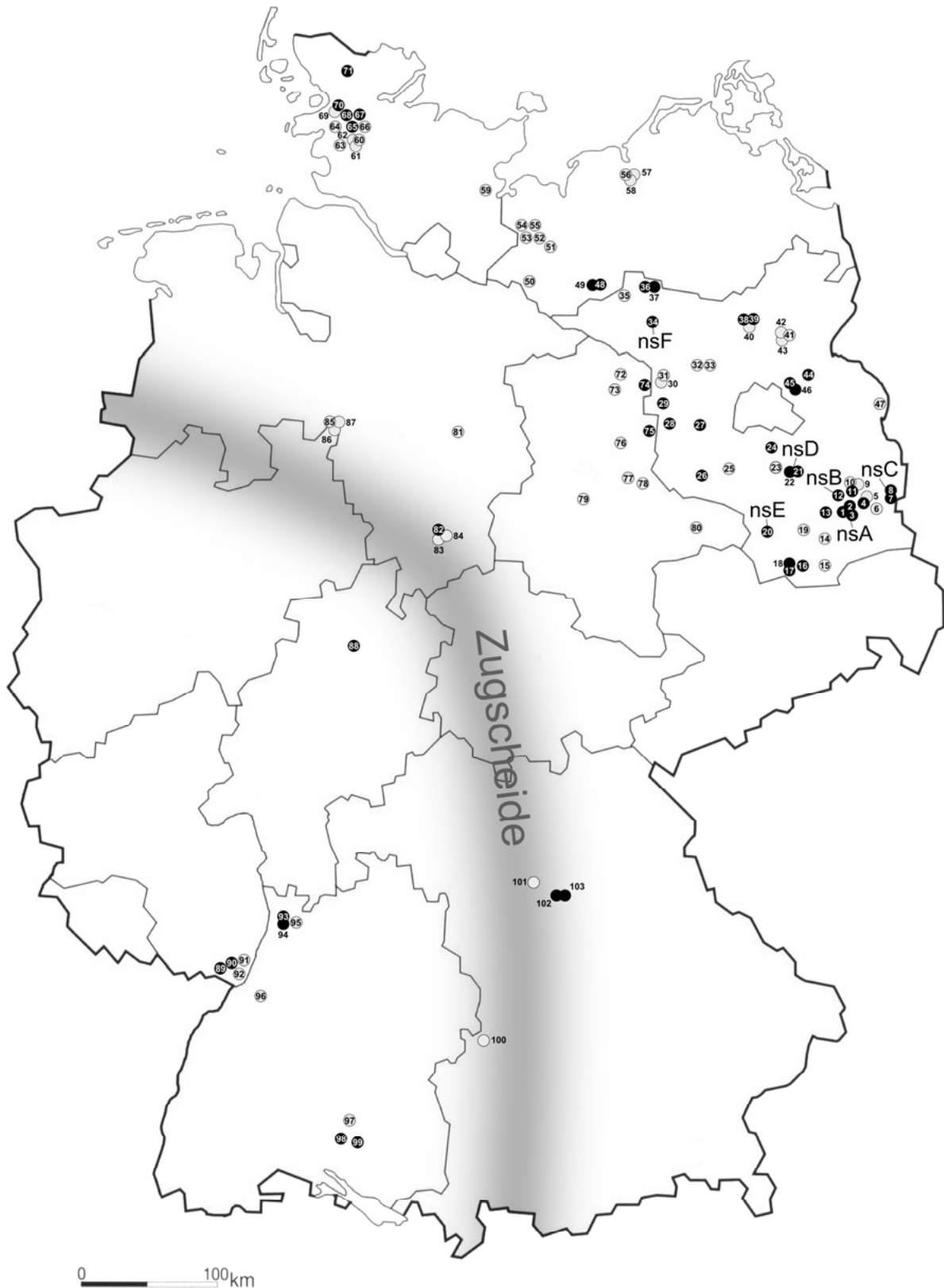


Abb. 4: Horststandorte der im Rahmen dieser Dissertation pathologisch untersuchten 103 Weißstorchnestlinge (2007 – 2009) und Verlauf der Zugscheide. Maßgeblich untersucht wurden Tiere der ostziehenden Population. Schwarze Punkte markieren die Horststandorte von Weißstorchnestlingen mit diagnostizierter mykotischer

Pneumonie; graue Punkte markieren die Fundorte von nicht mit Schimmelpilzen infizierten Tieren. Eine detaillierte Aufschlüsselung der Horststandorte und der jeweiligen Todesursachen der Tiere findet sich in Tab. 2 unter Punkt 9. Horststandorte, die für eine weiterführende epidemiologische Untersuchung der IA ausgewählt wurden, sind mit nsA-nsF bezeichnet (siehe Punkt 3.3). Der graue Strich markiert die Zugscheide, durch die die deutsche Weißstorchpopulation in Ost- und Westzieher geteilt wird. Quelle der Karte: www.tira.de/sag/service/d_stumm.jpg, Abrufdatum: 02.03.2008; bearbeitet von P. Olias.

mykotischer Pneumonie konnte gleichzeitig eine bakterielle Septikämie identifiziert werden. In allen anderen Fällen fanden sich keinerlei Hinweise auf bakterielle und virale Infektionen oder eine Atrophie immunrelevanter Organe. Auffälligerweise jedoch waren 94,1% der betroffenen Tiere nicht älter als drei Wochen. Unspezifische Traumata wurden bei etwa der Hälfte aller untersuchten Tiere als Todesursache identifiziert. Viele dieser Tiere wurden unter dem Nest gefunden und anekdotisch einem Infantizid zugeschrieben. Interessanterweise zeigten 16 dieser Vögel gleichzeitig eine mykotische Pneumonie. Andere Todesursachen von Nestlingen mit mykotischer Pneumonie waren ein Fremdkörper im Magen (n=1), eine Vormagendilatation (n=1) sowie um die Beine gewickeltes Bindegarn (n=1).

Basierend auf diesen Untersuchungsergebnissen wurde die folgende Hypothese formuliert:

Hypothese 1: Unbekannte Schimmelpilz-Arten sind verantwortlich für die hohe Rate an Weißstorchnestlingen mit einer mykotischen Pneumonie.

Von 38 der 45 Nestlinge mit diagnostizierter mykotischer Pneumonie konnten aus aseptisch entnommenem Lungengewebe auf antibiotikasupplementiertem Malzextraktagar oder Czapek-Agar Pilze angezüchtet werden. Dabei konnten bei 25°C, 37°C und 52°C neben Schimmelpilzen keine weiteren Pilze angezüchtet werden. Die Pilzspezies wurde nach erfolgter Subkultivierung anhand der Wachstumsmorphologie und der Sequenz der *Internal Transcribed Spacer 1* (ITS1)-Region identifiziert (Details siehe Punkt 3.2). Über einen Sequenzvergleich der ITS1-Region mit bereits in der Datenbank GenBank publizierten Pilzsequenzen durch die Software BLAST konnten alle bis auf eine Pilzspezies bestimmt werden. Dabei zeigte sich eine hohe Befallsrate der Tiere mit *Aspergillus fumigatus* (57,9%). Interessanterweise zeigten einige *A. fumigatus*-Isolate aus demselben Lungengewebe eine unterschiedliche Wachstumsmorphologie. Andere vermehrt isolierte Pilze waren Zygomyceten, wovon *Lichtheimia corymbifera* mit acht und *Rhizopus microsporus* mit sechs infizierten Tieren am häufigsten identifiziert wurden. Eine genaue Übersicht gibt Tab. 2 in

Publ. 1. Zudem wurde jeweils in einem Tier *Penicillium* spp., *Chaetomium globosum* und *Thermomyces lanuginosus* isoliert. Die Spezies des *Penicillium* konnte nicht weiter identifiziert werden, da, wie bei dem morphologisch eindeutig als *T. lanuginosus* identifizierten Pilz, eine Sequenzübereinstimmung in der BLAST-Analyse von nur 98% gegeben war. Die Sequenzen beider Pilze wurden daraufhin in die GenBank-Datenbank eingestellt. Interessanterweise zeigten sechs Vögel Koinfektionen von *A. fumigatus* mit verschiedenen Zygomyceten und zwei Tiere eine Koinfektion zweier Zygomyceten (siehe Tab. 3, Publ. 1). Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen der Untersuchungen gefolgert werden, dass bei Weißstorchnestlingen mit mykotischer Pneumonie entgegen der Hypothese 1 nicht von einer maßgeblichen Beteiligung unbekannter Schimmelpilzspezies auszugehen ist.

3.2 Identifizierung der Pilzspezies aus aviären Lungenproben mittels Laser-mikrodissektion und PCR-Produkt-Sequenzierung

Publikation 2: Olias P, Jacobsen ID, Gruber AD (2011) Fungal species identification from avian lung specimens by single hypha laser microdissection and PCR product sequencing. *Medical Mycology*, 49:56-61. DOI:10.3109/13693786.2010.497172

Die Pilzdiagnostik an klinischen Fällen beruht standardmäßig auf der konventionellen Anzucht auf Nährmedien. Die hierbei erzielten Ergebnisse müssen jedoch nicht immer eine invasive Pilzspezies darstellen, sondern können aufgrund von Schleimhautkolonisation oder Umweltkontamination falsch-positive Ergebnisse reflektieren (Rickerts et al. 2007). Ursächlich verantwortlich sind das ubiquitäre Vorkommen und die Inhalation von Pilzsporen sowie die respiratorische Schleimhaut besiedelnde Pilze, die in der Lunge keine Entzündung auslösen, jedoch bei der Ausplattierung von Gewebe auf Nährmedien angezüchtet werden. Trotz Spezialfärbeverfahren ist die Bestimmung einer invasiv wachsenden Pilzspezies aufgrund ihrer Wachstumsmorphologie in histologischen Präparaten nicht sicher möglich (Hope et al. 2005; Sangoi et al. 2009). Deshalb war das Ziel dieser Studie die Entwicklung einer diagnostischen Methode zur verlässlichen und präzisen Bestimmung der invasiv wachsenden Pilzspezies.

Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte neue Verfahren erlaubt die Identifizierung der infektiösen Pilzspezies direkt aus einer histopathologisch verifizierten Gewebeläsion. Hierzu wurden mittels des universellen Fluoreszenzfarbstoffs Blankophor® {4,4'-bis[(4-anilino-subst.1,3,5-triazin-2-yl)amino]stilben-2,2'-disulfonic acid} intraläsional wachsende, einzelne Pilzhyphen in 4-6 µm dünnen Gefrierschnitten markiert. Einzelne Pilzhyphen wurden anschließend erstmals unter Sichtkontrolle im Fluoreszenzmikroskop mittels *Laser Microdissection* (LCM) Technik aus dem Gewebeverband ausgeschnitten und mit dem universellen Primerpaar ITS1/ITS2 die *Internal Transcribed Spacer 1* (ITS1)-Region in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die mittels Gel-Elektrophorese nachgewiesenen Amplifikate wurden sequenziert und mittels BLAST-Analyse über einen Sequenzabgleich in öffentlich zugänglichen Sequenz-Datenbanken identifiziert.

Als Proben dienten sechs mit Schimmelpilzen infizierte Gewebe, fünf Lungen von Weißstorchneulingen mit histopathologisch diagnostizierter mykotischer Pneumonie sowie der Axillarlymphknoten eines Hundes, der an einer Pilzseptikämie verendet war. Repräsentative Anteile der Gewebe wurden ausplattiert und die angezüchteten Pilzspezies anhand ihrer Morphologie und ITS1-Sequenz bestimmt. Gleichzeitig wurden pro Probe jeweils 10 Hyphen mittels LCM aus unabhängigen Läsionen ausgeschnitten und wie oben beschrieben prozessiert. Über das konventionelle Kulturverfahren wurden in Probe S1 *Aspergillus fumigatus* und in S2 eine Dreifachinfektion durch *A. fumigatus*, *Aspergillus niger* und *Lichtheimia corymbifera* diagnostiziert. Koinfektionen von *A. fumigatus* mit *L.*

corymbifera wurden in S3 gefunden, solche mit *Rhizopus microsporus* wurden in S4 und mit *Rhizopus oryzae* in S5 gefunden. Aus dem Lymphknoten des Hundes (S6) wurde *Aspergillus terreus* isoliert. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen identifizierte die LCM-basierte Methode aus intraläsional wachsenden Pilzhyphen der Proben S1 bis S5 nur *A. fumigatus* (zum Vergleich der Ergebnisse beider Verfahren siehe Tab. 1 der Publ. 2). Dabei wurde *A. fumigatus* in S1 in 7 von 10, in S2 in 8 von 10, in S3 in 9 von 10, in S4 in 6 von 10 und in S5 in 7 von 10 mikrodisezierten Hyphen diagnostiziert. Zwei der 10 Hyphen aus S5 wurden zudem als *Cladosporium* spp. identifiziert. Dieses Ergebnis konnte jedoch mittels Spezialfärbung nach Fontana-Masson nicht bestätigt werden. Aus der Probe S6 wurden 8 der 10 mikrodisezierten Hyphen als *A. terreus* bestimmt.

Der Hinweis auf eine unterschiedliche Wachstumsmorphologie von *A. fumigatus*-Isolaten aus demselben Lungengewebe (siehe Punkt 3.1) führte zur Formulierung folgender Hypothese:

Hypothese 2: Die invasive Aspergillose von Weißstörchen basiert auf einer polyklonalen *Aspergillus fumigatus*-Infektion.

Der Sequenzvergleich der amplifizierten ITS1-Region der mikrodisezierten *A. fumigatus*-Hyphen erfolgte mit der Software MEGA4 und CLUSTALW. Der Abgleich aller Sequenzen identifizierte zwei konservierte Positionen (Position 72 und 96 der ITS1-Region von Referenzstamm ATCC36607) mit Einzelnukleotidpolymorphismen beziehungsweise Einzelbasendeletionen (Abb. 5). Insgesamt fanden sich so fünf verschiedene Sequenzvariationen von *A. fumigatus* in der ITS1-Region mit einer Häufung von vier Varianten in Probe S3 und drei Varianten in Probe S4. Dieses Ergebnis lässt auf polyklonale Infektionen genetisch verschiedener *A. fumigatus*-Stämme zumindest in zwei der untersuchten Nestlinge schließen.

```

          *           20           *           40           *
S3;S4: 5' -//CTTCGGCGGGCCCGCCG-TTTCGACGGCCCGGGGAGGCCCTGCGCCCCCGGG// -3'
S3:      .....C.....
S1;S2;S3;S4: .....-.....T.....
S3;S4:    .....C.....T.....
S5:      .....A.....T.....

```

Abb. 5: Sequenzvergleich der ITS1-Region mikrodisezierter *A. fumigatus*-Hyphen. Fünf verschiedene Sequenzvarianten wurden identifiziert. Die hervorgehobenen Varianten aus S3 und S4 wurden gleichzeitig aus den Lungengewebe mittels konventioneller Pilzanzucht bestimmt.

3.3 Molekulare Epidemiologie und Virulenzbestimmung von *Aspergillus fumigatus*-Isolaten aus Weißstorch-Nestlingen und ihrer Umwelt

Publikation 3: Olias P, Gruber AD, Hafez HM, Lierz M, Slesiona S, Brock M, Jacobsen ID (2011) Molecular epidemiology and virulence assessment of *Aspergillus fumigatus* isolates from white stork chicks and their environment. Veterinary Microbiology, DOI:10.1016/j.vetmic.2010.08.029

Die initial festgestellte, teils endemische Häufung von Infektionen mit *Aspergillus fumigatus* unter Nestlingen in der ostdeutschen Weißstorchpopulation (siehe Punkt 3.1) führte zu der Fragestellung, ob möglicherweise an betroffenen Horststandorten für Vögel besonders virulente *A. fumigatus*-Stämme endemisch vorkommen. Hieraus wurde die dieser Arbeit zu Grunde liegende Hypothese abgeleitet:

Hypothese 3: Bestimmte *Aspergillus fumigatus*-Stämme aus Weißstorch-Nestlingen zeigen eine höhere Prävalenz und Virulenz.

Als Methode der Wahl wurde zunächst das *Multilocus Microsatellite Typing* (MLMT) eingesetzt, welches nach dem gegenwärtigen Stand der Technik die höchste Diskriminierung unterschiedlicher Stämme von *A. fumigatus* bot. Anhand der Unterschiede von neun *Short Tandem Repeats* (STRs), einer Cluster-Analyse mittels UPGMA-Parameter sowie einer Multiplex-PCR für das *MAT-1 α-Box*-Kreuzungstyp-Gen wurden insgesamt 61 Isolate genotypisiert. Hierfür wurden 30 klinische Isolate und 31 Umweltisolate sechs repräsentativer Horststandorte (nsA-nsE) in Brandenburg mit 10 an hochgradiger invasiver Aspergillose verendeten Nestlingen der Jahre 2007 bis 2009 ausgewählt (Abb. 4; Tab. 1, Publ. 3). Dadurch sollte bestimmt werden, ob (1) Einzelvögel gleichzeitig mit mehreren Genotypen infiziert sind; (2) klinische Isolate und Umweltisolate clustern; (3) klinische Isolate einer Umweltquelle zugeordnet werden können.

Im Ergebnis zeigte sich, dass (1) alle 10 Nestlinge jeweils mit zwei bis vier Genotypen von *A. fumigatus* infiziert waren (siehe Tab. 2, Publ. 3). Sechs Tiere zeigten zudem Koinfektionen der beiden Kreuzungstypen *MAT1.1* und *MAT1.2*. Aus der Lunge eines Nestlings des Horstandorts nsD konnte derselbe Genotyp zweimal isoliert werden. Eine Mikroevolution zwischen Isolaten - definiert als Mikrovariation in nur einem STR - wurde unter zwei Isolaten eines Vogels von 2008 des Standorts nsA detektiert. Außerdem zeigte ein klinisches Isolat desselben Standorts aus dem Jahr 2009 eine Mikroevolution zu einem Umweltisolat von einem 39 Kilometer entfernten Horststandort des Jahres 2007. Dagegen konnte (2) eine Clusterbildung weder von klinischen Isolaten und noch von Umweltisolaten

einzelner Horststandorte identifiziert werden. Unter den Umweltisolaten waren die beiden Kreuzungstypen *MAT1.1* und *MAT1.2* etwa gleich häufig vertreten, unter den klinischen Isolaten war *MAT1.1* mit 58,6% minimal überrepräsentiert. Lediglich in einem Fall (3) wurde in der Genotypisierung eine Übereinstimmung zwischen einem klinischen Isolat (Standort nsA) von 2008 und einem Umweltisolat aus einem nahegelegenen Komposthaufen identifiziert.

Basierend auf der MLMT-Analyse wurden 20 repräsentative klinische Stämme und Umweltstämme ausgewählt und auf ihr Virulenzpotential hin untersucht. Zur Anwendung kam erstmals ein neu etabliertes, alternatives *in vivo*-Modell basierend auf embryonierten Hühnereiern (Jacobsen et al. 2010). Der Laborstamm *CEA17 Δ akuB* wurde als Referenz ausgewählt, da er ein definiert hohes Virulenzpotential im Maus- und Eiermodell zeigt. Im Ergebnis konnten für ein klinisches Isolat des Standorts nsE und für ein Isolat aus dem Horst von nsF eine signifikant erhöhte Virulenz bestätigt werden. Interessanterweise zeigte dagegen ein klinisches Isolat von nsF eine wiederholte starke Abschwächung der Virulenz, wobei ein normales Wachstum bei der Anzucht auf Nährmedium beobachtet werden konnte. Nachdem von diesem Nestling noch zwei weitere Stämme isoliert worden waren, wurde das Virulenzpotential aller drei Genotypen erneut miteinander verglichen. Hierbei zeigten sich neben dem stark in seiner Virulenz reduzierten Stamm zwei Stämme, die in ihrer Virulenz etwa mit dem Referenzstamm *CEA17 Δ akuB* übereinstimmten. Darüber hinaus wurden fünf klinische Isolate des Standorts nsA aus den Jahren 2008 und 2009 untersucht. Alle fünf Isolate zeigten eine hohe Virulenz, wobei die Virulenz zweier Isolate gegenüber dem Referenzstamm signifikant erhöht war. Zusammenfassend lässt sich damit sagen, dass die Mehrzahl der getesteten Stämme im Eiermodell unabhängig von ihrer Herkunft ein mit dem Referenzstamm *CEA17 Δ akuB* vergleichbar hohes Virulenzpotential aufwies. Obwohl klinische Stämme mit einer erhöhten Virulenz identifiziert werden konnten, lässt sich in der Gesamtschau der Ergebnisse dieser Arbeit die initial gestellte Hypothese (Hypothese 3) nicht unterstützen.

4 ÜBERGREIFENDE DISKUSSION

4.1 Die Entdeckung von Schimmelpilzen als Ursache einer erhöhten Sterblichkeit von Weißstorch-Nestlingen

In diesem Dissertationsprojekt wurde eine bislang nicht bekannte Bedeutung von Schimmelpilzen als Erkrankungs- und Todesursache von Nestlingen einer Wildvogelspezies nachgewiesen. Zunächst wurde eine umfangreiche Kasuistik zu den Mortalitätsursachen von Weißstorchnestlingen in Deutschland erstellt. Hierzu wurden insgesamt 103 verendete Weißstorchnestlinge aus den Jahren 2007 bis 2009 systematisch anatomisch-pathologisch und histopathologisch untersucht und pathologische Veränderungen diagnostiziert. Resultierend zeigte sich eine herausragende Bedeutung pulmonaler Schimmelpilzinfektionen als Erkrankungs- und Todesursache der Vögel. Mittels Spezialfärbeverfahren repräsentativer histologischer Schnitte der Lungen wurde bei 47 der insgesamt 103 (45,6%) untersuchten Tiere eine mykotische Pneumonie diagnostiziert, wobei 23 Tiere (22,3%) direkt an einer mykotischen Pneumonie verendet sind. Es ist zu vermuten, dass etliche weitere an Pilzinfektionen erkrankte Tiere beim Ausbleiben anderer Mortalitätsursachen ebenfalls daran verendet wären. Während über respiratorische Mykosen von Wirtschaftsgeflügel sowie subadulten und adulten Wildvögeln in der Literatur zahlreich bereits seit über einem Jahrhundert berichtet wird, war zu mykotischen Pneumonien bei freilebenden Wildvögeln in ihrer Nestlingszeit bisher nichts bekannt (siehe Diskussion Publ. 1). Umso überraschender erscheint der hohe Prozentsatz der in dieser Studie betroffenen Vögel.

Im Gegensatz zu diesem Untersuchungsergebnis konnten histopathologisch bei keinem der Nestlinge morphologische Korrelate identifiziert werden, die für Infektionen mit bekannten Viren sprechen würden. Insbesondere zeigte keines der Tiere entzündliche Veränderungen des Gehirns, des Pankreas, der Leber, der Nieren und der Lungen, die Hinweise auf eine Infektion durch WNV, HPAIV, Paramyxoviren, Herpesviren oder anderer relevanter vogelpathogener Viren geben würden (Thomas et al. 2007). Auch fanden sich keine Veränderungen, die auf eine Infektion mit immunsupprimierenden aviären Viren schließen ließen (Hoerr 2010). Die immunologisch relevanten Organe Thymus, Milz und Bursa Fabricius zeigten zudem keine Hinweise einer lymphatischen Atrophie. Drei Tiere wiesen eine massive Dilatation des Ösophagus und des Drüsenmagens auf. Histopathologisch fanden sich jedoch keine entzündlichen Veränderungen oder nachweisbare Erregerstrukturen. Eine durchgeführte qRT-PCR zum Nachweis des aviären Bornavirus (ABV) verlief negativ (Lierz et al. 2009), so dass die Ursache der Dilatation gegenwärtig ungeklärt bleibt. Lediglich fünf Tiere zeigten eine bakterielle Infektion, von denen zwei Tiere eine mittelgradige, multifokale, granulomatöse Bronchopneumonie aufwiesen. Mikrobiologisch konnte aus der Lunge eines dieser Tiere neben *Proteus* spp. auch *Escherichia coli* identifiziert werden.

Zunächst für weitere 35 Nestlinge aus dem Jahr 2007 routinemäßig durchgeführte bakteriologische Untersuchungen waren stark durch Fäulniserreger überlagert, da sich ein Großteil der Tierkörper bei der Sektion bereits in Autolyse befand. Diese werden hier nicht näher besprochen. In seiner Größenordnung korreliert das Ergebnis der diagnostizierten bakteriellen Infektionen der Nestlinge mit den über einen Zeitraum von zehn Jahren erhobenen Daten subadulter und adulter Tiere in Brandenburg (vergleiche Abb. 1) und lässt auf eine untergeordnete Bedeutung bakterieller Infektionen bei Weißstörchen in ihren ersten Lebenswochen schließen. Interessanterweise konnte als wahrscheinliche Todesursache dreier Nestgeschwister aus Mecklenburg-Vorpommern eine hochgradige Infektion mit *Alaria alata* periösophageal im Bindegewebe und im Thymus identifiziert werden. Die Metazerkarienstadien dieses auch als Dunckerscher Muskelegel bezeichneten Trematoden finden sich in paratenischen Wirten, zu denen auch der Weißstorch zählt. Einzelberichte über sporadische Brutaufälle durch Infektionen mit dem Parasiten sind in der Literatur beschrieben (Grunberg und Kutzer 1964). In früherer Literatur wurden parasitäre Infektionen anekdotisch auch als möglicher Auslöser für den bei Weißstörchen beobachteten Infantizid angeführt (Grunberg und Kutzer 1964; Szidat 1935; Szidat 1943). Gesicherte wissenschaftliche Erkenntnisse zu den Hintergründen dieses Verhaltens bei Weißstörchen existieren bislang nicht (Tortosa und Redondo 1992; Zielinski 2002). In der vorliegenden Studie nimmt die Rate der Tiere, die tot unter dem Nest gefunden wurden und typische pathologische Veränderungen eines Traumas aufwiesen, mit 38 von 103 Tieren (38,4%) den größten Prozentsatz der festgestellten, direkten Todesursachen ein. Ein Infantizid konnte nach erfolgter pathologischer Untersuchung jedoch nur in zwei Fällen zweifelsfrei bestätigt werden. In den meisten der übrigen 36 Fälle wurde anekdotisch von einem Abwurf der Nestlinge durch die Elterntiere aus dem Horst berichtet. Auffälligerweise zeigten histopathologisch 14 (38,9%) dieser Tiere eine Pilzinfektion der Lunge. Beim Vorliegen eines kausalen Zusammenhangs wären Schimmelpilze mit 37 von 103 (35,9%) betroffenen Weißstorchnestlingen nicht nur häufigste Infektions- sondern auch häufigste Todesursache. Inwiefern jedoch ein Infantizid ein aktives Eingreifen der Elterntiere auf das Vorliegen einer Pilzinfektion erkrankter Nestlinge darstellt, bleibt gegenwärtig Spekulation. Das gleichzeitige Auftreten von Pilzinfektion und Infantizid impliziert per se noch keine Kausalität (Kronmal 1993), so dass zur Klärung dieses spannenden Aspekts weitere Untersuchungen notwendig sind.

4.2 Entwicklung einer neuen Methode zur präzisen Identifizierung der invasiven Pilzspezies

Grundsätzlich ergibt sich in der Diagnostik pulmonaler Pilzinfektionen das Problem, ein invasives Pilzwachstum von einer Besiedlung der Schleimhaut oder eine intra vitale Infektion von einer post mortalen Kontamination zu differenzieren (Rickerts et al. 2007). Die

Bestimmung der Pilzspezies in Gewebsschnitten aufgrund der Wachstumsmorphologie kann auch mittels Spezialfärbungen als nicht zuverlässig gelten und bedarf weiterer Hilfsmittel wie etwa einer immunhistochemischen Untersuchung der Pilzspezies mittels spezifischer, monoklonaler Antikörper (siehe auch Diskussion Publ. 2). Die Pilzanzucht aus Gewebe- oder Tupferproben auf Nährmedien birgt das Risiko falsch-positiver Ergebnisse, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass neben invasiv wachsenden Pilzen auch die Schleimhaut besiedelnde Pilze oder Kontaminaten nachgewiesen werden. In der Routinediagnostik ist daher von einem gewissen Prozentsatz falsch-positiver Ergebnisse auszugehen; ein Problem, welches ernsthafte Konsequenzen für die Therapie haben kann, da sich das medikamentelle Regime je nach infizierender Pilzspezies sehr verschieden gestaltet (Chandrasekar 2009; Meis und Chakrabarti 2009; Sangoi et al. 2009).

Mittels *Laser Capture Microdissection* (LCM) von speziell angefärbten Einzelhyphen und nachgeschalteter PCR wurde hier erstmals ein diagnostisches Verfahren etabliert, welches die sichere Identifizierung invasiv wachsender Pilzspezies direkt aus infiziertem Lungengewebe erlaubt. Hierzu wurde eine Färbetechnik für Pilze weiterentwickelt und ein Protokoll erstellt, das Pilzzellen speziesübergreifend im Gewebeschnitt sichtbar macht ohne wie andere gängige Färbeverfahren (beispielsweise PAS-Reaktion oder Grocott-Versilberung) die Pilz-DNA zu schädigen und so eine nachfolgende PCR und Sequenzierung unmöglich zu machen. Der optische Aufheller Blankophor[®], ein Stilbenederivat, besitzt eine hohe Bindungsaffinität für β -glycosidische Polysaccharide. Diese Eigenschaft ermöglicht die selektive Sichtbarmachung von β -Glucanen die in Form von Chitin in Zellwänden von Pilzen vorkommen (Abb. 6; Hollander et al. 1984; Ruchel und Schaffrinski 1999). Mittels Anregung durch langwelliges UV-Licht (< 400 nm Wellenlänge) können invasiv wachsende Pilze unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden und durch einen UV-A-Laser steril aus infiziertem Gewebe entnommen werden. Die so auf zuverlässige, schnelle und kostengünstige Weise aus Gewebsläsionen entnommenen einzelnen Pilzzellen können dann selektiv weiter untersucht werden. Zur nachgeschalteten Speziesidentifizierung wurde eine PCR etabliert, die mit universellen Pilzprimern die unter Pilzspezies hochvariable ITS1-Region amplifiziert (White et al. 1990). Eine nachgeschaltete Sequenzierung und BLAST-Analyse ermöglicht dann die sichere Speziesidentifizierung. Mit dem beschriebenen Verfahren wurden in 60 bis 90% die mikrodisezierten Pilzspezies anhand ihrer ITS1-Sequenz erfolgreich identifiziert. In den anderen Fällen war das PCR-Produkt entweder nicht auswertbar oder es wurde kein Amplifikat generiert (siehe Diskussion Publ. 2). Zur Überprüfung der grundsätzlichen technischen Machbarkeit (*Proof of Principle*) wurde das Verfahren neben Lungengewebe auch auf Lymphknotengewebe von einem an einer Schimmelpilzseptikämie verendeten Hund angewendet, von dem mittels konventioneller Anzucht aus verschiedenen Organen *Aspergillus terreus* isoliert worden war. Dieses Ergebnis konnte durch die neu entwickelte Methode erfolgreich bestätigt werden.

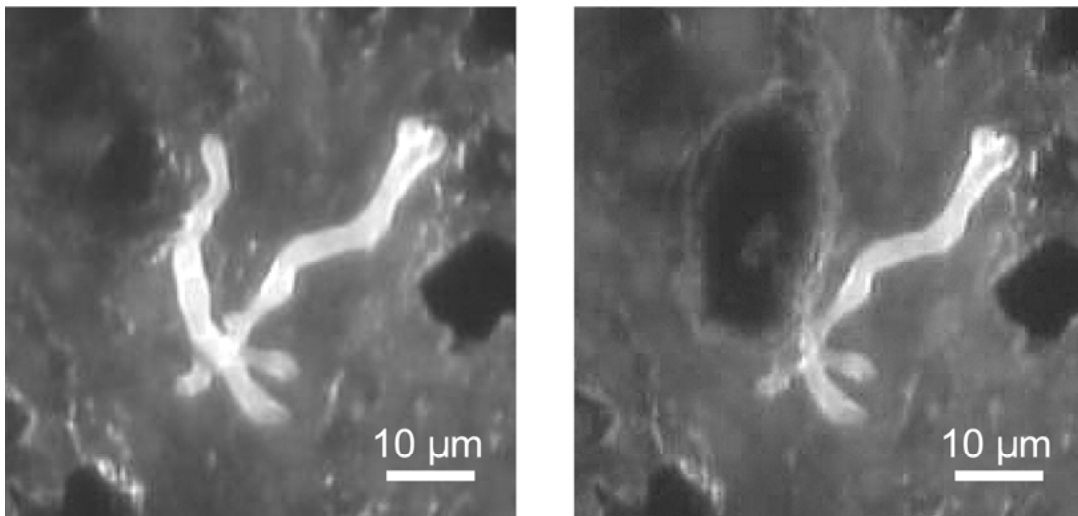


Abb. 6: *Laser Capture Microdissection* von Blankophor[®]-markierten Pilzhyphen. Fluoreszierende, invasiv wachsende Hyphen von *Aspergillus fumigatus* vor (links) und nach (rechts) der lasergestützten Mikrodisektion (LCM) einer einzelnen Hyphe aus einem histologischen Schnittpräparat einer Weißstorch-Lunge.

4.3 Mögliche Hintergründe zu dem plötzlichen Auftreten der Schimmelpilzmykosen

Schimmelpilze sind ein wichtiger Bestandteil eines jeden Ökosystems. Sie spielen eine bedeutende Rolle bei der Zersetzung und dem Abbau organischer Stoffe und damit in den natürlichen Verwesungsprozessen des Stoffkreislaufs einer belebten Umwelt. Durch das ubiquitäre Vorkommen von Schimmelpilzen ist jedoch gleichzeitig auch das permanente Vorhandensein einer potentiellen Infektionsquelle gegeben. Initiale mikrobiologische und molekularbiologische Untersuchungen konnten entgegen der Hypothese 1 (siehe Punkt 3.1) bei allen untersuchten Weißstorchnestlingen keine neuen, bisher unbekanntenen Pilzspezies identifizieren. Vielmehr handelte es sich mit einer Ausnahme bei allen Erregern um bereits in der Human- und Veterinärmedizin als obligat pathogen identifizierte Schimmelpilze (siehe Diskussion Publ. 1). Herausragende Pilzspezies war *Aspergillus fumigatus*, der in 24 von 40 Fällen (60%), in denen eine Pilzanzucht aus infiziertem Lungengewebe gelang, nachgewiesen werden konnte. Die Verifizierung der morphologischen Speziesdiagnose erfolgte von jedem zunächst auf Malz-Agar angezüchteten Pilz mittels PCR der ITS1 und teilweise zusätzlich der ITS2-Region sowie nachfolgender Sequenzierung und Vergleich der generierten Sequenzen und öffentlich zugänglichen Sequenzen mit der Software BLAST. In einem Fall konnte so mit *Thermomyces lanuginosus* ein bisher nicht für Pneumonien bekannter Schimmelpilz identifiziert werden (Abb. 1, Publ. 1). Interessanterweise wurden alle im Rahmen dieser Studie identifizierten Pilze bereits auch in der Einstreu von Geflügelhaltungen sowie aus den

Nestern verschiedener Vogelarten nachgewiesen (Anastasi et al. 2005; Apinis und Pugh 1967; Chute und Barden 1964; Eckman und Morgan-Jones 1979; Hubálek et al. 1973). Zudem sind alle identifizierten Pilze an Zersetzungsprozessen organischer Materialien beteiligt, wie etwa in Kompost- oder Grünschnitthaufen (Beffa et al. 1998; Ryckeboer et al. 2003), die von Weißstörchen häufig als Quelle zur Gestaltung der Nistmulde im Horst verwendet werden (Bauer und Glutz von Blotzheim 1966; persönliche Beobachtung). Obwohl in der veterinärmedizinischen Literatur häufig als Infektionserreger von Vögeln angeführt, konnten im Rahmen dieser Studie neben *A. fumigatus* keine anderen *Aspergillus* spp. identifiziert werden. Lediglich in einem Fall fand sich eine Koinfektion von *A. fumigatus* und *Aspergillus niger*. Jedoch konnte dieses Ergebnis mittels LCM-Verfahren nicht verifiziert werden, weshalb es sich im Falle von *A. niger* möglicherweise um eine Kontamination gehandelt haben könnte (siehe Diskussion Publ. 2). Statt anderer *Aspergillus* spp. wurden dagegen in 44,7% der betroffenen Tiere Zygomyceten isoliert, unter denen *Lichtheimia corymbifera* mit 17,8% am häufigsten vertreten war. In der Humanmedizin spielen Zygomyceten eine zunehmende Rolle als opportunistische Pathogene (Richardson und Lass-Flörl 2008). Anders jedoch als bei *A. fumigatus* ist über ihre Pathophysiologie bisher kaum etwas bekannt (Ribes et al. 2000). Interessanterweise wurden durch Anzucht aus infiziertem Lungengewebe in acht Fällen Koinfektionen mit Zygomyceten festgestellt. Sechs der betroffenen Tiere zeigten daneben eine Infektion durch *A. fumigatus*. Doppelinfektionen dieser Art sind aus der Humanmedizin beschrieben und nicht ungewöhnlich (Meis und Chakrabarti 2009). In Diskrepanz jedoch zu diesen mittels konventioneller Kultivierung erzielten Ergebnissen konnte bei dreien der Tiere mit offener Mehrfachinfektion durch LCM-Technik nur *A. fumigatus* detektiert werden. Dieses Ergebnis lässt über falsch-positive Ergebnisse im Anzuchtverfahren durch Schleimhautbesiedlung oder Kontamination spekulieren und verdeutlicht oben bereits beschriebene Hürden einer verlässlichen Diagnostik in der Mykologie (siehe auch Diskussion Publ. 2).

Aufgrund der überragenden Bedeutung von *A. fumigatus* bei mykotischen Pneumonien der Weißstorchnestlinge und einem gehäuftem Auftreten von Infektionen dieses Pilzes beispielsweise im brandenburgischen Vetschau wurde diese Pilzspezies im Rahmen dieser Promotionsarbeit genauer untersucht. Dabei stellte sich die Frage, ob an Horststandorten wie in Vetschau möglicherweise für Vögel besonders virulente *A. fumigatus*-Stämme evolviert sind und sich für das in Brandenburg seit 2005 dokumentierte endemische Auftreten mit kompletten Brutaussfällen verantwortlich zeigen. Hieraus wurde folgende Hypothese abgeleitet:

Hypothese 3: Bestimmte *Aspergillus fumigatus*-Stämme aus Weißstorch-Nestlingen zeigen eine höhere Prävalenz und Virulenz.

Zur Überprüfung der Hypothese wurden zwei Verfahren gewählt: (1) Zunächst wurde eine Genotypisierung anhand von Mikrosatelliten klinischer Isolate und Umweltisolate von *A. fumigatus* durchgeführt, die zuvor anhand ihrer Wachstumsmorphologie charakterisiert worden waren (siehe Diskussion Publ. 3). Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Analyse wurden dann (2) repräsentative klinische Stämme und Umweltstämme ausgewählt und mittels eines neu etablierten, alternativen *in vivo*-Modells auf Basis embryonierter Hühnereier (Jacobsen et al. 2010) auf ihr Virulenzpotential hin untersucht (siehe Punkt 4.4).

Zur epidemiologischen Untersuchung wurden sechs Neststandorte in Brandenburg mit 10 verendeten Nestlingen der Jahre 2007 bis 2009 ausgewählt (Abb. 4). Dabei wurde davon ausgegangen, dass das Horstmaterial selbst sowie Komposthaufen und Grünschnitthaufen der nahen Umgebung als Infektionsquelle dienen (siehe Diskussion Publ. 3). Daher wurden neben klinischen Isolaten auch Umweltisolate der Horste sowie Komposthaufen der Umgebung untersucht. Die hierfür angewandte Technik des *Multilocus Microsatellite Typing* (MLMT) mit dem STRAf-Assay (de Valk et al. 2005) verspricht dabei gegenwärtig mit $D = 0,9994$ die größte Diskriminierungsrate bei der Stammanalyse von *A. fumigatus* (Balajee et al. 2008). Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden auf diese Weise 61 *A. fumigatus*-Isolate genetisch charakterisiert.

Während zur Epidemiologie der Aspergillose in der Humanmedizin bereits zahlreiche wissenschaftliche Erkenntnisse vorliegen (siehe Diskussion Publ. 3), ist die Epidemiologie dieser Erkrankung bei Tieren kaum untersucht. In einer Studie an Puten konnte die Arbeitsgruppe um Lair-Fullerger basierend auf Ergebnissen einer *Microsatellite Length Polymorphism* (MLP)-Analyse eine Übereinstimmung zahlreicher Genotypen von *A. fumigatus*-Isolaten der Atemwege nicht erkrankter und histopathologisch unauffälliger Vögel und der Stallluft darstellen (Lair-Fullerger et al. 2003). Dabei zeigte sich eine hohe genetische Diversität der Isolate, tatsächlich aber auch neun Genotypen, die sowohl in den Luftwegen als auch in der Stallluft detektiert wurden sowie ein Genotyp welcher übereinstimmend in der Stallluft und in einem an invasiver Aspergillose (IA) erkrankten Tier isoliert wurde. Kürzlich erst untersuchte die Arbeitsgruppe um Alvarez-Perez ebenfalls mittels MLP sowie RAPD-Analyse klinische *A. fumigatus*-Isolate von in Gefangenschaft lebenden und an IA verendeten Pinguinen (Alvarez-Perez et al. 2010). Interessanterweise konnten sie über eine Anzucht aus infiziertem Gewebe der Vögel polyklonale Infektionen durch *A. fumigatus* identifizieren (siehe Diskussion Publ. 3). Die Ergebnisse der Genotypisierung mittels MLMT in der hier nun vorliegenden Arbeit bestätigen das Vorkommen polyklonaler Infektionen auch für eine Wildvogelart und unterstützen damit die Hypothese 2 (siehe Punkt 3.2). Durch das im Rahmen dieser Promotionsarbeit entwickelte LCM-Verfahren konnten dabei bis zu vier verschiedene Genotypen in einer Lunge identifiziert werden und wiederum die Ergebnisse der MLMT-Analyse bestätigt werden. Gleichzeitig verifizieren die Ergebnisse der LCM-Analyse erstmals das Vorkommen polyklonaler Infektionen von *A. fumigatus* bei IA, indem falsch-positive Ergebnisse aufgrund

von Kontaminationen oder Gewebsbesiedlung ausgeschlossen wurden (siehe Diskussion Publ. 2). Interessanterweise fanden sich in der Mehrzahl der untersuchten Tiere mittels Multiplex-PCR Infektionen beide Kreuzungstypen, so dass eine theoretische Möglichkeit einer sexuellen Fortpflanzung von *A. fumigatus* im Respirationstrakt von Vögeln gegeben ist (siehe Diskussion Publ. 3).

Lediglich in einem Fall konnte dagegen mittels MLMT eine Übereinstimmung zwischen einem klinischen Isolat eines Nestlings aus Vetschau von 2008 und einem Isolat aus einem horstnahen Komposthaufen in allen neun sequenzierten STR-Regionen identifiziert werden. Zwischen zwei klinischen Isolaten wurde eine Mikrovariation einer STR-Region identifiziert, die möglicherweise auf eine Mikroevolution des Pilzstamms nach der Infektion im Gewebe schließen lassen könnte. Bei der Auswertung mittels UPGMA-Parameter in einer Clusteranalyse durch das Computerprogramm BioNumerics fanden sich jedoch keine weiteren Übereinstimmungen von klinischen Isolaten und Umweltisolaten (siehe Diskussion Publ. 3). Vielmehr wurde eine extrem große genetische Diversität zwischen den Isolaten deutlich (Abb. 1, Publ. 3). Interessanterweise zeigten sogar Isolate von am selben Tag verendeten Geschwistertieren und Tieren sowie Nistmaterialien von Standorten mit endemischem Auftreten von *A. fumigatus*-Infektionen über mehrere Jahre keinerlei genetische Übereinstimmung oder Clusterbildung. Eine mögliche Erklärung hierfür liefern Berechnungen aus der Humanmedizin, die bei Intensivpatienten von einer Inhalation mit etwa 5.000 verschiedenen Genotypen von *A. fumigatus* über einen Zeitraum von drei Monaten ausgehen (Chazalet et al. 1998; siehe Diskussion Publ. 3). Basierend auf diesen Erkenntnissen ist daher anzunehmen, dass die Zusammensetzung der vorkommenden *A. fumigatus*-Stämme im Mikroklima der Weißstorchhorste einer permanenten Veränderung unterliegt und durch den Eintrag von Konidien durch die Elterntiere und die Luft beeinflusst wird (siehe Diskussion Publ. 3).

4.4 Die Bedeutung hochvirulenter *Aspergillus fumigatus*-Stämme

Zur Klärung der Frage, ob sich innerhalb des Milieus der betroffenen Horststandorte eine für Vögel besonders virulente Population von *A. fumigatus*-Stämmen entwickelt hat, wurde von genotypisierten *A. fumigatus*-Isolaten anhand der zuvor durchgeführten Clusteranalyse eine repräsentative Stammauswahl von drei zufällig ausgewählten betroffenen Horststandorten getroffen. Ziel war es, genetisch diverse klinische Stämme und Umweltstämme beider Kreuzungstypen auf das Vorliegen von Virulenzunterschieden zu untersuchen. Das Fehlen molekularbiologisch identifizierbarer primärer Virulenzfaktoren des Pilzes (Askew 2008) machte die Anwendung eines *in vivo*-Infektionsmodells unumgänglich. In der Regel werden hierfür in der mykologischen Forschung Mausmodelle angewendet (Clemons und Stevens

2005). In den letzten Jahren haben jedoch unter anderem ethische Überlegungen zur Entwicklung einer ganzen Reihe alternativer Methoden zur Untersuchung der Virulenzeigenschaften von *A. fumigatus* geführt. Neben Zell- und Gewebekulturen wurden Insektenmodelle mit Fruchtfliegen (*Drosophila melanogaster*; Lionakis und Kontoyiannis 2005; Lionakis et al. 2005) und Wachsmottenlarven (*Galleria mellonella*; Jackson et al. 2009; Mylonakis 2008; Reeves et al. 2004; Renwick et al. 2006) etabliert. Verglichen mit Wirbeltieren unterliegen diese alternativen Modelle jedoch Beschränkungen, die eine aussagekräftige Evaluation von Virulenzeigenschaften limitieren. Unterschiede umfassen beispielsweise den Infektionsweg, die Unterschiede im Immunsystem und die im Vergleich zum Vogel niedrigen Körpertemperaturen der Insekten. Um einige dieser Defizite auszugleichen und gleichzeitig auf Tierversuche zu verzichten, wurden das Virulenzpotential der Stämme erstmals an einem neu etablierten, alternativen Infektionsmodell basierend auf embryonierten Hühnereiern getestet (Jacobsen et al. 2010). Im Vergleich zum Mausmodell weist das alternative Modell bei einer notwendigen dosisabhängigen Überlebensrate ebenfalls eine ausgewiesene Reproduzierbarkeit auf (Jacobsen et al. 2010).

Im Ergebnis konnten durch die Infektionsversuche drei klinische Isolate mit einer signifikant gesteigerten Virulenz identifiziert werden. Dagegen war die überwiegende Mehrzahl der klinischen Isolate anhand der Virulenz nicht von den Umweltisolaten zu unterscheiden und zeigte eine mit dem pathogenen Referenzstamm CEA17 Δ *akuB* vergleichbare Virulenz (siehe Diskussion Publ. 3). In Übereinstimmung mit genetischen, biochemischen und immunologischen Erkenntnissen aus der Humanmedizin (Bart-Delabesse et al. 1999; Bart-Delabesse et al. 1998; Debeaupuis et al. 1997) legt das Ergebnis nahe, dass kein bestimmter Genotyp von *A. fumigatus* mit einer höheren Virulenz assoziiert ist und vielmehr annähernd jeder Stamm unabhängig von der Herkunft potentiell pathogen ist. Interessanterweise jedoch zeigte ein klinisches Isolat bei normalem Wachstum auf Anzuchtmedien eine wiederholbar starke Abschwächung der Virulenz. Dies verdeutlicht die derzeitige Notwendigkeit von komplexen Infektionsmodellen zur Abschätzung der Virulenzeigenschaften isolierter *A. fumigatus*-Stämme.

Signifikante Unterschiede in der Virulenz von *MAT1.1* und *MAT1.2*-Stämmen konnten nicht festgestellt werden. Dieses Ergebnis widerspricht einer aktuellen humanmedizinischen Studie von Patienten mit IA, die Stämmen vom Kreuzungstyp *MAT-1.1* eine höhere Virulenz zuschreibt (Alvarez-Perez et al. 2009). Das in der vorliegenden Promotionsarbeit mittels Multiplex-PCR nachgewiesene gleichzeitige Vorkommen beider Kreuzungstypen in infizierten Vögeln birgt die theoretische Möglichkeit für eine kürzlich erstmals experimentell nachgewiesene sexuelle Fortpflanzung von *A. fumigatus* (O'Gorman et al. 2009), da der Pilz in chronisch infizierten Vögeln eine hohe Sporulationsbereitschaft in der Lunge und dem Luftsacksystem zeigt (Richard et al. 1984).

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen ableiten, dass die Mehrzahl der getesteten Stämme unabhängig von ihrer Herkunft eine mit dem pathogenen Referenzstamm CEA17 Δ *akuB* vergleichbare Virulenz aufweist. Auch wenn einige klinische Stämme mit einer erhöhten Virulenz identifiziert werden konnten, lässt sich in der Gesamtschau der Ergebnisse dieser Studie die initial gestellte Hypothese (Hypothese 3) nicht unterstützen. Offenbar scheinen, entgegen der ursprünglichen Hypothese, keine Cluster hochvirulenter *A. fumigatus*-Stämme für die gehäuften Ausbrüche der IA an den untersuchten Horststandorten in Brandenburg verantwortlich zu sein. Vielmehr deuten die Ergebnisse darauf hin, dass wirtseigene Faktoren wie etwa ein unreifes oder supprimiertes Immunsystem der Nestlinge bei einer ubiquitär vorhandenen Sporenbelastung durch *A. fumigatus* ausschlaggebend sind für das Angehen einer Infektion und einen fatalen Ausgang.

4.5 Ausblick

Die Entdeckung mykotischer Pneumonien als bedeutende Morbiditäts- und Mortalitätsursache von Nestlingen einer Wildvogelspezies wirft zahlreiche neue Fragen auf. Bislang lagen keine wissenschaftlichen Erkenntnisse über die Bedeutung von Pilzinfektionen bei Wildvogelnestlingen vor, so dass es für eine abschließende Einschätzung des Einfluss dieser Erkrankung auf die Stabilität der Weißstorchpopulation in Deutschland weiterer Untersuchungen bedarf. In Ermangelung von Vergleichsdaten erscheint insbesondere das langfristige Monitoring der Erkrankungshäufigkeit von Weißstorchnestlingen und Nestlingen anderer Wildvogelspezies dringend geboten. Nachdem in der vorliegenden Promotionsarbeit entgegen der Hypothese 1 (siehe Punkt 3.1) keine unbekanntes Pilzspezies nachgewiesen werden konnten, lag der weitere Schwerpunkt der Arbeit auf der Untersuchung des Virulenzpotentials von *Aspergillus fumigatus*-Stämmen endemischer Ausbrüche und der Frage, warum sich gewöhnliche, saprophytäre Pilze in aggressive Pathogene verwandeln und bei Weißstorchnestlingen zu Infektionen und zum Tod führen. Die Ergebnisse basierend auf dem Hühnereimodell zeigten, dass offenbar entgegen der gestellten Hypothese 3 (siehe Punkt 3.3) keine Cluster hochvirulenter *A. fumigatus*-Stämme an betroffenen Neststandorten vorkommen. Sofern die Ergebnisse aus dem Modell auf die Situation beim Weißstorch übertragen werden können, folgt hieraus, dass nach gegenwärtigem Kenntnisstand aktive Gegenmaßnahmen aufgrund des ubiquitären Vorkommens von Schimmelpilzen in der Umwelt weder angebracht noch wirksam wären. Es muss vielmehr angenommen werden, dass andere Faktoren zu der hohen Empfänglichkeit der Weißstorchnestlinge für Schimmelpilzmykosen beitragen. Das Verständnis dieser der aviären Wirtsabwehr gegen Pilzinfektionen zugrundeliegenden Mechanismen erscheint hier als zukünftiges Forschungsfeld (Blanco und Garcia 2008).

Im allgemeinen wird bei Infektionen mit *A. fumigatus* meist von einer Vorschädigung oder dem Fehlen einer ausreichenden Wirtsimmunität ausgegangen, jedoch ist dieser Zusammenhang für Vögel nicht hinreichend geklärt (Tell 2005). Die im Rahmen dieser Promotionsarbeit erzielten Ergebnisse sprechen dafür, dass zum Verständnis der aviären Aspergillose ähnlich wie bei anderen Pilzkrankungen wie etwa der Chytridiomykose der Amphibien (siehe Einleitung) und anders als bei primär pathogenen Erregern eine komplexere Betrachtungsweise gewählt werden muss, die mögliche die Wirtsabwehr beeinflussende Faktoren miteinschließt (siehe Diskussion Publ. 1). Mittels Histopathologie der in dieser Studie untersuchten Tiere konnten zunächst Infektionen mit bekannten Viren und Bakterien als prädisponierende Faktoren ausgeschlossen werden. Auch konnten histologisch keine pathologischen Veränderungen der immunologisch relevanten Organe wie Thymus, Milz und Bursa Fabricius identifiziert werden. Interessanterweise waren jedoch annähernd 95% der Weißstörche mit diagnostizierter mykotischer Pneumonie nicht älter als drei Wochen, was dem ersten Drittel der Nestlingsperiode entspricht. Jovani und Tella konnten zeigen, dass Weißstörche in diesem Alter offenbar eine besondere Sensibilität gegenüber Umwelteinflüssen aufweisen (Jovani und Tella 2004). Interessanterweise korreliert dieser Zeitraum mit dem Defizit von Nesthockern (*Atricial Bird Type*) wie dem Weißstorch, die Körpertemperatur selbstständig zu regulieren (Tortosa und Castro 2003; Tortosa und Villafuerte 1999; Visser 1998). Von Vögeln ist zudem bekannt, dass Temperaturstress einen negativen Effekt auf die Stabilität des Immunsystems haben kann (Koutsos und Klasing 2008). Gegenwärtig verfolgen wir daher folgende Hypothese:

Hypothese 4: Umweltstress führt zu einer Schwächung der Immunabwehr von Weißstörchen in den ersten drei Lebenswochen und spielt damit eine entscheidende Rolle bei Ausbrüchen der invasiven Aspergillose.

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Meteorologie der Freien Universität Berlin unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Uwe Ulbrich wird daher gegenwärtig der Einfluss regionaler Klimavariablen (unter anderem die Niederschlagsmenge und die Umgebungstemperatur) auf das Auftreten von Pilzinfektionen untersucht. Erste statistische Auswertungen der den einzelnen Horststandorten zugeordneten meteorologischen Daten zeigen statistisch signifikante negative Anomalien der Tageshöchsttemperatur (T_{\max}) für die Gruppe an mykotischer Pneumonie verendeter Tiere ($p < 0,001$; χ^2 -Vergleichstest). Bemerkenswerterweise trat ein Temperatureinbruch 4 bis 7 Tage vor dem Tod der Tiere auf (Abb. 7). Dieser Zeitraum korreliert mit Ergebnissen aus Infektionsversuchen mit *A. fumigatus* an drei Wochen alten Putenküken, die die höchste Mortalitätsrate zwischen 3 und 7 Tagen p.i.

zeigten, bei einem mit den Lungenläsionen der Weißstorchnestlinge vergleichbaren morphologischen Bild (Peden und Rhoades 1992; Richard et al. 1984).

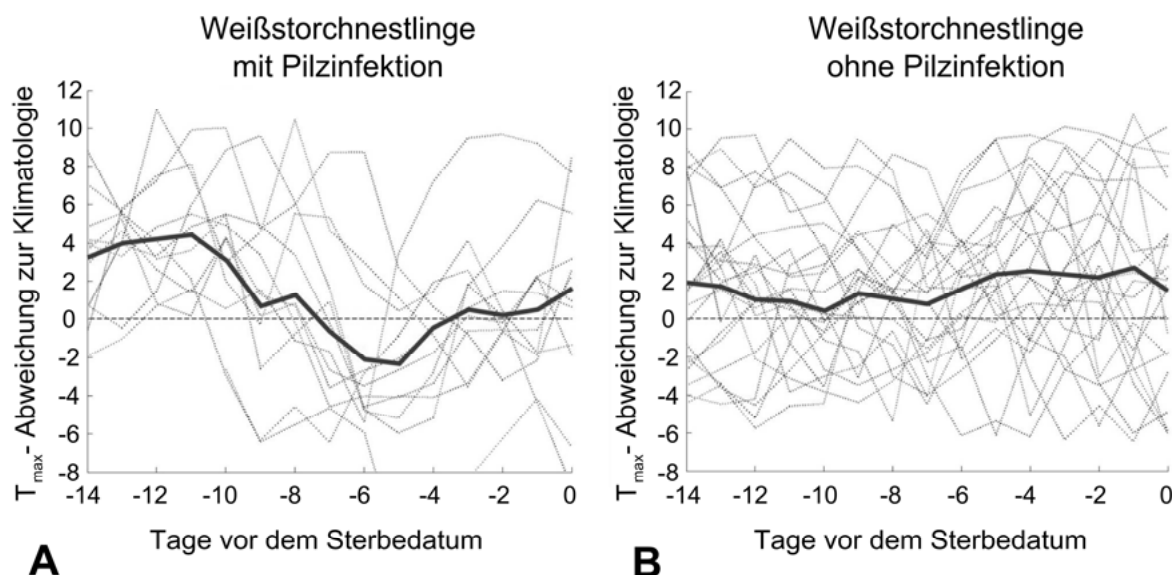


Abb. 7: Klimatologische Auswertung der Tageshöchsttemperatur (T_{\max}) zwischen Horststandorten von Weißstorchnestlingen mit (A) und ohne (B) *A. fumigatus*-Infektion. Im Vergleich zur Gruppe ohne Pilzinfektion ($n=27$) zeigten die Tiere, die an IA (Grad II) durch eine Infektion mit *A. fumigatus* verendet waren ($n=13$), im Mittel einen Abfall der T_{\max} 4 bis 7 Tage von dem Sterbedatum im Vergleich zu einer 10 Jahre umfassenden Klimatologie der entsprechenden kalendrischen Zeiträume. Zur Auswertung wurden jeweils die den Horststandorten nächst gelegenen Wetterstationen in Brandenburg und Mecklenburg-Vorpommern herangezogen. Grafik: T. Kruschke, P. Olias

Zusammengenommen lassen diese ersten Ergebnisse den Schluss zu, dass ein abrupter Temperaturabfall in den ersten drei Wochen der Nestlingsperiode einen wichtigen beeinflussenden Faktor für das Auftreten von mykotischen Pneumonien bei Weißstorchnestlingen darstellen könnte.

Offen bleibt gegenwärtig hingegen noch, welche pathophysiologischen Mechanismen die hohe Empfänglichkeit der Tiere für Schimmelpilzmykosen bedingen. Zum Verständnis der Rolle der Immunabwehr der Nestlinge bei Pilzinfektionen wären Erkenntnisse über die Ontogenie der Immunfunktionen von Weißstorchnestlingen notwendig, die bisher aber erst in Ansätzen für sehr wenige Wildvogelspezies untersucht wurden (Arriero 2009; Palacios et al. 2009; Smits und Bortolotti 2008). Da alle experimentellen Erkenntnisse von domestizierten

Vögeln aus der Kategorie der Nestflüchter (*Precocial Bird Type*) stammen, ist darüberhinaus eine direkte Übertragbarkeit auf Wildvögel wie den Weißstorch (Nesthocker; *Altricial Type Bird*) schwer möglich (Smits und Bortolotti 2008). Gegenwärtig ermöglicht lediglich die Untersuchung einer Reihe von Variablen des Immunsystems wie etwa eine Leukozytenzählung, die Antikörperproduktion gegen spezifische Antigene oder ein Hauttest basierend auf der Reaktion von T-Lymphozyten auf das Phytohämagglutinin eine Evaluation der immunologischen Fitness von Wildvögeln *in vivo* (Fair et al. 1999; Hale und Briskie 2007; Moreno et al. 1998; Svensson et al. 1998; Tella et al. 2001). Einer post mortalen Untersuchung entziehen sich die genannten Methoden, so dass eine Untersuchung dieser Parameter, die zum Teil bereits auch bei Weißstorchnestlingen in anderen Studien Anwendung fanden (Baos et al. 2006; Jovani et al. 2004), in der vorliegenden Arbeit nicht möglich war. Grundsätzlich ist jedoch davon auszugehen, dass Weißstörche sich ihrer ökologischen Nische angepasst haben und zur Gewährleistung des größtmöglichen Reproduktionserfolgs eine Balance zwischen energetischer Investition in das Immunsystem und in die Wachstumsrate des Nachwuchts gefunden haben (Viney et al. 2005). Zahlreiche Störgrößen können hierauf einen negativen Einfluss haben, insbesondere die Stabilität der Immunabwehr beeinflussen und so den erfolgreichen Schutz gegen Pathogene zusammenbrechen lassen (Koutsos und Klasing 2008). Neben den bereits erwähnten negativen klimatischen Einflüssen stellt eine Mangelernährung einen bedeutenden Stressor für das Immunsystem von Vögeln dar (Koutsos und Klasing 2008). Gegenwärtig finden in Deutschland durch den Anbau von Energiepflanzen großstrukturelle, landwirtschaftliche Veränderungen statt (K. Dziwiaty, persönliche Mitteilung), die bei einem Verlust von Dauergrünland zur Nahrungssuche des Weißstorchs über einen Mangel an Nahrung für die Nestlingsaufzucht, einen Einfluss auf die Fitness der Weißstorchpopulation vermuten lassen (Johst et al. 2001). Beispielweise reduzierte sich die Fläche an Dauergrünland in Mecklenburg-Vorpommern zwischen 2003 und 2009 um 6,4% (Anfrage der Bundestagsabgeordneten der Grünen C. Behm an die Bundesregierung; Quelle: www.cornelia-behm.de/cms/default/dok/314/314974.finanzkrise_und_gruenlandverordnungen_br.html, Abrufdatum: 15.04.2010). Der seit 2005 andauernde Rückgang um mehr als 300 Brutpaare (>30%) in dem intensiv agrarwirtschaftlich genutzten Flächenland Mecklenburg-Vorpommern mag in diesem Zusammenhang gesehen werden (Fletcher et al. 2010), bedarf zur Klärung jedoch wissenschaftlicher Erkenntnisse, die gegenwärtig nicht vorliegen. Umfassende modellgestützte Habitatsanalysen könnten hierzu wichtige Erkenntnisse liefern (Jepsen et al. 2005). Die offensichtliche Komplexität ökologischer Zusammenhänge bei der Beurteilung der Bedeutung von Pilzinfektionen auf Veränderungen der Populationsgröße des Weißstorchs in Deutschland impliziert die Notwendigkeit einer multidisziplinären Betrachtungsweise und bietet ein wichtiges Arbeitsfeld zukünftiger Forschung.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Bedeutung der invasiven Aspergillose für die aktuell regional gehäufte Nestlingssterblichkeit deutscher Weißstörche

Philipp Olias

Weißstörche (*Ciconia ciconia*) zählen in Deutschland mit etwa 4.000 Brutpaaren zu den gefährdeten Vogelarten. Seit dem Jahr 2005 kam es in der Ostpopulation zu wiederholten massiven Einbrüchen (regional über 30%) in der Zahl der aus den Überwinterungsgebieten zurückkehrenden Altvögel und im Bruterfolg. Gleichzeitig wurde erstmals über ungewöhnliche Totalverluste ganzer Bruten durch Pilzinfektionen der Atemwege berichtet. Während Pilze als Infektionserreger in der Geflügelwirtschaft und in der Gefangenschaftshaltung von Wildvögeln zu größeren Verlusten führen können, war dagegen über die Bedeutung von Pilzinfektionen bei Wildvogelnestlingen bislang nichts bekannt. An Beispielen wie der Chitridiomykose der Amphibien und des *White-Nose-Syndrome* der Fledermäuse zeigt sich mit welcher Rasanz neu auftretende Pilze als Infektionserreger unvermittelt ganze Wildtierpopulationen in ihrer Existenz bedrohen können. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Identifizierung von Ursachen der Nestlingssterblichkeit unter besonderer Berücksichtigung der Bedeutung von Pilzinfektionen.

In einem Drei-Jahres-Zeitraum zwischen 2007 und 2009 wurden 103 verendete Weißstorchnestlinge histopathologisch untersucht und die Todes- und Erkrankungsursachen festgestellt. Dabei wies insgesamt mit 45,6% eine unerwartet hohe Zahl an Tieren eine mykotische Pneumonie auf. Bei einem großen Prozentsatz der Tiere wurden zudem Traumata als unmittelbare Todesursache identifiziert. Lediglich acht Nestlinge zeigten eine letale bakterielle oder parasitäre Infektion. Interessanterweise waren etwa 95% der Nestlinge mit mykotischer Pneumonie im ersten Drittel ihrer Nestlingszeit verendet. Anhand der Wachstumsmorphologie der aus Lungengewebe isolierten Pilze sowie mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und nachfolgender Sequenzierung der pilzspezifischen *Internal Transcribed Spacer*-Region wurden in allen Fällen Schimmelpilze als Infektionserreger identifiziert. Dabei zeigte sich mit einer Infektionsrate von 60% eine herausragende Bedeutung von *Aspergillus fumigatus* gefolgt von verschiedenen Zygomyzeten-Spezies. Bislang gänzlich unbekannt Pilze konnten nicht identifiziert werden. In einem Fall wurde mit *Thermomyces lanuginosus* ein Pilz bestimmt, der bisher noch nicht als Infektionserreger für den Respirationstrakt bekannt war. Obwohl Aspergillen als Verursacher der sogenannten invasiven Aspergillose des Atmungstrakts von Menschen und Tieren bereits lange bekannt sind, stellt die Diagnostik aufgrund von falsch-positiver Ergebnisse durch Kontamination und Atemwegsbesiedlung immer noch eine große Herausforderung dar. Daher wurde zur Absicherung der hier zunächst über eine konventionelle Anzucht aus infiziertem

Lungengewebe generierten Ergebnisse erstmals ein diagnostisches Verfahren etabliert, das auf der *Laser Capture Microdissection*-Technologie basiert. Mittels pilzspezifischer Fluoreszenzfärbung können damit einzelne histologisch verifizierte intraläsionale Pilzstrukturen durch einen UV-A-Laser steril mikrodissenziert werden und anschließend mittels PCR und nachfolgender Sequenzierung bestimmt werden. Daneben konnte mit dem Verfahren gezeigt werden, dass es sich bei aviären *A. fumigatus*-Infektionen offenbar um polyklonale Infektionen handelt. Basierend auf den bisherigen Untersuchungsergebnissen wurde die Hypothese aufgestellt, dass bestimmte *A. fumigatus*-Stämme aus Weißstorch-Nestlingen eine höhere Prävalenz und Virulenz aufweisen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden mittels *Multilocus Microsatellite Typing*-Verfahren 61 klinische Isolate und Umweltisolate von sechs, teils über vier Jahre wiederholt betroffenen Horststandorten genotypisiert. Im Ergebnis zeigte sich eine große genetische Diversität und entgegen der ursprünglichen Hypothese keine Cluster-Bildung, die Rückschlüsse auf das Vorliegen einer höheren Prävalenz einzelner Stämme an bestimmten Horststandorten zulassen würde. Dagegen konnte das Vorkommen polyklonaler *A. fumigatus*-Infektionen in Vögeln auch mit diesem Verfahren und mittels Multiplex-PCR zum Nachweis beider Kreuzungstypen bestätigt werden. Nachfolgend wurde eine repräsentative Auswahl der genotypisierten Stämme in einem neuen Infektionsmodell auf der Basis embryonierter Hühnereier einer Untersuchung auf ihr Virulenzpotential unterzogen. Die Mehrheit der klinischen Stämme und Umweltstämme zeigte dabei in dem *in-vivo*-Modell eine vergleichbar große Virulenz. Zusammengefasst kann die Hypothese, dass bestimmte *A. fumigatus*-Stämme aus Weißstorch-Nestlingen eine höhere Prävalenz und Virulenz aufweisen, durch die eigenen Daten nicht unterstützt werden. Vielmehr deuten die Ergebnisse daraufhin, dass weitere, bisher unbekannte Faktoren zu der hohen Infektanfälligkeit der Weißstörche im ersten Drittel ihrer Nestlingszeit gegenüber diesen Pilzen beitragen. Daher werden gegenwärtig klimatologische Analysen durchgeführt, um mögliche Umweltstressoren zu identifizieren. Erste Ergebnisse lassen einen Zusammenhang zwischen einem abrupten Temperaturabfall und dem einige Tage späteren Verenden der Vögel durch Pilzinfektionen erkennen. Zukünftige Arbeiten sollten diesen Zusammenhang weiter beleuchten und zur weiteren Klärung des Einflusses von Schimmelpilzinfektionen und anderen Faktoren auf die Stabilität der Weißstorchpopulation ein langfristiges systematisches Monitoringprogramm umfassen.

6 SUMMARY

The Significance of Invasive Aspergillosis in Emerging Regional Chick Mortality of German White Storks

Philipp Olias

In Germany, white storks (*Ciconia ciconia*) count approximately 4,000 breeding pairs and are listed as endangered species. Since 2005, recurrent major declines in homecoming adult storks (regionally >30%) of the Eastern migrating population and in breeding success were monitored. Coincidentally, for the first time exceptional total breeding losses were recorded due to fungal infections of the airways. Although fungi can cause significant losses in poultry industry and in wild birds kept in captivity, no information were available on the relevance of fungal infections in free-ranging wild birds before fledging. Chitridiomycosis of amphibians and white nose syndrome of bats are two timely examples for rapid spread of previously unknown fungal infections causing a precipitous decline of animal populations. The principal aim of this study was, thus, to perform systematic postmortem examinations on white stork chicks to investigate mortality factors and to assess the role of fungi as potential causative agents.

One hundred and three deceased white stork chicks were necropsied during a three year period (2007-2009) and causes of mortality and morbidity identified by histopathology. Unexpectedly, 45.6% of the animals had fungal pneumonia. Trauma also constituted a significant percentage of direct mortality factors. Only eight chicks had a lethal bacterial or parasitic infection. Interestingly, about 95% of the chicks with fungal pneumonia died in the first third of their nestling period. In all cases molds were isolated from lung tissue and identified by morphology and polymerase chain reaction (PCR) and subsequent sequencing of the fungal internal transcribed spacer region. *Aspergillus fumigatus* was identified as primary causative agent in 60% of the cases followed by several zygomycetes. No previously unknown fungi were identified. In one chick, *Thermomyces lanuginosus*, previously unknown to cause respiratory infection, was identified. Accurate species diagnosis of *Aspergillus* spp. in invasive aspergillosis (IA), although long known as respiratory disease of animals and man, is still challenging due to environmental contamination and colonization resulting in false-positive results. Therefore, results of this study achieved by conventional culturing were verified by a newly established diagnostic method based on laser capture microdissection technology. Intralésional specific fluorescence-stained single fungal structures which has been identified by histopathology can thus be aseptically microdissected with a UVA laser system. Fungal species identification is then achieved by PCR and subsequent sequencing. Furthermore, it could be demonstrated by this technique that polyclonal infections of *A. fumigatus* in birds may occur regularly. Based on the previous results it was hypothesized that

certain *A. fumigatus* strains with a higher prevalence and virulence do occur in white stork chicks. To test this hypothesis, genomic fingerprinting was performed by multilocus microsatellite typing of 61 clinical and environmental isolates from six different nesting sites in part with subsequent IA outbreaks over a period of four years. The results show a very high genetic diversity and in contrast to the hypothesis no cluster enriched for certain genotypes at the nesting sites. However, previous results suggesting polyclonal infections of *A. fumigatus* in birds could be confirmed by this method and were additionally verified by a multiplex PCR that identified both fungal mating types in each bird. Based on the typing results, the virulence potential of selected strains was subsequently assessed in a novel infection model using embryonated chicken eggs. The majority of strains thereby showed no differences in virulence in the *in vivo* model, independent of their origin. In summary, the overall data did not support the initial hypothesis that certain *A. fumigatus* strains with a higher prevalence and virulence do occur in white stork chicks. Instead, the results of this study support the concept that other currently unknown factors may predispose white storks for fungal infections in the first third of their nestling period. In this concept, we are currently analysing the influence of climate as potential environmental stressor. Initial results have shown an apparent correlation between an abrupt temperature decline and the death of chicks by fungal infections a few days later. Future studies will have to further address this correlation and the influence of fungal infections and other factors on the stability of white stork population in a systematic long term monitoring program.

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

	Seite
Abb. 1: Populationsdynamik ostziehender Weißstörche in Deutschland	4
Abb. 2: Todesursachen adulter und subadulter Weißstörche aus Brandenburg der Jahre 1998 bis 2007	7
Abb. 3: Morphologie von einem Konidiophor von <i>Aspergillus fumigatus</i>	16
Abb. 4: Deutschlandkarte mit Horststandorten der untersuchten Nestlinge und Markierung der Zugscheide zwischen ost- und westziehender Population	20
Abb. 5: Alignment der ITS1-Sequenz mikrodisezierter <i>A. fumigatus</i> -Hyphen	24
Abb. 6: LCM von Blankophor [®] -markierten Pilzhyphen	30
Abb. 7: Klimatologische Auswertung der T _{max} zwischen Horststandorten von Weißstorchnestlingen mit und ohne <i>A. fumigatus</i> -Infektion	37

8 AUSFÜHRLICHE DARSTELLUNG DER UNTERSUCHUNGEN

	Seite
8.1 Publikation 1	45
Fungal pneumonia as a major cause of mortality of white stork (<i>Ciconia ciconia</i>) chicks	
8.2 Publikation 2	50
Fungal species identification from avian lung specimens by single hypha laser microdissection and PCR product sequencing	
8.3 Publikation 3	56
Molecular epidemiology and virulence assessment of <i>Aspergillus fumigatus</i> isolates from white stork chicks and their environment	

**Fungal pneumonia as a major cause of mortality of white stork
(*Ciconia ciconia*) chicks**

Autoren: Olias P, Gruber AD, Böhmer W, Hafez HM, Lierz M

Jahr: 2010

Zeitschrift: Avian Diseases 54:94-98.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1637/9088-092509-Reg.1>

Fungal species identification from avian lung specimens by single hypha laser microdissection and PCR product sequencing

Autoren: Olias P, Jacobsen ID, Gruber AD

Jahr: 2011

Zeitschrift: Medical Mycology 49:56-61

DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/13693786.2010.497172>

Molecular epidemiology and virulence assessment of *Aspergillus fumigatus* isolates from white stork chicks and their environment

Autoren: Olias P, Gruber AD, Hafez HM, Lierz M, Slesiona S, Brock M,
Jacobsen ID

Jahr: 2011

Zeitschrift: Veterinary Microbiology

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.08.029>

9 TABELLEN

Tab. 1: Übersicht über die Weißstorchpopulation in Deutschland zwischen 1934 und 2009

	BL	Jahr																								
		1934	1958	1974	1984	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Hpa	BB	1527	771	872	933	944	936	887	971	1231	1270	1260	1354	1127	1316	1357	1405	1372	1369	1318	1409	1181	1219	1238	1296	1193
	MV	2604	1141	1401	1144	1053	1065	1000	1016	1151	1237	1146	1223	1016	1188	1157	1177	1143	1091	1065	1142	834	877	848	863	770
	SA	470	313	382	352	357	390	377	393	475	519	517	583	485	549	554	574	563	539	522	572	485	508	511	542	528
	SH	1748	953	492	251	210	220	185	192	221	226	217	228	196	240	231	249	213	207	215	238	170	200	209	229	204
	JZa	BB	-	-	-	-	-	1,7	1,6	1,9	1,4	2,4	1,7	1,9	1,3	2,4	2,3	2	2,1	2	1,7	2,3	1,3	2,2	2,1	2,1
	MV	-	-	-	-	-	1,9	1,1	1,5	1,8	2,1	1,7	1,8	1,3	2,3	2,2	1,9	2,1	1,8	1,6	2,1	1,3	2	2	2	1,5
	SA	-	-	-	-	-	2	1,5	1,7	1,8	2,3	2,2	1,9	1,3	2,2	2,1	2,1	1,9	1,9	1,8	2,3	1,5	2,3	2	2,2	1,7
	SH	-	-	-	-	-	1,7	0,6	1,1	2,3	1,6	1,4	2	1,2	2	2,1	1,4	1,4	1,4	1,5	2,1	1,2	1,9	1,8	1,3	1,2

Hpa = Horstpaare; JZa = Jungenzahl pro Hpa; BL = Bundesland; BB = Brandenburg; MV = Mecklenburg-Vorpommern; SA = Sachsen-Anhalt; SH = Schleswig-Holstein. (Quellen: Kaatz 2008; C. Katz, B. Ludwig, K.-M. Thomsen, persönliche Kommunikation)

Tab. 2: Übersicht über die zur Untersuchung gelangten Weißstorchnestlinge

Nr.	ID-Nr./Jahr	Todesursache	Mykotische Pneumonie	Grad ¹	Pilzspezies	Bundesland ²	Horststandort	Gewicht [g]
1	C08604/2008	Mykotische Pneumonie	Ja	II	<i>A. fumigatus, R. microsporus</i>	BB	Vetschau	372
2	C09509/2009	Mykotische Pneumonie	Ja	II	<i>A. fumigatus</i>	BB	Vetschau	220
3	C09510/2009	Mykotische Pneumonie	Ja	II	<i>A. fumigatus</i>	BB	Vetschau	126
4	C08606/2008	Trauma: unter Horst	Ja	II	Unbestimmt	BB	Babow	621
5	C07804/2007	Trauma: unter Horst	Nein			BB	Babow	665
6	C08605/2008	Trauma: unter Horst	Nein			BB	Kolkwitz	672
7	C08610/2008	Infantizid	Ja	II	<i>A. fumigatus, R. microsporus</i>	BB	Forst	256
8	C08611/2008	Trauma: unter Horst	Ja	II	<i>A. fumigatus, L. corymbifera</i>	BB	Forst	245
9	C08609/2008	Trauma: unter Horst	Nein			BB	Nauendorf	477
10	C08622/2008	Trauma: unter Horst	Nein			BB	Nauendorf	931
11	C07805/2007	Trauma: unter Horst	Ja	II	<i>R. microsporus</i>	BB	Naundorf	753
12	C07907/2007	Mykotische Pneumonie	Ja	II	<i>A. fumigatus</i>	BB	Lübbenau	632
13	C08663/2008	Bakterielle Septikämie	Ja	I	Unbestimmt	BB	Stradow	562
14	C08624/2008	Trauma: unter Horst	Nein			BB	Freienhufen	627
15	C07735/2007	Unbekannt	Nein			BB	Brieske Dorf	278
16	C07831/2007	Infantizid	Ja	II	<i>R. oryzae, R. pusillus</i>	BB	Tettau	1490
17	C07905/2007	Mykotische Pneumonie	Ja	II	<i>L. corymbifera, R. microsporus</i>	BB	Schraden	721
18	C07906/2007	Mykotische Pneumonie	Ja	II	<i>A. fumigatus, R. oryzae</i>	BB	Schraden	783
19	C08626/2008	Drüsenmagentilatation	Nein			BB	Gröbitz	819
20	C07863/2007	Mykotische Pneumonie	Ja	II	<i>A. fumigatus</i>	BB	Malitschkendorf	664
21	C08666/2008	Mykotische Pneumonie	Ja	II	<i>A. fumigatus</i>	BB	Reichwalde	363

Noch Tab. 2

Nr.	ID-Nr./Jahr	Todesursache	Mykotische Pneumonie	Grad ¹	Pilzspezies	Bundesland ²	Horststandort	Gewicht [g]
22	C08667/2008	Mykotische Pneumonie	Ja	II	<i>A. fumigatus</i>	BB	Reichwalde	160
23	C08665/2008	Trauma: unter Horst	Nein			BB	Golßen	422
24	C08623/2008	Trauma: unter Horst	Ja	I	<i>L. corymbifera</i>	BB	Mittenwalde	934
25	C08655/2008	Trauma: unter Horst	Ja	II	<i>C. globosum</i>	BB	Baitz	451
26	C08681/2008	Bakterielle Septikämie	Ja	I	Unbestimmt	BB	Möthlow	2390
27	C08682/2008	Bindegarn	Ja	II	<i>A. fumigatus, R. oryzae</i>	BB	Rathenow	1850
28	C08657/2008	Mykotische Pneumonie	Ja	II	<i>A. fumigatus</i>	BB	Grütz	175
29	C07751/2007	Unbekannt	Nein			BB	Parey	54
30	C07752/2007	Unbekannt	Nein			BB	Parey	52
31	C07756/2007	Trauma: unter Horst	Nein			BB	Linum	633
32	C08677/2008	Euthanasie	Nein			BB	Linum	1015
33	C07794/2007	Mykotische Pneumonie	Ja	II	<i>A. fumigatus</i>	BB	Streckenthin	630
34	C08653/2008	Trauma: unter Horst	Nein			BB	Rühstädt	335
35	C07828/2007	Trauma: unter Horst	Nein			BB	Hülsebeck	956
36	C08652/2008	Mykotische Pneumonie	Ja	II	<i>Penicillium</i> spp.	BB	Meyenburg	684
37	C08654/2008	Mykotische Pneumonie	Ja	II	<i>A. fumigatus</i>	BB	Meyenburg	326
38	C07909/2007	Mykotische Pneumonie	Ja	II	<i>L. corymbifera</i>	BB	Zehdenick	1070
39	C071261/2007	Trauma: unter Horst	Ja	II	<i>A. fumigatus</i>	BB	Zehdenick	980
40	C07908/2007	Unbekannt	Nein			BB	Zehdenick	1187
41	C071018/2007	Trauma: Horstbruch	Nein			BB	Zerpenschleuse	2640
42	C071019/2007	Trauma: Horstbruch	Nein			BB	Zerpenschleuse	2740

Noch Tab. 2

Nr.	ID-Nr./Jahr	Todesursache	Mykotische Pneumonie	Grad ¹	Pilzspezies	Bundesland ²	Horststandort	Gewicht [g]
43	C071020/2007	Trauma: Horstbruch	Nein			BB	Zerpenschleuse	3020
44	C08651/2008	Mykotische Pneumonie	Ja	II	<i>T. lanuginosus</i>	BB	Schönefeld	757
45	C08612/2008	Mykotische Pneumonie	Ja	II	<i>A. fumigatus, L. corymbifera</i>	BB	Löhme	311
46	C08613/2008	Mykotische Pneumonie	Ja	II	<i>R. microsporus</i>	BB	Löhme	114
47	C07912/2007	Trauma: Horstbruch	Nein			BB	Güsterbieser Loose	3340
48	C07802/2007	Trauma: Horstbruch	Ja	I	<i>A. fumigatus</i>	MV	Zierzow	687
49	C07803/2007	Trauma: Horstbruch	Ja	I	<i>A. fumigatus</i>	MV	Zierzow	544
50	C07829/2007	Trauma: unter Horst	Ja	II	<i>L. corymbifera</i>	MV	Vorderhagen	1250
51	C08689/2008	Unbekannt	Nein			MV	Unbekannt	755
52	C07861/2007	Trauma: unter Horst	Ja	I	<i>A. fumigatus</i>	MV	Pogreß	2040
53	C07910/2007	Unbekannt	Nein			MV	Dreitützow	2100
54	C07911/2007	Unbekannt	Nein			MV	Neuhof / Zarrentin	2520
55	C07860/2007	Unbekannt	Nein			MV	Stralendorf	1900
56	C08664/2008	<i>Alaria alata</i>	Nein			MV	Ziesendorf	1066
57	C08668/2008	<i>Alaria alata</i>	Nein			MV	Ziesendorf	1361
58	C08669/2008	<i>Alaria alata</i>	Nein			MV	Ziesendorf	1260
59	C07839/2007	Trauma: unter Horst	Nein			SH	Eckhorst	62
60	C071228/2007	Trauma: unter Horst	Nein			SH	Süderstapel	38
61	C071229/2007	Trauma: unter Horst	Nein			SH	Süderstapel	204
62	C071230/2007	Trauma: unter Horst	Nein			SH	Süderstapel	351
63	C071080/2007	Unbekannt	Ja	I	<i>M. circinelloides</i>	SH	Schlichting	1180

Noch Tab. 2

Nr.	ID-Nr./Jahr	Todesursache	Mykotische Pneumonie	Grad ¹	Pilzspezies	Bundesland ²	Horststandort	Gewicht [g]
64	C07832/2007	Trauma: unter Horst	Nein			SH	Hollingstedt	150
65	C081249/2008	Trauma: unter Horst	Ja	I	Unbestimmt	SH	Seeth	200
66	C081246/2008	Unbekannt	Nein			SH	Wohle	793
67	C081247/2008	Trauma: unter Horst	Ja	I	<i>M. circinelloides</i>	SH	Ostenfeld	1057
68	C081250/2008	Trauma: unter Horst	Ja	I	<i>L. corymbifera</i>	SH	Winnert	310
69	C071227/2007	Unbekannt	Nein			SH	Rantrum	73
70	C081248/2008	Trauma: unter Horst	Ja	I	Unbestimmt	SH	Rantrum	276
71	C081251/2008	Mykotische Pneumonie	Ja	II	<i>A. fumigatus</i>	SH	Stadum	448
72	C08680/2008	Trauma: unter Horst	Nein			SA	Schwarzholz	1800
73	C08684/2008	Unbekannt	Nein			SA	Beelitz	361
74	C08687/2008	Trauma: unter Horst	Ja	II	<i>A. fumigatus</i>	SA	Schollene	540
75	C08679/2008	Trauma: unter Horst	Ja	I	<i>L. corymbifera</i>	SA	Kade	1377
76	C08678/2008	Trauma: unter Horst	Nein			SA	Güsen	1092
77	C08676/2008	Trauma: unter Horst	Nein			SA	Rosian	582
78	C08675/2008	Bakterielle Bronchopneumonie	Nein			SA	Unseburg	363
79	C08674/2008	Trauma: unter Horst	Nein			SA	Rade	818
80	C08673/2008	Trauma: unter Horst	Nein			SA	Löben	1010
81	C07862/2007	Trauma: unter Horst	Nein			NDS	Leiferde	352
82	C08659/2008	Mykotische Pneumonie	Ja	II	<i>A. fumigatus</i>	NDS	Ebergötzen	1330
83	C08660/2008	Fremdkörper	Nein			NDS	Ebergötzen	1900
84	C08661/2008	Unbekannt	Nein			NDS	Ebergötzen	1335

Noch Tab. 2

Nr.	ID-Nr./Jahr	Todesursache	Mykotische Pneumonie	Grad ¹	Pilzspezies	Bundesland ²	Horststandort	Gewicht [g]
85	C07152/2007	Unbekannt	Nein			NRW	Schlüsselburg	2500
86	C07153/2007	Unbekannt	Nein			NRW	Schlüsselburg	2240
87	C07154/2007	Unbekannt	Nein			NRW	Schlüsselburg	1240
88	C081081/2008	Trauma: unter Horst	Nein			HE	Unbekannt	890
89	C08607/2008	Bakterielle Bronchopneumonie	Nein			RP	Kapsweyer	1498
90	C08608/2008	Fremdkörper	Ja	I	<i>A. fumigatus</i>	RP	Minfeld	1471
91	C07793/2007	Bakterielle Septikämie	Nein			RP	Jockgrim	2440
92	C07792/2007	Fremdkörper	Nein			RP	Wörth am Rhein	2440
93	C07727/2007	Mykotische Pneumonie	Ja	II	Unbestimmt	BW	Mannheim	604
94	C07728/2007	Mykotische Pneumonie	Ja	II	Unbestimmt	BW	Mannheim	810
95	C07729/2007	Fremdkörper	Nein			BW	Mannheim	154
96	C08937/2008	Unbekannt	Nein			BW	Unbekannt	530
97	C08627/2008	Drüsenmagentilatation	Nein			BW	Beizhofen	1116
98	C08634/2008	Unbekannt	Nein			BW	Ostrach / Wangen	1369
99	C08625/2008	Drüsenmagentilatation	Ja	I	<i>A. fumigatus</i>	BW	Königssegwald	508
100	C08662/2008	Unbekannt	Nein			BY	Wittilingen	102
101	C08683/2008	Trauma: unter Horst	Nein			BY	Ühlfeld	1446
102	C08632/2008	Mykotische Pneumonie	Ja	II	<i>R. microsporus</i>	BY	Frauenaurach	583
103	C08633/2008	Mykotische Pneumonie	Ja	II	<i>A. fumigatus</i>	BY	Frauenaurach	458

¹Gradeinteilung der Pneumonie siehe Punkt 3.1. ²Bundesländer: BB: Brandenburg; MV: Mecklenburg-Vorpommern; SH: Schleswig-Holstein; SA: Sachsen-Anhalt; NDS: Niedersachsen; NRW: Nordrhein-Westfalen; HE: Hessen; RP: Rheinland-Pfalz; BW: Baden-Württemberg; BY: Bayern.

10 LITERATURNACHWEIS

- Aimanianda V, Bayry J, Bozza S, Knemeyer O, Perruccio K, Elluru SR et al. (2009) Nature 460:1117-1121.
- Ainsworth GC und Austwick PK (1973) Fungal diseases of animals. Commonwealth Agricultural Bureaux, Slough, United Kingdom
- Alvarez-Perez S, Blanco JL, Alba P, Garcia ME (2010) Mating type and invasiveness are significantly associated in *Aspergillus fumigatus*. Med Mycol 48:273-277.
- Alvarez-Perez S, Mateos A, Dominguez L, Martinez-Nevaldo E, Blanco JL, Garcia ME (2010) Polyclonal *Aspergillus fumigatus* infection in captive penguins. Vet Microbiol doi:10.1016/j.vetmic.2010.02.026:ePub ahead of print.
- Anastasi A, Varese GC, Filipello Marchisio V (2005) Isolation and identification of fungal communities in compost and vermicompost. Mycologia 97:33-44.
- Anderson MJ, Gull K, Denning DW (1996) Molecular typing by random amplification of polymorphic DNA and M13 Southern hybridization of related paired isolates of *Aspergillus fumigatus*. J Clin Microbiol 34:87-93.
- Andrzejewska I, Dolata PT, Jerzak L, Ptaszyk J, Tryjanowski P, Zduniak P (2004a) Prevalence of agglutinating antibodies against *Listeria monocytogenes* in chicks of the white stork (*Ciconia ciconia* Linnaeus, 1758) in Poland. Eur J Wildl Res 50:218-220.
- Andrzejewska I, Tryjanowski P, Zduniak P, Dolata PT, Ptaszyk J, Cwiertnia P (2004b) *Toxoplasma gondii* antibodies in the white stork *Ciconia ciconia*. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 117:274-275.
- Anonymous (2005a) Meister Adebar hat Nachwuchssorgen. In: Potsdamer Neueste Nachrichten, Potsdam, 30.07.2005
- Anonymous (2005b) Tote Storchenbabys - Auf der Suche nach dem "Giftmörder". In: Süddeutsche Zeitung, München, 08.06.2005
- Apinis AE und Pugh GJ (1967) Thermophilous fungi of birds' nests. Mycopathologia 33:1-9.
- Araujo R und Rodrigues AG (2004) Variability of germinative potential among pathogenic species of *Aspergillus*. J Clin Microbiol 42:4335-4337.
- Arriero E (2009) Rearing environment effects on immune defence in blue tit *Cyanistes caeruleus* nestlings. Oecologia 159:697-704.
- Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F et al. (2002) Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. Clin Infect Dis 34:7-14.
- Askew DS (2008) *Aspergillus fumigatus*: virulence genes in a street-smart mold. Curr Opin Microbiol 11:331-337.

- Aufauvre-Brown A, Brown JS, Holden DW (1998) Comparison of virulence between clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Europ J Clin Microbiol Infect Dis* 17:778-780.
- Bairlein F (1991) Population studies of white storks (*Ciconia ciconia*) in Europe. In: Perrins CM, Lebreton JD, Hirons GJ (Hrsg.) *Bird Population Studies*. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 207-229.
- Bakonyi T, Ivanics E, Erdélyi K, Ursu K, Ferenczi E, Weissenböck H et al. (2006) Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerg Infect Dis* 12:618-623.
- Balajee SA, de Valk HA, Lasker BA, Meis JF, Klaassen CH (2008) Utility of a microsatellite assay for identifying clonally related outbreak isolates of *Aspergillus fumigatus*. *J Microbiol Methods* 73:252-256.
- Baos R, Jovani R, Forero MG, Tella JL, Gómez G, Jiménez B et al. (2006) Relationships between T-cell-mediated immune response and Pb, Zn, Cu, Cd, and as concentrations in blood of nestling white storks (*Ciconia ciconia*) and black kites (*Milvus migrans*) from Doñana (southwestern Spain) after the Aznalcóllar toxic spill. *Environ Toxicol Chem* 25:1153-1159.
- Bardana EJ und Silva-Hutner M (1980) The clinical spectrum of aspergillosis - part 1: epidemiology, pathogenicity, infection in animals and immunology of *Aspergillus*. *Crit Rev Clin Lab Sci* 13:21-83.
- Barden ES, Chute HL, O'Meara DC, Wheelwright HT (1971) A bibliography of avian mycosis (partially annotated). Dept of Animal and Veterinary Sciences, University of Maine at Orono, Maine.
- Bart-Delabesse E, Cordonnier C, Bretagne S (1999) Usefulness of genotyping with microsatellite markers to investigate hospital-acquired invasive aspergillosis. *J Hosp Infect* 42:321-327.
- Bart-Delabesse E, Humbert JF, Delabesse E, Bretagne S (1998) Microsatellite markers for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Clin Microbiol* 36:2413-2418.
- Bauer K und Glutz von Blotzheim UN (1966): *Ciconia ciconia* (Linné 1758) - Weißstorch. In: *Handbuch der Vögel Mitteleuropas*, Bd. 1, Gaviiformes - Phoenicopteriformes. Akademische Verlagsgesellschaft, Wiesbaden, 388-415.
- Bauer HG, Bezzel, E, Fiedler W (2005) *Nonpasseriformes - Nichtsperlingsvögel*. Aula-Verlag, Wiebelsheim.
- Becker MH, Brucker RM, Schwantes CR, Harris RN, Minbirole KP (2009) The bacterially produced metabolite violacein is associated with survival of amphibians infected with a lethal fungus. *Appl Environ Microbiol* 75:6635-6638.
- Beffa T, Staib F, Lott Fischer J, Lyon PF, Gumowski P, Marfenina OE et al. (1998) Mycological control and surveillance of biological waste and compost. *Med Mycol* 36 Suppl 1:137-145.

- Berger L, Speare R, Daszak P, Green DE, Cunningham AA, Goggin CL et al. (1998) Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9031-9031.
- Berger L, Speare R, Hines HB, Marantelli G, Hyatt AD, McDonald KR et al. (2004) Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis. *Aust Vet J* 82:434-439.
- Bert E und Lorenzi MC (1999) The influence of weather conditions on the reproductive success of the white stork (*Ciconia ciconia*) in Piedmont/Italy. *Weißstorch im Aufwind*:437-442.
- Berthold P, vd Bossche W, Jakubiec Z, Kaatz C, Kaatz M, Querner U (2002) Long-term satellite tracking sheds light upon variable migration strategies of white storks (*Ciconia ciconia*). *J Ornithol* 143:489-493.
- Bertout S, Renaud F, Barton R, Symoens F, Burnod J, Piens MA et al. (2001) Genetic polymorphism of *Aspergillus fumigatus* in clinical samples from patients with invasive aspergillosis: investigation using multiple typing methods. *J Clin Microbiol* 39:1731-1737.
- Birch M, Anderson MJ, Denning DW (1995a) Molecular typing of *Aspergillus species*. *J Hosp Infect* 30:339-351.
- Birch M, Nolard N, Shankland GS, Denning DW (1995b) DNA typing of epidemiologically-related isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Epidemiology and infection* 114:161-168.
- Blanco JL, Garcia ME (2008) Immune response to fungal infections. *Vet Immunol Immunopathol* 125:47-70.
- Blehert DS, Hicks AC, Behr M, Meteyer CU, Berlowski-Zier BM, Buckles EL et al. (2009) Bat white-nose syndrome: an emerging fungal pathogen? *Science* 323:227.
- Bodey GP und Vartivarian S (1989) Aspergillosis. *Europ J Clin Microbiol Infect Dis* 8:413-437.
- Bosselmann HG (1972) Die Belastung mit Salmonellen als mögliche Ursache des Bestandsrückganges beim Weißstorch in Niedersachsen. *Dissertationsschrift, Freie Universität Berlin*.
- Both C, Bouwhuis S, Lessells CM, Visser ME (2006) Climate change and population declines in a long-distance migratory bird. *Nature* 441:81-83.
- Boujon P, Henzi M, Penseyres JH, Belloy L (2005) Enterotoxaemia involving β 2-toxigenic *Clostridium perfringens* in a white stork (*Ciconia ciconia*). *Vet Rec* 156:746-747.
- Brault AC, Huang CY, Langevin SA, Kinney RM, Bowen RA, Ramey WN et al. (2007) A single positively selected West Nile viral mutation confers increased virogenesis in American crows. *Nat Genet* 39:1162-1166.
- Brock M (2009) Fungal metabolism in host niches. *Curr Opin Microbiol* 12:371-376.

- Büthe A, Heidmann WA, Peterat B, Ternes W (1989) Schadstoffbelastung des Weißstorchs *Ciconia ciconia* durch Schwermetalle, persistente Pestizide und Industriechemikalien. In: White Stork. Proc 1st Int Stork Cons Symp. Schriftenreihe DDA, Vol 10, Seiten 415-422.
- Camin AM, Chabasse D, Guiguen C (1998) Keratinophilic fungi associated with starlings *Sturnus vulgaris* in Brittany, France. Mycopathologia 143:9-12.
- Capilla J, Clemons KV, Stevens DA (2007) Animal models: an important tool in mycology. Med Mycol 45:657-684.
- Carrascal LM, Bautista LM, Lázaro E (1993) Geographical variation in the density of the white stork *Ciconia ciconia* in Spain: Influence of habitat structure and climate. Biol Conserv 65:83-87.
- Casadevall A (2005) Fungal virulence, vertebrate endothermy, and dinosaur extinction: is there a connection? Fungal Genet Biol 42:98-106.
- Chandrasekar P (2009) Invasive mold infections: recent advances in management approaches. Leuk Lymphoma 50:703-715.
- Chazalet V, Debeaupuis JP, Sarfati J, Lortholary J, Ribaud P, Shah P et al. (1998) Molecular typing of environmental and patient isolates of *Aspergillus fumigatus* from various hospital settings. J Clin Microbiol 36:1494-1500.
- Chute HL, Barden E (1964) The fungous flora of chick hatcheries. Avian Dis 8:13-19.
- Clark TA, Hajjeh RA (2002) Recent trends in the epidemiology of invasive mycoses. Curr Opin Infect Dis 15:569-574.
- Clayton DH, Moore J (1997) Host-parasite evolution. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
- Clemons KV, Stevens DA (2005) The contribution of animal models of aspergillosis to understanding pathogenesis, therapy and virulence. Med Mycol 43 Suppl 1:S101-110.
- Conrad B (1977) Die Giftbelastung der Vogelwelt Deutschlands. Kilda-Verlag, Greven.
- Converse KA (2007) Aspergillosis. In: Thomas NJ, Hunter DB, Atkinson CT (Hrsg.) Infectious diseases of wild birds. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA, 360-374.
- Creutz G (1988) Der Weißstorch: *Ciconia ciconia*. A. Ziemsen Verlag, Wittenberg.
- Dagenais TR und Keller NP (2009) Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. Clin Microbiol Rev 22:447-465.
- Dallinga JH und Schoenmakers S (1989) Population changes of the white stork since the 1850s in relation to food resources. In: White Stork. Proc 1st Int Stork Cons Symp. Schriftenreihe DDA, Vol 10, Seiten 231-262.
- Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD (2000) Emerging infectious diseases of wildlife—threats to biodiversity and human health. Science 287:443-449.
- de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ (2009) Atlas of clinical fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, CD-ROM.

- de Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T et al. (2008) Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 46:1813-1821.
- de Valk HA, Meis JF, Bretagne S, Costa JM, Lasker BA, Balajee SA et al. (2009) Interlaboratory reproducibility of a microsatellite-based typing assay for *Aspergillus fumigatus* through the use of allelic ladders: proof of concept. *Clin Microbiol Infect* 15:180-187.
- de Valk HA, Meis JF, Curfs IM, Muehlethaler K, Mouton JW, Klaassen CH (2005) Use of a novel panel of nine short tandem repeats for exact and high-resolution fingerprinting of *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Clin Microbiol* 43:4112-4120.
- de Valk HA, Meis JF, de Pauw BE, Donnelly PJ, Klaassen CH (2007a) Comparison of two highly discriminatory molecular fingerprinting assays for analysis of multiple *Aspergillus fumigatus* isolates from patients with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 45:1415-1419.
- de Valk HA, Meis JF, Klaassen CH (2007b) Microsatellite based typing of *Aspergillus fumigatus*: strengths, pitfalls and solutions. *J Microbiol Methods* 69:268-272.
- Debeaupuis JP, Sarfati J, Chazalet V, Latge JP (1997) Genetic diversity among clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 65:3080-3085.
- Denac D (2006) Resource-dependent weather effect in the reproduction of the white stork *Ciconia ciconia*. *Ardea* 94:233-240.
- Denning DW (1998) Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 26:781-803.
- Denning DW, Clemons KV, Hanson LH, Stevens DA (1990) Restriction endonuclease analysis of total cellular DNA of *Aspergillus Fumigatus* isolates of geographically and epidemiologically diverse origin. *J Infect Dis* 162:1151-1158.
- Droual R, Bickford AA, Walker RL, Channing SE, McFadden C (1991) Favus in a backyard flock of game chickens. *Avian Dis* 35:625-630.
- Dyar PM, Fletcher OJ, Page RK (1984) Aspergillosis in turkeys associated with use of contaminated litter. *Avian Dis* 28:250-255.
- Eckman MK und Morgan-Jones G (1979) Fungus species isolated from commercial hatcheries in Alabama. *Avian Dis* 23:204-208.
- Espina V, Wulfkuhle JD, Calvert VS, VanMeter A, Zhou W, Coukos G et al. (2006) Laser-capture microdissection. *Nat Protocols* 1:586-603.
- Ezerskene EP, Archipova TV, Bakasenas VL, Jeziorskiene E, Archipova T (1987) Results of investigations of the natural foci of tularaemia in the Lithuanian SSR. *Acta Parasitologica Lithuanica* 22:18-24.

- Fabian L, Boros G, Janisch M (1979) Verluste durch Egelbefall bei Weißstörchen (*Ciconia ciconia*) im Zoo Budapest. In: Verhandlungsbericht XXI. Symp Erkrank Zoo. Mulhouse, Frankreich, Seiten 253-255.
- Fair JM, Hansen ES, Ricklefs RE (1999) Growth, developmental stability and immune response in juvenile Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). Proc Biol Sci 266:1735-1742.
- Fairbrother A, Smits J, Grasman K (2004) Avian Immunotoxicology. J Toxicol Environ Health Part B 7:105-137.
- Falvey DG und Streifel AJ (2007) Ten-year air sample analysis of *Aspergillus* prevalence in a university hospital. J Hosp Infect 67:35-41.
- Fedde MR (1998) Relationship of structure and function of the avian respiratory system to disease susceptibility. Poult Sci 77:1130-1138.
- Ficken MD, Edwards JF, Lay JC (1986) Induction, collection, and partial characterization of induced respiratory macrophages of the turkey. Avian Dis 30:766-771.
- Fiedler G und Wissner A (1980) Freileitungen als tödliche Gefahr für Störche *Ciconia ciconia*. Ökol Vögel 2:59-109.
- Fleming RV, Walsh TJ, Anaissie EJ (2002) Emerging and less common fungal pathogens. Infect Dis Clin North Am 16:915-933.
- Fletcher RJ, Robertson BA, Evans J, Doran PJ, Alavalapati JRR, Schemske DW (2010) Biodiversity conservation in the era of biofuels: risks and opportunities. Frontiers in Ecol Environ doi: 10.1890/090091:ePub ahead of print.
- Fonseca E und Mendoza L (1984) Favus in a fighting cock caused by *Microsporium gallinae*. Avian Dis 28:737-741.
- Frank C (1976) *Syngamus trachea* as cause of natural occurring helminthiasis in young storks. Angew Parasitol 17:99-100.
- Frick WF, Pollock JF, Hicks AC, Langwig KE, Reynolds DS, Turner GG et al. (2010) An emerging disease causes regional population collapse of a common North American bat species. Science 329:679-82.
- Fulton RM, Reed WM, de Nicola DB (1990) Light microscopic and ultrastructural characterization of cells recovered by respiratory-tract lavage of 2- and 6-week-old chickens. Avian Dis 34:87-98.
- Gams W (1987) CBS course of mycology. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
- Garrido JR und Fernández-Cruz M (2003) Effects of power lines on a white stork *Ciconia ciconia* population in central Spain. Ardeola 50:191-200.
- Gerlach H (1981) Listerien bei Weißstörchen (*Ciconia ciconia*). In: Tagungsberichte, Vol. 2, München, Seiten 21-24.

- Gomex-Villamandos JC, Hervas J, Salguero FJ, Quevedo MA, Aguilar JM, Mozos E (1998) Haemorrhagic enteritis associated with herpesvirus in storks. *Avian Pathol* 27:229-236.
- Goodley JM, Clayton YM, Hay RJ (1994) Environmental sampling for aspergilli during building construction on a hospital site. *J Hosp Infect* 26:27-35.
- Grishchenko V (2010) Monitoring of the white stork (*Ciconia ciconia*) number dynamics in Ukraine in 1994-2009. In: Bermejo A (Hrsg.) Conf Europ Bird Census Council, Vol. 18. SEO/Birdlife, Cáceres, Spanien.
- Grunberg W und Kutzer E (1964) Die Pathologie verschiedener Trematodeninfektionen bei Storchen (*Ciconia Ciconia* L., *Ciconia nigra* L.). *Zentralbl Veterinarmed* 11B:712-727.
- Haas G (1966) Jungenverluste bei Weißstorch-Gehecken mit zweierlei Altersgruppen. *Vogelwarte* 23:300-305.
- Hage CA, Goldman M, Wheat LJ (2002) Mucosal and invasive fungal infections in HIV/AIDS. *Europ J Med Res* 7:236-241.
- Hale KA und Briskie JV (2007) Decreased immunocompetence in a severely bottlenecked population of an endemic New Zealand bird. *Anim Conserv* 10:2-10.
- Hancock JA, Kushlan JA, Kahl MP (1992) Storks, ibises and spoonbills of the world. Academic Press, San Diego, USA, 97-102.
- Harmon BG (1998) Avian heterophils in inflammation and disease resistance. *Poult Sci* 77:972-977.
- Harris RN, James TY, Lauer A, Simon MA, Patel A (2006) Amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* is inhibited by the cutaneous bacteria of amphibian species. *Eco Health* 3:53-56.
- Hawksworth DL (1991) The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol Res* 95:641-655.
- Hennequin C (1996) Epidemiology of invasive mycoses. Experience of a university hospital center in Paris. *Rev Med Intern* 17:754-760.
- Henry T, Iwen PC, Hinrichs SH (2000) Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *J Clin Microbiol* 38:1510-1515.
- Herrmann R (2007) "MonitoRing" of white storks. In: Kaatz C (Ed) 3rd Jubilee Edition White Stork, Vol. 3. Kaatz C, Loburg, Seiten 348-360.
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE et al. (2007) A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycol Res* 111:509-547.
- Hinrikson HP, Hurst SF, Lott TJ, Warnock DW, Morrison CJ (2005) Assessment of ribosomal large subunit D1-D2, internal transcribed spacer 1, and internal transcribed spacer 2 regions as targets for molecular identification of medically important *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* 43:2092-2103.
- Hoerr FJ (2010) Clinical aspects of immunosuppression in poultry. *Avian Dis* 54:2-15.

- Höfle U, Krone O, Blanco JM, Pizarro M (2003) *Chaunocephalus ferox* in free-living white storks in central Spain. *Avian Dis* 47:506-512.
- Hollander H, Keilig W, Bauer J, Rothmund E (1984) A reliable fluorescent stain for fungi in tissue sections and clinical specimens. *Mycopathologia* 88:131-134.
- Hooimeijer J (1993) Reintroduction of the white stork (*Ciconia ciconia*) in the Netherlands. Proceedings of the European Conference on Avian Medicine and Surgery, Utrecht, The Netherlands, 454-463.
- Hope WW, Walsh TJ, Denning DW (2005) Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 5:609-622.
- Hospenthal DR, Kwon-Chung KJ, Bennett JE (1998) Concentrations of airborne *Aspergillus* compared to the incidence of invasive aspergillosis: lack of correlation. *Med Mycol* 36:165-168.
- Hubalek Z (1994) Pathogenic microorganisms associated with free-living birds (a review). *Acta Sci Nat Acad Sci Bohem Brno* 5:1-74.
- Hubalek Z (2004) An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. *J Wildl Dis* 40:639-659.
- Hubálek Z, Balát F, Toušková I, Vlk J (1973) Mycoflora of birds' nests in nest-boxes. *Mycopathologia* 49:1-12.
- Jackson JC, Higgins LA, Lin X (2009) Conidiation color mutants of *Aspergillus fumigatus* are highly pathogenic to the heterologous insect host *Galleria mellonella*. *PLoS One* 4:e4224.
- Jacobsen ID, Grosse K, Slesiona S, Hube B, Berndt A, Brock M (2010) Embryonated eggs as an alternative infection model to investigate *Aspergillus fumigatus* virulence. *Infect Immun* 78:2995-3006.
- Jakubiec Z (1991) Causes of breeding losses and adult mortality in white stork *Ciconia ciconia* (L.) in Poland. *Studia Nat A* 37:107-124.
- Jansson DS, Bröjer C, Mattsson R, Feinstein R, Mörner T, Hård af Segerstad C (2008) Mycotic proventriculitis in gray partridges (*Perdix perdix*) on two game bird farms. *J Zoo Wildl Med* 39:428-437.
- Jensen WI und Cotter SE (1976) An outbreak of erysipelas in eared grebes (*Podiceps nigricollis*). *J Wildl Dis* 12:583-586.
- Jensen WI und Price JI (1987) The global importance of type C botulism in wild birds. In: Eklund MW und Dowell Jr VR (Ed) *Avian botulism: an international perspective*. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois. Seiten 33-54.
- Jepsen JU, Topping CJ, Odderskaer P, Andersen PN (2005) Evaluating consequences of land-use strategies on wildlife populations using multiple-species predictive scenarios. *Agric Ecos Environ* 105:581-594.
- Johst K, Brandl R, Pfeifer R (2001) Foraging in a patchy and dynamic landscape: human land use and the white stork. *Ecol Appl* 11:60-69.

- Jonzén N, Lindén A, Ergon T, Knudsen E, Vik JO, Rubolini D et al. (2006) Rapid advance of spring arrival dates in long-distance migratory birds. *Science* 312:1959-1961.
- Jovani R und Tella JL (2004) Age-related environmental sensitivity and weather mediated nestling mortality in white storks *Ciconia ciconia*. *Ecography* 27:611-618.
- Jovani R, Tella JL, Blanco G, Bertellotti M (2004) Variable inter-annual relationships between T-cell mediated immunity and individual traits in white storks. *Ardeola* 51:357-364.
- Jungherr E (1933) Observations on a severe outbreak of mycosis in chicks. *J Agr Res* 46:169–178.
- Kaatz C (2008) Mitteilungsblatt 99/2007. In: Kaatz C (Hrsg.) 3. Jubilee Edition White Stork, Kaatz C, Loburg, Anhang.
- Kaatz M (1999) Warum sich 1997 die Weißstorchheimkehr so verzögerte? Die Satelitten-Telemetrie gibt Auskunft. In: Kaatz C (Hrsg.) Tagungsband, 6. und 7. Sachsen-Anhaltinischer Storchentag, Kaatz C, Loburg, 27-31.
- Kaleta EF (1980) Nachweis von Antikörpern gegen das Egg-drop-76-Virus bei domestizierten und nicht domestizierten Vögeln. *Prakt Tierarzt* 61:948.
- Kaleta EF und Kummerfeld N (1983) Herpesviruses and Newcastle disease viruses in white storks (*Ciconia ciconia*). *Avian Pathol* 12:347-352.
- Kano R, Sakamoto Y, Hanahachi A, Kamata H, Fukuda Y, Fujiwara K et al. (2001) Molecular identification of *Candida parapsilosis* from crop mucosa in a cockatiel. *J Vet Diagn Invest* 13:437-439.
- Kanyamibwa S, Bairlein F, Schierer A (1993) Comparison of survival rates between populations of the white stork *Ciconia ciconia* in Central Europe. *Ornis Scandinavica* 24:297-302.
- Kanyamibwa S, Schierer A, Pradel R, Lebreton JD (1990) Changes in adult annual survival rates in a western European population of the white stork *Ciconia ciconia*. *Ibis* 132:27-35.
- Keymer IF (1958) A survey and review of the causes of mortality in British birds and the significance of wild birds as disseminators of disease. *Vet Rec* 70:713–720.
- Kilpatrick AM, Briggs CJ, Daszak P (2009) The ecology and impact of chytridiomycosis: an emerging disease of amphibians. *Trends Ecol Evol* 25:109-118.
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW (2008) Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. CABI International, Oxon, United Kingdom.
- Klika E, Scheuermann DW, Groodt-Lasseel MH, Bazantova I, Switka A (1996) Pulmonary macrophages in birds, barn owl (*Tyto tyto alba*), domestic fowl (*Gallus gallus f. domestica*), quail (*Coturnix coturnix*), and pigeons (*Columbia livia*). *Anat Rec* 246:87-97.
- Köhler W (1999) Bestandsentwicklung des Weißstorchs in der Niederlausitz/Deutschland und Verluste an Freileitungen in Ostdeutschland. In: Schulz H (Hrsg.) Weißstorch im

- Aufwind - White storks on the up. Proceedings International Symposium on the White Stork. Naturschutzbund Deutschland e.V., Hamburg, 381-393.
- Köhler W und Langemach T. (2001) Verluste des Weißstorchs an Freileitungen - kein Ende in Sicht? In: Kaatz C (Hrsg.) 2. Jubilee Edition White Stork, Kaatz C., Loburg, 185-191.
- Komar N (2003) West Nile virus: epidemiology and ecology in North America. *Adv Virus Res* 61:185-234.
- Koutsos EA und Klasing KC (2008) Factors modulating the avian immune system. In: Davinson F, Kaspers B, Schat KA (Hrsg.) *Avian immunology*. Elsevier, London, United Kingdom, 323-338.
- Kruger KM und Hero JM (2007) The chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* is non-randomly distributed across amphibian breeding habitats. *Divers Distrib* 13:781-788.
- Kronmal RA (1993) Spurious correlation and the fallacy of the ratio standard revisited. *J R Stat Soc Ser A* 156:379-392.
- Kück U, Nowrousian M, Hoff B, Engh I, Reiß J (2009) *Schimmelpilze*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Kunkle R (2003) Fungal infections. In: Saif YM (Hrsg.) *Diseases of Poultry*. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA, 883-904.
- LaDeau SL, Kilpatrick AM, Marra PP (2007) West Nile virus emergence and large-scale declines of North American bird populations. *Nature* 447:710-713.
- Lair-Fulleriger S, Guillot J, Desterke C, Seguin D, Warin S, Bezille A et al. (2003) Differentiation between isolates of *Aspergillus fumigatus* from breeding turkeys and their environment by genotyping with microsatellite markers. *J Clin Microbiol* 41:1798-1800.
- Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubel V, Smith J, Parker M, Steele K et al. (1999) Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science* 286:2333-2337.
- Latgé JP (2003) *Aspergillus fumigatus*, a saprotrophic pathogenic fungus. *Mycologist* 17:56-61.
- Latgé JP (1999) *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 12:310-350.
- Lierz M (2008) Endoscopy, biopsy and endosurgery. In: Chitty J und Lierz M (Hrsg.) *BSAVA Manual of raptors, pigeons and passerine birds*. BSAVA Press, Birmingham, United Kingdom, 128-142.
- Lierz M, Hafez HM, Honkavuori KS, Gruber AD, Olias P, Abdelwhab EM et al. (2009) Anatomical distribution of avian bornavirus in parrots, its occurrence in clinically healthy birds and ABV-antibody detection. *Avian Pathol* 38:491-496.
- Linke S, Niedrig M, Kaiser A, Ellerbrok H, Müller K, Müller T et al. (2007) Serologic evidence of West Nile virus infections in wild birds captured in Germany. *Am J Trop Med Hyg* 77:358-364.

- Lionakis MS und Kontoyiannis DP (2005) Fruit flies as a minihost model for studying drug activity and virulence in *Aspergillus*. *Med Mycol* 43 Suppl 1:S111-114.
- Lionakis MS et al. (2005) Toll-deficient *Drosophila* flies as a fast, high-throughput model for the study of antifungal drug efficacy against invasive aspergillosis and *Aspergillus* virulence. *J Infect Dis* 191:1188-1195.
- Lips KR, Reeve JD, Witters LR (2003) Ecological traits predicting amphibian population declines in Central America. *Conserv Biol* 17:1078-1088.
- Löhmer R und Beyerbach M (1992) Der Weißstorch (*Ciconia ciconia*) im Regierungsbezirk Hannover: Bestandsübersicht und Analyse 1958 bis 1987. *Beiträge zur Naturkunde Niedersachsens* 45:53-88.
- Longcore JE, Pessier AP, Nichols DK (1999) *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia* 91:219-227.
- Loudon KW, Burnie JP, Coke AP, Matthews RC (1993) Application of polymerase chain reaction to fingerprinting *Aspergillus fumigatus* by random amplification of polymorphic DNA. *J Clin Microbiol* 31:1117-1121.
- Müller J (1994) Epidemiology of deep-seated, domestic mycoses. *Mycoses* 37:1-7.
- Maina JN, King AS, Settle G (1989) An allometric study of pulmonary morphometric parameters in birds, with mammalian comparisons. *Philos Trans R Soc Lon B Biol Sci* 326:1-57.
- Malik R, Krockenberger MB, Cross G, Doneley R, Madill DN, Black D et al. (2003) Avian cryptococcosis. *Med Mycol* 41:115-124.
- Malkinson M, Banet C, Weisman Y, Pokamunski S, King R, Deubel V (2002) Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. *Emerg Infect Dis* 8:392-397.
- Mandeel Q, Nardoni S, Mancianti F (2011) Keratinophilic fungi on feathers of common clinically healthy birds in Bahrain. *Mycoses* 54:71-77.
- McDougle HC und Vaught RW (1968) An epizootic of aspergillosis in Canada geese. *J Wildl Manage* 32: 415-417.
- Meis JF und Chakrabarti A (2009) Changing epidemiology of an emerging infection: zygomycosis. *Clin Microbiol Infect* 15:10-14.
- Mellado E, Diaz-Guerra TM, Cuenca-Estrella M, Buendia V, Aspa J, Prieto E et al. (2000) Characterization of a possible nosocomial aspergillosis outbreak. *Clin Microbiol Infect* 6:543-548.
- Mengoli C, Cruciani M, Barnes RA, Loeffler J, Donnelly JP (2009) Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 9:89-96.
- Mondon P, De Champs C, Donadille A, Ambroise-Thomas P, Grillot R (1996) Variation in virulence of *Aspergillus fumigatus* strains in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *J Med Microbiol* 45:186-191.

- Moreno J, De Leon A, Fargallo JA, Moreno E (1998) Breeding time, health and immune response in the chinstrap penguin *Pygoscelis antarctica*. *Oecologia* 115:312-319.
- Morgan J, Wannemuehler KA, Marr KA, Hadley S, Kontoyiannis DP, Walsh TJ et al. (2005) Incidence of invasive aspergillosis following hematopoietic stem cell and solid organ transplantation: interim results of a prospective multicenter surveillance program. *Med Mycol* 43 Suppl 1:S49-58.
- Moritz M, Maumary L, Schmid D, Steiner I, Vallotton L, Spaar R et al. (2001a) Time budget, habitat use and breeding success of white storks *Ciconia ciconia* under variable foraging conditions during the breeding season in Switzerland. *Ardea* 89:457-470.
- Moritz M, Spaar R, Biber O (2001b) Todesursachen in der Schweiz beringter Weißstörche (*Ciconia ciconia*) von 1947–1997. *Vogelwarte* 41:44–52.
- Morris G, Kokki MH, Anderson K, Richardson MD (2000) Sampling of *Aspergillus* spores in air. *J Hosp Infect* 44:81-92.
- Müller T, Hlinak A, Freuling C, Mühle RU, Engelhardt A, Globig A et al. (2009) Virological monitoring of white storks (*Ciconia ciconia*) for avian influenza. *Avian Dis* 53:578-584.
- Mylonakis E (2008) *Galleria mellonella* and the study of fungal pathogenesis: making the case for another genetically tractable model host. *Mycopathologia* 165:1-3.
- Mylonakis E, Casadevall A, Ausubel FM (2007) Exploiting amoeboid and non-vertebrate animal model systems to study the virulence of human pathogenic fungi. *PLoS Pathog* 3:e101.
- Neff JA (1955) Outbreak of aspergillosis in mallards. *J Wildl Manage* 19:415-416.
- Nierman WC, Pain A, Anderson MJ, Wortman JR, Kim HS, Arroyo J et al. (2005) Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 438:1151-1156.
- O'Gorman CM, Fuller HT, Dyer PS (2009) Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 457:471-474.
- Oevermann A, Völlm J, Posthaus H, Bacciarini LN, Wisser J, Hofer H et al. (2003) A retrospective study on white stork (*Ciconia ciconia*) mortality in Switzerland (1984-2002). In: *Erkrankungen der Zootiere: Verhandlungsbericht des 41. Internationalen Symposiums über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere*, Rom, Italien.
- Olias P, Hauck R, Windhaus H, vd Grinthen E, Gruber AD, Hafez HM (2010) Articular aspergillosis of hip joints in turkeys. *Avian Dis* 54:1098-1101.
- Palacios MG, Cunnick JE, Vleck D, Vleck CM (2009) Ontogeny of innate and adaptive immune defense components in free-living tree swallows, *Tachycineta bicolor*. *Dev Comp Immunol* 33:456-463.

- Paoletti M, Rydholm C, Schwier EU, Anderson MJ, Szakacs G, Lutzoni F et al. (2005) Evidence for sexuality in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Curr Biol* 15:1242-1248.
- Peden WM und Rhoades KR (1992) Pathogenicity differences of multiple isolates of *Aspergillus fumigatus* in turkeys. *Avian Dis* 36:537-542.
- Pollock C (2003) Fungal diseases of columbiformes and anseriformes. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 6:351-361.
- Powell FL (1999) Respiration. In: Whittow GC (Hrsg.) *Avian Physiology*. Academic Press, New York, USA, 233-264.
- Profus P (1986) Zur Brutbiologie und Bioenergetik des Weißstorchs in Polen. Artenschutzsymposium Weißstorch. Beihefte Veröffentlichungen zum Naturschutz und zur Landschaftspflege Baden-Württemberg 43:205-220.
- Ptaszyk J, Kosicki J, Sparks T, Tryjanowski P (2003) Changes in the timing and pattern of arrival of the white stork (*Ciconia ciconia*) in western Poland. *J Ornithol* 144:323-329.
- Pult I, Netter HJ, Bruns M, Prassolov A, Sirma H, Hohenberg H et al. (2001) Identification and analysis of a new Hepadnavirus in white storks. *Virology* 289:114-128.
- Redondo T, Tortosa FS, Reyna LA (1995) Nest switching and alloparental care in colonial white storks. *Anim Behav* 49:1097-1110.
- Rees RG (1968a) Keratinophilic fungi from Queensland—II. Isolations from feathers of wild birds. *Med Mycol* 6:14-18.
- Rees RG (1968b) Keratinophilic fungi from Queensland—III. Isolations from feathers of domestic fowls. *Med Mycol* 6:19-28.
- Reese S, Dalamani G, Kaspers B (2006) The avian lung-associated immune system: a review. *Vet Res* 37:311-324.
- Reeves EP, Messina CG, Doyle S, Kavanagh K (2004) Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. *Mycopathologia* 158:73-79.
- Renwick J, Daly P, Reeves EP, Kavanagh K (2006) Susceptibility of larvae of *Galleria mellonella* to infection by *Aspergillus fumigatus* is dependent upon stage of conidial germination. *Mycopathologia* 161:377-384.
- Rheinwald G, Ogden J, Schulz H (1989) Weißstorch - white stork. *Proceedings 1st Int Stork Conserv Symp. Schriftenreihe des DDA* 10:81-97.
- Ribes JA, Vanover-Sams CL, Baker DJ (2000) Zygomycetes in human disease. *Clin Microbiol Rev* 13:236-301.
- Richard JL, Thurston JR, Peden WM, Pinello C (1984) Recent studies on aspergillosis in turkey poults. *Mycopathologia* 87:3-11.
- Richardson M und Lass-Florl C (2008) Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clin Microbiol Infect* 14:5-24.

- Rickerts V et al. (2007) Comparison of histopathological analysis, culture, and polymerase chain reaction assays to detect invasive mold infections from biopsy specimens. *Clin Infect Dis* 44:1078-1083.
- Riegel M und Winkel W (1971) Über Todesursachen beim Weißstorch (*Ciconia ciconia*) an Hand von Ringfunden. *Vogelwarte* 26:128–135.
- Rieth H (1967) DHS-Diagnostik. *Fortsch Med* 85:594.
- Robert VA und Casadevall A (2009) Vertebrate endothermy restricts most fungi as potential pathogens. *J Infect Dis* 200:1623-1626.
- Rocke TE und Bollinger TA (2007) Avian botulism. In: Thomas NJ, Hunter DB, Atkinson CT (Hrsg.) *Infectious diseases of wild birds*. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA, 377-416.
- Roden MM et al. (2005) Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. *Clin Infect Dis* 41:634-653.
- Rohr JR und Raffel TR (2010) Linking global climate and temperature variability to widespread amphibian declines putatively caused by disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:8269-8274.
- Romani L (2004) Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* 4:11-24.
- Romeis B (1989) *Mikroskopische Technik*. Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore.
- Rosen MN (1964) Aspergillosis in wild and domestic fowl. *Avian Dis* 8:1-6.
- Rowley JJ und Alford RA (2007) Behaviour of Australian rainforest stream frogs may affect the transmission of chytridiomycosis. *Dis Aquat Organ* 77:1-9.
- Ruchel R und Schaffrinski M (1999) Versatile fluorescent staining of fungi in clinical specimens by using the optical brightener Blankophor. *J Clin Microbiol* 37:2694-2696.
- Ryckeboer J, Mergaert J, Coosemans J, Deprins K, Swings J (2003) Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. *J Appl Microbiol* 94:127-137.
- Saether BE, Grøtan V, Tryjanowski P, Barbraud C, Engen S, Fulin M (2006) Climate and spatio-temporal variation in the population dynamics of a long distance migrant, the white stork. *J Anim Ecol* 75:80-90.
- Samson RA (1999) The genus *Aspergillus* with special regard to the *Aspergillus fumigatus* group. In: Brackhage AA, Jahn B, Schmidt A (Hrsg.) *Aspergillus fumigatus: biology, clinical aspects, and molecular approaches to pathogenicity* 2:5-20.
- Sangoi AR, Rogers WM, Longacre TA, Montoya JG, Baron EJ, Banaei N (2009) Challenges and pitfalls of morphologic identification of fungal infections in histologic and cytologic specimens. A ten-year retrospective review at a single institution. *Am J Clin Pathol* 131:364–375.

- Sarangi S und Ghosh GR (1991) Survey of keratinophilic fungi inhabiting *Passer domesticus* in two districts of Orissa, India. *Mycopathologia* 114:109-116.
- Schaffer T (1996) Parasitologische Untersuchungen an der Wirtspezies Weißstorch (*Ciconia ciconia*). Dissertationsschrift, Freie Universität Berlin.
- Schaub M, Kania W, Köppen U (2005) Variation of primary production during winter induces synchrony in survival rates in migratory white storks *Ciconia ciconia*. *J Anim Ecol* 74:656-666.
- Schimkat JA (2004) Sind die Bestände der ostziehenden Weißstörche *Ciconia ciconia* stabil? *Actitis* 39:73-107.
- Schmidt A (1998) Georg Fresenius and the species *Aspergillus fumigatus*. *Mycoses* 41 Suppl 2:89-91.
- Schulz H (1998) *Ciconia ciconia* white stork. *BWP Update* 2:69-105.
- Schulz H (1999) Weißstorch im Aufwind? - White storks on the up. Proceedings International Symposium on the White Stork. Naturschutzbund Deutschland e.V., Hamburg.
- Schulze C und Heidrich R (2001) *Megabacteria*-associated proventriculitis in poultry in the state of Brandenburg, Germany. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 108:264-266.
- Schüz E (1959) Problems about the white stork (*Ciconia ciconia*) in Africa seen from a European viewpoint. *Proc 1st Pan-African Ornithol Congr Ostrich (Suppl)* 3:333-341.
- Schüz E (1961) Westeuropäische Zugscheide des Weißstorchs. *Auspicium* 1:243-310.
- Schüz E (1971) Grundriss der Vogelzugkunde, Parey, Berlin.
- Schüz E (1984) Über Syngenophagie, besonders Krosnismus. Ein Beitrag zur Ethologie speziell des Weißstorchs. *Ökologie Vögel* 6:141-158.
- Skutch AF (1976) Parent birds and their young. University of Texas Press, Austin, USA.
- Smits JE und Bortolotti GR (2008) Immunological development in nestling American kestrels *Falco sparverius*: post-hatching ontogeny of the antibody response. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 151:711-716.
- Steenbergen JN, Shuman HA, Casadevall A (2001) *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proc N Acad Sci U S A* 98:15245-15245.
- Svensson E, Raberg L, Koch C, Hasselquist D (1998) Energetic stress, immunosuppression and the costs of an antibody response. *Functional Biology*:912-919.
- Szidat L (1935) Warum wirft der Storch seine Jungen aus dem Nest? *J Ornithol* 83:76-87.
- Szidat L (1943) Weitere Beobachtungen über Parasiten und andere Krankheitserreger in aus dem Nest geworfenen Jungstörchen. *Zoomorphology* 40:238-247.
- Tell LA (2005) Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine. *Med Mycol* 43 Suppl 1:S71-73.
- Tella JL, Forero MG, Bertellotti M, Donázar JA, Blanco G, Ceballos O (2001) Offspring body condition and immunocompetence are negatively affected by high breeding

- densities in a colonial seabird: a multiscale approach. *Proc R Soc Lon Ser B Biol Sci* 268:1455-1464.
- Thomas NJ, Hunter DB, Atkinson CT (2007) *Infectious diseases of wild birds*. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA.
- Thornton CR (2010) Detection of invasive aspergillosis. *Adv Appl Microbiol* 70:187-216.
- Tortosa FS, Caballero JM, Reyes-López J (2002) Effect of rubbish dumps on breeding success in the white stork in southern Spain. *Waterbirds* 25:39-43.
- Tortosa FS und Castro F (2003) Development of thermoregulatory ability during ontogeny in the white stork *Ciconia ciconia*. *Ardeola* 50:39-45.
- Tortosa FS, Pérez L, Hillström L (2003) Effect of food abundance on laying date and clutch size in the white stork *Ciconia ciconia*: Food independently affects both laying date and clutch size, suggesting that seasonal decline in clutch size is related to a decrease in food availability. *Bird Study* 50:112-115.
- Tortosa FS und Redondo T (1992) Motives for parental infanticide in white storks *Ciconia ciconia*. *Ornis Scandinavica* 23:185-189.
- Tortosa FS und Villafuerte R (1999) Effect of nest microclimate on effective endothermy in white stork *Ciconia ciconia* nestlings. *Bird Study* 46:336-341.
- Toth TE (2000) Nonspecific cellular defense of the avian respiratory system: a review. *Dev Comp Immunol* 24:121-139.
- Toth TE und Siegel PB (1986) Cellular defense of the avian respiratory tract: paucity of free-residing macrophages in the normal chicken. *Avian Dis* 30:67-75.
- Tryjanowski P und Kuzniak S (2002) Population size and productivity of the white Stork *Ciconia ciconia* in relation to common vole *Microtus arvalis* density. *Ardea* 90:213-217.
- Tryjanowski P, Leszek J, Józef R (2005) Effect of water level and livestock on the productivity and numbers of breeding white Storks. *Waterbirds* 28:378-382.
- Tryjanowski P, Sparks TH, Ptaszyk J, Kosicki J (2004) Do white storks *Ciconia ciconia* always profit from an early return to their breeding grounds?: Capsule Arrival date strongly influenced date of breeding and breeding success. *Bird Study* 51:222-227.
- Tsai SS, Park JH, Hirai K, Itakura C (1992) Aspergillosis and candidiasis in psittacine and passeriforme birds with particular reference to nasal lesions. *Avian Pathol* 21:699-709.
- van Belkum A, Quint WG, de Pauw BE, Melchers WJ, Meis JF (1993) Typing of *Aspergillus* species and *Aspergillus fumigatus* isolates by interrepeat polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 31:2502-2505.
- van den Bossche W, Berthold P, Kaatz M, Nowak E, Querner U (2002) Eastern European white stork populations: migration studies and elaboration of conservation measures. BfN Skripten 66, Bundesamt für Naturschutz, Bonn.
- van den Bossche W, Kaatz M, Querner U (1998) Satellite tracking of white storks *Ciconia ciconia*. *Journal of African ornithology*. In: Adams NJ and Slotow RH (Hrsg.)

- Proceedings of the 22nd International Ornithological Congress, Durban. Ostrich 69:152.
- van der Does HC und Rep M (2007) Virulence genes and the evolution of host specificity in plant-pathogenic fungi. *Mol Plant Microbe Interact* 20:1175-1182.
- van Riper III C, van Riper SG, Goff ML, Laird M (1986) The epizootiology and ecological significance of malaria in hawaiian land birds. *Ecol Monogr* 56:327-344.
- Vanhee LM, Symoens F, Jacobsen MD, Nelis HJ, Coenye T (2009) Comparison of multiple typing methods for *Aspergillus fumigatus*. *Clin Microbiol Infect* 15:643-650.
- Vergara P, Aguirre JI, Fernandez-Cruz M (2007) Arrival date, age and breeding success in white stork *Ciconia ciconia*. *J Avian Biol* 38:573-579.
- Viney ME, Riley EM, Buchanan KL (2005) Optimal immune responses: immunocompetence revisited. *Trends Ecol Evol* 20:665-669.
- Visser GH (1998) Development of temperature regulation. In: Starck JM, Ricklefs RE (Hrsg.) Avian growth and development. Evolution within the altricial-precocial spectrum. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 117-156.
- Völlm J (1995) Todesursachen von Weißstörchen. In: Biber O, Enggist P, Marti C, Salathé T (Hrsg.) Proceedings of the International Symposium on the White Stork (Western Population) Basel 1994. Buchdruckerei Hochdorf AG, Hochdorf, Schweiz, 349-358.
- Voyles J, Young S, Berger L, Campbell C, Voyles WF, Dinudom A et al. (2009) Pathogenesis of chytridiomycosis, a cause of catastrophic amphibian declines. *Science* 326:582-585.
- White PL, Bretagne S, Klingspor L, Melchers WJ, McCulloch E, Schulz B et al. (2010) Aspergillus PCR: one step closer to standardization. *J Clin Microbiol* 48:1231-1240.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Hrsg.) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, New York, USA, 315-322.
- Wibbelt G, Moore MS, Schountz T, Voigt CC (2010) Emerging diseases in Chiroptera: why bats? *Biol Lett* 6:438-440.
- Wolcott MJ (2007) Erysipelas. In: Thomas NJ, Hunter DB, Atkinson CT (Hrsg.) Infectious diseases of wild birds. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA, 332-340.
- Woodhams DC, Ardipradja K, Alford RA, Marantelli G, Reinert LK, Rollins-Smith LA (2007) Resistance to chytridiomycosis varies among amphibian species and is correlated with skin peptide defenses. *Anim Conserv* 10:409-417.
- Zafra R, Pérez J, Pérez-Ecija RA, Borge C, Bustamante R, Carbonero A et al. (2008) Concurrent aspergillosis and ascites with high mortality in a farm of growing broiler chickens. *Avian Dis* 52:711-713.

- Zangger N und Müller M (1990) Endemic poxvirus infection in white storks (*Ciconia ciconia*) and black storks (*Ciconia nigra*) in Switzerland. Schweiz Arch Tierheilkd 132:135-138.
- Zielinski P (2002) Brood reduction and parental infanticide - are the white stork *Ciconia ciconia* and the black stork *C. nigra* exceptional? Acta Ornithologica 37:113-119.

11 DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. Achim D. Gruber, Ph.D., Leiter des Instituts für Tierpathologie der Freien Universität Berlin, gilt mein ganz besonderer Dank für die Aufnahme in sein Institut, eine uneingeschränkte und intensive Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit und für die Freiräume, viele Ideen verwirklichen zu können.

Herrn Professor Dr. Hafez Mohamed Hafez, Leiter des Instituts für Geflügelkrankheiten der Freien Universität Berlin, und seinen Mitarbeitern danke ich sehr für die Betreuung, die stete Hilfe und die Bereitstellung der Labore.

Herrn Professor Dr. Michael Lierz, Leiter der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische der Justus-Liebig-Universität Gießen, danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die wohlwollende und langjährige Förderung.

Frau Ilse Jacobsen, Ph.D. aus dem Hans-Knöll-Institut in Jena danke ich herzlich für die produktive Kooperation bei den *in vivo*-Versuchen und die Unterstützung bei der Erlernung und Durchführung mykologischer Techniken. Ebenso gedankt sei Herrn Dr. Matthias Brock und Frau Silvia Slesiona für ihre stets tatkräftige Unterstützung.

Herrn Professor Dr. Robert Klopfleisch danke ich für die unterstützende und humorvolle Arbeitsatmosphäre in Berlin und die zahllosen anregenden Diskussionen. Herrn Dr. Lars Mundhenk und Herrn Alexander Weiss, Ph.D. danke ich für stete Hilfe und den Spaß bei und neben der Arbeit. Frau Jana Enders und Frau Monika Schaerig sei besonders gedankt für die technische Unterstützung und zahlreiche gute Ideen. Meinen Mitdoktoranden und allen aus Platzgründen hier nicht namentlich genannten Kollegen, Mitarbeitern und Freunden am Institut für Tierpathologie danke ich für das produktive und angenehme Arbeitsklima.

Herrn Winfried Böhmer und den Mitarbeitern des Weißstorch-Informationszentrums in Vetschau sowie den vielen größtenteils ehrenamtlichen Weißstorchbetreuern danke ich für ihre großartige Initiative und tatkräftige Unterstützung, ohne die das Projekt nicht durchführbar gewesen wäre. Herrn Dipl.-Biol. Kai-Michael Thomsen aus dem Michael-Otto-Institut in Bergenhusen danke ich herzlich für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Frau Professor Dr. Helga Gerlach, Herrn Professor Dr. Axel Schmidt, Frau Dr. Christiane Schewe und Frau Dr. Kathrin Tintelnot danke ich für ihre Unterstützung bei der Einarbeitung in das Thema der Dissertation.

Herrn Professor Dr. Uwe Ulbrich und Herrn Tim Kruschke vom Institut für Meteorologie der Freien Universität Berlin danke ich für die klimatologischen Auswertungen.

Herrn Hartmut Altvater bin ich dankbar für die schönen ökologischen Lehrjahre und seine Freundschaft.

Meinen Eltern gilt mein besonderer Dank, für ihr Vorbild und ihre immerwährende Unterstützung. Ganz besonders aber bin ich meiner Frau Lena dankbar für ihre Liebe, ihre große Stärke und Zuversicht und meinen Kindern für ihre Lebensfreude, ihr Staunen und das geschenkte Glück.

12 SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Philipp Olias

Berlin, 2010