

# **2 Literaturübersicht**

## **2.1 Hühnerpocken**

### **2.1.1 Geschichte**

Die erste wissenschaftliche Beschreibung als „Conjunctivite des poules“ datiert auf das Jahr 1775. Aufgrund ihrer Symptomatik wurde die Schleimhautform der Geflügelpocken als sog. Geflügeldiphtherie mit der durch *Corynebacterium diphtheriae* ausgelösten Diphtherie des Menschen in Zusammenhang gebracht. Bei verschiedenen Diphtherieepidemien des Menschen wurden die Geflügelpocken sogar als Ursache angesehen. Teilweise wurde auch die Hautform der Geflügelpocken mit der Variola–Infektion des Menschen in Zusammenhang gebracht (v. Heelsbergen, 1929; Gratzl und Köhler, 1968; Mayr, 1992).

Erst ab der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts begann sich die Ansicht durchzusetzen, daß für die Diphtherie des Menschen und die Geflügeldiphtherie verschiedene Erreger verantwortlich sind. 1873 wurde von Bollinger erkannt, daß die diphteroide Schleimhautform und die Hautform der Geflügelpocken auf denselben Erreger zurückzuführen sind (v. Heelsbergen, 1929; Gratzl und Köhler, 1968; Mayr, 1992). 1902 wurde gezeigt, daß dieser Erreger filtrierbar ist (Marx und Stricker, 1902). Die Isolierung im embryonierten Hühnerei gelang erstmals 1931 (Woodruff und Goodpasture, 1931).

### **2.1.2 Das Hühnerpockenvirus**

#### **2.1.2.1 Taxonomische Einordnung**

Das Hühnerpockenvirus (Fowlpox virus, FPV) wird innerhalb der Familie der *Poxviridae* und der Unterfamilie *Chordopoxvirinae* in das Genus *Avipoxvirus* eingeordnet. In diesem Genus stellt es die Typspezies dar. Zu den *Avipoxvirus* zählen neun weitere, nach ihrem Wirt benannte Virusspezies, unter anderem das vom FPV schwer zu differenzierende Putenpockenvirus (Turkeypox virus, TKPV) (Moyer et al., 2000; Lüschow et al., 2004).

Pockeninfektionen wurden bisher bei mindestens 232 Vogelarten beschrieben, wobei die Erreger meist nicht den beschriebenen Vogelpockenspezies zugeordnet werden konnten (Bolte et al., 1999).

Die Abgrenzung des FPV gegenüber anderen Spezies des Genus kann durch Tierversuche, Verhalten im embryonierten Hühnerei bzw. in der Zellkultur, sowie mit serologischen und molekularbiologischen Methoden vorgenommen werden.

Bei experimenteller Bestimmung des Wirtsspektrums erkrankten nach intravenöser Applikation des FPV nur Hühner und Puten, nicht jedoch Enten oder Kanarienvögel. Bei

Wachteln bildet sich nach Applikation über die Federfollikel eine milde Primärpocke. FPV und TKPV lassen sich bei der Bestimmung des Wirtsspektrums nur durch die intravenöse Infektion von Entenküken differenzieren, wobei nur mit TKPV infizierte Tiere generalisiert erkranken (Mayr, 1963; Mayr, 1992).

Die Veränderungen auf der Chorioallantoismembran (CAM) embryonierter, mit FPV infizierter Hühnereier zeichnen sich im Gegensatz zu den durch andere Vogelpocken hervorgerufenen Veränderungen durch mehr Sekundärherde aber eine geringere Proliferation der Primärherde aus. Die Einschlußkörperchen sind homogen und größer als bei anderen Vogelpocken, treten aber in nicht so großer Anzahl auf (Mayr, 1963). Das TKPV unterscheidet sich vom FPV durch niedrigere Absterberaten der Embryonen und das Auftreten mehrerer Trübungsringe um die Pockenherde auf der CAM (Mayr, 1963).

Bei der Vermehrung auf Hühner–Embryo–Fibroblasten (HEF) kann eine Differenzierung anhand des cytopathischen Effekts (CPE) bzw. der Plauegröße und –morphologie erfolgen. Der durch FPV und TKPV hervorgerufene CPE zeichnet sich vor allem durch Abkuglung der Zellen aus, eine Lyse tritt später auf als nach Infektion mit anderen Vogelpocken–Viren (Mayr und Kalcher, 1960; Mayr, 1963). Ferner zeigen die Plaques nur eine undeutlich ausgebildete Ringzone, da auch das Zentrum des Plaques nicht lysiert ist, sondern aus degenerierten Zellen besteht (Mayr und Kalcher, 1961). Eine Differenzierung zwischen FPV und TKPV ist in der Zellkultur nicht möglich (Mayr, 1963).

Im Neutralisationstest treten zwischen Hühnerpocken, Kanarienvpocken und Taubenvpocken Kreuzreaktionen auf (Uppal und Nilakantan, 1970; Baxendale, 1971). Insbesondere zwischen Putenvpocken und Hühnerpocken konnte nur ein sehr geringer Unterschied festgestellt werden (Baxendale, 1971). Mittels monoklonaler Antikörper ist eine Differenzierung zwischen Hühnerpocken, Taubenvpocken und Kanarienvpocken nur zwischen Tauben– und Kanarienvpockenvirus, bzw. zwischen FPV und Kanarienvpockenvirus aber nicht zwischen Taubenvpockenvirus und FPV möglich (Burck, 1999).

Molekularbiologisch können verschiedene Avipoxviren, jedoch nicht FPV und TKPV, durch Restriktionsenzymeanalyse des gesamten Pockenvirusgenoms (Schnitzlein et al., 1988a; Ghildyal et al., 1989; Tripathy et al., 2000; Weli et al., 2004), bzw. eines mittels Polymerase–Ketten–Reaktion (PCR) gewonnenen Amplifikats aus dem Bereich des 4b–Core–Proteins (Hoffmann, 2005) voneinander unterschieden werden. Ferner treten antigenetische Unterschiede im Western–Blot auf (Schnitzlein et al., 1988a; Ghildyal et al., 1989; Burck, 1999).

### 2.1.2.2 Morphologie

Das FPV ist etwa 330x280x200 nm groß. Es hat elektronenmikroskopisch das für die meisten Pockenviren charakteristische Erscheinungsbild mit einer quaderförmigen Gestalt und zufällig angeordneten Tubuli, die der äußeren Hüllmembran aufsitzen. Nach Innen folgt die innere Hüllmembran, die zwei Lateralkörper mit bislang unbekannter Funktion und den elektronendichten, bikonkaven Innenkörper (Nukleoid) mit der Desoxyribonukleinsäure (DNA) umschließt (Arhelger et al., 1962; Tajima und Ushijima, 1966).

### 2.1.2.3 Genom

Das FPV-Genom besteht aus unsegmentierter, doppelsträngiger DNA mit einer Haarnadelschleife und inverted terminal repeats von ungefähr je 10.000 Basenpaaren (bp) an jedem Ende (Campbell et al., 1989; Coupar et al., 1990). Die Größe des gesamten Genoms wird auf 254.000–309.000 bp geschätzt (Coupar et al., 1990; Mockett et al., 1992). Der G/C-Gehalt beträgt etwa 35 % (Randall et al., 1962).

In den letzten Jahren wurde das Genom eines pathogenen, aus den USA stammenden und eines durch Passagierung attenuierten, europäischen FPV-Stammes vollständig sequenziert. Die Größen betragen 288.539 bp bzw. 266.145 bp. Insgesamt konnten 118 Mutationen, davon 77 Punktmutationen, in 71 offenen Leserastern (open reading frames, ORFs) festgestellt werden. In dem größeren Genom des amerikanischen, pathogenen Stammes wurden 260 ORFs, die Polypeptide von 60 oder mehr Aminosäuren kodieren, identifiziert, von denen 101 eine Ähnlichkeit mit bekannten Genen aufweisen. In dem kleineren Genom des attenuierten Stammes wurden 244 der 260 ORFs des pathogenen Stammes identifiziert, 189 davon ohne Mutation. Nach einem Vergleich der unterschiedlichen Regionen mit einer noch nicht attenuierten, frühen Passage des europäischen Stammes wurden die Mutationen von 25 ORFs auf regionale Unterschiede und die der restlichen 46 veränderten ORFs auf die Attenuierung zurückgeführt (Afonso et al., 2000; Laidlaw und Skinner, 2004).

Der Vergleich mit dem Genom anderer Chordopoxviren zeigt einen zentralen Bereich von ca. 100.000 bp. In diesem zentralen Bereich liegen 90 Gene, die bei allen anderen sequenzierten *Chordopoxvirinae* ebenfalls vorkommen. Im Vergleich zu diesen sind jedoch Unterschiede in der Anordnung zu beobachten (Binns et al., 1988; Gubser et al., 2004). Diese Gene kodieren hauptsächlich für die Replikation notwendige Proteine, während peripher kodierte Proteine überwiegend das Wirtsspektrum und die Pathogenität bestimmen (Binns et al., 1988; Campbell et al., 1989; Gubser et al., 2004).

Der erhebliche Größenunterschied zu anderen *Chordopoxvirinae* (150.000–210.000 bp) resultiert vor allem aus dem Vorliegen von 113 Genen, denen ein Äquivalent bei allen

anderen *Chordopoxvirinae* fehlt. Dabei handelt es sich um zusätzliche Mitglieder mehrerer Multigen-Familien und einer größeren Zahl ORFs, die mit aviären zellulären Genen homolog sind (Afonso et al., 2000; Gubser et al., 2004).

Wegen der Größe des Genoms und des relativ großen Anteils für die Replikation nicht essentieller Regionen gibt es zahlreiche Ansätze, Hühnerpocken als Vektoren für rekombinante Impfstoffe, z. B. gegen Influenza oder Newcastle-Disease, zu nutzen (Bournell et al., 1990; Boyle et al., 2000; Qiao et al., 2003). Da FPV in Säugetierzellen nur eine abortive Infektion hervorrufen, aber dennoch einige Proteine des FPV exprimiert werden können, werden sie als sichere Vektoren, auch zur Impfung von Säugetieren, erprobt (Limbach und Paoletti, 1996). So verliefen z. B. Versuche zur Vakzinierung verschiedener Tiere gegen Tollwut oder von Menschen gegen Malaria mit rekombinanten Impfstoffen auf FPV-Basis erfolgreich (Taylor et al., 1988; Moorthy et al., 2004).

Bei einigen FPV-Stämmen ist ein fast vollständiges Provirus des Retikuloendotheliose-Virus (REV), eines für Geflügel pathogenen Retrovirus, in das Genom integriert, bei anderen Stämmen nur Überreste der long terminal repeats (LTR) des REV (Hertig et al., 1997; Singh et al., 2000).

#### 2.1.2.4 Replikation

Über den Replikationszyklus des FPV ist bei weitem nicht so viel bekannt, wie über den des Vaccinia-Virus. Grundlegende Unterschiede gibt es wahrscheinlich nicht (Moss, 1990; Boulanger et al., 2000).

Die Aufnahme in die Zelle erfolgt beim FPV mittels Phagozytose (Arhelger et al., 1962; Arhelger und Randall, 1964), während beim Vaccinia-Virus der direkten Verschmelzung von Virushülle und Zellmembran wohl die größere Bedeutung zukommt (Moss, 1990). Direkt nach der Aufnahme in die Zelle beginnt die Transkription der frühen, präreplikativ transkribierten Gene, deren Proteinprodukte u.a. für das Uncoating und die DNA-Replikation notwendig sind (Moss, 1990). Ein frühes Protein, das beim Vaccinia-Virus, dem Shope-Fibroma-Virus und dem Myxomytose-Virus identifiziert wurde, ist dem epidermalem Wachstumsfaktor strukturell sehr ähnlich und bindet an dessen Rezeptor (Porter et al., 1988). Auch beim FPV kommt es nach Infektion der Zelle zu einer Zunahme der Synthese zellulärer DNA und somit einer Zellhypertrophie und -plasie (Cheevers et al., 1968; Cheevers und Randall, 1968).

Dem Uncoating und der DNA-Replikation folgt die Transkription der postreplikativ transkribierten, mittleren und späten Gene, deren Proteinprodukte hauptsächlich Strukturproteine sind (Moss, 1990). Die Einteilung in präreplikativ transkribierte, frühe und postreplikativ transkribierte, späte Gene wurde auch für das FPV gezeigt (Prideaux und Boyle, 1987).

Der Ort der Transkription und der DNA–Replikation im Zytoplasma macht das Vorhandensein virus–kodierter Enzyme, die viruseigene Promotorsequenzen benutzen, zur Transkription und DNA–Replikation notwendig (Moss, 1990). Mittels rekombinanter Viren wurde gezeigt, daß die Promotorsequenzen für frühe Gene (Boyle und Coupar, 1986; 1988; Taylor et al., 1988; Prideaux et al., 1990) und späte Gene (Prideaux et al., 1990; Boyle, 1992) von Vaccinia–Virus und FPV austauschbar sind, wenn auch teilweise mit einer Einbuße an Transkriptionseffizienz (Prideaux et al., 1990; Boyle, 1992). Ebenso legen Hinweise nahe, daß Vakzinia–Virus und FPV ein gemeinsames Signal zur Beendigung der Transkription besitzen (Binns et al., 1988; Prideaux et al., 1990). Wie beim Vakzinia–Virus wurde auch ein posttranskriptionelles Processing der Messenger–Ribonukleinsäure (mRNA) gezeigt (Kumar und Boyle, 1990).

Nach Transkription und Translation der späten Gene entstehen durch das Assembly von einer Lipidmembran unbekannter Herkunft umgebene intrazelluläre reife Virionen (Boulanger et al., 2000). Die Freisetzung aus der Zelle geschieht entweder nach Lyse der Zelle, wobei die bereits infektiösen intrazellulären reifen Virionen in die Umwelt gelangen oder durch Budding durch die Zellmembran. Eine weitere Möglichkeit der Freisetzung ist das sog. Wrapping, d. h. der Erwerb zweier umgebender Membranen vom endoplasmatischem Retikulum oder dem Golgi–Apparat und Verschmelzen der äußeren dieser Membranen mit der Zellmembran (Boulanger et al., 2000). Während beim Vaccinia–Virus das Wrapping vorzuherrschen scheint, verläßt das FPV wahrscheinlich hauptsächlich (Arhelger et al., 1962; Arhelger und Randall, 1964; Boulanger et al., 2000), jedoch nicht ausschließlich (Calvert et al., 1992), mittels Budding die Zelle. Die durch Budding oder Wrapping entstandenen extrazellulären, behüllten Virionen zeigen beim FPV, wie auch bei anderen Pockenviren, antigenetische Unterschiede zu den intrazellulären reifen Virionen (Maiti et al., 1991).

Eine zeitliche Übersicht über die Vorgänge gibt Tabelle 1.

Die Rolle des Zellkerns im Replikationszyklus der Pockenviren ist weitgehend ungeklärt (Moss, 1990). So ist z. B. die DNA–Replikation und die Transkription früher und später Gene, jedoch keine Produktion infektiöser Viren in enuklierten Zellen möglich (Pennington und Follett, 1974). Für das FPV wurde, wie für andere Pockenviren auch, das Vorkommen viraler Nukleinsäuren im Zellkern nachgewiesen (Gafford und Randall, 1976). Außerdem wurden elektronenmikroskopisch unreife FPV–Partikel im Zellkern festgestellt (Arhelger und Randall, 1964).

**Tabelle 1: Zeitliche Übersicht über den Replikationszyklus des FPV**

Zeit p. i. <sup>1</sup>	Vorgang	Referenz
ab 12 h	Synthese viraler DNA in geringem Umfang	Cheevers et al., 1968
24–72 h	Starker Anstieg der Synthese zellulärer DNA, verbunden mit Zellhyperplasie und Zunahme der Zellzahl	Cheevers et al., 1968, Cheevers und Randall, 1968
24–48 h	Ende der Eklipse und Auftreten erster infektiöser Virionen; Beginn der exponentiellen Wachstumsphase	Gafford et al., 1969, Chang und Jasty, 1970
48 h	erste lipidhaltige Virus-Factories im Zytoplasma elektronenmikroskopisch sichtbar	Arhelger et al., 1962, Arhelger und Randall, 1964
ab 72 h	Einschlußkörperchen im Lichtmikroskop sichtbar	Arhelger et al., 1962
ab 120 h	Abfall des Virustiters	Gafford et al., 1969, Chang und Jasty, 1970

<sup>1</sup>nach der Infektion (post infectionem)

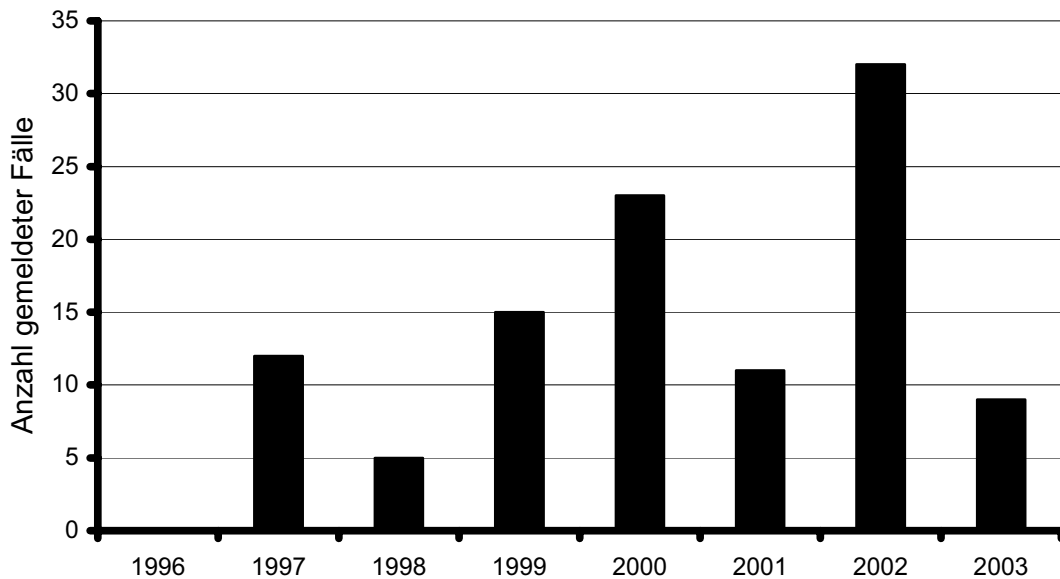
### 2.1.3 Vorkommen

Die Hühnerpocken treten weltweit bei Hühnern und Hühnervögeln aller Altersstufen und beiderlei Geschlechts auf, verstärkt in Herbst und Winter (Mayr, 1992; Hoffmann, 2005). Vor Einführung der Impfung wurde das periodische An- und wieder Absteigen der Anzahl der Ausbrüche (säkulare Rhythmik) beschrieben (Mayr, 1992).

Durch intensive Impfungen und mit der Änderung der Haltungsbedingungen hin zur Haltung in geschlossenen Ställen wurden die Hühnerpocken in West- und Mitteleuropa so weit zurückgedrängt, daß sie Ende des letzten Jahrzehnts als fast besiegt galten (Burck, 1999).

In den letzten Jahren stieg die Zahl der Hühnerpockenausbrüche in Deutschland wieder an (Abbildung 1). Als mögliche Ursachen werden die weitgehende Einstellung routinemäßiger Impfungen und die Freiland-Haltung, die Hygienemaßnahmen erschweren, diskutiert (Hafez et al., 2001; Kaleta et al., 2001).

In den USA und Australien, wo vermehrt über das Auftreten der Krankheit in geimpften Beständen berichtet wird, werden als mögliche Ursachen der Impfdurchbrüche variante Stämme und/oder die Integration des REV in das Genom der Geflügelpocken diskutiert (Diallo et al., 1998; Singh et al., 2000; Singh und Tripathy, 2000).



**Abbildung 1: Anzahl der Welt Tiergesundheits Organisation (OIE) aus Deutschland gemeldeten Hühnerpocken–Ausbrüche 1996 – 2003 (Anonym, 2005a)**

#### 2.1.4 Übertragung

Hühnerpockenviren können in der Umwelt lange überleben und überstehen insbesondere Austrocknung sehr gut. Die Fähigkeit zur Produktion einer Photolyase, die durch UV–Strahlen geschädigte DNA reparieren kann, trägt zu der hohen Tenazität in der Umwelt bei (Srinivasan et al., 2001). Das FPV wird jedoch durch die gängigen Desinfektionsmittel inaktiviert (Cunningham, 1978).

Die Übertragung geschieht durch direkten Kontakt mit infizierten Tieren oder indirekt durch kontaminierte Gegenstände und Trinkwasser. Die Rolle von Moskitos als mechanische Vektoren wurde frühzeitig bewiesen, wobei das Virus im Stechrüssel nachgewiesen wurde (Kligler und Aschner, 1929). Eine Aufzählung von 13 Moskito–Arten, denen die Fähigkeit zur Übertragung von Vogelpocken nachgewiesen wurde, findet sich bei DaMassa (1966). Die Möglichkeit der Übertragung durch Milben wurde vermutet (Dorn, 1971; Shirinov et al., 1972). In *Ornithonyssus sylvarium* wurde FPV vier Tage nach Kontakt mit FPV–erkrankten Tieren nachgewiesen, jedoch gelang keine Übertragung von den Milben auf gesunde Hühner (Brody, 1936). Auch in neueren Untersuchungen konnte FPV–DNA in Vogelmilben, die in mit FPV infizierten Geflügelbeständen gesammelt worden waren, nachgewiesen werden (Hoffmann, 2005).

### 2.1.5 Pathogenese

Als Eintrittspforte in den Körper dienen kleinste Hautwunden, Insektenstiche und die Tröpfcheninfektion von Kopf- und Augenschleimhäuten.

Nach intrakutaner Infektion kommt es an der Infektionsstelle zu einer örtlichen Virusvermehrung und etwa drei Tagen später zu einer ersten Virämie mit anschließender Vermehrung in den primär affinen Organen Lunge, Leber und Knochenmark (Francis, 1956; Mayr und Wittmann, 1957; Singh et al., 1987). Etwa ab dem sechsten Tag p. i. geht von den primär affinen Organen eine zweite Virämie aus und führt zur Generalisation mit Virusvermehrung in weiteren inneren Organen wie Niere, Milz und Herz und den zunächst nicht betroffenen Hautregionen. Die Ausscheidung erfolgt über die Niere mit dem Harn und hauptsächlich in den getrockneten, abfallenden Pockenkrusten (Mayr und Wittmann, 1957; Singh et al., 1987; Mayr, 1992).

Andere Autoren stellten nach perkutaner Infektion keine Generalisierung fest und verwiesen deswegen auf die Möglichkeit einer Infektion direkt in die Blutbahn, z. B. durch Insektenstiche (Minbay und Kreier, 1973). Nach experimenteller intravenöser Infektion wurde das Virus in Thymus, Milz, Leber, Niere und Lunge bis ca. zehn Tage p. i. und in der Haut des Kammes über einen Monat nachgewiesen. Das Virus oder histologische Anzeichen einer Infektion konnten hingegen nicht in Gehirn, Pankreas und Darm festgestellt werden. Eine Virämie trat zwischen dem dritten und siebten Tag auf (Minbay und Kreier, 1973; Tanizaki et al., 1989).

Nach intratrachealer, oraler oder Infektion in den kaudalen thorakalen Luftsack repliziert das Virus zunächst in der Lunge (Singh et al., 1987; Tanizaki et al., 1987; Mockett et al., 1990). Nach intratrachealer Infektion wurde anschließend auch eine Generalisierung, ähnlich der nach perkutaner Infektion, nachgewiesen (Singh et al., 1987). Nach oraler Infektion und nach Infektion in den kaudalen thorakalen Luftsack erfolgte nur die Replikation in der Lunge und keine Generalisierung (Mockett et al., 1990). Die Vermehrung in der Lunge läßt auch eine Ausscheidung mit dem Atem möglich erscheinen (Mockett et al., 1990).

Verschiedene Hinweise lassen auf die Möglichkeit einer latenten, subklinischen Infektion und der Reaktivierung unter Streß schließen. So wurde FPV von Hühnern mit nur unauffälligen Hautläsionen aus einem Bestand, in dem seit acht Jahren kein Pockenausbruch mehr verzeichnet wurde, isoliert (Tripathy et al., 1974). Ebenso wurde das Virus aus Moskitos in der Nähe nicht erkrankter und nicht geimpfter Bestände nachgewiesen, so daß gefolgert wurde, daß die Insekten das Virus von latent infizierten Tieren aufgenommen hatten (Sanchez et al., 1976). Außerdem konnte FPV noch nach 13 Monaten aus inneren Organen mit FPV infizierter Hühner reisoliert werden (Siebert, zitiert nach Manninger, 1938).



### 2.1.6 Klinisches und pathologisches Bild

Das Krankheitsbild läßt sich beim Wirtschaftsgeflügel in drei verschiedene Formen einteilen: die kutane Form (Hautform), die diphtheroide Form (Schleimhautform) und die Mischform (Mayr, 1992). Bei allen drei Formen sind gestäubtes Federkleid, Mattigkeit, verminderte Futteraufnahme, verminderte Gewichtszunahme bzw. Legeleistungsabfall zu beobachten.

Bei der Hautform treten nach einer Inkubationszeit von vier bis zwanzig Tagen an den unbefiederten Stellen des Körpers, also vor allem am Kopf und seinen Anhängen, bevorzugt in Schnabel- und Augenwinkel, Hautveränderungen auf. Sie entwickeln sich von kleinen, rötlichen, leicht erhabenen Fleckchen über kleine Papeln mit perlmuttartigem Glanz zu großen, borkigen, braunen Krusten, die seropurulent entzündetes Gewebe bedecken (Pocken). Die Krusten fallen nach ein oder zwei Wochen, meist unter Hinterlassung einer Narbe ab (Mayr und Wittmann, 1957). Die Mortalität ist bei dieser Krankheitsform gering (Mayr, 1992; Tripathy und Reed, 2003).

Für die Schleimhautform sind gelbliche, dicke, diphtheroide Beläge auf den Schleimhäuten im oberen Atmungs- und Verdauungstrakt typisch. Der Verlauf kann durch bakterielle Sekundärinfektionen und die Ausbreitung in die Sinus kompliziert werden. Da die Beläge die Nahrungsaufnahme und Atmung vor allem bei Jungtieren behindern, geht diese Krankheitsform meist mit hoher Mortalität einher (Mayr, 1992; Tripathy und Reed, 2003).

Häufig tritt die Mischform mit Läsionen an Haut und Schleimhäuten auf. Auch diese Form kann mit hoher Mortalität einhergehen (Mayr, 1992; Tripathy und Reed, 2003).

Als weitere, atypische Symptome einer FPV-Infektion wurden u. a. Knötchenartige Verdickungen der befiederten Haut des Rückens (Back et al., 1995), diphtheroide Entzündung der inneren Augenlider (Nyaga et al., 1979; Eleazer et al., 1983), hämorrhagische Pocken auf der Haut (Fatunmbi und Reed, 1996a; b) und, nach künstlicher Besamung von Puten, proliferative Entzündungen der Kloake, der Kloakenschleimhaut und des Eileiters (Metz et al., 1985) beschrieben. Ebenso wurde das FPV als mögliche Ursache des aviären Keratoacanthoms, das durch kraterförmige Geschwüre mit erhöhten Rändern gekennzeichnet ist, genannt (Fallavena et al., 2002).

Makroskopisch sichtbare Veränderungen der inneren Organe sind selten. Neben einer unspezifischen Milzvergrößerung wurden kleine weiße Knötchen auf Leber und Niere beobachtet (Mayr und Wittmann, 1957; Minbay und Kreier, 1973; Tanizaki et al., 1989).

Histologisch sind bei allen Formen eine Hyperplasie des betroffenen Epithels, Vergrößerung der Epithelzellen, sudanophile und eosinophile Einschlusskörperchen (Bollingerkörperchen) im Zytoplasma und Infiltrationen mit Entzündungszellen zu sehen (Mayr, 1992; Tripathy und Reed, 2003).

## 2.1.7 Diagnose durch direkten Nachweis und Isolierung

### 2.1.7.1 Direkter Nachweis

Der direkte Nachweis einer Infektion mit Hühnerpocken kann durch Antigennachweis mit bekannten Antikörpern, im histologischen Schnitt, im Abklatschpräparat oder elektronenmikroskopisch geführt werden.

Als serologische Nachweismethoden von FPV-Antigen kommt vor allem der Agargelpräzipitationstest (AGP) zum Einsatz (Jordan und Chubb, 1962; Woernle, 1966). Außerdem ist ein Antigen-Capture-ELISA mit monoklonalen Antikörpern beschrieben (Burck, 1999).

Im histologischen Schnitt können die Virus-factories als sog. Bollingerkörperchen sichtbar werden. Infolge ihres DNA-Gehaltes erscheinen sie nach Hämatoxilin/Eosin-Färbung eosinophil und nach Färbung mit Akridin-Orange grün (Chang und Jasty, 1970). Ebenso lassen sie sich – im Gegensatz zu den Pockenviren der Säuger – aufgrund ihres Lipidgehaltes mit Fettfarbstoffen wie z. B. Sudanrot anfärben (Randall und Gafford, 1962; Mayr, 1963). Immunhistochemisch läßt sich ihr Gehalt an Pockenantigen nachweisen (Tripathy et al., 1973). Außerdem lassen sich die Einschlusskörperchen im Abklatschpräparat von Pockeneffloreszenzen mit der Färbung nach Giménez nachweisen (Tripathy und Hanson, 1976). Nicht jede FPV-Infektion ist jedoch notwendigerweise durch das Auftreten von Einschlusskörperchen gekennzeichnet, so daß bei ihrem Fehlen der Verdacht auf FPV nicht ausgeräumt ist (Bickford et al., 1971; Tripathy et al., 1974).

Elektronenmikroskopisch lassen sich Geflügelpocken-Virionen im Ultradünnschnitt wegen ihrer Größe und Morphologie leicht identifizieren (Tripathy und Reed, 2003).

Der Nachweis von Virus-DNA mittels PCR wird zur routinemäßigen schnellen und sicheren Diagnose einer FPV-Infektion herangezogen (Lee und Lee, 1997; Fallavena et al., 2002; Lüscho et al., 2004).

### 2.1.7.2 Isolierung

Die Isolierung des FPV aus betroffenen Geweben ist auf der CAM embryonierter Hühnereier und in der Zellkultur möglich.

Die CAM embryonierter spezifisch pathogenfreier (SPF) Hühnereier wird zu diesem Zweck zwischen dem neunten und zwölften Bruttag mit dem Organhomogenat infiziert und dann weitere fünf bis sieben Tage bebrütet (Tripathy und Reed, 1998). Nach drei bis vier Tagen entstehen ca. 5 mm breite, kompakte Proliferationsherde, die zunächst ohne zentrale Nekrose von mehreren trüben Ringzonen umgeben sind. Ab dem fünften Tag bilden sich

ebenfalls von einer Ringzone umgebene, kleinere und flachere Sekundärherde (Mayr und Wittmann, 1956).

Zur Isolierung eignen sich auch verschiedene primäre Zellkulturen wie u. a. Hühner-Embryo-Fibroblasten (HEF) (Köhler und Schwöbel, 1956), Enten-Embryo-Fibroblasten (Gelenczei und Lasher, 1968) oder Hühner-Embryo-Hautzellen (Silim et al., 1982) und permanente aviäre Zelllinien wie QT-35 (Wachtel-Fibrosarkomzellen) (Schnitzlein et al., 1988a) und LMH (Hühner-Leberkarzinomzellen) (Fatunmbi et al., 1995). Erfolglos blieben Versuche der Isolierung auf Säugetierzellen (Mayr, 1992; Hashavya et al., 2002).

Abhängig von der Infektionsdosis, der Dicke der Zellkulturen (ein- oder mehrschichtiger Zellrasen) und dem Stamm kann der CPE ab dem zweiten Tag p. i. auftreten. Der CPE ist zweiphasig: Zunächst kugeln sich die Zellen ab, ohne sich aus dem Zellverband zu lösen, später lysieren sie (Mayr und Kalcher, 1960; Chang und Jasty, 1970). In der Anzucht kann ein CPE völlig fehlen (Morita, 1973b), jedoch tritt dieser mit der Adaptation an die Zellkultur früher und in größerem Ausmaße auf (Mayr und Kalcher, 1960). In Zellkulturen unter einem Agarose-Overlay sind etwa vier Tage p. i. kleine bis zu 6 – 9 mm große Plaques mit einem aufgehellten Zentrum und einer dunkleren peripheren Zone sichtbar (Mayr, 1963; Morita, 1973b).

Nach der Isolierung erfolgt eine sichere Identifizierung wie unter 2.1.7.1 beschrieben. Ferner ist die Gewinnung viraler DNA aus infizierten Zellkulturen möglich. Der Nachweis erfolgt in diesem Fall entweder durch den Einsatz markierter Oligonukleotide als spezifische Sonden (Schnitzlein et al., 1988b; Fatunmbi et al., 1995) oder durch Restriktionsenzymanalyse (REA), die ein charakteristisches Schnittmuster zeigt, das eine sichere Identifizierung erlaubt (Schnitzlein et al., 1988a; Ghildyal et al., 1989; Mishra und Mallick, 1996c).

### **2.1.8 Immunreaktion und Nachweis von Antikörpern**

Über die Grundlagen der spezifischen Immunantwort gegen eine Infektion mit Hühnerpocken ist wenig bekannt. Generell erfolgt sie durch humorale und zelluläre Mechanismen. Dabei hat die zelluläre Immunantwort die größere Bedeutung, wie anhand thymektomierter und burssektomierter Hühnerküken gezeigt wurde (Morita, 1973a). Das Vorhandensein neutralisierender Antikörper hat keinen Einfluß auf den Krankheitsverlauf (Turner, 1971; Morita, 1973a) und eine belastbare Immunität kann auch ohne nachweisbare zirkulierende Antikörper vorliegen (Wittmann und Mayr, 1960). Andere Untersuchungen zeigen jedoch einen Zusammenhang zwischen Antikörperbildung und Immunität (Bosgra und Roerink, 1962; Ariyoshi et al., 2003). Ebenso ist die erfolgreiche passive Immunisierung mit Hyperimmunserum beschrieben (Findlay, 1928).

### 2.1.8.1 Humorale Immunantwort und Nachweis von Antikörpern

#### 2.1.8.1.1 *Nachweis neutralisierender Antikörper*

Für den Nachweis neutralisierender Antikörper wurden verschiedene Methoden angewandt. Der erste Nachweis gelang durch die Verminderung der Infektiosität von Virusmaterial für Hühner nach Inokulation mit Hyperimmunserum (Dalling et al., 1929). Der Nachweis *in vitro* gelang zuerst durch den Neutralisationstest auf der CAM embryonierter Hühnereier. Angewandt wurden die  $\alpha$ -Methode (Wittmann und Mayr, 1960) und die  $\beta$ -Methode mit dem Endpunkt-Kriterium einer um 50% gegenüber der Negativkontrolle verminderten Anzahl von Pocken auf der CAM (Tsubuhara et al., 1960). Als weiteres Verfahren wurde die Plaquereduktion auf HEF unter einem Agarose-Overlay angewendet (Morita, 1973c). In neueren Untersuchungen erfolgte der Nachweis mittels Neutralisation ( $\beta$ -Methode) auf HEF (Buscaglia et al., 1985; Nagy et al., 1990; Mishra und Mallick, 1996a).

Nach intrakutaner Infektion bzw. Vakzinierung gelang der Nachweis neutralisierender Antikörper unabhängig von dem Testsystem ab der zweiten Woche bis mehrere Wochen p. i. (Tsubuhara et al., 1960; Wittmann und Mayr, 1960; Nagy et al., 1990). Ein höchster Titer wurde zwischen der dritten und vierten Woche p. i. erreicht (Bosgra und Roerink, 1962; Mishra und Mallick, 1996a). Unterschiede in der Immunantwort auf verschiedene Stämme waren vorhanden, jedoch nur geringfügig (Wittmann und Mayr, 1960; Mishra und Mallick, 1996a). Ferner wurde der Übergang maternaler neutralisierender Antikörper von geimpften Elterntier-Hennen auf ihre Küken gezeigt (Bosgra und Roerink, 1962).

#### 2.1.8.1.2 *Nachweis präzipitierender Antikörper*

Nach übereinstimmender Aussage aller Autoren, die sich mit der Thematik befasst haben, sind präzipitierende Antikörper im AGP ab etwa der zweiten bis dritten Woche p. i. und danach für drei bis vier Wochen nachweisbar (Wittmann, 1958; Tsubuhara und Kato, 1960; Wittmann und Mayr, 1960; Dorn und Kronenthaler, 1965; Tripathy et al., 1970).

Unterschiedliche Ergebnisse liegen hinsichtlich des Anteils der Tiere vor, bei denen nach Infektion mit FPV bzw. nach Impfung gegen FPV präzipitierende Antikörper nachgewiesen wurden. Sie reichen von 16 von 97 experimentell infizierten Hühnern (Wittmann, 1958), über 51 von 150 Seren einer pockengeimpften Herde (Tadese et al., 2003) bis zu acht von zwölf (Dorn und Kronenthaler, 1965) bzw. vier von sechs experimentell infizierten Tieren (Tripathy et al., 1970).

Ein höherer Anteil positiv reagierender Seren ergab sich bei älteren Hühnern und nach experimenteller Infektion mit einem stark pathogenen FPV-Stamm (Wittmann, 1958; Wittmann und Mayr, 1960).

### 2.1.8.1.3 Nachweis von Antikörpern im ELISA

Der Nachweis von Antikörpern gegen FPV mittels ELISA erfolgt meist durch das nicht kompetitive Verfahren mit an das Trägermaterial absorbiertem FPV-Antigen, an das die gesuchten Antikörper binden, an die wiederum markierte, gegen Hühnerantikörper gerichtete Antikörper binden.

Buscaglia et al. (1985) wiesen mittels ELISA nach Impfung einer Herde bei 26 von 33 untersuchten Seren und nach Challenge bei 29 von 33 Seren Antikörper gegen FPV nach. Allerdings reagierten in diesem ELISA auch 18 von 66 Seren, die 3,5 Wochen vor der Impfung genommen wurden, positiv. Die Autoren erklärten dies mit einer subklinisch verlaufenen Pockeninfektion.

Andere Ergebnisse zeigen eine Woche nach intrakutaner FPV-Infektion eine einsetzende Antikörperbildung mit einem Maximum etwa drei Wochen p. i. Eine zweite Infektion sechs Wochen nach der ersten induzierte wesentlich höhere Antikörper-Titer (Mockett et al., 1987).

In einem ähnlichen Versuch wurden diese Ergebnisse bestätigt (Iritani und Sawaguchi, 1994). Auch hier wurde ein maximaler Titer FPV-spezifischer Antikörper nach drei Wochen p. i. erreicht. Durch den direkt darauffolgenden Challenge konnten jedoch keine höheren Titer erzielt werden. Bei dem Vergleich unterschiedlicher FPV-Stämme wurden Unterschiede im Ausmaß der Induktion von Antikörpern gegen FPV festgestellt.

Werner (1990) wies 26 Tage nach der Impfung mit einer kommerziellen Vakzine bei 20 von 40 Tieren Antikörper gegen FPV nach. Nach 72 Tagen waren noch 14 von 36 Seren positiv.

In weiteren Versuchen wurden schon eine Woche nach Vakzinierung geringe Antikörper-Titer nachgewiesen, und die Antikörperbildung erreichte in der vierten Woche p. i. ein Maximum. Die Antikörper persistierten über die sechste Woche hinaus. Ein Vergleich der zur Impfung bzw. Infektion verwendeten Stämme ergab keine Unterschiede (Nagy et al., 1990; Mishra und Mallick, 1996a).

Bei dem Vergleich der Immunogenität verschiener Pockenisolat wiesen zwölf Tage nach intrakutaner Infektion, abhängig vom zur Infektion verwendeten Stamm, zwischen zwei und neun von neun Tieren Antikörper auf. Nach intrakutanem Challenge reagierten die Seren aller Tiere aller Gruppen positiv (Singh et al., 2000).

Isa et al. (2002) entwickelten einen Blocking-ELISA, bei dem monoklonale Antikörper von der Maus mit den gesuchten Antikörpern um das Antigen konkurrieren und durch markierte, gegen Mausantikörper gerichtete Antikörper nachgewiesen werden. Mittels dieses ELISAs wurden 184 Seren von Beständen aus Gambia, von denen vier positiv reagierten, untersucht. Der Infektionsstatus der Tiere war nicht bekannt (Isa et al., 2002).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß Antikörper gegen FPV im ELISA frühestens eine Woche und sicher zwei Wochen nach einer Infektion bzw. Vakzinierung bis mehrere Monate später nachweisbar sind und ihre Titer um die dritte Woche einen Höhepunkt erreichen. Da in vielen Arbeiten nur Mittelwerte der Titer bzw. optischen Dichte angegeben waren (Mockett et al., 1987; Nagy et al., 1990; Iritani und Sawaguchi, 1994; Mishra und Mallick, 1996a), blieb in diesen Untersuchungen der Anteil der positiv reagierenden Tiere offen. Die Ergebnisse von Buscaglia et al. (1985) und Werner (1990) legen aber nahe, daß nur gut die Hälfte der infizierten Tiere Antikörper bilden. Der Anteil seropositiver Tiere bzw. der mittlere Titer kann dabei auch vom FPV–Stamm, der zur Infektion genutzt wurde, abhängen (Iritani und Sawaguchi, 1994; Singh et al., 2000).

#### *2.1.8.1.4 Nachweis von Antikörpern mit weiteren Methoden*

Mit direkter und indirekter Komplementbindungsreaktion waren Antikörper gegen FPV in Abhängigkeit von dem zur Infektion verwendeten Stamm ab etwa zwei Wochen p. i. bis über die siebte Woche p. i. hinaus feststellbar (Tsubuhara et al., 1960).

Mittels passiver Hämagglutination wurden Antikörper bei vier von sechs Tieren nach intrakutaner Infektion ab dem siebten Tag p. i. bis über die 14te Woche hinaus nachgewiesen (Tripathy et al., 1970). Zeitpunkt und Dauer des Auftretens von Antikörpern können sowohl von dem zur Infektion benutzten FPV–Stamm als auch von dem Alter der infizierten Tiere abhängen (Baxi und Oberoi, 1999).

Bei Anwendung des indirekten Immunfluoreszenz Tests (IIFT) zum Nachweis von Antikörpern waren 14 und 28 Tage nach intrakutaner Vakzinierung bei allen untersuchten Tieren Antikörper gegen FPV nachweisbar (Ariyoshi et al., 2003).

Um die Sensitivität des AGP zu steigern wurde ein Agargel Enzym Assay mit einem Antigen–Mix aus Hühner–, Puten– und Taubenpocken eingesetzt. Bei diesem Verfahren wurde der Boden einer Petrischale mit dem Antigen–Mix beschichtet und mit Agarose bedeckt. Die gesuchten Antikörper diffundierten aus Zellulose–Scheibchen, die in die zu untersuchenden Seren getränkt worden waren, durch die Agarose und banden an den Antigen–Mix. Der Nachweis erfolgte nach Entfernung des Agars mit enzymatisch markierten, gegen Hühnerantikörper gerichteten Antikörpern. Mit dieser Methode konnten bei 96 von 150 Seren, die zwei Wochen nach Impfung mit einer kommerziellen Vakzine gewonnen worden waren, FPV–spezifische Antikörper nachgewiesen werden (Tadese et al., 2003).

#### 2.1.8.2 Aktivierung des Komplement–Systems

Neben der spezifischen humoralen Immunantwort spielt vor allem in der frühen Phase der FPV–Infektion die Anlagerung des C3–Proteins des Komplementsystems an mit FPV infizierte Zellen und die darauf folgende Aktivierung des Komplementsystems über den

antikörperunabhängigen alternativen Weg eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr (Ohta et al., 1983). Eine selektive Hemmung des alternativen Wegs führt zu einer verstärkten Virusvermehrung und zu verstärkten klinischen Symptomen (Ohta et al., 1986).

### 2.1.8.3 Zelluläre Immunantwort

Die wichtige Rolle der zellulären Immunantwort ist daran ablesbar, daß sich eine passive Immunität gegen FPV mit Milzzellen infizierter Tiere übertragen läßt (Turner, 1971). Andere Nachweismethoden sind der Leukozyten–Migrations–Inhibitions–Test, der Lymphozyten–Proliferations–Test und der Lymphozyten–Blastogenese–Test.

Der antigenspezifische Leukozyten–Migrations–Inhibitions–Test beruht auf einer Inhibierung der Migration von Leukozyten FPV–infizierter Tiere durch die Anwesenheit von FPV–Antigen. In diesem Test ist eine zelluläre Immunantwort bereits fünf Tage p. i. feststellbar, die über die sechste Woche hinaus persistiert (Morita, 1973a; Dharsana und Spradbrow, 1985; Nagy et al., 1990; Mishra und Mallick, 1996a).

Im ebenfalls antigenspezifischen Lymphozyten–Proliferations–Test wurden Lymphozyten FPV–infizierter Tiere durch die Anwesenheit von FPV–Antigen zur Proliferation angeregt. Mittels dieses Testes war eine Immunantwort zwei bis vier Wochen nach der Infektion nachweisbar (Singh und Tripathy, 2003).

Eine Infektion mit FPV aktiviert auch unspezifisch das zelluläre Immunsystem. Im nicht antigenspezifischen Lymphozyten–Blastogenese–Test waren Leukozyten FPV–infizierter Tiere schon eine Woche p. i. leichter durch ein Mitogen stimulierbar (Baxi und Oberoi, 1999). Außerdem unterdrückten Zellkulturen aus Peritoneal–Makrophagen FPV–infizierter Tiere, im Gegensatz zu denen nicht infizierter Tiere, *in vitro* nicht nur die Vermehrung von FPV, sondern auch die des aviären Paramyxovirus 1 (Virus der Newcastle–Disease) und von *Salmonella gallinarum* (Pathak et al., 1974). Ferner wirkten Überstände von Leukozyten–Kulturen pocken–infizierter Tiere wachstumsstimulierend auf Kulturen von peripheren Blut–mononukleären Zellen (PBMC) von Tieren, die noch keinen Kontakt mit FPV hatten. Der verantwortliche Botenstoff wurde noch nicht mit Sicherheit identifiziert (Singh und Tripathy, 2003).

#### 2.1.8.4 Beeinflussung des Immunsystems durch eine Infektion mit FPV

Pockenviren im Allgemeinen kodieren eine Reihe für die Replikation nicht-essentieller Proteine, die durch verschiedene Mechanismen eine effektive Antwort des Immunsystems hemmen (Smith et al., 1997). Für das FPV im Besonderen wurde bisher die Bildung eines interferon- $\gamma$ -bindenden Proteins nachgewiesen (Puehler et al., 2003). Außerdem wurden bei der Sequenzierung des FPV-Genoms eine Vielzahl ORFs identifiziert, deren Sequenzhomologien mit bekannten Proteinen immunmodulatorische Funktionen erwarten lassen (Afonso et al., 2000).

#### **2.1.9 Prophylaxe**

Bislang stehen keine gegen FPV wirksamen antiviralen Therapeutika zur Verfügung, obwohl eine gegen FPV gerichtete Wirkung verschiedener pflanzlicher Inhaltsstoffe, wie z. B. von Extrakten aus *Guira senegalensis*, *in vitro* gezeigt wurde (Reddy und Sethi, 1974; Lamien et al., 2005a; Lamien et al., 2005b; Lamien et al., 2005c). Deswegen ist die Vakzinierung neben guten Hygienebedingungen die einzige wirksame Maßnahme zur Bekämpfung der Geflügelpocken.

Seit über einem halben Jahrhundert wird gegen Geflügelpocken geimpft. Generell wird dabei homologen Impfstoffen gegen Geflügelpocken ein besseres Immunisierungsvermögen als heterologen Impfstoffen zugeschrieben (Beaudette, 1949; Seeger und Price, 1956; Bengelsdorff und Schneider, 1963). Als heterologe Impfstoffe wurden Taubenpockenvirus oder Putenpockenvirus eingesetzt (Mayr, 1959; Bamberger und Szakmáry, 1963). Der Einsatz von Wachtel- und Papageienpocken als heterologe Impfstoffe brachte bei Hühnern keine zufriedenstellenden Ergebnisse (Winterfield und Reed, 1985; Fatunmbi und Reed, 1996b). Als homologe Impfstoffe wurden schwach-pathogene oder durch Passagierung in der Taube, im embryonierten Hühnerei oder in der Zellkultur attenuierte FPV-Stämme eingesetzt (Mayr, 1959; Mayr und Malicki, 1966).

Der ursprünglich hoch virulente Stamm HP 1 behielt nach 86 Passagen im embryonierten Hühnerei die Virulenz bei intrakutaner, intramuskulärer, intracerebraler und intravenöser Infektion. Nach 110 weiteren Passagen in der Zellkultur verlor er die Virulenz bei intrakutaner Infektion, nach gut 300 Passagen die Virulenz bei intramuskulärer, intracerebraler und intravenöser Infektion zwei Wochen alter Küken und zwölf Wochen alter Hühner. Auch nach 350 Passagen behielt der Stamm eine geringfügige Virulenz für Eintagsküken nach intravenöser Infektion (Tabelle 2).



**Tabelle 2: Verlauf der Virulenzabschwächung des FPV-Stammes HP 1 durch Dauerpassagen auf HEF nach Mayr und Malicki (1966)**

Passage	Prozentsatz der Generalisierung im Eintagsküken nach Impfung				Prozentsatz der Generalisierung im zwei Wochen alten Küken nach Impfung				Prozentsatz der Generalisierung im 12 Wochen alten Huhn nach Impfung			
	i.k. <sup>1</sup>	i.m. <sup>2</sup>	i.c. <sup>3</sup>	i.v. <sup>4</sup>	i.k.	i.m.	i.c.	i.v.	i.k.	i.m.	i.c.	i.v.
Ausgangsmaterial (86. Passage auf CAM)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
110	0	10	50	100	0	0	60	90	0	75	50	75
304	0	74	25	70	0	0	0	0	0	0	0	0
350	0	0	0	15	0	0	0	0	0	0	0	0

<sup>1</sup>intrakutan, <sup>2</sup>intramuskulär, <sup>3</sup>intracerebral, <sup>4</sup>intravenös

Wegen des Auftretens sogenannter „varianter Stämme“ in den USA, gegen die die zugelassenen und eingesetzten Impfstoffe nur einen unzureichenden Schutz bieten, wurden in den letzten Jahren solche varianten Stämme mit guten Ergebnissen als mögliche Impfstämme erprobt (Fatumbi und Reed, 1996a; Singh et al., 2000).

Die Applikation erfolgt analog der „Variolation“ des Menschen intrakutan entweder mittels Durchstechen der Flügelhaut mit einer in die Vakzine getauchten Impfdoppelnadel (Wing–Web–Methode) oder durch Verreiben der Vakzine in die Federfollikel an Brust oder Oberschenkel nach Ausreißen einiger Federn (Federfollikelmethode). Letztere Methode kann zur Steigerung des Impferfolges beitragen, ist jedoch in der Durchführung umständlicher (Mayr und Malicki, 1966; Mayr, 1992).

Um den Arbeitsaufwand, der mit der Impfung jedes einzelnen Tieres verbunden ist, zu umgehen, wurden wiederholt Versuche unternommen, die Impfstämme peroral zu verabreichen. Die Ergebnisse waren durchweg nicht befriedigend, bzw. es wurde zur Ausbildung einer belastbaren Immunität mindestens die 100fache Menge Impfvirus im Vergleich zur intrakutanen Impfung benötigt (Mayr et al., 1971; Gerberman, 1974; Sarma und Sharma, 1988; Jieyuan und Spradbrow, 1992), oder es war eine Boosterung erforderlich (Ariyoshi et al., 2003). Impfversuche mit Aerosol ergaben vergleichbare Resultate (Francis, 1956; Mockett et al., 1990; Nagy et al., 1990; Deuter et al., 1991).

Ebenso wurde die subkutane Applikation allein (Springer und Truman, 1981) oder in Kombination mit anderen Impfungen, z. B. mit dem routinemäßig subkutan am ersten Lebenstag verabreichten Lebendimpfstoff gegen das Gallide Herpesvirus 2 – Virus der Marek’schen Krankheit (Siccardi, 1975) oder mit einer Lebendvakzine gegen das Aviäre Paramyxovirus 1 (Virus der Newcastle–Disease) (Peleg et al., 1993), erprobt. Die subkutane

Impfung am ersten Lebenstag konnte sich jedoch nicht durchsetzen, da negative Effekte auf die Gewichtszunahme und Hinweise auf eine Immunsuppression festgestellt wurden (Springer und Truman, 1981).

Die Impfung sollte wegen der generell erhöhten Krankheitsanfälligkeit nicht bei sehr jungen Tieren, aber spätestens einen Monat vor Legebeginn erfolgen (Beaudette, 1949; Hafez, 2002). Die zur erfolgreichen Vakzinierung mittels der Wing–Web–Methode mindestens benötigte Konzentration an Virus liegt bei  $10^4$  EID<sub>50</sub>/ml (Mayr, 1959; Winterfield und Hitchner, 1965; Gelenczei und Lasher, 1968). Bei erfolgreicher Impfung bildet sich etwa eine Woche später die sog. Impfpocke aus. Mindestens 10% des Bestandes sollten daraufhin untersucht werden, um den Erfolg der Impfung festzustellen (Hafez, 2002; Tripathy und Reed, 2003).

Über die Notimpfung nach dem Auftreten erster klinischer Symptome im Bestand liegen wenige gesicherte Erkenntnisse vor. Sie wird einerseits als „Mittel der Wahl“ (Hartwig, 1962), andererseits als kontraindiziert (Mayr, 1992) bezeichnet. Dokumentiert ist ihr Erfolg bei der Impfung von Tieren, die in demselben Betrieb, auf dem Geflügelpocken aufgetreten waren, jedoch räumlich getrennt voneinander gehalten wurden (Jodas und Hafez, 2003).

Der einzige z. Zt. in Deutschland zugelassene Impfstoff gegen Geflügelpocken enthält den attenuierten FPV–Stamm HP–B in einer Konzentration von mindestens  $10^2$  EID<sub>50</sub>/Dosis. Die Applikation sollte laut Angaben der Hersteller zwischen der siebten und 14. Lebenswoche per Wing–Web–Methode erfolgen.

### **2.1.10 Rechtliche Regelungen**

2.2 Laut der Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten (Anonym, 2001) sind Tierärzte und Leiter öffentlicher oder privater Untersuchungsstellen verpflichtet, das Auftreten einer Avipoxinfektion bei Hühnern, Puten, Tauben, Gänsen oder Enten der zuständigen Behörde zu melden.

Von der OIE werden Geflügelpocken als eine Krankheit von „sozio–ökonomischer Bedeutung“ und als „bedeutend im internationalen Handel mit Tieren und Tierprodukten“ angesehen. Eine Meldung der Anzahl der aufgetretenen Fälle von den Mitgliedstaaten an die OIE hat mindestens jährlich zu erfolgen (Anonym, 2005b).

## 2.2 Retikuloendotheliose

### 2.2.1 Geschichte

Erstmals wurde ein Retikuloendotheliose Virus 1957 von einem Truthahn aus einem Bestand in Kansas isoliert (Robinson und Twiehaus, 1974). Im Herkunftsbestand herrschten eine erhöhte Mortalität und lymphoider Leukose ähnliche Symptome. Da bei den ersten Tierpassagen jedoch eine veränderte Symptomatik auftrat, blieben die Beobachtungen zunächst unveröffentlicht. Die erste Veröffentlichung über das als „Lymphomatose Virus Stamm T“ bezeichnete Virus mit Angaben über die Symptomatik und die experimentelle Übertragung stammt aus dem Jahre 1964 (Sevoian et al., 1964a).

Zwei Jahre später wurden antigenetische Unterschiede zu verschiedenen aviären Leukose-Viren festgestellt (Theilen et al., 1966). Außerdem wurden elektronenmikroskopisch morphologische Unterschiede zwischen dem untersuchten Virus und den übrigen aviären Leukoseviren gezeigt und die entarteten Zellen als Zellen des retikulohistozytären Systems identifiziert (Zeigel et al., 1966). In diesen beiden Publikationen wurde auch erstmals der Begriff „Retikuloendotheliose-Virus“ gebraucht.

1971 wurde festgestellt, daß REV und die aviären Leukose Viren unterschiedliche Massen und Dichten haben, und REV nicht das für die Aviären Leukose Viren typische gruppenspezifische Antigen besitzt (Maldonado und Bose, 1971). 1973 wurde die antigenetische (Purchase et al., 1973) und genetische (Kang und Temin, 1973) Ähnlichkeit bisher unklassifizierter Virus-Isolate, nämlich des 1958 isolierten Trager Duck Spleen Necrosis Virus (SNV) (Trager, 1959), des 1969 isolierten Chicken Syncytial Virus (CSV) (Cook, 1969) und des 1946 erstmals beschriebenen (Dearborn, 1946) und 1972 charakterisierten Duck Infectious Anaemia Virus (Ludford et al., 1972) mit Stamm T gezeigt und somit die Existenz einer Gruppe der Retikuloendotheliose-Viren festgestellt (Purchase et al., 1973).

1979 wurde das Helfervirus REV A vom replikationsdefektiven und onkogenen REV T isoliert (Hoelzer et al., 1979).

### 2.2.2 Das Retikuloendotheliose-Virus

#### 2.2.2.1 Taxonomische Einordnung

Da die Retikuloendotheliose-Viren morphologisch (Kang et al., 1975; Moelling et al., 1975), antigenetisch (Barbacid et al., 1979; Charman et al., 1979; Bauer und Temin, 1980) und genetisch (Hunter et al., 1978; Rice et al., 1981) mehr Gemeinsamkeiten mit bestimmten von Säugetieren isolierten Retroviren als mit den aviären Leukoseviren aufweisen, werden

sie innerhalb der Familie Retroviridae in das Genus Gammaretrovirus („Säugetier Typ C Retrovirus“) eingeordnet (Coffin et al., 2000).

Alle bisher bekannten REVs gehören einer einzigen Serogruppe an (Purchase et al., 1973). In ihr können durch geringe Unterschiede in der Kreuzneutralisation und verschiedene Reaktivität mit monoklonalen Antikörpern drei Subtypen unterschieden werden. Namensgebender Stamm der Gruppe 1 ist REV im engeren Sinne mit Stamm A und Stamm T, von Gruppe 2 das SNV und von Gruppe 3 das CSV (Chen et al., 1987). CSV scheint der am häufigsten vorkommende Serosubtyp zu sein (Chen et al., 1987; Davidson et al., 1996). Mit Ausnahme des REV T sind alle REV replikationskompetent.

#### 2.2.2.2 Morphologie

Retikuloendotheliose–Viren weisen die für alle Retroviren charakteristische, annähernd runde Form mit einem mehrschaligem Aufbau auf. Der Durchmesser beträgt etwa 100–110 nm. Äußere Hülle ist eine Lipidmembran, aus der ca. 6 nm lange Fortsätze (Spikes), die von den Envelope–Proteinen gebildet werden, hervorragen. Nach Innen folgt eine elektronendurchlässige Schicht aus Matrixproteinen und das elektronendichte Core. Das Core besteht aus dem Kapsid, das die RNA umgibt (Nukleokapsid). Eine Abgrenzung gegenüber den aviären Leukoseviren ist möglich, da REV etwas größer ist und eine geringere Elektronendichte aufweist (Zeigel et al., 1966; Padgett et al., 1971; Kang et al., 1975).

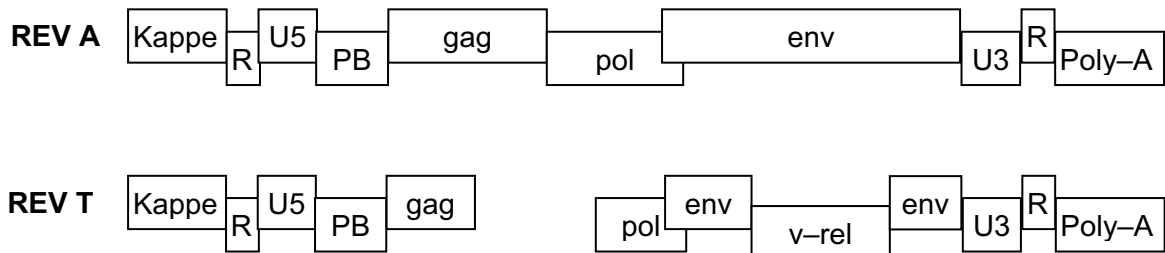
#### 2.2.2.3 Genom

Das Genom der Retikuloendotheliose–Viren besteht aus zwei Kopien eines einsträngigen, positivsinnigen RNA–Moleküls, die an ihren 5'–Enden miteinander verbunden sind (Maldonado und Bose, 1973; Bender et al., 1978). Die Größe des Genoms beträgt bei den replikationskompetenten Viren ca. 8 800 bp und bei dem replikationsdefektiven REV T 5,7 kbp (Gonda et al., 1980).

Der RNA–Strang der nicht replikationsdefektiven REV ist am 5'–Ende durch einen 7–Methylguanosin–Rest modifiziert (Capping) (Coffin, 1990). Auf dem RNA–Strang liegen, wie bei allen nicht replikationsdefektiven Retroviren, vom 5'–Ende beginnend die R–Sequenz, die U5–Region, die Primer–Bindungsstelle (PB), die genetische Information für die inneren Strukturproteine (gag), die reverse Transkriptase (pol) und die Hüllenglykoproteine (env) (Wang und Cui, 2004; Jirong und Cui, 2005). Bei den nicht replikationsdefektiven REV liegen gag und pol durch ein Stop–Kodon getrennt im selben Leserahmen (Weaver et al., 1990) und pol und env überlappen sich um 63 bp (Wilhelmsen et al., 1984). Am 3'–Ende des RNA–Stranges liegen die U3–Region und wiederum die R–Sequenz. Das 3'–Ende ist

polyadenyliert (Coffin, 1990). Aus der R-Sequenz, der U5-Region und der U3-Region entstehen bei der Bildung des DNA-Provirus die LTR (Coffin, 1990).

Das Genom des replikationsdefektiven REV T weist im gag-pol-Bereich eine Deletion von ca. 3290 bp auf, und ca. 1100 bp der env-Region sind durch das Onkogen v-rel ersetzt, das eine Homologie zu zellulärer DNA aufweist (Hu et al., 1981; Rice et al., 1982). Abbildung 2 zeigt schematisch den Aufbau des Genoms replikationskompetenter und replikationsdefektiver REV.



**Abbildung 2: Genomabbildung von REV A (stellvertretend für die replikationskompetenten REV) und dem replikationsdefektiven REV T; Kappe: 7-Methylguanosenrest; R: R-Sequenz; U5: U5-Region; PB: Primer-Bindungsstelle; gag: innere Strukturproteine; pol: reverse Transkriptase; env: Hüllenglykoproteine; v-rel: Onkogen; U5: U5-Region; R: R-Sequenz; Poly-A: Polyadenylation; nicht maßstabsgerecht**

Erst seit kurzer Zeit liegen die vollständigen Sequenzen eines REV A-Genoms aus China (Wang und Cui, 2004) sowie eines SNV-Genoms aus den USA (Jirong und Cui, 2005) vor. Außerdem wurden Abschnitte verschiedener REV-Proviren sequenziert (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Sequenzierte Abschnitte des REV-Genoms**

Stamm	Genom-Abschnitt	Referenz
REV A	5'-LTR	Filardo et al., 1994
	gag	Casella und Panganiban, 1993
	3'-ende von pol und env	Wilhelmsen et al., 1984
REV T	3'-LTR	Notani und Sauerbier, 1987
	v-rel und env	Stephens et al., 1983, Wilhelmsen et al., 1984
SNV	5'-Ende	Shimotohno et al., 1980(Shimotohno et al., 1980)
	Teil der 5'-LTR (verschiedene Variationen)	Shimotohno und Temin, 1982(Shimotohno und Temin, 1982)
	Teil der 5'-LTR und Teil von gag	O'Rear und Temin, 1982
	gag-pol-Verbindung	Weaver et al., 1990
	env	Kewalramani et al., 1992
CSV	3'-LTR	Shimotohno et al., 1980, Notani und Sauerbier, 1987
	5'-LTR	Swift et al., 1987
	3'-LTR	Swift et al., 1987

#### 2.2.2.4 Replikation

Der Replikationszyklus beginnt mit der Bindung der Virus-Envelope-Glykoproteine an einen bisher nicht identifizierten Rezeptor der Zelloberfläche, dem die Aufnahme in das Zellinnere mittels direkter Membranfusion folgt (Dornburg, 1995). Die Aufnahme in die Zelle bewirkt eine Resistenz der Zelle gegen eine Superinfektion mit Retroviren, die denselben Rezeptor benutzen. Im Falle des REV handelt es sich um verschiedene Retroviren, deren Wirte Säugetiere sind (Koo et al., 1992), jedoch nicht aviäre Leukoseviren (Bose und Levine, 1967).

Die sich anschließende reverse Transkription der einsträngigen Virus-RNA in doppelsträngige DNA, das sog. Provirus, ist ein komplexer Prozess, der noch im Kapsid stattfindet. In seinem Verlauf werden identische LTR, bestehend aus den Sequenzen U3-R-U5 an beide Enden des Provirus angehängt, der dann die folgende Anordnung aufweist: LTR-PB-gag-pol-env-LTR (Coffin, 1990).

Das Provirus wird in den Zellkern transportiert und in jeder Zelle an fünf bis zehn Stellen in das Wirtsgenom integriert (Fritsch und Temin, 1977; Keshet und Temin, 1979). Die Festlegung der Integrationsstelle erfolgt weitgehend zufällig (Coffin, 1990).

Das Provirus ist theoretisch dauerhaft integriert, jedoch wurde bei anderen Retroviren die Möglichkeit eines spontanen, nicht durch Enzyme des Wirtes oder des Virus bewirkten Verlustes eines einmal integrierten Provirus unter Hinterlassung einer LTR gezeigt (Copeland et al., 1983; Seperack et al., 1988).

Nach der Integration werden von der zelleigenen RNA-Polymerase Kopien des gesamten Provirus synthetisiert, wobei die Sequenzen der 5'-LTR als Promotor und Enhancer dienen (Dornburg, 1995). Die RNA-Transkripte des Provirus dienen ungespliced als Genom der neu gebildeten Virionen oder als mRNA der gag- und gag+pol-Polypeptide sowie nach Splicing als mRNA des env-Polypeptids. Das gag-Polypeptid wird in vier, das env-Polypeptid in zwei Einzelproteine gespalten, die teilweise posttranslational glykosyliert werden (Tsai et al., 1985; 1986). Dem Virus-Assembly folgt das Verlassen der Zelle mittels Budding durch die Zellmembran (Kang et al., 1975).

### 2.2.3 Vorkommen

Das Wirtsspektrum der REV ist sehr breit. Es umfaßt neben domestizierten Puten und Hühnern wildlebende Puten (Ley et al., 1989; Hayes et al., 1992), Japanische Wachteln (Theilen et al., 1966; Schat et al., 1976), Perlhühner (Theilen et al., 1966), Enten (Grimes und Purchase, 1973; Paul et al., 1978), Gänse (Drén et al., 1988) und Fasane (Drén et al., 1983). Die Verbreitung ist weltweit (Bagust, 1993).

In den USA wurden in 20 – 44 % der untersuchten Hühnerbestände Antikörper gegen REV nachgewiesen (Aulisio und Shelokov, 1969; Witter et al., 1982). In England wurde hingegen seit 1975 kein Hinweis auf eine Infektion festgestellt (McDougall, 1993). In Deutschland wurden bei Hühnern zwischen 1978 und 1980 in 19 von 930 untersuchten Seren Antikörper gegen REV nachgewiesen, wobei 14 von 299 untersuchten Herden betroffen waren (Neumann et al., 1981). Bei Puten konnten 2001 Antikörper gegen REV in Seren von fünf aus 18 untersuchten Putenbeständen nachgewiesen werden (Hafez, 2001).

### 2.2.4 Übertragung

REV kann vertikal, horizontal und über kontaminierte Vakzinen übertragen werden. Eine horizontale Infektion älterer Tiere führt in der Regel nur zu einer vorübergehenden oder intermittierenden Virämie mit anschließender Antikörperbildung, während eine vertikale Infektion oder eine horizontale Infektion von Eintagsküken eine persistierende Virämie hervorruft. Die persistierend infizierten Tiere bilden meist keine Antikörper und bleiben Dauerausscheider (Bagust und Grimes, 1979; McDougall et al., 1980; Witter et al., 1981; Li et al., 1983).

Die vertikale Übertragung durch persistierend infizierte Hennen findet nur auf maximal die Hälfte der Küken statt (McDougall et al., 1980; Bagust et al., 1981; Witter et al., 1981; Motha

und Egerton, 1987b; Witter und Salter, 1989), wohingegen die vertikale Übertragung durch persistierend infizierte Hähne seltener ist (McDougall et al., 1981). Die Bedeutung der vertikalen Übertragung für die Praxis ist wohl gering, da bei den Nachkommen eines infizierten Puten–Elterntierbestandes keine Anzeichen einer REV–Infektion und keine Antikörper gegen REV nachgewiesen werden (Witter und Glass, 1984).

Eine direkte horizontale Übertragung ist bei engem Kontakt möglich, jedoch scheint schon eine Trennung mittels Maschendraht ausreichend zu sein, um sie zu verhindern (Bagust et al., 1981; McDougall et al., 1981).

Eine indirekte horizontale Übertragung scheint ebenfalls möglich zu sein. Dabei können Insekten, vor allem Fliegen, eine Rolle als mechanische Vektoren spielen (Motha et al., 1984; Davidson und Braverman, 2005). Eine indirekte horizontale Übertragung über Einstreu und Arbeitsgerät scheint prinzipiell möglich, da aus der Einstreu infizierter Bestände REV isoliert wurde. Jedoch sind die Möglichkeiten dieses Übertragungsweges, insbesondere zwischen zeitlich und räumlich getrennten Herden, aufgrund des geringen Ausmaßes der Virusausscheidung und der geringen Tenazität des Virus in der Umwelt begrenzt (Campbell et al., 1971; Witter und Johnson, 1985).

Eine weitere Infektionsmöglichkeit liegt in kontaminierten Vakzinen. Beschrieben sind Fälle nach Vakzinierung gegen FPV (Bendheim, 1973; Fadly et al., 1996) oder gegen das Gallide Herpesvirus 2 – Virus der Marek’schen Krankheit (Yuasa et al., 1976; Jackson et al., 1977; Bagust et al., 1979).

## **2.2.5 Pathogenese und klinische und pathologische Symptome**

Eine Infektion mit REV kann drei unterschiedliche Symptom–Komplexe hervorrufen: Kümmerwachstum bei Küken, chronische Lymphome oder akute Neoplasien. Außerdem ruft eine REV–Infektion eine vorübergehende Immunsuppression hervor.

### **2.2.5.1 Kümmerwachstum**

Das durch vertikale REV–Infektion oder horizontale Infektion frisch geschlüpfter Küken hervorgerufene Kümmerwachstum („Runting–Disease“, „Nakanuke“) ist neben einem um 20–50% verringertem Gewicht durch Blässe, evtl. bedingt durch Anämie, und durch eine aus Degeneration und Nekrose der federbildenden Zellen resultierenden Störung der Federbildung (Witter et al., 1970; Mussman und Twiehaus, 1971; Koyama et al., 1975; Kimura et al., 1976; Yuasa et al., 1976; Tajima et al., 1977; Grimes et al., 1979) gekennzeichnet. Die Mortalität ist normalerweise gering (Witter et al., 1979).

Die Pathogenese des Kümmerwachstums ist ungeklärt. Bekannt ist lediglich, daß eine verminderte Futteraufnahme als Grund ausgeschlossen werden kann und die Infektion mit REV oder die Applikation inaktivierter REV–Virionen die Aktivität der zur Glukoneogenese



benötigten Phosphoenolpyruvat–Carboxykinase, jedoch nicht anderer Leberenzyme, um 40–50 % hemmt (Garry et al., 1985).

#### 2.2.5.2 Chronische Lymphome

Chronische Neoplasien treten erst mehrere Wochen bis Monate nach Infektion mit nicht defektiven Stämmen auf (Witter und Crittenden, 1979; Witter et al., 1981). Ausgelöst werden sie durch eine Integration des Provirus in der Nachbarschaft des zellulären Onkogens *c-myc*, das durch die Promoter–Wirkung der 3'–LTR aktiviert wird (Noori-Daloi et al., 1981; Ridgway et al., 1985; Boerkoel und Kung, 1992).

Pathologisch–anatomische Veränderungen sind weiße Knötchen oder diffuse Lymphome in der Leber, der Bursa Fabricii oder anderen inneren Organen (Grimes et al., 1979; Witter und Crittenden, 1979; Witter et al., 1981; Witter et al., 1986). Histologisch bestehen sie meist aus lymphoblastoiden Zellen mit großen Zellkernen und häufig auftretenden Mitose–Figuren (Grimes et al., 1979; Witter und Crittenden, 1979). Immunhistochemisch lassen sich die häufigeren, bursaabhängigen B–Zell Lymphome (Witter et al., 1981) und die selteneren, nicht bursa–abhängigen T–Zell Lymphome (Witter et al., 1986; Crespo et al., 2002) unterscheiden.

Eine Sonderform der chronischen Lymphome sind schon wenige Wochen p. i. auftretende plasmazelluläre Infiltrationen der peripheren Nerven, insbesondere der Nn. vagi, die auch zu makroskopisch sichtbaren Verdickungen der Nerven führen können (Witter et al., 1970; Yuasa et al., 1976) sowie Lymphome in der Haut, die makroskopisch durch FPV verursachten Läsionen ähneln (Hanson und Howell, 1979). Histologisch wurden Tumorzellen ohne deutliche Herdbildung schon nach wenigen Wochen in einer Vielzahl von Organen und der Haut festgestellt (Kimura et al., 1976).

#### 2.2.5.3 Akute Neoplasien

Akute Neoplasien werden durch Infektion mit dem replikationsdefektiven Stamm T, bzw. der Expression von dessen Onkogen *v-rel* hervorgerufen (Witter und Fadly, 2003). Das *v-rel* kodierende Gen ist etwa 1,5 kb groß und ersetzt einen Teil von *env* (Rice et al., 1982; Stephens et al., 1983; Wilhelmsen et al., 1984). Welche Zellart durch REV T transformiert wird, hängt vom Helfervirus ab. So führen Infektionen mit REV A als Helfervirus zu Retikulum–Zell–Neoplasien und mit CSV als Helfervirus zu B–Zell–Lymphomen (Barth und Humphries, 1988).

Die Inkubationszeit kann, abhängig von Infektionsdosis und Tierart, drei bis 21 Tage betragen. Der Tod tritt wenige Stunden nach dem Auftreten erster unspezifischer klinischer Symptome ein (Theilen et al., 1966). Pathologisch treten Vergrößerungen von Leber, Milz, Niere und Pankreas sowie weiße Herde auf diesen Organen auf (Theilen et al., 1966;

Robinson und Twiehaus, 1974). Histologisch sind Infiltration und Proliferation großer, vesikulärer Zellen und großflächige Nekrosegebiete nachweisbar (Theilen et al., 1966).

Abgesehen von der erstmaligen Isolierung wurden durch Stamm T verursachte akute Neoplasien nur nach experimenteller Infektion beschrieben (Witter und Fadly, 2003).

#### 2.2.5.4 Immunsuppression

Infektionen mit REV rufen eine erhöhte Anfälligkeit für zahlreiche Krankheiten, wie z.B. für die Infektiöse Laryngotracheitis (Motha und Egerton, 1982), Kokkzidiose (Motha und Egerton, 1984), Geflügelpocken (Motha und Egerton, 1987a) sowie für Salmonellose nach Infektion mit *Salmonella typhimurium* (Motha und Egerton, 1983) hervor. Als Ursache wurde eine Suppression sowohl der zellulären als auch der humoralen Immunität festgestellt.

Pathologisch konnte nach Infektion mit REV ein verringertes relatives Gewicht von Bursa Fabricii und Thymus festgestellt werden (Mussman und Twiehaus, 1971; Koyama et al., 1975; Yuasa et al., 1976; Grimes et al., 1979). Der Effekt war nach Infektion mit REV T und REV A oder nur mit REV A ausgeprägter als nach Infektion mit CSV (Barth und Humphries, 1988; Filardo et al., 1994). Histologisch war in Bursa und Thymus nach Infektion mit onkogenem REV T eine Infiltration mit Tumorzellen und eine Zerstörung der umgebenden Lymphozyten (Mussman und Twiehaus, 1971) und nach Infektion mit REV A oder CSV eine follikuläre Atrophie zu beobachten, die nach Infektion mit REV A stärker ausgeprägt war (Kimura et al., 1976; Bagust et al., 1979; Barth und Humphries, 1988; Filardo et al., 1994). Ähnliches wurde in der Milz gezeigt (Kimura et al., 1976). Hämatologisch konnte eine Leukopenie festgestellt werden (Grimes et al., 1979).

Die Beeinträchtigung der humoralen Immunabwehr zeigt sich in niedrigeren Antikörpertitern nach Impfung gegen das Gallide Herpesvirus 2 – Virus der Marek'schen Krankheit und gleichzeitiger Infektion mit REV (Bülow, 1977) oder nach Impfung vertikal mit REV infizierter Hühner gegen das Aviäre Paramyxovirus 1 (Virus der Newcastle-Disease) (Ianconescu und Aharonovici, 1978; Yoshida et al., 1981), sowie einer deutlichen Suppression der Antikörperbildung gegen *Brucella abortus*, Schafserythrozyten oder Bovines Serumalbumin (Witter et al., 1979; Li et al., 1983). Die Reduktion der Antikörperbildung war nach Infektion mit CSV weniger ausgeprägt (Witter et al., 1979). Es wurde nur die primäre und nicht die sekundäre Immunantwort supprimiert und der Effekt war vorübergehend sowie von der Infektionsdosis abhängig (Witter et al., 1979). Die Bildung von Antikörpern gegen REV selber wird nicht beeinträchtigt (Bülow, 1977; Walker et al., 1983). Die Infektion mit einem höher in vitro passagierten REV-Stamm führte zu einer gesteigerten Antikörperbildung (Motha und Egerton, 1983).

Die Suppression der zellulären Immunantwort ist durch eine verminderte Stimulierbarkeit der Leukozyten von REV-infizierten Tieren durch Mitogene gekennzeichnet

(Carpenter et al., 1978; Scofield und Bose, 1978; Rup et al., 1982). Wie die Suppression der humoralen Immunantwort hält auch die Suppression der zellulären Immunantwort nur vier bis fünf Wochen an (Rup et al., 1979). Es wird dabei nur die Fähigkeit zur Proliferation und nicht die Fähigkeit zu zytotoxischen Reaktionen unterdrückt (Carpenter et al., 1978). Der Effekt ist *in vitro* durch Leukozyten REV-infizierter Tiere, jedoch nicht durch REV oder durch REV transformierte Zellen, auf Leukozyten nicht infizierter Tiere übertragbar (Carpenter et al., 1978; Scofield und Bose, 1978). Aus diesen Ergebnissen wird gefolgert, daß durch eine REV-Infektion eine Suppressorzell-Population induziert wird (Carpenter et al., 1978; Rup et al., 1979). Die Eigenschaften dieser Suppressorzellen, sowie der Mechanismus ihrer Aktivierung oder ihrer Wirkung sind bisher nicht bekannt.

Sowohl die env-Proteine als auch die gag-Proteine, jedoch nicht die LTR bestimmen das Ausmaß der immunsuppressiven Wirkung (Filardo et al., 1994). Ein Teil der Aminosäuren-Sequenz der env-Proteine von REV A und SNV ist mit Aminosäuren-Sequenzen der env-Proteine einer Reihe anderer immunsuppressiver Säugetier-Retroviren homolog (Cianciolo et al., 1984; Harrell et al., 1986; Sonigo et al., 1986; Kewalramani et al., 1992). Das entsprechende, synthetisch hergestellte Polypeptid CKS-17 entfaltet bei verschiedenen Säugetieren eine Vielzahl verschiedener immunsuppressiver Wirkungen, die Haraguchi et al. (1997) zusammengestellt haben. Nachgewiesen wurden u. a. ein hemmender Effekt auf die Synthese von IgG (Mitani et al., 1987), die Transkription von Interferon- $\gamma$  und TNF  $\alpha$  (Haraguchi et al., 1992) sowie die Sekretion, jedoch nicht die Transkription von Interleukin (IL) -2 (Nelson und Nelson, 1990).

Markowski-Grimsrud und Schat (2003) fanden nach Infektion mit CSV nur eine statistisch nicht signifikante Verringerung der IL-2 und IL-1 $\beta$  Transkription, stellten jedoch eine erhebliche Steigerung der Transkription von Interferon- $\gamma$  fest.

### 2.2.6 Diagnose

Die Isolierung des REV aus Milz, Tumoren, Vollblut oder Plasma ist in der Zellkultur und im embryonierten Hühnerei möglich.

Als Zellkulturen eignen sich vor allem primäre Fibroblastenkulturen verschiedener Vogelarten wie Hühnern, Enten oder Fasanen (Temin und Kassner, 1974; Koyama et al., 1975; Temin und Kassner, 1975) oder aviäre permanente Zelllinien wie QT 35 (Wachtel-Fibrosarkomzellen) (Franklin et al., 1974; Cho, 1984). Der Versuch der Vermehrung in Säugetierzellen blieb in den meisten Fällen erfolglos (Calnek et al., 1969; Koo et al., 1991) und gelang nur auf Ratten-Nierenzellen (Keshet und Temin, 1979), Hunde-Thymuszellen (Allen et al., 1980) und Hunde-Osteosarkomzellen (Barbacid et al., 1979). Ein CPE tritt besonders in den ersten Passagen nur schwach auf oder kann ganz fehlen (Koyama et al., 1975; Bagust et al., 1979; Fadly und Witter, 1998). Betroffene Zellen lösen sich aus dem

Zellverband und kugeln sich ab (akute Phase). Der CPE bildet sich nach einigen Tagen zurück (chronische Phase) (Temin und Kassner, 1975; Keshet und Temin, 1979).

Zur Isolierung im embryonierten Hühnerei werden diese am vierten Bebrütungstag via Dottersack infiziert (Sevoian et al., 1964b). So infizierte Embryonen weisen eine erhöhte Mortalität auf und sind meist etwas kleiner als nicht infizierte Embryonen gleichen Alters. Weitere makroskopisch erkennbare Symptome sind vergrößerte und verfärbte Lebern und Milzen, sowie gelegentlich eine verdickte CAM. Mikroskopisch sind extravaskuläre Ansammlungen lymphoider Tumorzellen in einer Vielzahl von Geweben zu beobachten (Sevoian et al., 1964b; Alphandary et al., 1997).

Ein direkter Nachweis ist durch Antigennachweis mittels Antigen-ELISA (Smith und Witter, 1983; Ignjatovic et al., 1987; Cui et al., 1988), direkter Immunfluoreszenz (Witter et al., 1970; Bagust und Dennett, 1977), Komplementfixation (complement-fixation test for avian reticuloendotheliosis virus, COFAR-Test) (Smith et al., 1977) oder Immunoperoxidase-Färbung (Calvert und Nazerian, 1994) möglich. Zur routinemäßigen, schnellen und sicheren Diagnose eignet sich insbesondere die PCR aus Zellkulturmaterial, verschiedenen Geweben und Blut. Die PCR eignet sich auch zur Überprüfung von Vakzinen auf das Vorliegen einer Kontamination mit REV (Aly et al., 1993; Reimann und Werner, 1996; Takagi et al., 1996). Verschiedene Hybridisierungstechniken zum Nachweis proviraler DNA wurden zu wissenschaftlichen Zwecken angewandt (Kang und Temin, 1973; Rice et al., 1982; Reimann und Werner, 1996).

Eine Infektion mit REV induziert eine REV-spezifische Antikörperbildung. Zum Nachweis sind u. a. der Virus-Neutralisations-Test (Purchase et al., 1973; Yuasa et al., 1976; Motha und Egerton, 1983), IIFT (Aulisio und Shelokov, 1969; Bagust und Grimes, 1979), AGP (Bülow, 1977; Bagust und Grimes, 1979) und ELISA (Meyers, 1993; Fadly und Witter, 1997) geeignet. Antikörper können bis zu einem halben Jahr und länger nach der Infektion persistieren (Bagust und Grimes, 1979).

### **2.2.7 Prophylaxe und Bekämpfung**

Neben guten Hygienebedingungen werden keine besonderen Maßnahmen gegen REV oder zu seiner Ausmerzung getroffen (Witter und Fadly, 2003). Die wenigen Versuche zur Entwicklung einer Vakzine ergaben unterschiedliche Ergebnisse. So bewirkte die Impfung mit einem rekombinanten FPV-Impfstoff, der das env-Gen von SNV exprimiert, einen Schutz gegen eine Virämie nach Infektion mit SNV (Calvert et al., 1993). Im Gegensatz dazu bewirkte die Immunisierung mit leeren REV-Virionen ohne RNA nur einen teilweisen Schutz gegen eine Infektion mit dem onkogenem Stamm T (Meyers, 1993).

Obwohl die Möglichkeit einer Übertragung auf den Menschen nicht ausgeschlossen ist, da Säugetierzellen von REV infiziert werden können (siehe 2.2.6) und Antikörper gegen REV

bei Arbeitern in der Geflügelindustrie festgestellt wurden (Johnson et al., 1995), liegen bis jetzt keine Berichte über Erkrankungen bei Menschen vor, und die Bedeutung für die menschliche Gesundheit wird als gering eingeschätzt (DiGiacomo und Hopkins, 1997).

## 2.3 Die Integration eines Retikuloendotheliose- Provirus in das Genom des Hühnerpockenvirus

Die Kontamination von Impfstoffen gegen das Gallide Herpesvirus 2 – Virus der Marek'schen Krankheit (Yuasa et al., 1976; Jackson et al., 1977; Bagust et al., 1979) und gegen FPV (Bendheim, 1973; Fadly et al., 1996) gilt als einer der wichtigsten Verbreitungswege des REV.

Anfang der 90er Jahre wurde nachgewiesen, daß REV-spezifische Sequenzen in unterschiedlichem Ausmaße auch in das aus doppelstängiger DNA bestehende Genom des Galliden Herpesvirus 2 integriert vorliegen können (Isfort et al., 1992; Kost et al., 1993). Einige Jahre später wurde auch die Integration von REV-spezifischen Sequenzen in das Genom des FPV festgestellt (Hertig et al., 1997).

### 2.3.1 Nachweis der Integration

Mittels Hybridisierung und Sequenzierung wurde nachgewiesen, daß ein fast vollständiges REV-Provirus (fvRP) in FPV-Feldstämmen integriert vorliegt (Hertig et al., 1997). Eine größere Deletion liegt lediglich im Bereich der 3'-LTR vor (Hertig et al., 1997; Singh et al., 2003). Das fvRP ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

Als weiteres Nachweisverfahren wurde die direkte Immunfluoreszenz von FPV-infizierten Gewebekulturen mit gegen REV gerichteten monoklonalen Antikörpern eingesetzt (Tadese und Reed, 2003). Auch eine chimäre PCR mit einem FPV- und einem REV-Primer wurde beschrieben (Garcia et al., 2003). Es konnte dadurch auch nachgewiesen werden, daß die Integrationsstelle konstant ist (Hertig et al., 1997; Garcia et al., 2003; Singh et al., 2003).

Bei dem Vergleich der Nukleotidsequenz der integrierten 5'-LTR wurde die größte Homologie zu CSV festgestellt, beim Vergleich der integrierten env-Sequenz zu SNV (Garcia et al., 2003).

### 2.3.2 Verbreitung von FPV-Stämmen mit integriertem REV-Provirus

Bei verschiedenen Untersuchungen wurde das fvRP insgesamt in 75 von 78 FPV-Isolaten und vier von 36 Impfstämmen<sup>1</sup> aus Australien und den USA nachgewiesen (Tabelle 4). Bei den Isolaten handelt es sich auch um über 50 Jahre lyophilisiert gelagerte Stämme.

---

<sup>1</sup> Die Untersuchung desselben Impfstammes durch mehrere Arbeitsgruppen kann nicht ausgeschlossen werden

Zum Nachweis wurde teilweise nur das Vorkommen proviraler REV–DNA herangezogen. In allen FPV–Feldstämmen und Vakzinen, in denen kein Provirus vorhanden war, waren Überreste der LTR jedoch mittels PCR, Sequenzierung oder Hybridisierung nachweisbar.

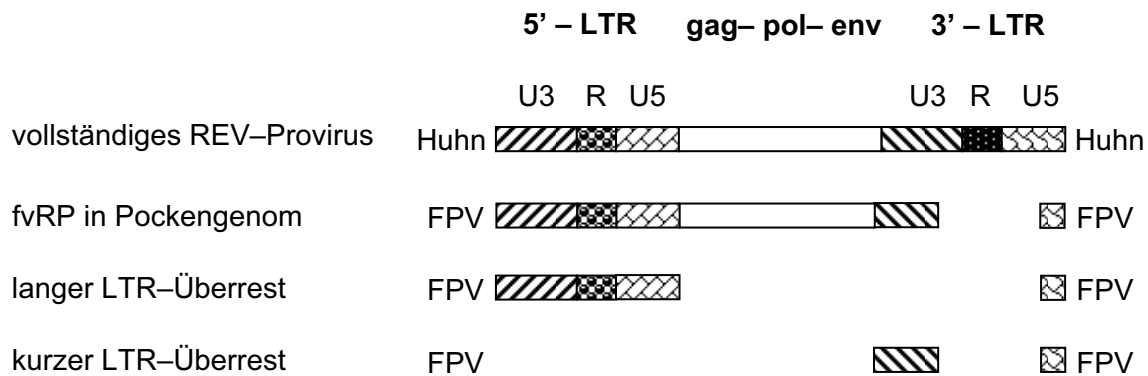
In Taubenpockenvirus konnten nur die Überreste der LTR nachgewiesen werden. In Wachtelpocken– und Kanarienspockenvirus fanden sich jedoch keine REV–spezifischen Sequenzen (Moore et al., 2000; Kim und Tripathy, 2001).

**Tabelle 4: Nachweis des fvRP in FPV–Stämmen**

REV–positive FPV–Feldstämmen	REV–positive FPV–Vakzinen	Referenz
In fünf von fünf untersuchten australischen Feldstämmen	In einer von zwei untersuchten australischen Vakzinen	Hertig et al. (1997)
In 45 von 45 untersuchten australischen Feldstämmen		Diallo et al. (1998)
In vier von vier untersuchten amerikanischen Feldstämmen	In keiner von zwei untersuchten amerikanischen Vakzinen	Singh et al. (2000)
	In keiner von zwölf untersuchten amerikanischen Vakzinen	Moore et al. (2000)
In sechs von sieben untersuchten, bis zu über fünfzig Jahre alten und lyophilisiert gelagerten FPV–Stämmen		Kim und Tripathy (2001)
In fünf von sechs untersuchten amerikanischen Feldstämmen	In zwei (eine und ihre Modifikation) von sieben untersuchten amerikanischen Vakzinen	Tadese und Reed (2003)
In fünf von fünf untersuchten amerikanischen Feldstämmen	In einer von vier untersuchten amerikanischen Vakzinen	Garcia et al. (2003)
In fünf von sechs untersuchten amerikanischen Feldstämmen	In keiner von neun untersuchten amerikanischen Vakzinen	Singh et al. (2003)

### 2.3.3 Unterschiede in der Länge der LTR–Überreste und Heterogenität der FPV–Stämme

Die Größe der LTR–Überreste in FPV–Stämmen, die kein fvRP integriert haben, variiert. Mittels PCR, die die Integrationsstelle amplifiziert, konnten zwei LTR–Überrest–Typen, deren Länge sich um ca. 300 bp unterscheidet, festgestellt werden, wobei der kürzere Typ häufiger vorkam (Moore et al., 2000; Garcia et al., 2003; Singh et al., 2003). Die Sequenzen des langen und des kurzen Typs (Singh et al., 2003) sind in Abbildung 3 zusammen mit den Sequenzen des vollständigen in zelluläre DNA integrierten REV–Provirus und des in FPV–DNA integrierten fvRP schematisch dargestellt.



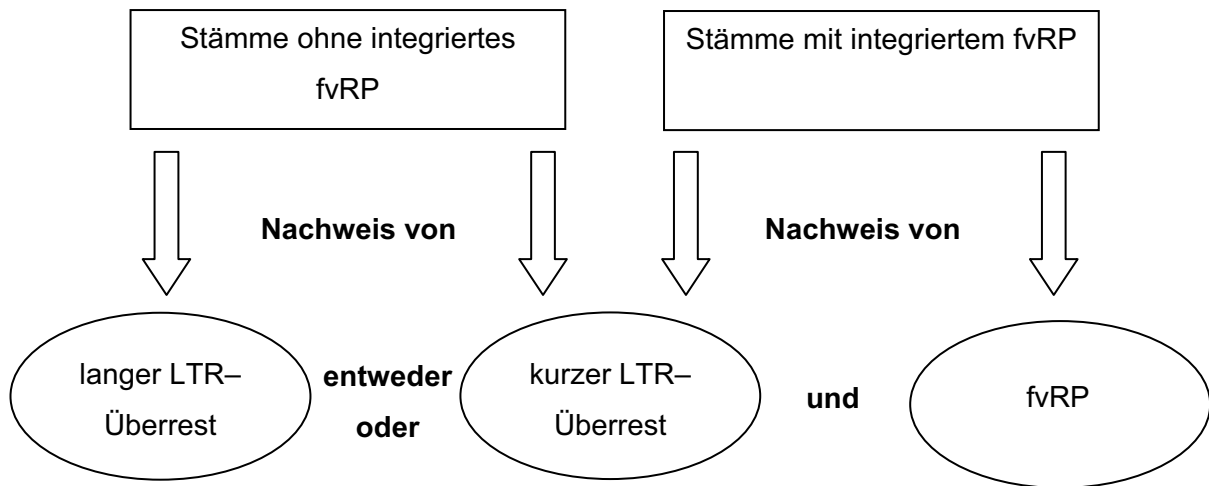
**Abbildung 3: Schematische Gegenüberstellung eines kompletten in zelluläre DNA integrierten Provirus, des in das Pockengenom integrierten fvRP und der langen und kurzen LTR–Überreste; nicht maßstabsgerecht**

Die Feldstämme, in denen das fvRP nachgewiesen wurde, setzen sich wahrscheinlich aus zwei Subpopulationen zusammen, von denen eine das fvRP integriert hat und die andere den kurzen REV–Überrest.

Ein Hinweis darauf ist die Möglichkeit, mittels PCR aus Feldstämmen das Amplifikat der Integrationsstelle mit dem kurzen LTR–Überrest zu erhalten, und trotzdem mittels Long–Range–PCR, Sequenzierung oder chimärer PCR das fvRP nachzuweisen (Hertig et al., 1997; Garcia et al., 2003; Singh et al., 2003).

Nach REA des Genoms von Feldisolaten wurde mittels Southern–Blot das Vorkommen von LTR–Sequenzen auf drei Fragmenten nachgewiesen. Die Größe dieser drei Fragmente entspricht den Größen der drei Fragmente, auf denen vorhergesagt wurde, dass der kurze Überrest, die 5'– bzw. die 3'–LTR liegen (Singh et al., 2003).

Abbildung 4 zeigt schematisch das Vorkommen des langen und des kurzen LTR–Überrestes sowie des fvRP in FPV–Stämmen.



**Abbildung 4: Nachweis des langen und des kurzen LTR-Überrestes sowie des fvRP in FPV-Stämmen**

### 2.3.4 Verlust des fvRP

Um den möglichen Verlust des Provirus unter Hinterlassung des kurzen Überrestes der LTR zu demonstrieren, inserierten Singh et al. (2003) in das fvRP eines FPV-Stammes, in dem sich mittels PCR sowohl der kurze Überrest als auch das fvRP nachweisen ließen, ein für ein grün fluoreszierendes Protein kodierendes Gen, so daß Plaques, die durch das rekombinante Virus verursacht wurden, fluoreszierten. Nach der anschließenden Plaque-Reinigung erhielten sie einen FPV-Stamm, der wahrscheinlich vollständig aus Virionen mit integriertem fvRP bestand. Schon nach einmaliger Passagierung in der Zellkultur war jedoch wieder eine heterogene Population nachweisbar. Ein vollständiger Verlust der Fluoreszenz und somit wahrscheinlich auch des Provirus trat bis zur 55. Passage nicht ein.

### 2.3.5 Tierversuche mit FPV-Stämmen mit einem integriertem fvRP

Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind die Ergebnisse von vier Tierversuchen zur Pathogenese nach Infektion mit FPV-Stämmen, die ein integriertes fvRP tragen, veröffentlicht (Hertig et al., 1997; Diallo et al., 1998; Singh et al., 2000; Singh et al., 2005).

Nach Infektion drei Wochen alter SPF Küken mittels Wing-Web-Methode mit einer FPV Vakzine mit integriertem fvRP entwickelten alle Tiere innerhalb von 32 Tagen hohe Antikörpertiter gegen REV. Aus dem Blut von mehr als der Hälfte der infizierten Tiere ließ sich REV isolieren (Hertig et al., 1997).

Intraperitoneale Infektion von Eintagsküken mit einem das fvRP enthaltenden Vakzinestamm führte innerhalb von zwei Wochen p. i. zu einer Mortalität von 80%. Die Tiere zeigten sowohl pockentypische als auch REV-typische Symptome wie Befiederungsdefekte, Proventrikulitis und Atrophie der Bursa Fabricii (Diallo et al., 1998).



Singh et al. (2000) verglichen je einen FPV–Impfstamm, in dem nur der kurze bzw. nur der lange LTR–Überrest nachweisbar waren, und vier Feldisolate mit integriertem fvRP hinsichtlich ihrer Potenz als Impfstamm und ihrer Fähigkeit, Antikörper gegen FPV und REV hervorzurufen. Zu diesem Zweck wurden je neun sechs Wochen alte SPF–Hühner mittels Wing–Web–Methode infiziert und zwei Wochen später mittels Wing–Web–Methode und Skarifikation am Oberschenkel mit demselben Stamm zum zweiten Mal infiziert. Antikörper gegen FPV wurden je zwölf Tage nach erster und zweiter Infektion, Antikörper gegen REV zwölf Tage nach der zweiten Infektion mittels ELISA bestimmt. Der durch die erste Infektion hervorgerufene Schutz wurde anhand des Auftretens bzw. Ausbleibens einer Primärpocke nach der zweiten Infektion beurteilt. Die beiden Impfstämme vermittelten einen guten Schutz und induzierten bei fast allen Tieren schon nach der ersten Infektion Antikörper gegen FPV. Nach der zweiten Infektion ließen sich bei allen Tieren Antikörper gegen FPV nachweisen, jedoch keine gegen REV. Drei Feldstämme mit integriertem fvRP induzierten nach der ersten Infektion nur bei einem Drittel der Tiere Antikörper gegen FPV. Nach der zweiten Infektion hatten alle Tiere, die einen dieser Stämme erhalten hatten, Antikörper gegen FPV, jedoch keine gegen REV. Der durch sie hervorgerufene Impfschutz war unterschiedlich. Die erste Infektion mit dem vierten Feldisolat rief einen guten Impfschutz und Antikörper gegen FPV bei fast allen Tieren hervor. Nach dem Challenge entwickelten sieben der neun Tiere Antikörper gegen REV.

In einer weiteren Studie dieser Arbeitsgruppe wurde aus einem FPV–Feldisolat eine Mutante hergestellt, der das fvRP fehlte (Singh et al., 2005). Der Vergleich des Feldstammes, der Mutante und eines Vakzinestammes zeigte eine verringerte, wenn auch nicht vollständig aufgehobene Virulenz der Mutante ohne das fvRP. Die Antikörperbildung gegen FPV war nach Infektion bzw. Vakzinierung vergleichbar stark.

### **2.3.6 Die Folgen der Integration**

Die Bedeutung des integrierten REV–Provirus ist bisher unklar. Gezeigt wurde die Expression von REV–Antigen durch Immunfluoreszenz mit gegen REV gerichteten Antikörpern in mit FPV infizierten Zellkulturen (Tadese und Reed, 2003) und durch die Bildung gegen REV gerichteter Antikörper nach Infektion mit FPV (Hertig et al., 1997; Singh et al., 2000). Darüber hinaus gelang es, infektiöses REV aus mit FPV infizierten Hühnern zu reisolieren (Hertig et al., 1997). Ob, und wenn ja, welchen Einfluß das REV auf die Pathogenese der FPV–Infektion hat, und welche evolutionäre Bedeutung es besitzt, ist bis auf vage Theorien vollständig ungeklärt (Singh et al., 2003).