

5 Diskussion

Die Hühnerpocken gehören zu den am längsten bekannten virusbedingten Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels. Nach über zwei Jahrzehnten ohne nennenswerte Ausbrüche in Deutschland traten vor einigen Jahren hierzulande wieder vermehrt Fälle auf (Hafez et al., 2001). Inzwischen sind die Erkrankungszahlen rückläufig. So wurden am Institut für Geflügelkrankheiten der FU Berlin 2001 27 Fälle, 2002 20 Fälle und 2003 neun Fälle festgestellt (Hoffmann, 2005). Im Jahr 2004 wurde in zehn Fällen und 2005 nur zwei Mal die Diagnose „Geflügelpocken“ gestellt. Dies ist auf den wieder vermehrten Einsatz der Impfung zurückzuführen.

Da jedoch kein Eradikationsprogramm verfolgt wird, gibt es keinen Grund anzunehmen, daß das FPV, wie das Variolavirus, getilgt werden könnte. Darüber hinaus wurden in den USA und Australien gehäufte Impfdurchbrüche beobachtet (Diallo et al., 1998; Singh et al., 2000). Deswegen muß der Erreger weiterhin mit zeitgemäßen Methoden untersucht werden, um seine Pathogenese weiter aufzuklären, eine mögliche Veränderung der Pathogenität zu bemerken und so bei der nächsten Erkrankungswelle geeignete Interventionsstrategien zur Verfügung zu haben.

Einer der wissenschaftlich interessantesten Aspekte des FPV ist die Integration eines fast vollständigen REV-Provirus (fvRP) in das Genom vieler FPV-Feldstämme (Hertig et al., 1997; Diallo et al., 1998; Singh et al., 2000; Garcia et al., 2003). Dieser Umstand wurde zunächst als eine mögliche Ursache gehäufter Impfdurchbrüche in den USA und Australien diskutiert (Diallo et al., 1998; Singh et al., 2000). Dies erscheint weniger wahrscheinlich, nachdem gezeigt wurde, daß es FPV-Isolate mit integriertem fast vollständigem REV-Provirus (fvRP) schon vor mehr als 50 Jahren gab (Kim und Tripathy, 2001). Trotzdem wird angenommen, daß das integrierte fvRP einen wichtigen Einfluß auf die Pathogenese der Geflügelpocken hat (Singh et al., 2003).

Da die Berichte über die FPV-Stämme mit fvRP sich bisher ausschließlich auf die USA und Australien bezogen, wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit untersucht, ob bzw. wie weit FPV-Isolate mit integriertem REV in Deutschland verbreitet sind. Dazu wurden 42 DNAs aus FPV-Feldinfektionen untersucht. Die Infektionen waren in den letzten vier Jahren bei Legehennen, Broiler-Elterntieren, Mastputen und Puteneltern in Deutschland aufgetreten. Daneben wurde der in Deutschland zugelassene Vakzinestamm für Hühner einbezogen.

Für diese Untersuchungen wurde zunächst eine Multiplex-PCR zum gleichzeitigen Nachweis des 4b-Core-Protein des FPV, der gag-, pol- und env-Gene sowie der LTR des REV etabliert. Zum Teil wurden veröffentlichte Primer verwendet. Die Primer zum Nachweis

des gag- und des pol-Genes wurden selbst entwickelt. Die Spezifität dieser beiden Primerpaare wurde mittels PCR und sich anschließender REA aus proviraler REV-DNA, der DNA zweier FPV-Feldisolate sowie der DNA des FPV-Stammes HP 1, in dem kein fvRP integriert vorliegt (Laidlaw und Skinner, 2004), kontrolliert. Des Weiteren wurde mit allen Primerpaaren der Multiplex-PCR überprüft, ob die DNA verschiedener anderer Pathogene zu falsch positiven Ergebnissen führte. Außerdem wurden die Primerkonzentrationen und die Anlagerungstemperatur der Multiplex-PCR empirisch optimiert. Im letzten Schritt vor der Anwendung wurde die relative Sensitivität der Primerpaare in der Multiplex-PCR bestimmt. Innerhalb des Systems besaßen das Primerpaar zum Nachweis der LTR die geringste und das Primerpaar zum Nachweis des FPV die höchste Sensitivität.

Nach der Etablierung wurden die 42 Feld-DNAs sowie die kommerzielle Vakzine mittels der Multiplex-PCR untersucht. In der kommerziellen Vakzine ließen sich keine REV-spezifischen Sequenzen nachweisen. Auch in anderen Untersuchungen konnte das fvRP nur bei wenigen Vakzinestämmen nachgewiesen werden (Moore et al., 2000; Garcia et al., 2003; Singh et al., 2003; Tadese und Reed, 2003). Bei 40 der 42 untersuchten DNAs konnten neben der FPV-spezifischen Sequenz auch alle vier REV-spezifischen Sequenzen nachgewiesen werden. Da Genbereiche aller drei REV-Gene und der LTR detektiert wurden, konnte von einem Vorhandensein des gesamten fvRP in den untersuchten DNAs ausgegangen werden. Teilweise erfolgte der Nachweis der LTR bzw. des pol-Genes erst in der Uniplex-PCR, was auf die geringere Sensitivität dieser beiden Primerpaare zurückgeführt wurde. Der hohe Anteil von FPV-Isolaten mit integriertem fvRP deckt sich mit anderen Untersuchungen in Australien und den USA (Diallo et al., 1998; Singh et al., 2000; Garcia et al., 2003).

Bei den zwei DNAs GB 93/03 und GB L8/04 war der Nachweis aller REV-spezifischen Sequenzen weder in der Multiplex-PCR, noch in der Uniplex-PCR möglich. Bei beiden DNAs war der Nachweis des pol-Genes und der LTR nicht möglich und der Nachweis des env-Genes gelang nur mittels nPCR. Bei der DNA GB L8/04 konnte außerdem das Vorkommen von für das gag-Gen spezifischer DNA nur in der offensichtlich sensitiveren qPCR gezeigt werden. Der Verlust einzelner Gene des fvRP ist in der Literatur nicht beschrieben und erscheint unwahrscheinlich (Hertig et al., 1997; Afonso et al., 2000; Singh und Tripathy, 2003). Das Fehlen des Nachweises der LTR und des pol-Genes aus der DNA der beiden Einsendungen scheint eher auf einen zu geringen Anteil der FPV-DNA an der Gesamt-DNA in Verbindung mit der geringeren Sensitivität der beiden Primerpaare zurückzuführen zu sein.

Durch die Multiplex-PCR war zunächst nur das Vorhandensein der REV-Sequenzen festgestellt worden. Um zu untersuchen, ob es sich um eine zufällige Co-Infektion handelt oder ob die REV-Sequenzen in das FPV-Genom integriert sind, wurden die mit der

Multiplex-PCR untersuchten DNAs zusätzlich mittels einer chimären PCR geprüft. In dieser PCR wurden mittels eines FPV-spezifischen Primers und eines REV-spezifischen Primers FPV-Sequenzen und das 5'-Ende des integrierten fvRP nachgewiesen (Lüschow und Hafez, 2003). Zur Etablierung wurde ein DNA Gemisch aus FPV- und REV-DNA untersucht. Die PCR verlief negativ, so daß davon ausgegangen werden konnte, daß die chimäre PCR nur in das FPV-Genom integrierte REV-Sequenzen nachweist. Bei 40 der 42 DNAs wurde das chimäre PCR-Produkt nachgewiesen. Bei den schon erwähnten DNAs GB 93/03 und GB L8/04 war der Nachweis nicht möglich. Wegen der bereits erörterten Bedenken hinsichtlich der DNA muß jedoch offenbleiben, ob dieses negative Ergebnis darauf zurückzuführen ist, daß das REV-Provirus an einer anderen Stelle im FPV-Genom oder überhaupt nicht integriert vorlag.

Diesen Abschnitt zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß REV-spezifische Sequenzen in allen FPV-Feldisolaten nachgewiesen werden konnte. Bei 40 der 42 untersuchten Isolate konnte die Integration an der in der Literatur beschriebenen Stelle in das FPV-Genom gezeigt werden. In dem Vakzinestamm HP B konnten mittels PCR keine REV-Sequenzen nachgewiesen werden. Erst die Sequenzierung der Integrationsstelle zeigte einen Überrest der LTR von etwa 300 bp. Damit stehen diese Ergebnisse im Einklang mit anderen veröffentlichten Arbeiten, bei denen REV-Sequenzen in allen untersuchten Feldisolaten aber nur in wenigen Vakzinestämmen nachgewiesen wurden (Hertig et al., 1997; Diallo et al., 1998; Moore et al., 2000; Singh et al., 2000; Kim und Tripathy, 2001; Garcia et al., 2003). Es kann somit davon ausgegangen werden, daß FPV-Ausbrüche in Deutschland fast ausschließlich von FPV-Stämmen mit integriertem fvRP verursacht wurden.

Anschließend wurde mittels Long-Distance-PCR versucht, bei einigen Feldisolaten nicht nur das Vorkommen einzelner REV-Nukleotidsequenzen, sondern des gesamten fvRP zu zeigen. Dazu wurden FPV-spezifische Primer, die das fvRP flankieren, eingesetzt. Es gelang nur der Nachweis des kurzen, 485 bp langen und einen Überrest der LTR umfassenden, aber nicht des großen, über 8000 bp langen und das gesamte fvRP umfassenden Amplikons. Die Erklärung hierfür ist vermutlich in technischen Gründen zu suchen, da bei einer PCR kurze Zielsequenzen bevorzugt amplifiziert werden. So war auch Hertig et al. (1997), im Gegensatz zu Singh et al. (2003), die Amplifikation des fvRP mit FPV-spezifischen Primern, die die Integrationsstelle umfassen, nicht gelungen. Bei den Versuchen, verschiedene chimäre PCR-Produkte nachzuweisen, zeigte sich, daß die Amplifikation von PCR-Produkten, die die 3'-LTR beinhalteten, nur in einem Fall gelang. PCR-Produkte ähnlicher Größe, die diese Region nicht beinhalteten, konnten jedoch problemlos amplifiziert werden. Wahrscheinlichster Grund dafür ist die räumliche Anordnung der DNA in diesem Bereich. Eine andere, theoretisch denkbare Möglichkeit wäre, daß kein

durchgehendes fvRP integriert vorliegt, sondern an zwei Stellen im FPV-Genom einmal das 5'-Ende des fvRP bis inklusive des env-Genes und einmal das 3'-Ende ab inklusive dem env-Gen integriert ist. Dies würde jedoch den Ergebnissen der Sequenzierung und der Long-Distance-PCR von Singh et al. (2003) widersprechen. Außerdem bliebe ungeklärt, wie aus diesen zwei nicht zusammenhängenden Sequenzbereichen infektiöse REV-Virionen entstehen könnten. Die Bildung infektiöser REV-Virionen aus FPV-Isolaten mit integriertem REV wurde von Hertig et al. (1997) und in den eigenen Infektionsversuchen gezeigt.

In der DNA, aus der der Nachweis des fvRP mit FPV-spezifischen Primern nicht gelungen war, wurde mittels Long-Distance-PCR mit REV-spezifischen Primern ein REV-Provirus nachgewiesen. Dabei konnte aber nicht mit letzter Sicherheit gesagt werden, ob dieses REV-Provirus in zelluläre oder virale DNA integriert vorlag, bzw. an welcher Stelle es ggf. in die virale DNA integriert war. Die Ergebnisse der chimären PCRs lassen jedoch vermuten, daß das REV-Provirus an der in der Literatur beschriebenen Stelle in das FPV-Genom integriert war. Durch die sich an die Long-Distance-PCR von LTR zu LTR anschließende REA wurde gezeigt, daß das Amplikon dem REV-Provirus entsprach. Die Amplifikation des REV-Provirus aus CSV-Zellkulturmaterial gelang nicht. Dies kann darauf zurückzuführen sein, daß in dem Zellkulturmaterial weniger REV-Provirus-spezifische DNA als in der DNA aus Originalmaterial vorlag. Außerdem ist nicht auszuschließen, daß die Primer nicht optimal gewählt waren. Der Primer L 1 wurde der Literatur entnommen und war auf Grundlage von Sequenzen des REV entworfen worden (Aly et al., 1993). Hingegen wurde der Primer L 5 für die eigene Arbeit auf Grundlage der Sequenzen des in das FPV-Genom integrierten fvRP entworfen.

Hertig et al. (1997) konnten in der ersten Publikation zur Integration des fvRP in das Genom des FPV mittels PCR nur einen integrierten Überrest der LTR nachweisen. Andererseits gelang es auch, von denselben FPV-spezifischen Primern ausgehend zwei chimäre PCR-Produkte mit REV-Genen nachzuweisen. Seitdem wird eine Heterogenität der Viruspopulation, also das gleichzeitige Vorliegen von Virionen mit integriertem fvRP und mit integriertem Überrest der LTR postuliert (Hertig et al., 1997; Garcia et al., 2003; Singh et al., 2003). Dies wurde darauf zurückgeführt, daß die Wiederholung der LTR eine Instabilität des FPV-Genoms an dieser Stelle bewirkt (Hertig et al., 1997). Da es sich bei dem von Hertig et al. (1997) untersuchten FPV-Stamm um einen Vakzinestamm handelte, konnte nicht ausgeschlossen werden, daß die Heterogenität ein bei der *in vitro*-Passagierung entstandenes Artefakt war. Singh et al. (Singh et al., 2003) konnten jedoch auch in Originalmaterial eine heterogene Viruspopulation nachweisen.

In der eigenen Arbeit wurden das PCR-Produkt, das die Integrationsstelle umfaßt, sowie das chimäre PCR-Produkt, das von der Integrationsstelle bis zum Ende der 5'-LTR des integrierten fvRP reicht, sequenziert. Beide Amplikons waren direkt aus DNA aus

Originalmaterial vervielfältigt worden. In dem die Integrationsstelle umfassenden PCR-Produkt wurden Überreste der LTR von ca. 300 bp nachgewiesen. Das chimäre PCR-Produkt beinhaltete einen Teil des FPV-ORF 202 und die kompletten 5'-LTR. Der Vergleich beider Sequenzen mit entsprechenden veröffentlichten Sequenzen von Feldstämmen aus den USA (Singh et al., 2003) sowie dem australischen Vakzinestamm, in dem ein fvRP nachgewiesen worden war (Hertig et al., 1997), zeigte lediglich eine Punktmutation.

Zusätzlich wurde aus dem Vakzinestamm HP B das PCR-Produkt, das die Integrationsstelle umfaßt, amplifiziert und sequenziert. Wie bei den meisten anderen untersuchten Vakzinestämmen und allen untersuchten Feldstämmen (Singh et al., 2000; Singh et al., 2003) betrug die Größe 485 bp. Das Amplikon enthielt einen ca. 300 bp großen Überrest der LTR. Ein 745 bp langes, die Integrationsstelle umfassendes PCR-Produkt mit einem größeren Überrest der LTR, wie Singh et al. (2003) es bei zwei Vakzinestämmen nachgewiesen hatten, wurde somit nicht gefunden. Der Sequenzvergleich mit den entsprechenden Sequenzen von Vakzine- und Feldstämmen zeigte keine Mutationen.

Insgesamt konnte eine hohe Konserviertheit der Sequenzen bei Stämmen aus drei Kontinenten festgestellt werden. Ferner befindet sich das integrierte fvRP stets an derselben Stelle des FPV-Genoms (Hertig et al., 1997; Garcia et al., 2003; Singh et al., 2003), und die Nukleotidsequenz des integrierten fvRP läßt sich keinem aktuellen REV-Stamm zuordnen (Garcia et al., 2003). Dies legt den Schluß nahe, daß die Integration des fvRP in das FPV-Genom kein sich häufig wiederholender Vorgang ist, sondern auf ein oder wenige Ereignisse zurückgeht. Im Unterschied dazu kann die Integration von REV in das Genom des *Gallid herpesvirus 2* – Virus der Marek'schen Krankheit an verschiedenen Stellen des Herpesvirus-Genoms stattfinden (Borenstein und Davidson, 1999) und ist *in vivo* und *in vitro* reproduzierbar (Isfort et al., 1992; Kost et al., 1993).

Trifft es zu, daß die Viruspopulation heterogen ist, so stellt sich die Frage, in welchem Mengenverhältnis die beiden Subpopulationen mit bzw. ohne fvRP vorliegen. Um dies zu untersuchen, wurde eine Multiplex-qPCR zum gleichzeitigen Nachweis des FPV und des gag-Genes des REV angewendet. Bei Anwendung dieser Methode konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß nicht nur das in das FPV-Genom integrierte fvRP, sondern auch in zelluläre DNA integrierte REV-Proviren oder noch nicht integrierte REV-Proviren nachgewiesen wurden. Das Risiko einer Überschätzung der Menge REV-proviraler DNA aus diesem Grund wurde jedoch als eher gering betrachtet, da die Gewebe, aus denen die DNA extrahiert wurde – Haut bzw. Trachea – nicht als vorrangige Gewebe der Replikation des REV gelten (Witter und Fadly, 2003).

Bei der Einschätzung der Genauigkeit der Methode wurde beobachtet, daß ein systematischer Fehler auftreten konnte, der zu einer Überschätzung des Verhältnisses zwischen FPV- und proviraler REV-DNA zu Gunsten der REV-DNA führte. Dies war

vermutlich hauptsächlich auf die Ungenauigkeit der Bestimmung der Effizienzen der einzelnen qPCRs zurückzuführen. Des Weiteren war mit einer zusätzlichen Ungenauigkeit bei der Einstellung des Kopien-Verhältnisses zwischen FPV- und REV-Plasmid DNA im Standard zu rechnen. Diese wurde bei der Einschätzung der Genauigkeit nicht erfaßt.

Die Untersuchung von vier Feldisolaten, in deren DNA mittels Multiplex-PCR alle vier REV-Amplikons und zusätzlich das chimäre PCR-Produkt nachgewiesen worden waren, ergab ein Verhältnis zwischen FPV- und REV-spezifischer DNA von 1:0,8 bis zu 1:1,4. Die Ungenauigkeit der Methode ließ als Aussage nur zu, daß die FPV-Subpopulation mit integriertem fvRP in großer Überzahl vorlag.

In die Untersuchungen wurden auch die beiden DNAs GB 93/03 und GB L8/04 einbezogen, aus denen nicht alle REV-spezifischen Amplikons nachgewiesen worden waren. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre ein geringer Anteil an REV-proviraler DNA im Vergleich zur FPV-DNA gewesen. Die Untersuchung der beiden DNAs ergab jedoch ein Verhältnis zwischen FPV- und REV-spezifischer DNA von etwa 1:3,5. Damit konnte nicht gezeigt werden, daß bei diesen Einsendungen im Verhältnis zur FPV-DNA weniger REV-DNA vorlag. Es wurde aber in beiden DNAs eine geringe Anzahl an FPV-Genomkopien festgestellt (Ergebnisse nicht dargestellt). Da bei einer geringen Menge eingesetzter FPV-DNA das Verhältnis zu Gunsten des REV überschätzt wurde, muß dieses hohe Verhältnis als Folge eines methodischen Fehlers angesehen werden.

Singh et al. (2003) inserieren ein für ein fluoreszierendes Protein kodierendes Gen in das integrierte fvRP eines FPV-Feldstammes. 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. Im Rahmen der eigenen Arbeit wurde das Feldisolat GB 869/02, in dessen Originalmaterial die heterogene Viruspopulation nachgewiesen worden war, zunächst vier Mal auf HEF und anschließend auf LMH passagiert. Mittels der qPCR wurde die Verringerung der Subpopulation mit integriertem fvRP gezeigt und die Abnahme-Rate berechnet. Bis zur 16. Passage auf LMH verlief die Abnahme annähernd exponentiell. Auf die Berechnung des Verhältnisses in höheren Passagen mußte wegen der zu groß werdenden Ungenauigkeit der Methode verzichtet werden.

Der Verlust von Retrovirus-Proviren unter Zurücklassung einer LTR *in vitro* und *in vivo* ist in der Literatur für ein endogenes murines Leukämie-Virus im Mäuse-Genom beschrieben. Der Verlust geschieht wahrscheinlich durch Interaktion der beiden LTRs des Provirus (Varmus et al., 1981; Copeland et al., 1983). Die Verlustrate wurde mit etwa $1:4,5 \cdot 10^6$ pro Mäusegeneration berechnet (Seperack et al., 1988). Die Abnahmerate der Subpopulation mit integriertem fvRP war mit 1:2 (50%) pro Passagierung wesentlich höher. Die Erklärung hierfür ist einerseits darin zu suchen, daß eine Passage des FPV nicht einer,

sondern mehreren Generationen FPV–Viren entspricht. Andererseits existiert vermutlich ein Selektionsdruck, der bei der Passagierung des FPV *in vitro* die FPV–Virionen ohne fvRP begünstigt, während er bei einer natürlichen Infektion die FPV–Virionen mit fvRP fördert. Die Annahme, daß das Vorhandensein der Subpopulation mit fvRP *in vivo* einen Vorteil bedeutet, wird auch durch den größeren Anteil von Virionen mit fvRP in Originalmaterial gestützt. Dieser Vorteil kann in einer durch das fvRP ausgelösten Suppression des Immunsystems liegen. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde dieser Aspekt näher untersucht.

In der 32. Passage auf LMH war keine REV–spezifische DNA mittels PCR oder qPCR mehr nachweisbar, was für einen vollständigen oder zumindest nahezu vollständigen Verlust des fvRP spricht. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnten Singh et al. (2003) auch nach 55 Passagen auf QT–35–Zellen noch das fvRP nachweisen. Der Unterschied könnte durch unterschiedliche Nachweismethoden oder durch die unterschiedlichen zur Passagierung benutzten Zelllinien bedingt sein. Singh et al. benutzten die Zelllinie QT–35, die aus chemisch transformierten Wachtel–Fibroblasten etabliert wurde (Moscovici et al., 1977) und die Replikation von REV zuläßt (Cho, 1984). Die eigenen Untersuchungen wurden auf der Zelllinie LMH, die aus einem chemisch induzierten Leberzellkarzinom eines Leghorn–Hahnes gewonnen wurde (Kawaguchi et al., 1987), durchgeführt. In der gesamten Literatur wurde kein Hinweis auf die Vermehrung von REV auf Leberzellen oder einer Leberzelllinie gefunden. Es wurden ausschließlich Fibroblasten oder Nierenzellen für diesen Zweck verwendet.

In den sich anschließenden Teilen dieser Arbeit wurde die Beeinflussung der spezifischen humoralen Immunabwehr durch Infektionen mit FPV mit und ohne integriertes fvRP untersucht. Es ist beschrieben, daß Infektionen mit REV die humorale Immunantwort hemmen (Bülow, 1977; Ianconescu und Aharonovici, 1978; Witter et al., 1979). Für die immunsuppressive Wirkung zahlreicher Retroviren bei Säugern wird das Polypeptid CKS–17 verantwortlich gemacht (Haraguchi et al., 1997). Dessen Sequenz ist auch in den veröffentlichten Sequenzen des env–Proteins von REV (Sonigo et al., 1986) und in der von Singh et al. (2003) veröffentlichten Sequenz des env–Proteins des integrierten fvRP enthalten. Da eine Infektion mit FPV nur eine geringe Antikörperbildung induziert (Mayr, 1992; Tripathy und Reed, 2003), sollte untersucht werden, ob die Antikörperbildung gegen FPV durch das integrierte fvRP gehemmt wird.

Als Methode zum Nachweis von Antikörpern wurde der ELISA gewählt. Diese Methode gilt als sensitiv und erlaubt bei relativ geringem Aufwand eine Untersuchung vieler Proben. In der Literatur sind von verschiedenen Arbeitsgruppen ELISAs zum Nachweis von Antikörpern gegen FPV beschrieben (Buscaglia et al., 1985; Mockett et al., 1987; Nagy et al., 1990; Werner, 1990; Iritani und Sawaguchi, 1994; Mishra und Mallick, 1996a; Singh et al., 2000;

Isa et al., 2002). Da jedoch kein kommerzieller ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen FPV zur Verfügung steht, mußte ein eigener ELISA für diesen Zweck etabliert werden. Zunächst wurde der Schwellenwert festgelegt sowie Sensitivität und Spezifität berechnet. Anschließend wurde die Wiederholbarkeit der im ELISA erzielten Ergebnisse untersucht und der ELISA mit anderen Methoden zum Nachweis gegen FPV gerichteter Antikörper verglichen.

Bei der Festlegung des Schwellenwertes wurde dann zugunsten einer hohen Spezifität von 100 % und einer niedrigeren Sensitivität des Testes von 85 % entschieden. Dabei wurde ein Intermediärbereich eingeführt, um Proben zu bezeichnen, deren S/P-Ratio geringfügig unter dem Schwellenwert lag, und deren Untersuchung wiederholt werden sollte, um zu einem eindeutigen Ergebnis zu gelangen. Sowohl für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit als auch im Hinblick auf einen möglichen Einsatz in der Diagnostik erschien eine hohe Spezifität wichtiger, zumal in der Diagnostik die geringere Sensitivität durch die Untersuchung mehrerer Seren aus einer Herde ausgeglichen wird.

Die Untersuchungen zur Wiederholbarkeit der Ergebnisse im ELISA zeigten im Intraassay-Vergleich mit Variationskoeffizienten von 4,3 % bzw. 10,8 % bei den positiven Plasmaproben eine gute Wiederholbarkeit, die den Empfehlungen der OIE (Jacobson, 2004) entsprach. Dagegen lag der Variationskoeffizient des negativen Plasmas mit 57 % sehr hoch, was mit dem relativ hohen Variationskoeffizienten bei einem niedrigen Mittelwert der S/P-Ratios zu erklären ist.

Die Ergebnisse des Interassay-Vergleiches lagen mit Variationskoeffizienten von bis zu über 30 % teilweise über den von der OIE empfohlenen Werten von 20–30 % (Jacobson, 2004). Eine Erklärung hierfür wurde in der mangelnden Stabilität des Beschichtungsantigens nach Lagerung im Kühlschrank bzw. einem zweiten Einfrieren angebrochener Platten gefunden. Jedoch beeinflussten die Schwankungen des S/P-Ratios nur in wenigen Fällen die qualitative Beurteilung der Proben. Als Konsequenz aus den Ergebnissen des Intraassay-Vergleiches wurde bei der Darstellung der ELISA-Ergebnisse in dieser Arbeit auf über die Ermittlung des S/P-Ratios hinausgehende Berechnungen verzichtet und nur noch die qualitative Einteilung in positiv, grenzwertig und negativ zu Grunde gelegt. Zudem wurde nach Möglichkeit auf die wiederholte Verwendung einer nicht vollständig mit Proben belegten Platte verzichtet. In der Literatur gibt es keine Angaben über die Wiederholbarkeit von Testergebnissen im Pocken-ELISA. Der Grund der geringen Stabilität des Beschichtungsantigens könnte darin liegen, daß das FPV für ein Virus sehr groß und komplex ist. Mögliche Lösungen für dieses Problem in der Zukunft könnte die Beschichtung der Platten mit weiter gereinigten oder rekombinant expremierten Hüllproteinen sein, wie sie auch zum Nachweis von Antikörpern gegen andere Pockenviren angewendet werden (Rao et al., 1999; Watanabe et al., 2000).

Als Vergleichsmethode für die positiven Proben wurde der IIFT verwendet. In der Literatur ist nur einmal der IIFT zum Nachweis von Antikörpern gegen FPV beschrieben (Ariyoshi et al., 2003). In dieser Arbeit wurden Seren von zuvor gegen FPV geimpften Tieren untersucht. Bei allen Tieren konnten Antikörper gegen FPV nachgewiesen werden. Damit kann zusätzlich zu der hohen Spezifität, die der Methode generell zugeschrieben wird, auch von einer guten Sensitivität ausgegangen werden (Ariyoshi et al., 2003). Beim Vergleich der Ergebnisse von ELISA und IIFT ergab sich in der eigenen Arbeit eine Übereinstimmung von 86,3% der mit beiden Verfahren untersuchten Plasma- und Serumproben. Insgesamt erwies sich der IIFT als etwas sensitiver als der ELISA.

Außerdem wurde der Pocken-ELISA mit dem AGP zum Nachweis von Antikörpern gegen FPV verglichen. Tripathy et al. (1970) verglichen die Ergebnisse von AGP und passiver Hämagglutination. Mittels passiver Hämagglutination wurden Antikörper zu einem früheren Zeitpunkt p. i. und über einen längeren Zeitraum nachgewiesen. Der Anteil der Tiere, bei denen nach intrakutaner Infektion Antikörper nachgewiesen wurden, war mit beiden Verfahren gleich. In einer neueren Arbeit wurden die Ergebnisse im AGP und im sog. AGEA, einer Kombination aus AGP und einem Enzym-Assay, verglichen (Tadese et al., 2003). Mittels AGP wurden bei etwa einem Drittel der Tiere einer gegen FPV geimpften Herde Antikörper gegen FPV nachgewiesen. Durch den Einsatz des AGEA erhöhte sich der Anteil der Seren, in denen Antikörper gegen FPV nachgewiesen werden konnten, auf über 60% (Tadese et al., 2003). In der eigenen Arbeit stimmten die Ergebnisse von ELISA und AGP nur bei knapp 60% der untersuchten Proben überein. Fast 20% der untersuchten Proben wurden im ELISA positiv, aber im AGP negativ bewertet, während umgekehrt nur 5% der untersuchten Proben im ELISA negativ, im AGP jedoch positiv reagierten. Diese höhere Sensitivität eines Enzym-Assays im Vergleich zum AGP entspricht den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen.

Die Untersuchung von Seren aus an Geflügelpocken erkrankten oder gegen FPV geimpften Beständen auf Antikörper gegen FPV zeigte bei den erkrankten und den geimpften Herden einen etwa gleich hohen Anteil an seropositiven Tieren. Innerhalb der Gruppen der erkrankten bzw. geimpften Herden traten deutliche Unterschiede zwischen den Herden auf, wofür mehrere Ursachen diskutiert werden können. Sowohl bei den erkrankten als auch bei den geimpften Herden wird das Ergebnis der Untersuchung durch den Zeitpunkt der Probenentnahme beeinflusst. Ein Höhepunkt der Antikörperbildung gegen FPV wird ca. drei bis vier Wochen p. i. bzw. nach Vakzination erreicht (Mockett et al., 1987; Nagy et al., 1990; Iritani und Sawaguchi, 1994; Mishra und Mallick, 1996a). Bei den untersuchten Seren aus den erkrankten Herden ist der Zeitraum zwischen Infektion und Probennahme unbekannt. Evtl. wurden die Proben vor dem Einsetzen der Antikörperbildung entnommen. Diese Vermutung betrifft insbesondere eine erkrankte Herde, die einen besonders geringen

Anteil von Seren mit Antikörpern gegen FPV oder REV aufwies. Bei den Seren aus geimpften Herden ließ sich, obwohl sie in einigen Fällen erst drei bis vier Monate nach der Impfung gewonnen worden waren, kein Einfluß der Zeitdauer nach der Impfung erkennen. Dieses lange Persistieren der Antikörper deckt sich mit den Ergebnissen von Werner (1990).

Ferner wird das Ergebnis der Untersuchung von Seren aus erkrankten Beständen auch durch den Anteil der infizierten Tiere zum Zeitpunkt der Probennahme beeinflusst. Bei der Untersuchung von Seren aus geimpften Beständen spielen darüber hinaus alle Faktoren, die den Erfolg einer Impfung bestimmen, eine Rolle. Ferner können auch zahlreiche Umweltfaktoren oder die Infektion mit immunsuppressiven Viren die Stärke der Immunantwort beeinflussen (Neumann und Kaleta, 1992). Außerdem wurde beobachtet, daß verschiedene Feldisolate unter experimentellen Bedingungen eine unterschiedlich starke Immunantwort hervorrufen können (Iritani und Sawaguchi, 1994; Singh et al., 2000).

Da in Infektionsstudien gezeigt wurde, daß FPV-Isolate mit integriertem fvRP eine Antikörperbildung gegen REV hervorrufen können (Hertig et al., 1997; Singh et al., 2000), wurden die Feld-Seren auch auf Antikörper gegen REV untersucht. Fast 75 % aller Seren aus an Geflügelpocken erkrankten Beständen, aber nur 5,9 % der Seren aus zwei der geimpften Herden wiesen Antikörper gegen REV auf. Dies zeigt, daß die Bildung von REV-Antikörpern von dem integrierten fvRP und nicht durch eine zufällige, gleichzeitige Infektion mit REV induziert wurden. Außerdem wurden bei keiner der untersuchten Herden über Veränderungen, die auf eine Infektion mit REV hindeuteten, berichtet. Die Antikörper gegen REV in den Seren aus zwei geimpften Herden können sowohl von einer zusätzlichen Feldinfektion mit FPV als auch von einer Coinfektion mit REV induziert worden sein. Desweiteren lassen diese Ergebnisse vermuten, daß die Fähigkeit Antikörper gegen REV zu induzieren bei den FPV-Feldstämmen weit verbreitet ist. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Singh et al. (2000), die dies im Tierversuch nur bei einem von vier untersuchten FPV-Feldisolaten zeigen konnten.

Bei der Untersuchung von Seren aus an FPV erkrankten Beständen wurde festgestellt, daß es eine wesentlich höhere Anzahl positiver Reagenten sowohl für FPV als auch für REV gab, als nur für eines der beiden Viren. Dieser Zusammenhang widerspricht der These, daß eine Expression der REV-Proteine und eine dadurch hervorgerufene Immunsuppression für die schlechte spezifische humorale Immunantwort nach Infektion mit FPV verantwortlich sind.

Unabhängig von dieser Problematik wurden Seren aus Herden untersucht, über die vorberichtlich nichts über eine Erkrankung von Geflügelpocken oder eine Impfung gegen FPV bekannt war. Jedoch waren in zahlreichen anderen Herden des gleichen Betriebes in den letzten Jahren Geflügelpocken aufgetreten. In einigen der Seren wurden Antikörper gegen FPV nachgewiesen. Grund hierfür könnte eine subklinisch verlaufene FPV-Infektion

sein. In der Literatur gibt es vereinzelte Berichte über das Vorkommen bzw. Persistieren von FPV ohne klinische Symptomatik (Siebert, zitiert nach Manninger, 1938; Tripathy et al., 1974; Sanchez et al., 1976). Auch Buscaglia et al. (1985) wiesen in einem Legehennenbestand noch vor einer Impfung Antikörper gegen FPV nach, ohne daß die Tiere klinische Symptome gezeigt hatten. Bei der Untersuchung der Seren in der eigenen Arbeit wurden keine Antikörper gegen REV detektiert. Ursache für die Bildung von Antikörpern gegen FPV könnte zum einen ein Feldisolat sein, dem das fvRP fehlt und das seine Virulenz verloren hat. Zum anderen stellt sich die Frage nach einem möglicherweise verschleppten Impfstamm.

Um die Antikörperbildung gegen FPV und REV nach Infektion mit einem FPV-Feldisolat und dem Vakzinestamm HP B zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Infektionsversuche *in vivo* durchgeführt. Im ersten Versuch wurden die Tiere mit zwei verschiedenen Dosen des Feldisolates GB 869/02 in der sechsten Passage auf HEF bzw. mit dem Vakzinestamm HP B in der vom Hersteller empfohlenen Dosierung per Wing-Web-Methode (intrakutan) infiziert bzw. vakziniert. Nach fünf Wochen wurden alle Tiere ein zweites Mal intravenös mit dem Feldisolat infiziert.

Eine Woche nach der ersten Infektion wiesen alle infizierten Tiere an der Infektionsstelle eine Impfpocke auf. Bei den seziierten Tieren konnte in der Haut der Infektionsstelle auch FPV-spezifische DNA nachgewiesen werden, so daß von einer erfolgreichen Infektion ausgegangen werden konnte. Zu diesem Zeitpunkt war in den Lebern der seziierten Tiere, die das Feldisolat erhalten hatten, keine FPV-spezifische DNA nachweisbar. Dieses Ergebnis stimmt mit den Angaben von Minbay und Kreier (1973) überein. Hingegen ist in anderen Arbeiten nach intrakutaner Infektion mit virulentem FPV eine Vermehrung des FPV in den primär affinen Organen Leber und Knochenmark ab dem dritten Tag p. i. beschrieben (Francis, 1956; Mayr und Wittmann, 1957; Singh et al., 1987). Es muß offen bleiben, ob die Virusvermehrung in der Leber eine Woche nach der Infektion nicht mehr nachweisbar war, oder ob eine Replikation des FPV in diesem Organ nicht stattgefunden hat. Ein Grund für die möglicherweise ausgebliebene Virusvermehrung in der Leber könnte die Infektion per Wing-Web-Methode in der eigenen Arbeit sein, die gewählt wurde, um eine Vergleichbarkeit zu den Arbeiten von Hertig et al. (1997) und Singh et al. (2000) zu gewährleisten. In den Arbeiten von Francis (1956), Mayr und Wittmann (1957) und Singh et al. (1987) wurden die Tiere mittels Skarifikation oder Federfollikelmethode infiziert. Diese Infektionsmethoden führen zu einem besseren Angehen der Infektion (Mayr und Malicki, 1966; Mayr, 1992). Ein anderer Grund für die nicht nachgewiesene Virusvermehrung in der Leber könnte die Infektionsdosis und der verwendete Stamm sein.

Nach intrakutaner Infektion mit attenuierten Stämmen bleibt die Vermehrung in den primär affinen Organen aus (Mayr und Wittmann, 1957; Mayr, 1959). Somit stimmt der

negative Nachweis FPV-spezifischer DNA in den Lebern der vakzinierten Tiere mit der Literatur überein.

Bei der Mehrzahl der infizierten bzw. vakzinierten Tiere konnten drei Wochen nach der ersten, intrakutanen Infektion Antikörper gegen FPV bzw. REV nachgewiesen werden. Das zeigt, daß auch ohne nachweisbare Generalisation des FPV eine Antikörperbildung erfolgen kann. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit denen von Mayr und Wittmann (1957) und von Mayr (1959).

Kein Tier, das mit dem Feldisolat infiziert worden war, aber alle Tiere, die die Vakzine erhalten hatten, hatten vier Wochen nach der Infektion Antikörper gegen FPV entwickelt. Diese Ergebnisse stehen nicht in Einklang mit den Ergebnissen, die bei der Untersuchung der Feldseren erzielt wurden, bei denen die an FPV erkrankten und gegen FPV geimpften Herden einen vergleichbaren prozentualen Anteil von etwa 50 % an Tieren mit Antikörpern gegen FPV aufwiesen. Die Ursachen für die Unterschiede bei der Antikörperbildung nach Infektion mit pathogenem FPV im Feld und im Versuch sind vermutlich einerseits darin zu suchen, daß im Versuch SPF-Eintagsküken verwendet wurden. Andererseits liegen die Ursachen vermutlich auch in den unterschiedlichen Infektionswegen und es ist nicht ausgeschlossen, daß im Feld Reinfektionen stattfinden. Auch unter experimentellen Bedingungen konnten in dieser Arbeit durch eine intravenös durchgeführte Zweitinfektion mit dem Feldisolat bei etwa der Hälfte der Tiere Antikörper gegen FPV induziert werden.

Demgegenüber führten die definierten Bedingungen im Versuch dazu, daß, anders als im Feld, alle mit dem Vakzinestamm geimpften Tiere Antikörper gegen FPV entwickelten, obwohl in beiden Fällen derselbe Vakzinestamm eingesetzt worden war. Faktoren, die im Feld zu einem niedrigeren prozentualen Anteil von Tieren mit Antikörpern gegen FPV nach der Impfung geführt hatten, könnten, wie oben ausgeführt, der Zeitpunkt der Probenentnahme, eine Beeinträchtigung der Immunantwort durch die Haltungsbedingungen oder eine nicht optimale Durchführung der Impfung sein. Auch in der Arbeit von Werner (1990) wurden 3,5 Wochen nach der Impfung unter Feldbedingungen mittels ELISA nur bei 50 % der Tiere Antikörper gegen FPV nachgewiesen, so daß dies der unter Feldbedingungen zu erwartende Anteil seropositiver Tiere nach Impfung sein dürfte.

Fast alle Tiere, die mit der hohen Dosis des Feldisolates infiziert worden waren, und ungefähr ein Drittel der Tiere, die mit der niedrigen Dosis des Feldisolates infiziert worden waren, entwickelten Antikörper gegen REV. dahingegen induzierte der Vakzinestamm, in dem nur Überreste der LTR vorlagen, keine Antikörper gegen REV. Die Fähigkeit, Antikörper gegen REV zu induzieren, setzt eine Expression der im fvRP kodierten Gene voraus. Das wurde bisher erst von Hertig et al. (1997) bei einem Vakzinestamm, in dem ein integriertes fvRP vorlag, und von Singh et al. (2000) bei einem von vier untersuchten FPV-Feldisolaten mit integriertem fvRP festgestellt.

Im eigenen Versuch wurde zunächst vier Wochen nach der intrakutanen Infektion und später auch eine und vier Wochen nach der intravenösen Zweitinfektion bei mehreren Tieren, die das Feldisolat erhalten hatten, in den PBMC REV–Provirus–spezifische DNA, jedoch, bis auf eine Ausnahme keine FPV–spezifische DNA nachgewiesen. Ebenso war bei mehreren Tieren nach der intravenösen Zweitinfektion REV–Provirus–spezifische DNA, jedoch keine FPV–spezifische DNA in der Leber nachweisbar. Dies läßt auf die Bildung infektiöser REV–Virionen aus dem FPV–Genom und eine darauffolgende Integration in das zelluläre Genom schließen. Hertig et al. (1997) hatten aus dem Blut von Tieren, die mit einem Vakzinestamm mit integriertem fvRP infiziert worden waren, REV reisoliert. Dies hatte gezeigt, daß nicht nur REV–Antigen expremiert wird oder leere Viruspartikel ohne RNA (Meyers, 1993), gebildet werden, sondern komplette Virionen. Dies wurde nun bei einem Feldisolat festgestellt. Über die Ergebnisse von Hertig et al. (1997) hinausgehend wurde nachgewiesen, daß das gebildete REV auch in vivo unabhängig vom FPV weitere Zellen infizieren und dort persistieren kann.

Zudem wurde in dem ersten Infektionsversuch gezeigt, daß die Antikörperbildung gegen REV nach Infektion mit einem FPV–Stamm mit integriertem fvRP eng mit der Bildung infektiöser REV–Virionen aus FPV–Virionen mit integriertem fvRP zusammenhängt. Es sind wahrscheinlich die gebildeten REV–Virionen, die die Antikörper induzieren. Eine Expression der REV–Gene ohne die Bildung infektiöser REV–Virionen kommt offenbar seltener vor oder führt zu keiner Antikörperbildung.

Nach der intravenösen Zweitinfektion stieg in den beiden Gruppen, die zuvor mit dem Feldisolat infiziert worden waren, der Anteil von Tieren mit Antikörpern gegen REV oder mit REV–spezifischer DNA in den PBMC etwas an. Darüber hinaus konnte bei drei von sechs Tieren aus diesen beiden Gruppen FPV–spezifische DNA in der Leber und in einem Fall in den PBMC nachgewiesen werden. Hingegen waren bei den Tieren, die vorher mit dem Vakzinestamm geimpft worden, nach der Zweitinfektion keine FPV–DNA in der Leber, keine Antikörper gegen REV und, bis auf eine Ausnahme, keine REV–DNA in den PBMC nachweisbar. Dies kann darauf zurückzuführen sein, daß durch die vorhergegangene Immunisierung mit dem Vakzinestamm eine Replikation des FPV und eine Bildung von REV–Virionen verhindert wurden.

Eine Woche nach der Zweitinfektion wurde bei einem Tier FPV–spezifische DNA in den PBMC nachgewiesen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Minbay und Kreier (1973), die zwischen dem dritten und siebten Tag nach intravenöser Infektion mit FPV das Virus aus den PBMC reisolieren konnten.

Im zweiten Infektionsversuch wurde die Antikörperbildung nach Infektion mit dem Feldisolat GB 869/02, das 32 Mal auf LMH passagiert worden war, bis das fvRP mittels qPCR nicht mehr nachweisbar war, untersucht. Als Vergleich diente die vierte Passage

dieses Stammes auf LMH, in der das fvRP noch nachweisbar war. Die unterschiedlich passagierten Stämme wurden mit demselben Virustiter eingesetzt. Im ersten Versuch war die Antikörperbildung nach Vakzinierung mit dem Impfstamm HP B in der vom Hersteller empfohlenen und im Feld angewendeten Dosis untersucht worden. Im zweiten Versuch wurde der Vakzinestamm in derselben Dosierung wie das Feldisolat verabreicht, um auszuschließen, daß der hohe Anteil seropositiver Tiere in der geimpften Gruppe im ersten Versuch auf eine höhere Infektionsdosis zurückzuführen war. Darüber hinaus wurde einem Teil der Tiere gleichzeitig mit der FPV-Infektion Schafserythrozyten injiziert, um die humorale Immunantwort gegen diese zu messen und somit zu prüfen, ob es durch die Bildung infektiöser REV-Virionen zu einer nachweisbaren Immunsuppression kommt.

Das gering passagierte Feldisolat induzierte bis fünf Wochen p. i. bei keinem Tier Antikörper gegen FPV, jedoch bei etwa einem Drittel der Tiere Antikörper gegen REV. Der Anteil REV-positiver Tiere entsprach ungefähr dem Ergebnis der Gruppe, die im vorhergehenden Versuch die niedrige Dosierung des Feldisolates erhalten hatte. Im ersten Versuch betrug der Virustiter in dieser Gruppe 10^4 TCID₅₀/ml der sechsten Passage auf HEF. Das in der qPCR ermittelte Verhältnis von allen FPV-Virionen zu den FPV-Virionen mit integriertem fvRP lag bei 1:0,009. Somit betrug der Titer fvRP-haltiger FPV-Virionen etwa 90 TCID₅₀/ml. Im zweiten Versuch wurde die vierte Passage auf LMH mit einem Virustiter von 10^5 TCID₅₀/ml zur Infektion benutzt. Das Verhältnis von allen FPV-Virionen zu den FPV-Virionen mit integriertem fvRP lag bei $1:4,574 \cdot 10^{-4}$. Somit betrug der Titer fvRP-haltiger FPV-Virionen etwa 45 TCID₅₀/ml. Also erhielt jedes Tier der Gruppe, die im zweiten Versuch mit der vierten Passage auf LMH infiziert wurde, in etwa ebensoviele FPV-Virionen mit integriertem fvRP wie in der Gruppe mit der niedrigen Dosis im ersten Versuch.

Die Infektion mit dem hoch passagierten Feldisolat ohne nachweisbares fvRP bewirkte bei keinem der Tiere eine Bildung von Antikörpern gegen REV. Die ausbleibende Antikörperbildung zeigte, daß, selbst wenn noch FPV-Virionen mit fvRP unter der Nachweisgrenze der qPCR vorgelegen hätten, diese keine Bedeutung für die Pathogenese mehr besaßen.

Bei vier von 20 Tieren wurde durch die Infektion mit der 32. Passage des Feldisolates eine Bildung von Antikörpern gegen FPV induziert. Demgegenüber entwickelte keines der Tiere, die mit der vierten Passage des Feldisolates infiziert worden waren, Antikörper gegen FPV. Dieser Vergleich zeigt eine Beteiligung des fvRP bei der Hemmung der Antikörperbildung. Gleichzeitig wird jedoch deutlich, daß das fvRP nur eine von mehreren Strategien des FPV zur Immunsuppression sein kann, da der Anteil von Tieren mit Antikörpern gegen FPV nach Infektion mit dem Vakzinestamm wesentlich höher war. Den unterschiedlichen Anteil von Tieren mit Antikörpern auf die Testmethode zurückzuführen, ist wenig wahrscheinlich, da in den Feldseren mit diesem ELISA bei ca. 50 % der untersuchten

Seren Antikörper gegen FPV nachgewiesen wurden. Antigenetische Unterschiede zwischen dem als Beschichtungsantigen und dem zur Infektion verwendeten Virusstamm müßten auf gravierenden Veränderungen in den Hüllproteinen beruhen. Die Antikörperbildung gegen FPV beruht auf etwa 30 verschiedenen immunogenen Proteinen (Mockett et al., 1987; Schnitzlein et al., 1988a; Mishra und Mallick, 1996b), so daß Unterschiede bei nur wenigen immunogenen Proteinen nicht das Ergebnis im ELISA beeinflussen würden. Auch traten im Western-Blot zwischen verschiedenen FPV-Stämmen und -Isolaten nur kleinere Unterschiede auf (Schnitzlein et al., 1988a).

Daß das Feldisolat ohne das integrierte fvRP nicht zu einer deutlichen Antikörperbildung gegen FPV führte, liegt also vermutlich an einer Modulation des Immunsystems durch das FPV mit anderen Mechanismen als dem integriertem fvRP. Bei der Sequenzierung des FPV-Genoms eines pathogenen Stammes wurden eine Vielzahl ORFs identifiziert, deren Sequenzhomologien mit bekannten Proteinen immunmodulatorische Funktionen erwarten lassen (Afonso et al., 2000). Die DNA-Sequenz dieses amerikanischen, pathogenen Stammes wurde mit einer niedrigen und noch pathogenen Passage des europäischen FPV-Stammes HP 1 und einer hohen, attenuierten Passage von HP 1 verglichen. Dabei wurden drei ORFs identifiziert, deren Produkte eine immunmodulatorische Funktion erwarten ließen und die sich zwischen der pathogenen und der nicht pathogenen Passage, jedoch nicht zwischen dem amerikanischen und dem europäischen Stamm unterschieden (Afonso et al., 2000; Laidlaw und Skinner, 2004). Betroffen sind die im attenuierten Stamm deletierten ORFs 001 und 260 sowie der vom C-Ende um 47 Aminosäuren verkürzte ORF 239. Alle drei Gene weisen Homologien zu C-Typ Lektinen auf (Afonso et al., 2000). Die Rolle dieser Lektine im Immunsystem ist vielfältig und nicht vollständig geklärt, es wird jedoch eine Rolle bei der Erkennung von Pathogenen und der Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Stoffen angenommen (Weis et al., 1998).

Mittels gentechnischer Verfahren wurde von Singh et al. (2005) basierend auf einem FPV-Feldstamm eine Mutante mit einer Deletion des fvRP hergestellt. Der Vergleich des Feldstammes, der Deletionsmutante und eines Vakzinestammes zeigte im Infektionsversuch eine verringerte, wenn auch nicht vollständig aufgehobene Virulenz der Mutante ohne das fvRP. Ähnlich wie die Ergebnisse des eigenen Versuches zeigt dies, daß das fvRP zwar ein bedeutender, aber bei weitem nicht der einzige Virulenzfaktor ist. In dem Versuch von Singh et al. (2005) war die Antikörperbildung gegen FPV jedoch nach Infektion bzw. Vakzinierung mit dem Feldisolat, der Mutante und dem Vakzinestamm vergleichbar stark. Die Infektion der Tiere mittels Skarifikation könnte eine Erklärung für die in diesem Versuch aufgetretene klinische Symptomatik sein, die in der vorhergehenden Untersuchung dieser Arbeitsgruppe (Singh et al., 2000) und den beiden eigenen Versuchen ausblieb.

Beim Vergleich der Infektion mit dem Impfstamm HP B zwischen dem ersten und dem zweiten Versuch zeigte sich, trotz des Unterschiedes in der Dosis, nur eine unwesentliche Abweichung. Die Impfung induzierte annähernd so wie im ersten Versuch bei fast allen Tieren Antikörper gegen FPV. Somit ist die starke Antikörperbildung nach der Impfung mit dem Vakzinestamm nicht auf einen Unterschied in der Infektionsdosis zurückzuführen. Der Unterschied zu dem Feldstamm dürfte, wie oben ausgeführt, eher auf einer verminderten Immunmodulation, oder evtl. auf einer erhöhten Immunogenität der immundominanten Proteine beruhen.

Eine sich in einer Verringerung der Antikörpertiter gegen Schafserythrozyten manifestierende Immunsuppression konnte nicht nachgewiesen werden, da keines der Tiere, inklusive der Tiere der Negativkontrolle, Antikörper gegen Schafserythrozyten bildete. Die Bestimmung von Antikörpern gegen Schafserythrozyten ist eine etablierte Methode, jedoch wurde keine Literaturangabe gefunden, in der die Injektion von Schafserythrozyten in Eintagsküken beschrieben wurde. Eventuell liegt die ausbleibende Antikörperbildung in dem noch nicht voll ausgebildeten Immunsystem begründet. Dies ist möglicherweise auch der Grund, warum in den eigenen Versuchen die Antikörperbildung gegen FPV erst drei Wochen p. i., und nicht, wie in der Literatur beschrieben (Mockett et al., 1987; Nagy et al., 1990; Iritani und Sawaguchi, 1994; Mishra und Mallick, 1996a; Singh et al., 2000; Singh et al., 2005) schon früher einsetzte.

Auch wenn eine immunsuppressive Wirkung des fvRP nicht deutlich nachweisbar war, konnte mit dem zweiten Versuch zusammenfassend gezeigt werden, daß mit dem Verlust des fvRP eine gesteigerte Antikörperbildung gegen FPV einhergeht, aber auch andere Faktoren eine wichtige Rolle spielen.