

DIE IMPFUNG NICHT DOMESTIZIERTER TIERE GEGEN NEUE VIRUSINFEKTIONEN

VACCINATIE VAN NIET-GEDOMESTICEERDE DIEREN TEGEN
OPKOMENDE VIRUSINFECTIES

Proefschrift

Ter verkrijging van de graad van doctor aan de
Erasmus Universiteit Rotterdam
op gezag van de
rector magnificus

Prof.dr. S.W.J. Lamberts

en volgens besluit van het College voor Promoties.

De openbare verdediging zal plaatsvinden op
donderdag 4 oktober 2007 om 10.00 uur

door

Johannes David Willem Phllppa

geboren te Nieuwveen

Promotiecommissie

Promotores: Prof.dr. A.D.M.E. Osterhaus
Prof.dr. T. Kuiken

Overige leden: Prof.dr. E.H.J.H.M. Claassen
Prof.dr. M. Domingo Prof.dr.
M.P.G. Koopmans

Die in dieser Dissertation beschriebene Studie wurde in der Abteilung Virologie des Klinikums der Erasmus-Universität Rotterdam, Niederlande, sowie im Rotterdamer Zoo, Rotterdam, Niederlande, durchgeführt und von Intervet International B.V. finanziell unterstützt.

Der Druck dieser Dissertation wurde finanziell unterstützt von: BioCheck B.V., E.V.L. B.V., F. Hoffmann-La Roche Ltd., Intervet International B.V., Merial B.V., Organon BioSciences und ViroClinics B.V.

Inhalt		
Kapitel 1.	Allgemeine Einführung	9
Kapitel 2.	Morbillivirus-Infektionen	29
Kapitel 2.1.	Neurologische Zeichen bei der Mehrheit der jungen Seehunde (<i>Phoca Vitulina</i>) mit tödlichem Seehund-Staupevirus während eines vor kurzem erfolgten Ausbruchs	31
Kapitel 2.2.	Serologische Untersuchungen freilaufender Tiere	45
Kapitel 2.2.1.	Studie zum Nachweis von Antikörpern gegen ausgewählte Pathogene bei freilaufenden Landraubtieren und Meeressäugern in Kanada	47
Kapitel 2.2.2.	Serologische Untersuchung zum Nachweis ausgewählter viraler Pathogene beim Europäischen Nerz (<i>Mustela lutreola</i>) und anderen freilaufenden Mardern im Südwesten Frankreichs	59
Kapitel 2.3.	Die Staupevirus-Impfung nicht domestizierter Landraubtiere	73
Kapitel 2.3.1.	Der ISCOM-Impfstoff gegen den Staupevirus induziert eine stärkere humorale Immunantwort beim Europäischen Nerz (<i>Mustela lutreola</i>) als ein auf Kanarienvogel als Vektor basierender rekombinanter Impfstoff	75
Kapitel 2.3.2.	Auf ISCOM basierende und rekombinante Impfstoffe induzieren eine schwache Immunität gegen Staupeviren beim Afrikanischen Wildhund (<i>Lycaon pictus</i>)	85
Kapitel 3.	Aviäre Influenza	97
Kapitel 3.1.	Hochpathogene Aviäre Influenza (H7N7): Die Impfung von Zoovögeln und die Übertragung auf Vogelarten außer Geflügel	99
Kapitel 3.2.	Die Impfung gegen den hochpathogenen Aviären Influenzavirus H5N1 in Zoos mit einem adjuvantierten, inaktivierten H5N2-Impfstoff	115
Kapitel 3.3.	Die Persistenz von Serumantikörpern nach einer Impfung gegen die hochpathogene Aviäre Influenza (H5 und H7) in Zoos.	133
Kapitel 3.4.	Der Schutz von Felsentauben (<i>Columba livia</i>) gegen die hochpathogene Aviäre Influenza (H5N1) durch einen inaktivierten H5N6-Impfstoff	141
Kapitel 4.	Zusammenfassende Diskussion	161
	Referenzen	189
	Nederlandse samenvatting	209
	Dankwoord	229
	Curriculum vitae, publicaties	233
	Bildquellen	236

ABKÜRZUNGEN

ADV	Aleutenkrankheit
AI	Aviäre Influenza
AIV	Aviärer Influenzavirus
AZA	Association of Zoos and Aquariums
AAZV	American Association of Zoo Veterinarians
CAV	Canines Adenovirus
CCoV	Canines Coronavirus
CDV	Staupevirus
CI	Konfidenzintervall
CN	zentralnervös
CPIV	Canines Parainfluenzavirus
CPV	Canines Parvovirus
DIVA	Unterscheidbarkeit infizierter von geimpften Tieren
DMV	Delfin-Morbillivirus
dpi	Tage nach Inokulation
DRV	Delfin-Rhabdovirus
EAZA	European Association of Zoos and Aquariums
EAZWW	European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (EIA)
EU	Europäische Gemeinschaft
F	Fusion
FCoV	Felines Coronavirus
FCS	Fetales Kälberserum
FelV	Felines Leukämievirus
FHV	Felines Herpesvirus
FPV	Felines Parvovirus
GI	gastrointestinal
GMT	Geometrischer Mittelwert
H	Hämagglutinin
HAO	Hämagglutinin in einer inaktiven Vorläuferform
HI	Hämagglutinationshemmung (dt.: HAH)
HPAI	hochpathogene Aviäre Influenza
Ig	Immunglobulin
i.m.	intramuskulär
ISCOM	immunstimulierender Komplex
IUCN	World Conservation Union
KV	Totimpfstoff
LPAI	niedrigpathogene Aviäre Influenza
M	Matrix
MLV	Modifizierter Lebendvirus
MS	Mitgliedsstaaten
NP	Nukleoprotein

PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PDV	Seehund-Staupevirus
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RV	Rabiesvirus (Tollwutvirus)
SARS	Schweres Akutes Atemwegssyndrom
S.C.	subkutan
SD	Standardabweichung
SRRC	Seal Rehabilitation and Research Centre
TCID	Gewebekultur-Infektionsdosis
TMB	Tetramethylbenzidin
VN	Virusneutralisierung
WNV	West-Nil-Virus

3.4.

Der Schutz von Felsentauben (*Columba livia*)
gegen die hochpathogene Aviäre Influenza (H5N1)
durch einen inaktivierten
H5N6-Impfstoff

Eingereicht

J.D.W. Philippa
T.M. Bestebroer
C. Baas
M.W.G. van de Bildt
R.A.M. Fouchier
G. van Amerongen
W. Schaftenaar
M. Vrijenhoek
T. Kuiken
A.D.M.E. Osterhaus

Die Impfung von Tauben gegen den HPAI-Virus (H5N1)

Die jüngsten Ausbrüche der hochpathogenen Aviären Influenza (HPAI), die durch den Virus-Subtyp H5N1 hervorgerufen wird, sind in ihrer Dauer, Ausdehnung und Vielzahl ihrer verschiedenen Wirte – darunter auch Menschen – noch nie da gewesen. Wild lebende und domestizierte Felsentauben (*Columba livia*) kommen weltweit sehr häufig vor und leben in großer Nähe zum Menschen. Deshalb ist ihre Anfälligkeit für Infektionen mit HPAI-Viren derzeit Gegenstand der Diskussion. Eine experimentelle intratracheale und intraoesophageale Infektion mit 10^8 TCID₅₀/ml des HPAI-Virus vom H5N1-Subtyp aus zwei verschiedenen antigenen Varianten (A/indonesia/5/05 oder A/turkey/Turkey/1/05) induzierte eine systemische Infektion bei Felsentauben mit einer geringen Morbidität und Mortalität. Die klinischen Zeichen der infizierten Tiere beschränkten sich auf Depression, allgemeines Unwohlsein und neurologische Zeichen (Ataxie, Tremor, Opisthotonus und Torticollis). Am 3. Tag nach der Inokulation (dpi) wurde durch Immunhistochemie das Vorkommen viraler Nukleoproteine in Lunge, Luftsack und Gehirn nachgewiesen. An diesem Tag konnte der Virus auch aus verschiedenen Organen isoliert werden, und am 3. und 27. dpi wurde durch RT-PCR virale RNA in verschiedenen Organen der Tiere nachgewiesen, die mit einem der beiden Viren infiziert waren. Nach dem 4. dpi wurde aus den oropharyngealen Abstrichen kein Virus mehr isoliert, und auch aus den Kloakenabstrichen konnte über den gesamten Zeitraum des Experiments kein Virus isoliert werden. Die Impfung von Tauben mit einem handelsüblichen inaktivierten adjuvantierten H5N6-Impfstoff für Geflügel hat sich als sicher erwiesen, extra-respiratorische Infektionen weitestgehend eingedämmt, die Entstehung von schwerwiegenden klinischen Zeichen und Mortalität verhindert und die oropharyngeale Virusfreisetzung beider Stämme auf den 1. dpi beschränkt. Deshalb kann gesagt werden, dass die Impfung die potentiellen Risiken, die von mit HPAI-H5N1-Viren infizierten Tauben ausgehen, wirksam verringert hat.

EINFÜHRUNG

Aviäre Influenzaviren (AIV) gehören zu den Influenzaviren vom Typ A der Familie Orthomyxoviridae und können sowohl auf der Grundlage der antigenen Eigenschaften ihres Oberflächenglykoproteins Hämagglutinin (H) sowie der Neuraminidasen (N) klassifiziert werden, als auch auf der Basis ihrer Pathogenität für Hühner nach intravenöser Inokulation. Bis heute wurden 16 H-Subtypen (H1-H16) und 9 N-Subtypen (N1-N9) identifiziert, die in vielen verschiedenen Kombinationen auftreten^{151,160}. Aquatische Vogelarten (aus den Ordnungen der Gänsevögel und der Regenpfeiferartigen) werden derzeit als die bedeutendsten natürlichen AI-Viren-Reservoirs erachtet. Bei diesen Vogelarten ist in der Regel nur eine sehr geringe bis gar keine Morbidität und Mortalität als Folge einer Infektion zu beobachten. Die hochpathogenen Aviären Influenzaviren (HPAI) sind auf die Subtypen H5 und H7 begrenzt und wurden bis heute vor allem aus Hühnervögeln isoliert (Hühner, Puten, Raufußhühner, Fasanen und Wachteln). Bei diesen Vogelarten können sie schwere generalisierte Erkrankungen hervorrufen, deren Mortalitätsrate bei Geflügel bis zu 100 Prozent betragen kann. Obwohl HPAI-Ausbrüche in der Vergangenheit nur bei Geflügel auftraten, führte ein Ausbruch von HPAI-Viren des Subtyps H5N1 im Jahre 2002 zu schweren Erkrankungen wild lebender Zugvögel und ortsgewandener Wasservögel in Hongkong mit einer hohen Mortalität^{183,372}. Seit 2002 haben sich HPAI-Viren vom Subtyp H5N1 in noch nie da gewesenem Ausmaß von

Südostasien über Asien bis in den Mittleren Osten, Europa und Afrika ausgebreitet. Dabei wurde die Bandbreite der unterschiedlichen Wirte – einschließlich vieler Vogelarten – immer größer. Sie umfasst heute mindestens 105 Gattungen aus 14 verschiedenen Ordnungen¹⁶⁴ sowie mehrere Arten von Säugetieren, darunter auch Menschen.

Felsentauben (*Columba livia*) kommen weltweit sehr häufig vor – vor allem als Wildtauben in Städten und als Haustiere – und werden oft auch als Brieftauben gezüchtet, die große Distanzen zurücklegen. Die Anfälligkeit von Tauben für AIV-Infektionen ist zurzeit noch umstritten. In der Vergangenheit wurden Tauben als „resistent, oder größtenteils resistent, gegenüber Infektionen mit HPAI-Viren der Subtypen H7 und H5“ beschrieben^{391,392,411}, weil sie nach experimentellen Infektionen keine Antikörper bildeten⁴⁰⁵. In letzter Zeit wurde aber eine Anfälligkeit von Tauben gegenüber neueren HPAI-Virenstämmen des Subtyps H5N1 dokumentiert^{213,372,304,411,412}, wobei der Neurotropismus des Virus nur auf das Zentrale Nervensystem begrenzt war. Der Nachweis erfolgte durch Immunhistochemie mit Antikörpern. Eine Übertragung von Vogel zu Vogel wurde jedoch nicht dokumentiert. Indikatorhühner, die gemeinsam mit experimentell infizierten Tauben untergebracht waren, infizierten sich nicht⁴⁰⁷. Im Gegensatz dazu könnten aber infizierte wild lebende und domestizierte Tauben für Geflügel, bestimmte Arten von Säugetieren und auch Menschen eine Gefahr darstellen, wenn HPAI-H5N1-Viren freigesetzt werden, da Wildtauben in Städten sehr häufig vorkommen und domestizierte Tauben in großen Gruppen in unmittelbarer Nähe zum Menschen gehalten werden.

Impfungen sind eine probate Methode, die horizontale Ausbreitung von Aviären Influenzaviren unter Geflügel zu verringern^{179,180}, und haben sich zum Schutz von Geflügel vor HPAI unter Feldbedingungen als wirksam erwiesen¹⁸¹. Dennoch induzierte die Impfung von Tauben und anderen Gattungen der Ordnung Columbidae mit H5- und H7-Vakzinen nur relativ geringe Serumantikörperantworten im Vergleich mit anderen Ordnungen, die in Zoos getestet wurden, was darauf schließen lässt, dass eine Impfung in diesen Gattungen wohl weniger wirksam wäre^{402,410}.

Das Ziel dieser Studie bestand darin, (1) die Sicherheit und Wirksamkeit eines vollständigen inaktivierten adjuvantierten H5N6-Impfstoffs gegen Infektionen mit einem der beiden HPAI-Virenstämmen aus verschiedenen antigenen Varianten zu bestimmen, und (2) den Zelltropismus, die assoziierten Erkrankungen und die Virusabsonderung bei Tauben zu bestimmen, die mit einem der beiden Viren infiziert sind.

MATERIALIEN UND METHODEN

Tiere und Versuchsanordnung

Das Versuchsprotokoll wurde von einem unabhängigen Komitee zur Genehmigung von Tierversuchen genehmigt, und alle Experimente wurden unter den Bedingungen der biologischen Schutzstufe 3 durchgeführt. Achtundvierzig weibliche und männliche Felsentauben aus derselben Zucht wurden ab einem Alter von etwa 4 Wochen gemeinsam in einer Innenraumvoliere untergebracht und nach dem Zufallsprinzip mit farbigen Fußbändern versehen, um 4 Gruppen à 12 Vögeln zu bilden. Zwei dieser Gruppen wurden im Alter von 4-5 Wochen sowie noch einmal 6 Wochen später mit 0,25ml eines inaktivierten adjuvantierten Impfstoffs zum Schutz von Geflügel gegen den Aviären Influenzavirus des Subtyps H5N6 subkutan geimpft (Nobilis Influenza H5N6®, Intervet, Boxmeer, Niederlande). Der verwendete Virenstamm (A/duck/Potsdam/2243/84) besaß eine Homologie von 88% bzw. 87% zu A/Indonesia/5/05 bzw. A/turkey/Turkey/1/05 hinsichtlich der Nukleotidsequenz des HA-Gens (1692 Basenpaare ohne die grundlegende Spaltstelle), und von 91,5% bzw. 91,5% hinsichtlich der Aminosäuren. Der Impfstoff wurde nach Maßgabe der Anforderungen produziert und getestet, die im „Manual of Diagnostic Tests and

Vaccines for Terrestrial Animals” der OIE (Kapitel 2.7.12) beschrieben werden. Wie ein Potency-Test bei Hühnern ergab, induziert er mindestens 6 log₂ Hämagglutinationshemmungs-(HI)-Einheiten (weitere Details können vom Hersteller erfragt werden). Die Kontrollgruppen erhielten eine Placeboimpfung mit 0,25ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS). Drei Wochen nach der zweiten Impfung wurde jede Gruppe in separate Isolatoren der Biologischen Schutzstufe 3 mit negativem Druck (Sog) verlegt. Vier Wochen nach der zweiten Impfung wurden zwei Gruppen (eine geimpft und die andere mit Placebo geimpft) mit A/Indonesia/5/05 (A/Indonesia) inokuliert, und die beiden anderen Gruppen (eine geimpft und die andere mit Placebo geimpft) mit A/turkey/Turkey/1/05 (A/turkey). Zur Inokulation wurde eine allantoische Flüssigkeit verwendet, die 1 x 10⁸ TCID₅₀/ml HPAI-H5N1-Viren enthielt – aufgeteilt auf Trachea (0,5ml) und Oesophagus (0,5ml). Zeitgleich wurden Transponder zur Temperaturüberwachung subkutan implantiert. Die klinischen Zeichen wurden dokumentiert (täglich durch einen qualifizierten Veterinär), sowie auch die Temperatur (täglich) und das Körpergewicht (alle 3 Tage) bis zum 27. Tag nach der Inokulation (dpi).

Unter manueller Stauung wurde der rechten Vena jugularis mehrmals Blut entnommen (0,5-1ml): zum Zeitpunkt der Impfung, am Infektionstag, am 14. dpi und zum Zeitpunkt der Euthanasie (3. dpi oder 27. dpi). Die Blutabnehmeröhrchen mit Gerinnungsaktivator und Serum-Separator (MiniCollect®, Greiner Bio-One) wurden zentrifugiert, und das Serum wurde bei -70°C eingelagert. Kloakale und oropharyngeale Proben wurden mit Wattestäbchen entnommen und bei -70°C in einem Transportmedium eingelagert, das aus Hanks' ausgeglichener Salzlösung, 10% vol/vol Glycerin, 200 E/ml Penicillin, 200 µg/ml Streptomycin, 100 E/ml Polymyxin B Sulfat und 250 µg/ml Gentamicin bestand (MP Biomedicals, Zoetermeer, Niederlande). Es wurden mehrere Abstriche genommen: zum Zeitpunkt der Impfung, innerhalb der nächsten zwei Wochen nach der Impfung täglich und danach zweimal pro Woche. Am 3. dpi wurden 5 Tauben aus jeder Gruppe nach Isofluran-Anästhesie durch Aderlass euthanasiert. Die verbleibenden Tiere wurden euthanasiert, als sie moribund waren, oder am 27. dpi. Alle Tiere wurden zum Zwecke der groben Pathologie, Histopathologie, Immunhistochemie und der virologischen Untersuchung obduziert.

Nach Beginn der Impfungen wurden interkurrente Salmonelleninfektionen (*Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Typhimurium) sowie Trichomonasinfektionen diagnostiziert, während alle Tauben zusammen untergebracht waren. Trotz des sofortigen Beginns einer antibakteriellen und trichomonaziden Behandlung starben drei Tiere an diesen Infektionen. Deshalb standen für die Belastungsinfektion nur noch drei Gruppen von 11 Tauben und eine Gruppe von 12 Tauben zur Verfügung. Alle Tauben waren zum Zeitpunkt der Infektion klinisch gesund und wiesen in Tests keine der genannten Pathogene auf.

Serologie

Um die humorale Immunantwort auf die Impfung und die Infektion einschätzen zu können, wurden die für A/duck/Potsdam/2243/84 (Virenstamm der Vakzine), A/turkey und A/Indonesia spezifischen Antikörpertiter in doppelter Ausfertigung bestimmt. Dazu diente ein Hämagglutinationshemmungs-Test (HI) nach Standardprozedur mit Puten-Erythrozyten^{377,378}. Nicht nachweisbare Titer (<10) wurden zur Berechnung der Geometrischen Mitteltiter (GMT) mit einem 95%igen Konfidenzintervall (CI) als 5 berücksichtigt. Darüber hinaus wurde der Prozentsatz von Tauben mit einem Titer > 40 berechnet, um ihn mit einer kürzlich publizierten Impfung von Tierarten der Ordnung Taubenvögel in Zoos vergleichen zu können^{402,410}.

Viren

Die verwendeten Virenstämme repräsentierten zwei antigene Varianten⁴⁰⁴: A/turkey/Turkey/1/05 von H5N1, Clade 2, Subclade 2, sowie A/Indonesia/5/05 von H5N1, Clade 2, Subclade 1⁴¹³. Die Kulturen wurden in embryonierten Hühnereiern nach der zweiten Passage produziert und die allantoischen Flüssigkeiten nach 3 Tagen entnommen. Die infektiösen Virustiter wurden als 50-prozentige Gewebekultur-Infektionsdosis (TCID₅₀) in der Madin-Darby-Hundenieren(MDCK)-Zelllinie bestimmt (ATCC Produkt-Nr. CCL-34 (NBL-2)) wie bereits beschrieben⁴¹⁴.

Histopathologische und immunhistochemische Untersuchung

Die Obduktionen und die Gewebeproben wurden nach einem Standardprotokoll durchgeführt. Dabei wurden Proben von Lunge, Luftsack, Oesophagus, Proventriculus, Duodenum, Pankreas, Jejunum, Ileum, Caecum, Kolon, Leber, Milz, Niere, Nebennieren, Cerebrum, Cerebellum und Hirnstamm entnommen. Nachdem die Proben in einer 10-prozentigen neutral gepufferten Formalinlösung fixiert und in Paraffin eingelegt wurden, wurden Gewebesektionen mit einer Dicke von 4 µm angefertigt, entwachst und mit Hämatoxylin und Eosin zum Zwecke der histologischen Bewertung eingefärbt. Sektionsduplikate wurden mit einer immunhistologischen Technik eingefärbt. Dazu diente ein monoklonaler Antikörper gegen das Nukleoprotein des Influenza-A-Virus (als primärer Antikörper zum Nachweis des Influenza-Virus-Antigens) sowie eine Isotyp-Kontrolle IgG2A⁴¹⁵.

Virologische Untersuchung

Zum Zwecke der histopathologischen und immunhistochemischen Bestimmung wurden Duplikate von Proben desselben Gewebes entnommen und bei -70°C bis zur virologischen Untersuchung eingelagert. Die Gewebeproben wurden gewogen und in einem Homogenisiergerät (Kinematica Polytron, Luzern, Schweiz) in 3 ml Infektionsmedium (aus Eagle's Minimal Essential Medium [EMEM], bovinem Serumalbumin [Fraktion V 7,5%, 1:25], 4 µg/ml Trypsin, 2 mM L-Glutamin, 100 E/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 7,5-prozentigem NaHCO₃ und 1 M HEPES) homogenisiert. Die homogenisierte Lösung (200 µl) wurde dann zum Zwecke der RNA-Isolierung zu 300 µl Lysis-Puffer hinzugefügt und bei -70°C eingelagert.

Die RNA-Isolierung und die Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) erfolgten wie bereits beschrieben³⁶⁰. Zur Isolierung der RNA wurde ein MagNaPure LC System mit dem MagnaPure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit verwendet (Roche Diagnostics, Almere, Niederlande), und der Influenza-A-Virus wurde mit Hilfe eines Echtzeit-RT-PCR-Tests nachgewiesen⁴¹⁶. Zur Verstärkung und Erkennung diente ein

ABI-7700-Gerät mit dem TaqMan EZ RT-PCR Core Reagents Kit (Applied Biosystems, Nieuwerkerk aan den IJssel, Niederlande). Dazu wurden 20 µl Eluat in einem Endvolumen von 50 µl eingesetzt.

Für alle entnommenen Abstriche wurden die infektiösen Virustiter sowie alle auf Influenza-A-Virus RT-PCR-positiv getesteten homogenisierten Gewebeproben bestimmt. Zu diesem Zweck wurden zehnfache Serienverdünnungen auf MDCK-Zellen im Triplikot inokuliert, um die TCID₅₀ pro Milliliter oder Gramm Gewebe zu bestimmen, wie bereits beschrieben⁴¹⁴.

ERGEBNISSE

Nebenwirkungen, klinische Zeichen und Mortalität

Bei keinem der Vögel traten allgemeine oder lokale Nebenwirkungen auf, die auf die Impfung hätten zurückgeführt werden können. Dagegen zeigten alle Vögel – unabhängig von ihrem Impfstatus – am 1. dpi nach der trachealen und oesophagealen Belastungsinfektion mit 10⁸ TCID₅₀ HPAI-H5N1-Viren (A/turkey oder A/Indonesia) Zeichen allgemeinen Unwohlseins: Depression, Aufplustern sowie eine leichte Erhöhung der Körpertemperatur. In allen Gruppen wurde eine geringe durchschnittliche Erhöhung der Körpertemperatur (bis zu 0,5°C) während der ersten 2 dpi beobachtet, wobei die Durchschnittstemperaturen jedoch über einen Zeitraum von 27 dpi zwischen 42°C und 43°C blieben (diese Ergebnisse sind hier nicht aufgeführt). Hinsichtlich der Schwankungen ihres durchschnittlichen Körpergewichts unterschieden sich die Gruppen für die Dauer des Experiments nicht wesentlich.

Mit Placebo geimpfte Tauben

Eine von 6 mit Placebo geimpften Tauben, die mit A/turkey inokuliert wurden, zeigte geringfügige neurologische Zeichen (Tremor) am 4. dpi und zunehmend schwerwiegendere neurologische Zeichen am 5. dpi, an dem sie daraufhin euthanasiert wurde (Torticollis, Hemiparalyse der Flügel, Ataxie und schließlich Unfähigkeit zu stehen). Drei von 6 mit Placebo geimpften Tauben zeigten geringfügige klinische Zeichen (Aufplustern, Tremor) vom 1. bis zum 7. dpi. Die Inokulation der mit Placebo geimpften Tauben mit A/Indonesia hatte in 2 von 7 Tauben vom 1. bis zum 7. dpi keine Mortalität und nur eine leichte Morbidität mit geringfügigen klinischen Zeichen zur Folge (Aufplustern, Tremor). Am 7. dpi wurden die klinischen Zeichen in einer der mit A/Indonesia inokulierten Tauben schwerwiegend (Opisthotonus/Torticollis, Ataxie, Tremor – Verschlimmerung mit Aufregung, Depression und Aufplustern). Diese Taube war jedoch fähig zu stehen und zu fressen und wurde deshalb nicht euthanasiert. Bis zum 27. dpi erholte sich das Tier langsam. Tremor, Ataxie und Opisthotonus traten in diesem Zeitraum aber noch gelegentlich auf.

Geimpfte Tauben

Die tracheale und oesophageale Belastungsinfektion der geimpften Tauben mit 10⁸ TCID₅₀ HPAI-H5N1-Viren (A/turkey oder A/Indonesia) rief am 1. dpi Zeichen allgemeinen Unwohlseins hervor (Depression, Aufplustern, geringfügiger Anstieg der Körpertemperatur), jedoch keine Mortalität.

Serologie

Zum Zeitpunkt der Belastungsinfektion (0 dpi) hatten die geimpften Tiere auf zwei Impfungen mit hohen Serum-HI-Antikörpertitern reagiert, sowie mit einer hochprozentigen Serokonversion gegen das homologe H5N6-Antigen, das im Impfstoff verwendet wurde (GMTs: 132 bzw. 217 und 80% bzw. 100% für A/Indonesia bzw. A/turkey) (Abbildung 1). Dagegen produzierten die geimpften Tauben gegen die heterologen HPAI-H5N1-Virenstämme nur niedrige Serum-HI-Antikörpertiter (die GMTs der mit A/turkey und A/Indonesia inokulierten Gruppen unter Verwendung von A/turkey im HI-Test betragen jeweils 22 und 11 mit einer 36%igen und 30%igen Serokonversion; die GMTs der mit A/turkey und A/Indonesia inokulierten Gruppen unter Verwendung von A/Indonesia im HI-Test betragen jeweils 5 und 5 mit 0% Serokonversion). Am 3. dpi waren die GMTs aller Gruppen vergleichbar mit denen der Proben, die vor der Infektion genommen wurden, und alle Tiere bis auf einen geimpften Vogel hatten nachweisbare Antikörpertiter gegen das Impfstoffantigen. Am 14. dpi hatte sich der GMT erhöht, und die Serokonversion der geimpften Vögel betrug 100%.

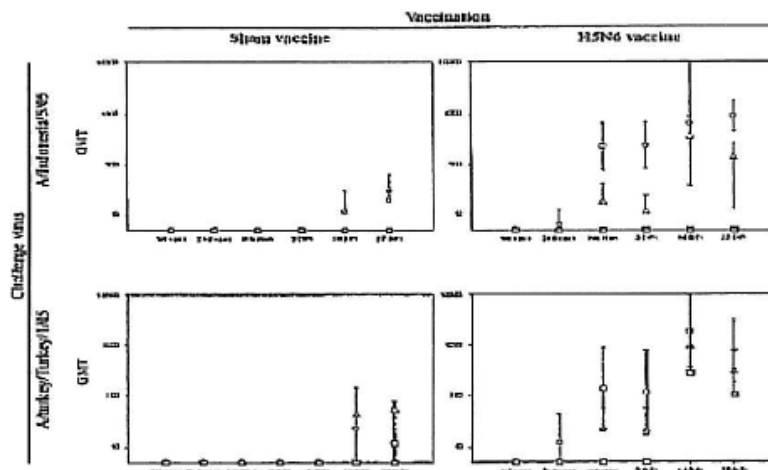


Abbildung 1. Geometrische Mitteltitern (GMT) der geimpften Tauben von der ersten Impfung bis zum 27. Tag nach Inokulation (dpi) mit einer hohen Dosis (10^8 TCID₅₀) A/Indonesia/5/05 oder A/turkey/Turkey/1/05 (H5N1). Die HI-Tests wurden mit verschiedenen Antigenen durchgeführt. Kreise: A/duck/Potsdam/2243/84 (Virenstamm des Impfstoffs); Dreiecke: A/turkey/Turkey/1/05; Quadrate: A/Indonesia/5/05. Die Linien zeigen die Standardabweichung.

Alle mit Placebo geimpften Tauben waren zum Zeitpunkt der Inokulation und am 3. dpi seronegativ: Es konnten keine Antikörper gegen alle drei Antigene nachgewiesen werden, die im HI-Test verwendet wurden. Die Inokulation der mit Placebo geimpften Tauben mit A/turkey induzierte höhere GMTs und Prozentsätze der Serokonversion am 14. und 27. dpi als die Inokulation mit A/Indonesia – unter Verwendung von A/turkey (14. dpi: 40% vs. 14%; 27. dpi: 80% vs. 28%) und vom Virenstamm des Impfstoffs (14. dpi: 40% vs. 0%; 27. dpi: 40% vs. 14%) als Antigenen im HI-Test. Die GMTs waren nach der Inokulation im Vergleich zum Virenstamm des Impfstoffs höher, und es gab keine A/Indonesia-spezifischen Antikörper in den mit Placebo

geimpften Tauben, die mit einem der beiden Stämme inokuliert wurden.

Die Erkennung viraler RNA (durch RT-PCR) in Abstrichen

Die oropharyngealen Abstriche von 100% der mit Placebo geimpften und von 90% der geimpften Vögel wurden durch RT-PCR am 1. dpi positiv getestet, unabhängig vom für die Inokulation verwendeten Virenstamm (Abbildung 2). Die Viruslast in oropharyngealen Abstrichen sank nach dem 1. dpi und war in geimpften Vögeln noch bis zum 5. dpi und in mit Placebo geimpften Vögeln noch bis zum 9. dpi nachweisbar – unabhängig von dem für die Inokulation verwendeten Virus. Nach dem 9. dpi wurden durch RT-PCR keine oropharyngealen Abstriche mehr positiv getestet.

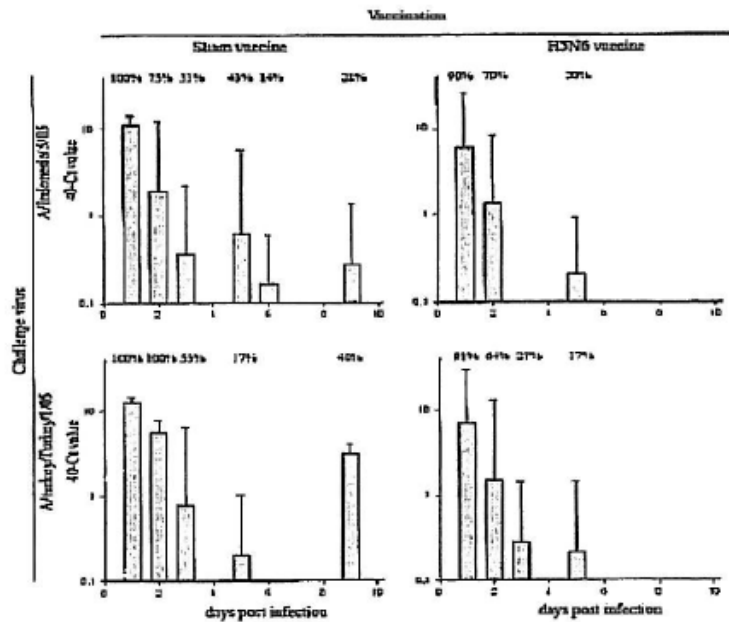


Abbildung 2. Die Erkennung von Viren durch RT-PCR in oropharyngealen Abstrichen von geimpften und mit Placebo geimpften Tauben nach intratrachealer und intraoesophagealer Infektion mit 10^8 TCID₅₀ A/Indonesia/5/05 oder A/turkey/Turkey/1/05 (H5N1). Die Abstriche wurden bis zu 27 Tage nach der Infektion entnommen, waren aber bereits nach dem 9. Tag seronegativ. Balken kennzeichnen die geometrische mittlere Viruserkennung (40-CT-Wert), Fehlerbalken die Standardabweichung, und % bezeichnet den Prozentsatz der RT-PCR-positiven Tiere pro Gruppe. Zum Zwecke der Berechnung des geometrischen Mittels wurde 0,1 als 40-CT-Wert für die negativen Proben verwendet.

Die Kloakenabstriche von mit Placebo geimpften Vögeln wurden nach einer Inokulation mit A/Indonesia bzw. A/turkey bis zum 11. bzw. 9. dpi RT-PCR-positiv getestet. Die geometrischen Mittelwerte der Viruserkennung (40-CT-Werte) waren an jedem Tag niedrig (≤ 1), an dem die Abstriche positiv auf virale RNA getestet wurden (am 2., 6., 8., 9. und 11. dpi bei A/Indonesia und am 8. und 9. dpi bei A/turkey). Im Vergleich dazu hatten die geimpften Vögel nur am 2. dpi nach A/Indonesia und am 2. und 9. dpi nach A/turkey schwach RT-PCR-positive Kloakenabstriche (Geometrisches Mittel ≤ 1 an jedem dieser Tage).

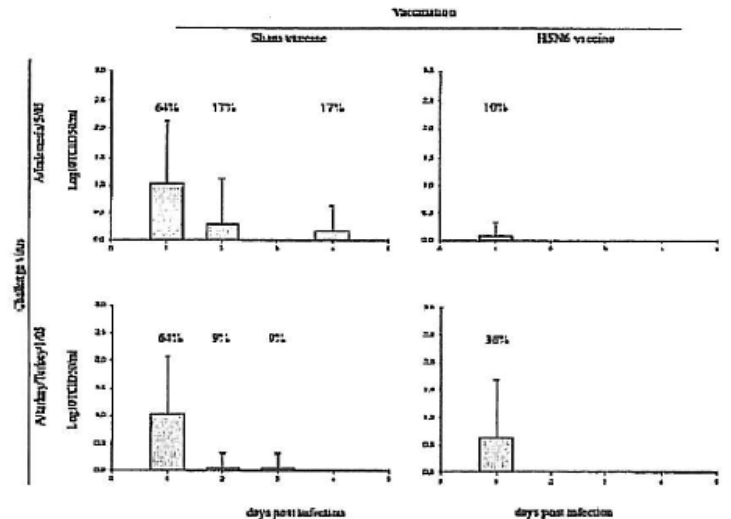


Abbildung 3. Die geometrische mittlere Virusisolierung aus oropharyngealen Abstrichen von geimpften und mit Placebo geimpften Tauben nach intratrachealer und intraoesophagealer Infektion mit 10^8 TCID₅₀ A/Indonesia/5/05 oder A/turkey/Turkey/1/05 (H5N1). Die Abstriche wurden bis zu 27 Tage nach der Infektion entnommen, waren aber bereits nach dem 4. Tag seronegativ. Die Kloakenabstriche wurden zwar im selben Zeitraum entnommen, jedoch konnte aus ihnen kein Virus isoliert werden, weswegen die Ergebnisse hier auch nicht aufgeführt sind. Balken kennzeichnen den Virustiter: geometrisches Mittel von log₁₀TCID₅₀/ml, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung, und % bezeichnet den Prozentsatz der im Rahmen der Virusisolierung positiv getesteten Tiere pro Gruppe.

Die Isolierung von Viren aus Abstrichen

Am 1. dpi wurde der Virus bei der Mehrzahl der Vögel aller Gruppen aus dem Oropharynx isoliert (Abbildung 3). Bis zum 3. bzw. 4. dpi (A/turkey bzw. A/Indonesia) wurde der Virus in niedrigen Titern auch bei einer geringen Zahl von mit Placebo geimpften Vögeln isoliert. Nach dem 1. dpi wurde bei den geimpften Vögeln kein Virus mehr isoliert. Aus den Kloakenabstrichen wurde zu keiner Zeit nach der Inokulation ein Virus isoliert, unabhängig vom Impfstatus der Vögel.

Die virale RNA-Erkennung in Organen durch RT-PCR

Am 3. dpi wurde durch RT-PCR in allen untersuchten Organen (Gehirn, Lunge, Luftsack, Pankreas, Milz, Leber und Duodenum) der mit Placebo geimpften Tiere virale RNA entdeckt. Die geimpften Tiere, die mit A/Indonesia inokuliert wurden (Abbildung 4), wiesen in allen Organen außer Gehirn und Duodenum RT-PCR-positive Testergebnisse auf. Alle Tiere, die mit A/turkey inokuliert wurden (Abbildung 5), wurden in allen Organen außer der Pankreas positiv getestet. Die geometrische mittlere virale RNA-Last pro Organ (als 40-CT-Wert dargestellt) und der Prozentsatz positiv getesteter Tiere pro Gruppe waren in den geimpften Gruppen grundsätzlich niedriger. In einer mit Placebo geimpften Taube, die mit A/turkey inokuliert und am 5. dpi euthanasiert wurde, wurden hohe virale RNA-Lasten in allen Organen außer Pankreas und Duodenum nachgewiesen. Am 27. dpi wurde virale RNA in den Lungen der Tiere aller Gruppen nachgewiesen, und zwar unabhängig vom Impfstatus. Dabei waren die geometrischen Mitteltitel und der Prozentsatz der positiv getesteten Vögel für die geimpfte, mit A/turkey inokulierte Gruppe niedriger. Das einzige andere Organ, in dem am 27. dpi durch RT-PCR nach Inokulation mit A/turkey virale RNA entdeckt wurde, war bei mit Placebo geimpften Vögeln das Gehirn und bei geimpften Tieren die Leber.

Die Virusisolierung und Quantifizierung aus Organen

Am 3. dpi konnte der Virus aus mehreren Organen der mit Placebo geimpften Vögel isoliert werden (Abbildung 6). Dagegen wurde der Virus bei den geimpften Vögeln am 3. dpi nur aus der Lunge isoliert. Im Bereich der Lunge waren sowohl der Prozentsatz von Vögeln, die bei der Virusisolierung positiv getestet wurden, als auch das geometrische mittlere TCID₅₀ pro Gramm Lungengewebe in den geimpften Gruppen niedriger als in den mit Placebo geimpften Gruppen (A/turkey: 20% vs. 60%, geometrisches mittleres TCID₅₀/g: 10^{0,18} vs. 10^{0,92}; A/Indonesia: 80% vs. 80%, geometrisches mittleres TCID₅₀/g: 10^{1,57} vs. 10^{1,86}). Die höchsten Virustiter (TCID₅₀/g Gewebe), die bei mit Placebo geimpften Tauben am 3. dpi isoliert wurden, betragen 10^{7,0} (Luftsack, Infektion mit A/turkey) sowie 10^{4,3} (Lunge, Infektion mit A/Indonesia). Die höchsten Virustiter (TCID₅₀/g Gewebe), die bei geimpften Tauben am 3. dpi isoliert wurden, betragen 10^{3,9} (Lunge, Infektion mit A/Indonesia) und 10^{2,0} (Lunge, Infektion mit A/turkey). Die einzige mit Placebo geimpfte und mit A/turkey infizierte Taube, die aufgrund schwerwiegender neurologischer Zeichen am 5. dpi euthanasiert werden musste, zeigte bei der Virusisolierung positive Ergebnisse im Gehirn (10^{6,48} TCID₅₀/g) und im Luftsack (10^{3,66} TCID₅₀/g). Am 27. dpi wurde aus keinem der Organe aller Tauben ein Virus mehr isoliert, unabhängig vom Impfstatus.

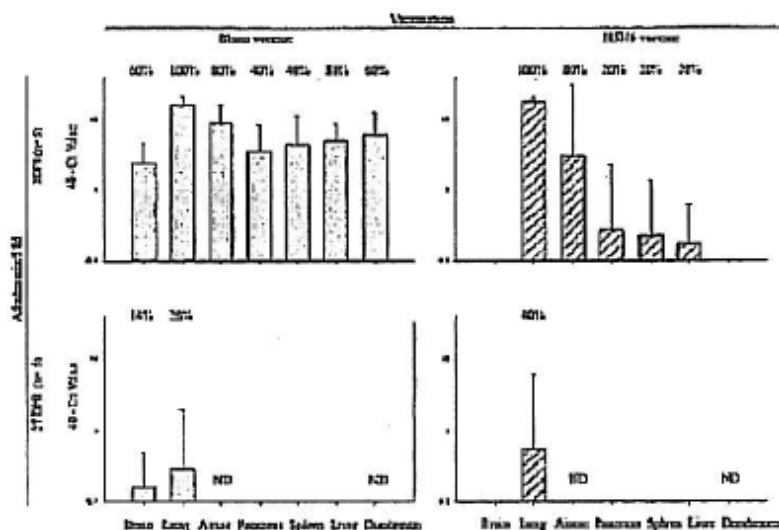


Abbildung 4. Viruserkennung durch RT-PCR in Organen geimpfter und mit Placebo geimpfter Tauben: 3 und 27 Tage nach trachealer und intraoesophagealer Inokulation mit 10⁸ TCID₅₀ A/Indonesia/5/05 (H5N1). Balken kennzeichnen das geometrische Mittel der 40-CT-Werte, Fehlerbalken die Standardabweichung, und % bezeichnet den Prozentsatz RT-PCR-positiver Tiere pro Gruppe.

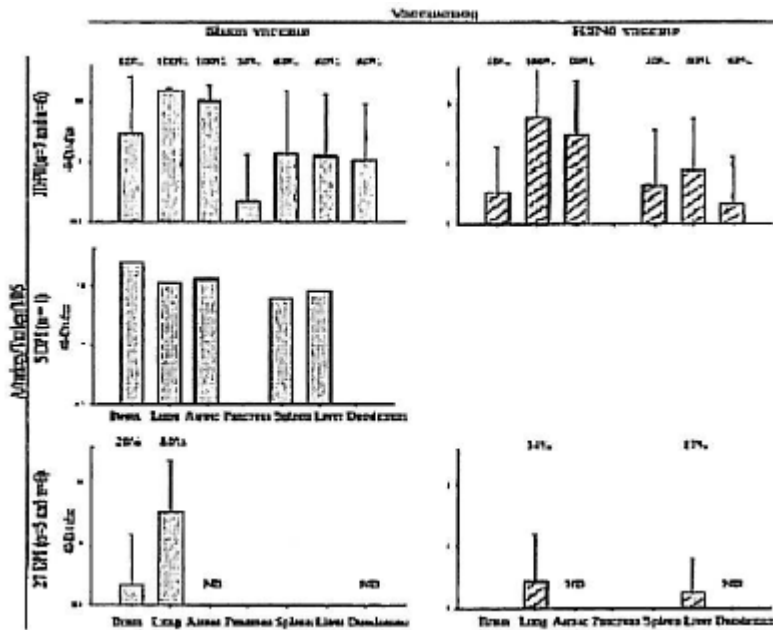


Abbildung 5. Geometrische mittlere Viruserkennung durch RT-PCR in Organen von geimpften und mit Placebo geimpften Tauben: 3, 5 und 27 Tage nach trachealer und intraesophagealer Inokulation mit 10^8 TCID₅₀ A/turkey/Turkey/1/05 (H5N1). Balken kennzeichnen das geometrische Mittel der 40-CT-Werte, Fehlerbalken die Standardabweichung, und % bezeichnet den Prozentsatz RT-PCR-positiver Tiere pro Gruppe.

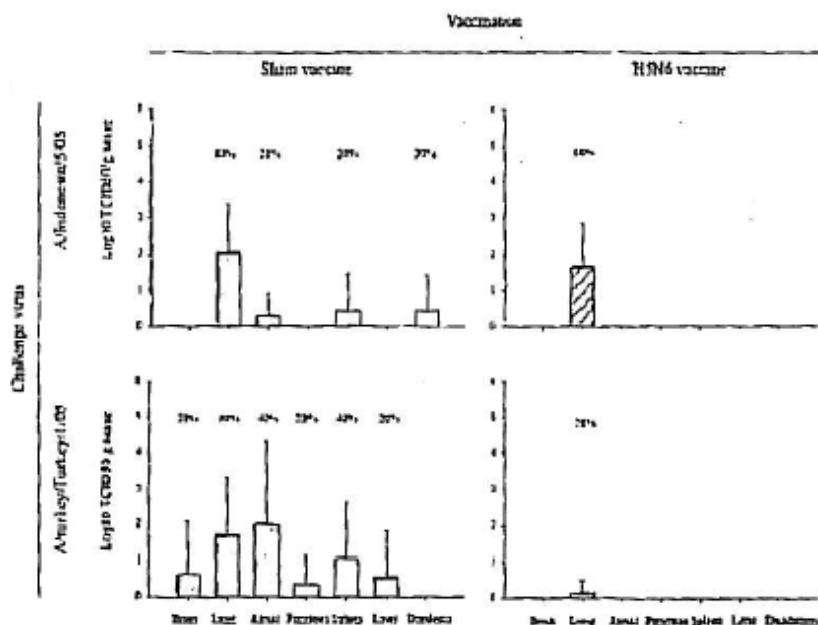


Abbildung 6. Virusisolierung (TCID₅₀/g Gewebe) aus Organen von geimpften und mit Placebo geimpften Tauben 3 Tage nach intratrachealer und intraesophagealer Inokulation mit einer hohen Dosis A/Indonesia/5/05 oder A/turkey/Turkey/1/05 (H5N1). Balken kennzeichnen das geometrische mittlere \log_{10} TCID₅₀/g Gewebe, Fehlerbalken die Standardabweichung, und % bezeichnet den Prozentsatz der Tiere pro Gruppe, die bei der Virusisolierung positiv getestet wurden.

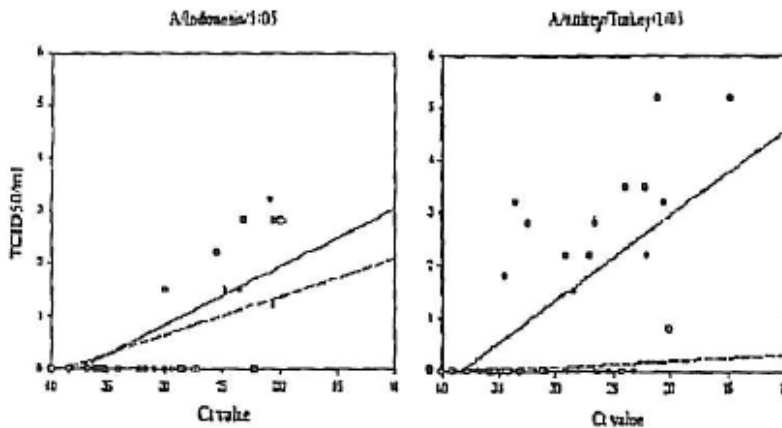


Abbildung 7. Eine Impfung verringert die Überlebensfähigkeit des hochpathogenen Aviären Influenzavirus in den Organen infizierter Tauben. Das Diagramm gibt das Verhältnis des Virustiters ($\log_{10}TCID_{50}/g$) zu der Viruserkennung durch PCR (CT-Wert) wieder – in den Organen von mit Placebo geimpften ($n=5$) und geimpften Tauben ($n=5$), 3 Tage nach intratrachealer und intraesophagealer Inokulation mit 10^8 $TCID_{50}$ A/Indonesia/5/05 oder A/turkey/Turkey/1/05 (H5N1). Die schwarzen Kreise und die durchgehende Linie kennzeichnen die Werte und die Regressionslinie der mit Placebo geimpften Tiere, während die Kreise und die gestrichelte Linie die Werte und die Regressionslinie der geimpften Tiere anzeigen.

Grobe Pathologie

Alle Tiere (sowohl geimpfte als auch mit Placebo geimpfte), die am 3. dpi obduziert wurden, zeigten eine Konsolidierung des ventrokaudalen linken Lungenflügels in unterschiedlichen Ausmaßen (10 bis 30% Lungenvolumen). Im rechten Lungenflügel traten dagegen keine Veränderungen auf. Am 3. dpi waren die Luftsackwände bei einigen mit Placebo geimpften (A/Indonesia: 40%, A/turkey: 20%) und geimpften (A/turkey: 40%) Tauben opak verdichtet. Bei mit Placebo geimpften und geimpften Tauben trat nach einer Infektion mit A/Indonesia Splenomegalie auf (jeweils 40% und 40% am 3. dpi sowie 71% und 80% am 27. dpi). Am 27. dpi wurden keine weiteren makroskopischen Läsionen gefunden. Eine mit Placebo geimpfte, mit A/turkey infizierte und am 5. dpi obduzierte Taube litt unter einem subkutanen Ödem des Kopfes und Halses, einer Konsolidierung des linken Lungenflügels und demarkierten brüchigen grauen Nekrosen der Leber (etwa 90% der Gesamtoberfläche).

Immunhistochemie

Die Lunge und die Luftsäcke waren die einzigen Organe, in denen am 3. dpi durch Immunhistochemie (IHC) ein Nukleoprotein entdeckt wurde (Tabelle 1). Immunhistochemisch positive Zellen wurden vor allem in den Parabronchien gefunden und waren in den Lungen der mit Placebo geimpften und mit A/Indonesia infizierten Vögel breiter gestreut als in den Lungen geimpfter Vögel. Dagegen unterschieden sich die Lungen geimpfter und mit Placebo geimpfter Vögel mit einer A/turkey-Infektion hinsichtlich der Verbreitung dieser immunhistochemisch positiven Zellen nicht. Am 5. dpi wurde im Cerebellum einer Taube, die aufgrund schwerwiegender neurologischer Zeichen euthanasiert werden musste, ein Nukleoprotein entdeckt; in ihren anderen Organen fand sich dagegen kein Nukleoprotein. Am 27. dpi wurde in immunhistochemischen Untersuchungen in keinen Organen (aller Gruppen) mehr ein Nukleoprotein entdeckt.

Histopathologie

Ein durchgängiger histopathologischer Befund am 3. dpi – sowohl bei mit A/Indonesia als auch mit A/turkey infizierten Tauben – war eine Bronchopneumonie mit mononukleären Infiltrationen und (Peri-)vaskulitis. Hinsichtlich des Schweregrades der Bronchopneumonie gab es zwischen den mit A/turkey infizierten geimpften und mit Placebo geimpften Gruppen keine bemerkenswerten Unterschiede, aber die mit A/Indonesia infizierten geimpften Tauben waren in einem geringeren Ausmaß betroffen als die mit Placebo geimpften Tauben. Die Gehirne von 3/5 mit Placebo geimpften, mit A/turkey infizierten Tauben waren von einer Meningoencephalitis mit perivaskulären Wandverdickungen, Gliose und neuronaler Nekrose betroffen. Auf die geimpften Tiere traf das nicht zu. In den Gehirnen der mit A/Indonesia infizierten Tauben wurden keine histopathologischen Veränderungen beobachtet, und zwar unabhängig vom Impfstatus.

Am 27. dpi waren die histopathologischen Befunde weit weniger schwerwiegend, und zwischen den geimpften und mit Placebo geimpften Gruppen gab es keine Unterschiede im Schweregrad mehr. In der mit A/turkey infizierten Gruppe wurde bei einer mit Placebo geimpften und bei einer geimpften Taube eine Meningoencephalitis diagnostiziert, jeweils mit Gliose und perivaskulären Wandverdickungen. In der mit A/Indonesia infizierten Gruppe litt eine mit Placebo geimpfte Taube unter Meningoencephalitis mit perivaskulären Wandverdickungen und Gliose.

	Cerebrum	Cerebellum	Lunge	Luftsack
Placeboimpfung A/Indonesia/5/05 – 3. dpi				
Taube 1	-	-	++	-
Taube 2	-	-	++	+
Taube 3	-	-	++	+
Taube 4	-	-	++	
Taube 5	-	-	+++	+
Impfung A/Indonesia/5/05 – 3. dpi				
Taube 1	-	-	-	-
Taube 2	-	-	-	-
Taube 3	-	-	++	-
Taube 4	-	-	+	-
Taube 5	-	-	+	-
Placeboimpfung A/turkey/Turkey/1/05 – 3. dpi				
Taube 1	-	-	-	-
Taube 2	-	-	-	++
Taube 3	-	-	-	-
Taube 4	-	-	+	-
Taube 5	-	-	+	-
Placeboimpfung A/turkey/Turkey/1/05 – 5. dpi **				
Taube 1	++	-	-	+
Impfung A/turkey/Turkey/1/05 – 3. dpi				
Taube 1	-	-	-	-
Taube 2	-	-	+	-
Taube 3	-	-	+	-
Taube 4	-	-	-	-
Taube 5	-	-		-

Tabelle 1. Die durchschnittliche Verteilung* des Influenza-A-Nukleoproteins – bestimmt durch Immunhistochemie in (nicht-)geimpften Tauben, 3 oder 5 Tage nach intratrachealer und intraoesophagealer Infektion mit 10^{10} TCID₅₀ A/Indonesia/5/05 oder A/turkey/Turkey/1/05 (H5N1). In keinem der Organe, die am 3. dpi untersucht wurden, konnte ein Nukleoprotein nachgewiesen werden (Pankreas, Milz, Leber, Niere, Oesophagus, Proventriculus, Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum, Kolon, Hoden, Eierstock und Nebenniere). Das gleiche galt für Organe, die am 27. dpi untersucht wurden.
* - = keine, + = selten, ++ verbreitet, +++ = weit verbreitet.
** Diese Taube musste aufgrund schwerwiegender klinischer Zeichen euthanasiert werden.

DISKUSSION

In der vorliegenden Forschungsarbeit haben wir nachweisen können, dass die gleichzeitige intratracheale und intraoesophageale Infektion mit einer extrem hohen Dosis eines HPAI-Virus des Subtyps H5N1 (A/Indonesia/5/05 oder A/turkey/Turkey/1/05) eine systemische Infektion in Tauben induziert, die durch eine geringe Morbidität und Mortalität gekennzeichnet ist. Die klinischen Zeichen der infizierten Tiere waren Depression, allgemeines Unwohlsein sowie neurologische Zeichen (Ataxie, Tremor, Opisthotonus und Torticollis). Schwerwiegende klinische Zeichen wurden in einer von sechs Tauben nach Inokulation mit A/turkey und in einer von sieben Tauben nach Inokulation mit A/Indonesia beobachtet. Sie traten jeweils am 4. und am 7. dpi zum ersten Mal auf. Die systemische Infektion wurde durch das Vorkommen eines Nukleoproteins in den Lungen, Luftsäcken und im Gehirn sowie durch histopathologische Veränderungen in den Lungen und Gehirnen mit Hilfe von IHC-Verfahren nachgewiesen.

Der Virus wurde durch RT-PCR erkannt (Gehirn, Lunge, Luftsack, Pankreas, Milz, Leber und Duodenum) und konnte am 3. dpi aus mehreren Organen isoliert werden (A/Indonesia: Lunge, Luftsack, Milz und Duodenum; A/turkey: Gehirn, Lunge, Luftsack, Pankreas, Milz und Leber). Dabei erwies sich die Immunhistochemie zur Bestimmung von Infektionen mit Influenzaviren als weniger sensitiv (nur Gehirn, Lunge und Luftsack waren positiv) als RT-PCR oder Virusisolierung. Dieses Phänomen ist dadurch zu erklären, dass die IHC virale Antigene in Zellen sucht und deshalb auf eine Replikation des Virus angewiesen ist, wohingegen die Virusisolierung die Anzahl infektiöser Viren misst, und die RT-PCR das Vorkommen viraler RNA nachweist.

Unser Befund IHC-positiver Zellen (in den Parabronchien der Lungen, in den Luftsäcken und im Gehirn) und einer (vorübergehenden) Bronchopneumonie, die durch eine Inokulation mit A/turkey und A/Indonesia hervorgerufen wurde, lässt darauf schließen, dass die Primärreplikation tief in den Lungen und Luftsäcken stattfand. Die Parabronchien, die eng von Blutkapillaren umgeben und am Gasaustausch beteiligt sind, bieten dem Virus wahrscheinlich die Gelegenheit, in die Blutbahn einzutreten und sich hämatogen im Gehirn auszubreiten. Nach der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke kann eine weitere Replikation in den Gliazellen und in den Neuronen stattfinden, so wie es bereits bei Hühnern beschrieben wurde, die über die Luftsäcke inokuliert wurden⁴¹⁷. Auch der Neurotropismus des HPAI-Virus (Subtyp H5N1) bei Tauben wurde bereits im Vorfeld schon einmal dokumentiert⁴⁰⁷ – dort allerdings ohne IHC-positive Zellen in den Atemwegen –, wobei diese Tauben zu einem Zeitpunkt nach dem 3. dpi euthanasiert wurden, und ein anderer Inokulationsweg und Virenstamm verwendet wurde. Obwohl der Endotheltropismus bei Hühnern eine wichtige Rolle in der Pathogenese von HPAI zu spielen scheint, und ihr Tod am 1. oder 2. dpi mit dem Auftreten von Lungenödemen, Kongestion und dem Vorkommen von viralen Antigenen vor allem in den vaskulären Endothelzellen, aber auch im Parenchym mehrerer Organe in Verbindung gebracht wird^{408,418,419}, wurde bei mit H5N1 infizierten Tauben kein virales Antigen in den Endothel- oder Parenchymzellen entdeckt. Die in der vorliegenden Studie beschriebene Virusisolierung aus mehreren Organen könnte daher darauf hindeuten, dass der Virus während der virämischen Phase im Blut von anderen Organen als Lunge und Gehirn vorkommt. Die Unterschiede im Zelltropismus und in der Pathogenese der H5N1-Virus-Infektion bei Tauben im Vergleich zu (beispielsweise) Hühnern könnte die geringere Anfälligkeit dieser Familie erklären.

Das Vorhandensein eines infektiösen Virus im Oropharynx

wurde am 1. dpi in einer signifikanten Anzahl von mit Placebo geimpften Tauben festgestellt (A/turkey: 64%, A/Indonesia: 58%) und hielt bis zum 3. bzw. 4. dpi nach einer Infektion mit A/turkey bzw. A/Indonesia an. Dabei betrug der höchste Titer, der am 1. dpi isoliert wurde, $1 \times 10^{3,2}$ TCID₅₀/ml. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass dieser hohe Titer auf einen Restvirus von der Inokulation zurückzuführen ist (1×10^8 TCID₅₀/ml) und deshalb keine Virenreplikation am ersten Tag belegt. Die oropharyngealen Abstriche der mit Placebo geimpften Vögel waren bis zum 11. bzw. 9. dpi nach einer Infektion mit A/Indonesia bzw. A/turkey RT-PCR-positiv. Die Kloakenabstriche waren dagegen nur bei einer geringen Anzahl von Tauben RT-PCR-positiv – bei niedrigen individuellen Niveaus und geometrischen Mitteln und einem geringen Höchststand bei mit Placebo geimpften Vögeln am 8. und 9. dpi. Aus den Kloakenabstrichen wurde kein infektiöser Virus isoliert, und zwar unabhängig vom Impfstatus der Vögel. Eine – vornehmlich aus den Atemwegen auftretende – Virenabsonderung nach HPAI-H5N1-Infektion wurde bereits im Vorfeld schon einmal für verschiedene Entenarten beschrieben^{162,420}. Nach erfolgter Infektion mit LPAI-Viren erfolgt die Virenabsonderung von Enten dagegen hauptsächlich über den Magen-Darm-Trakt¹⁵⁹. Frühere Versuche, Viren aus den oropharyngealen Abstrichen von Tauben zu isolieren, die zu experimentellen Zwecken mit dem HPAI-Virus infiziert wurden (H5N1: A/chicken/HongKong/220/97), waren nicht erfolgreich³⁹¹.

Die Impfung von Tauben mit dem inaktivierten, adjuvantierten H5N6-Impfstoff (Nobilis Influenza H5N6®, Intervet, Boxmeer, Niederlande) hat sich als sicher erwiesen und bot in der vorliegenden Studie einen Schutz vor schweren klinischen Erkrankungen nach der Inokulation mit Viren zweier antigener Varianten. Darüber hinaus gewährte diese Impfung einen 100-prozentigen Schutz vor einem extra-respiratorisch nachweisbaren Auftreten infektiöser Viren (Abbildung 6): IHC-positive Zellen und Virusisolierung wurden am 3. dpi nur in den Lungen dokumentiert, und der Impfstoff verringerte weitestgehend die systemische Ausbreitung des Virus, so wie er durch RT-PCR nachgewiesen wurde. Obwohl die geometrische mittlere Viruserkennung durch RT-PCR (40-CT-Wert) am 3. dpi in einigen Organen der Tiere der geimpften Gruppen höher war als in denen der mit Placebo geimpften Gruppen (Infektion mit A/Indonesia: Lunge: 18,4 vs. 15,2; Luftsack: 3,1 vs. 2,5; Infektion mit A/turkey: Lunge 19,7 vs. 15,5), waren der Prozentsatz der Vögel, bei denen ein Virus aus der Lunge isoliert werden konnte, sowie die geometrischen mittleren Virustiter bei den geimpften Vögeln viel geringer als bei den mit Placebo geimpften.

Der Schutz vor systemischen Infektionen hat sich im Bezug auf den Virenstamm A/turkey als wesentlich wirksamer erwiesen als auf den Virenstamm A/Indonesia. Obwohl durch RT-PCR Viren in den Organen einiger mit A/Indonesia inokulierter und geimpfter Vögel gefunden wurden, war die Korrelation mit der Virusisolierung aus diesen Organen viel geringer als bei Vögeln, die mit A/turkey infiziert wurden (Abbildung 7). Zum Zeitpunkt der Inokulation hatten die geimpften Vögel im HI-Test hohe GMTs und eine hochprozentige Serokonversion, vor allem im Vergleich mit den Serum-HI-Antikörpertitern, die in den Columbiformes nach der H5N2-Impfung induziert wurden⁴¹⁰. Die Impfung induzierte die höchsten GMTs gegen den homologen Virenstamm des Impfstoffs sowie hohe Titer gegen A/turkey (Abbildung 1). Bei den mit Placebo geimpften Vögeln waren die durch Infektion induzierten GMTs viel geringer als die durch Impfung induzierten, und am höchsten gegen A/turkey. Die geringe Korrelation zwischen der Virusisolierung und der Viruslast im RT-PCR-Test kann dadurch erklärt werden, dass die durch die Impfung induzierten Antikörper zwar den Virus wirksam neutralisiert haben, aber der neutralisierte Virus durch RT-PCR immer noch nachgewiesen werden konnte (Abbildung 7). Das Fehlen hoher Titer

virusspezifischer Antikörper bedeutet jedoch nicht, dass die Tauben nicht vor klinischen Erkrankungen geschützt sind. Zwei Wochen nach einer Inokulation mit A/turkey wiesen nur 40% der mit Placebo geimpften Tauben einen virusspezifischen Antikörpertiter auf. Trotzdem war die Morbidität gering, und alle Tauben bis auf eine überlebten die Inokulation mit einer hohen Virendosis. Keiner der mit Placebo geimpften und mit A/Indonesia inokulierten Vögel bildete virusspezifische Antikörper aus; dennoch überlebten alle diese Vögel, und nur zwei von sieben zeigten klinische Zeichen. Experimentelle Infektionen von Enten mit aktuellen H5N1-Stämmen konnten in einigen der infizierten Vögel keine im HI-Test nachweisbaren Antikörpertiter induzieren⁴²⁰.

Keine Tiere aller Gruppen bildeten während des gesamten Experiments A/Indonesia-spezifische Antikörper aus, mit Ausnahme einer geimpften Taube am 14. dpi nach einer Inokulation mit A/turkey (Antikörpertiter: 1620) sowie einer weiteren aus derselben Gruppe am 27. dpi (Antikörpertiter: 560 und 30). Am 14. und 27. dpi war der Serumantikörpertiter dieser Vögel – im HI-Test mit dem Virenstamm des Impfstoffs oder mit A/turkey – viel höher (jeweils 7680 oder 640 und 1280 oder 140). Frühere Studien haben bereits ergeben, dass die Impfung bestimmter Ordnungen von Vögeln mit inaktivierten adjuvantierten H5N2-Impfstoffen niedrige HI-Antikörpertiter gegen den Virenstamm A/Indonesia induzieren⁴¹⁰. Außerdem wurde bei Mäusen nach MVA-HA-Impfung und bei Frettchen nach Infektion mit den ursprünglichen Influenzaviren eine Asymmetrie in den Antikörper-Erkennungsmustern festgestellt: Im HI-Test waren gegen A/Indonesia weit weniger spezifische Antikörper nachweisbar als gegen die anderen verwendeten Virenstämme^{413,421}.

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der H5N6-Impfstoff nach Maßgabe der histopathologischen Daten nicht vor einer (vorübergehenden) Bronchopneumonie schützt, die durch Infektionen mit A/turkey und A/Indonesia induziert wird. Dennoch konnte am 3. dpi ein gewisser Schutzeffekt in den Gehirnen geimpfter, mit A/turkey inokulierter Tauben beobachtet werden. Erstaunlicherweise zeigten sich am 3. dpi histopathologische Zeichen einer Meningoencephalitis in mit Placebo geimpften, A/turkey-inokulierten Tauben, die keine schwerwiegenden neurologischen Zeichen aufwiesen. Dagegen wurden am 3. dpi in A/Indonesia-inokulierten Tauben keine histopathologischen Zeichen einer Meningoencephalitis beobachtet, und zwar unabhängig vom Impfstatus. Die mit Placebo geimpften Tauben, die schwerwiegende klinische neurologische Zeichen aufwiesen, hatten am 5. dpi (Infektion mit A/turkey) und am 27. dpi (Infektion mit A/Indonesia) nachweislich Meningoencephalitis. Eine Infektion des Gehirns mit A/Indonesia könnte später auftreten als mit A/turkey (die ersten schwerwiegenden neurologischen Zeichen nach einer Inokulation mit A/Indonesia zeigten sich am 7. dpi, nach Inokulation mit A/turkey dagegen schon am 4. dpi). Dieser Umstand könnte die beobachteten histopathologischen und immunhistochemischen Unterschiede zwischen beiden Virenstämmen am 3. dpi erklären.

Am 1. dpi wurde der Virus aus dem Oropharynx einiger geimpfter Tauben isoliert (A/Indonesia: 10%; A/turkey: 36%) (Abbildung 3). Die oropharyngealen Abstriche blieben bei den geimpften Vögeln bis zum 5. dpi RT-PCR-positiv (Infektion mit A/Indonesia), bei den mit Placebo geimpften Tauben dagegen bis zum 11. dpi. Der am 1. dpi entdeckte und isolierte Virus (höchster isolierter Virustiter: $10^{3,2}$ TCID₅₀/ml) kann unter Umständen auf einen Restvirus von der Inokulation zurückzuführen sein, die einen Tag vor der Entnahme der Abstriche erfolgte (die Inokulationsdosis betrug 10^8 TCID₅₀/ml) und belegt daher keine Virenreplikation am ersten Tag. Die Kloakenabstriche

waren in einer geringen Anzahl geimpfter Tauben am 2. dpi (A/turkey und A/Indonesia) bzw. am 9. dpi (A/Indonesia) RT-PCR-positiv, wobei die Viruslasten extrem gering waren. Von den Kloakenabstrichen konnte kein infektiöser Virus isoliert werden, und zwar unabhängig vom Impfstatus. Demnach verringert die Impfung signifikant die von H5N1-infizierten Tauben ausgehende potentielle Bedrohung durch Virenabsonderung in Exkrementen.

Dass sich die Konsolidierung am 3. dpi bei allen inokulierten Vögeln auf den ventrokaudalen linken Lungenflügel beschränkte, kann auf die Inokulationspraxis zurückgeführt werden. Die Vögel wurden im Isolator zum Zeitpunkt der Inokulation in einer links-lateralen Position gehalten, wodurch sich das Virusinokulum im linken Lungenflügel einlagerte.

Obwohl vorangegangene Studien die geringe Anfälligkeit von Tauben gegenüber einer HPAI-H5N1-Virusinfektion bereits belegt haben – mit einer Mortalitätsrate von 21% nach Infektion mit einem Virenstamm aus dem Jahr 2003⁴⁰⁷ – waren sowohl die Morbidität als auch die Mortalität in der vorliegenden Studie sogar noch geringer, obwohl für die Belastungsinfektion die gleichen Virendosen verwendet wurden. Eine mögliche immunmodulierende Wirkung der Salmonellen- und Trichomonasinfektionen, die im Rahmen der vorliegenden Studie vor der HPAIV-Belastungsinfektion diagnostiziert wurden, kann nicht ausgeschlossen werden. Verschiedene Bakterienarten und Cholera-Toxine können Makrophagen unspezifisch aktivieren und die Zytokinproduktion erhöhen, worauf sich bei Mäusen die adaptive Immunantwort auf Influenzaviren erhöht⁴²²⁻⁴²⁴. Die Auswirkungen von Salmonellen- und Trichomonasinfektionen auf die natürliche Immunität von Tauben gegen Influenzaviren wurden jedoch bislang noch nicht dokumentiert.

Die vorliegende Studie kommt zu dem Schluss, dass der Virus systematisch in verschiedene Organe vordringt – auch wenn die Anfälligkeit von Tauben gegenüber einer Belastungsinfektion mit hohen Dosen dieser beiden HPAI-H5N1-Virenstämme relativ niedrig ist und nur eine geringe Morbidität und Mortalität zur Folge hat. Schließlich konnte der Virus bis zum 5. dpi aus Organen isoliert werden, und eine begrenzte Virusfreisetzung über die Atemwege war bis zu 4 Tage lang zu beobachten. Die Impfung ist sicher, beugt schweren klinischen Zeichen und Mortalität vor, begrenzt die extra-respiratorische Infektion durch beide Virenstämme, bietet einen partiellen Schutz gegen Lungeninfektionen und Lungenkrankheiten (nach Infektion mit A/Indonesia) und beschränkt den Zeitraum der Virusfreisetzung auf den 1. dpi. Dennoch könnte das Vorkommen infektiöser Viren in Lunge und Luftsäcken am 3. dpi ein gewisses Risiko für Raubtiere und Aasfresser darstellen.