

Aus der Klinik für Geflügel
der Tierärztlichen Hochschule Hannover

**Feldstudien
zum Einfluss maternaler Antikörper
auf den Vakzinationserfolg eines
intermediär-virulenten Gumboro-Lebendimpfstoffes
bei Broilern**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
DOKTORS DER VETERINÄRMEDIZIN
(Dr. med. vet.)
durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von
Hermann Block
aus Gehlenberg

Hannover 2006

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. med. vet. Silke. Rautenschlein, Ph.D

1. Gutachterin(nen)/Gutachter: Prof. Dr. med. vet. Silke. Rautenschlein, Ph.D

2. Gutachterin(nen)/Gutachter: Prof. Moening, Institut für Virologie

Tag der mündlichen Prüfung: 23.05.2006

Für Karen und Thorge

Abkürzungen

AGP	Agar Gel Präzipitationstest
Ak	Antikörper
BT	Blutentnahmetag
°C	Grad Celsius
cDNA	copy Desoxyribonucleic Acid, komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CV-Wert	Variations-Koeffizient
d.p.vacc.	day(s) post vaccination, Tag(e) nach Impfung
E. acervulina	Eimeria acervulina
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, enzymgekoppelter Immunabsorptionstest
EU	Europäische Union
Fa.	Firma
FVW	Futterverwertung
g	Gramm
G	Gumboro
HE	Hämatoxilin-Eosin
IB	Infektiöse Bronchitis
IBD	Infectious Bursal Disease, Infektiöse Bursitis
IBDV	Infectious Bursal Disease Virus
log ₂	Logarithmus zur Basis 2
mAk	Maternale(r) Antikörper
MEG	Mastendgewicht
min	Minute(n)

ND	Newcastle Disease
µl	Mikroliter
n =	Anzahl der untersuchten Proben
NK	Negativ-Kontrolle
NL	Niederlande
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
p.i.	post infectionem; nach Infektion
p.vacc.	post vaccinationem; nach Impfung
pH	negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PKZ	Produktionskennzahl
REGW	Ryan, Einot, Gabriel, Welsch
Reo	Respiratory Enteric Orphan
RNA	Ribonucleic Acid, Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, Reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion
sec	Sekunde(n)
sog.	so genannte(-r, -s, -n, -m)
S/P	Serum zu Positiv-Kontrolle
SPF	spezifiziert pathogen frei
TGZ	tägliche Gewichtszunahme
VNT	Virusneutralisationstest
VP1-5	virale Proteine 1-5
vv	very virulent, hochgradig virulent
x g	Fallbeschleunigung

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	11
2	Literatur	14
2.1	Die Gumboro-Krankheit (Infectious Bursal Disease, IBD)	14
2.1.1	Einleitung	14
2.1.2	Geschichtlicher Überblick	15
2.1.3	Vorkommen und Verbreitung	16
2.1.4	Ökonomische Bedeutung	17
2.2	Das Infektiöse Bursitis Virus (IBDV)	17
2.2.1	Struktur	17
2.2.2	Evolution, Einteilung in Sero- und Pathotypen	19
2.2.3	Klinisches Bild	20
2.2.4	Pathologie und Pathohistologie	21
2.2.5	Pathogenese	22
2.2.6	Diagnose	23
2.3	Bekämpfung	24
2.3.1	Möglichkeiten der Eradikation	24
2.3.2	Immunprophylaxe	24
2.3.2.1	Entstehung der IBD Vakzine	24
2.3.2.2	Einteilung der IBD Vakzine	25
2.3.2.3	Lebendimpfstoffe	25
2.3.2.4	Inaktivimpfstoffe	26
2.3.2.5	Neuentwicklungen	27

2.3.2.6	Probleme bei der IBD-Impfstoffanwendung	28
2.3.2.7	Interferenzen von maternalen Antikörpern mit dem Impfvirus und Bestimmung des „optimalen“ Impfzeitpunktes	29
2.4	Fragestellung der eigenen Untersuchungen	31
3	Material und Methoden	32
3.1	Tiere	32
3.1.1	Betriebe, Bestandsgrößen, Tiermaterial und Herkunft	32
3.1.2	Haltung und Versorgung der Broiler	36
3.1.3	Angaben zum Impfstoff	36
3.1.4	Impfstoffanwendung	37
3.2	Untersuchungsmethoden	38
3.2.1	Gewinnung von Blutproben	38
3.2.2	Pathologisch-anatomische Untersuchungen	38
3.2.3	Entnahme der Bursa cloacalis	39
3.2.4	Histologische Untersuchung der Bursa cloacalis	39
3.2.5	„Deventer Formel“	43
3.2.6	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	45
3.2.7	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	47
3.3	Produktionsparameter	49
3.4	Versuchsaufbau	50
3.4.1	Feldversuch 1	50
3.4.2	Feldversuch 2	52
3.5	Statistische Auswertung	53

4	Ergebnisse	54
4.1	Ergebnisse des 1. Feldversuches	54
4.1.1	Bestimmung des „optimalen“ Impfzeitpunktes	55
4.1.2	Abfall der maternale Antikörper und Bestätigung des „optimalen“ Impfzeitpunktes	55
4.1.3	Induktion von IBDV-Antikörpern nach der IBD-Impfung	58
4.1.4	Klinische Untersuchungen	62
4.1.5	Produktionsergebnisse	62
4.1.6	Histologische Untersuchungen Vakzine-induzierter Bursaläsionen	64
4.1.7	Detektion des IBDV-Genoms in Bursa-Proben nach der IBD-Impfung	66
4.1.8	Detektion von Impfvirus in der Bursa cloacalis	68
4.2	Ergebnisse des 2. Feldversuches	69
4.2.1	Bestimmung des Impfzeitpunktes	69
4.2.2	Retrospektive Bestimmung des „optimalen“ Impfzeitpunktes der Broilerherden	69
4.2.3	Maternale IBDV-Antikörpertiter zum Zeitpunkt der IBD-Impfung	71
4.2.4	Verlauf der IBDV-Antikörperbildung nach der IBD-Impfung	73
4.2.5	Klinische Untersuchungen	75
4.2.6	Pathomorphologische Untersuchungen	75
4.2.7	Produktionsergebnisse	76

5	Diskussion	77
5.1	Bestimmung des „optimalen“ Impfzeitpunktes und Untersuchung des Verlaufes der maternalen IBD-Antikörpertiter	79
5.2	Induktion einer aktiven humoralen Immunantwort nach IBD-Impfung	80
5.3	Korrelation zwischen IBD-Virusgenomdetektion und Läsionen der Bursa cloacalis sowie IBDV-Antikörperproduktion	82
5.4	Nachweis von IBD-Impfvirus	85
5.5	Entwicklung der Broilerherden nach der Gumboroimpfung	88
6	Zusammenfassung	90
7	Summary	91
8	Literaturverzeichnis	92

1. Einleitung

Die infektiöse Bursitis (engl. Infectious Bursal Disease, IBD) ist eine Erkrankung junger Hühner, die erstmals von COSGROVE (1962) beschrieben wurde. Die Krankheit ist unter der Bezeichnung „Gumboro“-Krankheit oder „Gumboro Disease“ bekannt, da der erste Ausbruch im Ort Gumboro (Delaware; USA) auftrat. Das Hauptzielorgan der Erkrankung ist die Bursa cloacalis (WINTERFIELD und HITCHNER, 1962). Die Erkrankung wurde „Infectious Bursal Disease“ (IBD) und der ätiologische Erreger „Infectious Bursal Disease Virus“ (IBDV) genannt.

Von Amerika ausgehend verbreitete sich das IBDV auf allen Kontinenten. In den USA wurden zunächst nur die so genannten „klassischen“ Stämme detektiert. Später auftretende IBDV-Stämme waren antigenetisch unterschiedlich zu den „klassischen“ Stämmen. Sie wurden deshalb als „variant“ Stämme bezeichnet. In Europa traten später, neben den klassischen Stämmen, auch die als „very virulent“ bezeichneten Stämme auf. Diese sind antigenetisch nicht von den klassischen Stämmen zu unterscheiden, weisen aber eine beträchtlich höhere Virulenz auf. Diese „very virulent“ Stämme sind in Europa, Asien, Südamerika und Afrika beschrieben worden. Die ökonomischen Verluste machen die Infektionskrankheit IBD zu einer der weltweit bedeutendsten Geflügelkrankheiten.

Für die Pathogenese ist nicht nur der Grad der Virulenz des Erregers bedeutsam, sondern auch das Alter und der genetische Hintergrund ungeschützter Tiere zum Zeitpunkt der Infektion. Während der IBDV-Infektion kommt es zur Zerstörung der Bursa cloacalis, aber auch andere lymphatische Organe und Gewebe können betroffen sein. Die Veränderungen der Bursa cloacalis sind pathognomisch. Bereits zwei Tage nach der Infektion erscheint die Bursa ödematös, hyperämisch und oft mit petechialen Blutungen.

Das klinische Bild der Erkrankung ist durch Durchfall, Mattigkeit, gesträubtes Gefieder, Dehydration und Fieber gekennzeichnet. In schweren Fällen kommt ein Koordinationsverlust hinzu. Gleichzeitig treten auch die ersten Todesfälle auf. Nicht nur diese Verluste, sondern auch die auftretende Immunsuppression und nachfolgende Sekundärinfektionen können zu schlechteren Produktionsergebnissen führen.

Aufgrund der hohen Tenazität des IBDV und der aufwendigen und schwierigen Eradikation sind konsequente Hygienemaßnahmen als Schutz vor einer Einschleppung des Erregers in Geflügelbestände zwingend notwendig. Ein gut durchdachtes Management des Geflügelbetriebes ist für eine sichere Produktion von entscheidender Bedeutung.

Nach dem ersten Auftreten der IBD wurde mit der Entwicklung von Impfstoffen begonnen. Mit dem Einsatz der IBD-Lebendimpfstoffe stellte sich das Problem der Interferenz der Lebendvaccine mit maternalen Restantikörpern. Diese Antikörper, die von Elterntieren nach IBD-Vakzination oder nach natürlicher Infektion auf die Nachkommen übertragen werden, führen zu dem Problem der Bestimmung des richtigen Impfzeitpunktes. Auch stellt sich die Frage nach geeigneten IBD-Impfstrategien für die Elterntiere. Ziel ist es einheitlich hohe maternale IBDV-Antikörpertiter auf die Nachkommen zu übertragen. Nur bei einheitlichen maternalen Antikörper-Titern in den Nachkommen innerhalb einer Herde kann ein geeigneter Impfzeitpunkt für die Gesamtherde bestimmt und somit die Herde vor Feldinfektionen geschützt werden.

Für die Immunisierung der Broilerbestände werden IBD-Lebendimpfstoffe eingesetzt, die je nach dem Grad der Attenuierung als „mild“, „intermediär“ und „intermediär plus“-Vakzine angesprochen werden. Die „intermediär plus“-Vakzine besitzen

stärkere immunsuppressive Eigenschaften als intermediäre Vakzine. Die „intermediär plus“ oder auch als „hot“ bezeichneten Vakzine sind in der Lage, die vorhandenen maternalen IBDV-Antikörpertiter früher als die „intermediären“ Vakzine zu durchbrechen. Der „optimale“ Impfzeitpunkt variiert aufgrund unterschiedlicher Durchbruchtiter verschiedener Impfstoffe sowie unterschiedlich hohe maternalen Antikörpertiter der Broilerherden. Daraus leitet sich die Frage nach der Bestimmung eines „optimalen“ Impfzeitpunktes für die IBD-Vakzination ab.

Im Rahmen der Entwicklung und Zulassung werden die Impfstoffe an Broilern und SPF-Tieren vom Legetyp getestet. Fraglich war, ob diese daraus gewonnenen Erkenntnisse sich auf kommerziell gehaltenen Broilern, die einen unterschiedlich genetischen Hintergrund an maternalen Restantikörpertiter zu SPF-Tieren haben, übertragen lassen.

Ziel dieser Arbeit war, die Impfantwort auf den intermediär-virulenten Gumboro-Lebendimpfstoff (AviPro® PRECISE) unter Feldbedingungen in Broilern zu untersuchen und die Bedeutung der Bestimmung eines „optimalen“ Impfzeitpunktes darzustellen.

Es wurden 2 Feldstudien durchgeführt. In der ersten Feldstudie wurden 16 Broilerherden zu einem nach der „Deventer Formel“ bestimmten „optimalen“ Zeitpunkt geimpft. In der zweiten Feldstudie mit 20 Broilerherden erfolgte die IBD-Impfung vergleichsweise zu früh, zum „optimalen“ und nach dem „optimalen“ Impfzeitpunkt.

Folgende Aspekte wurden in den Feldstudien nach der IBD-Impfung untersucht:

- Induktion humoraler IBDV-Antikörper
- Histologische Bursaläsionen (nur Feldversuch 1)
- Detektion von IBDV-Genom in der Bursa cloacalis (nur Feldversuch 1)
- Entwicklung der Broilerherden und Produktionsparameter

2 Literatur

2.1 Die Gumboro-Krankheit (Infectious Bursal Disease, IBD)

2.1.1 Einleitung

Die Gumboro-Krankheit oder „Infectious Bursal Disease“ (IBD) ist eine hoch kontagiöse Virusinfektion. Es erkranken vornehmlich junge Hühnerküken. IBD ist mit hohen Morbiditäts- und wechselhaften Mortalitätsraten assoziiert und führt in der Geflügelwirtschaft zu großen ökonomischen Problemen (LUKERT und SAIF, 2003). Der Erreger schädigt bei den infizierten Tieren das Immunsystem. Die B-Lymphozyten in der Bursa cloacalis gelten als die eigentlichen Zielzellen des Virus (KAUFER und WEISS, 1980). IBDV-Antikörper oder IBDV konnten bei Hühnern, Fasanen, Puten und Wildvögeln als symptomlose Träger nachgewiesen werden (JACKWOOD et al., 1982). Der Einfluss als Reservoir oder als Vektor dieser Erkrankung wurde von einigen Autoren beschrieben (MCFERRAN et al., 1980; WILCOX et al., 1983; GARDNER et al., 1997; OGAWA et al., 1998). Das Virus wurde auch bei Pinguinen nachgewiesen (GARDNER et al., 1997; GOUGH et al., 2002; JACKWOOD et al., 2005). Hunde werden als potentieller Vektor des IBDV diskutiert (TORRENTS et al., 2004). Das Virus ist für den Menschen apathogen, die Erkrankung gilt nicht als Zoonose (PEDERSEN et al., 1990).

2.1.2 Geschichtlicher Überblick

Anfang 1962 wurde erstmalig über eine akute Erkrankung von Masthühnern berichtet, die seit 1957 in der Nähe von Gumboro (Delaware; USA) auftrat und als „chickens-avian nephrosis“ bezeichnet wurde (COSGROVE, 1962).

Die Erregeridentifizierung wurde durch das zeitgleiche Auftreten eines infektiösen Bronchitis Virus (des sog. „gray strain“) in den betroffenen Beständen erschwert. Die pathomorphologischen Veränderungen dieser Mischinfektion wurden unter dem Syndrom der „Aviären Nephrose“ zusammengefasst (WINTERFIELD und HITCHNER, 1962). In weitergehenden Untersuchungen konnte zwischen der neuen nephrotoxischen Variante des Infektiösen Bronchitis Virus und dem Infektiösen Bursitis Agens differenziert werden (WINTERFIELD et al., 1962).

Danach etablierte sich die bis heute gültige Terminologie „Infectious Bursal Disease“ als Bezeichnung der Erkrankung (HITCHNER, 1964). Die exakte biochemische Charakterisierung des Erregers erfolgte durch zwei Arbeitsgruppen an der University of Delaware und Auburn University, USA (BENTON et al., 1967; CHO und EDGAR, 1969). Als Erreger der IBD wurde ein höchst widerstandsfähiges Virus (IBDV) isoliert. Die Untersuchungen zum Krankheitsbild und zu möglichen Vorbeugemaßnahmen wurden nach der Publikation der IBDV bedingten Immunsuppression (ALLAN et al., 1972; FARAGHER et al., 1974) wesentlich verstärkt. Die erste erfolgreich im Feld eingesetzte Lebendvakzine, die von einer Gruppe um Edgar an der Auburn University, USA entwickelt wurde (LASHER und DAVIS, 1997), war aus Bursahomogenat IBDV infizierter Tiere gewonnen worden.

2.1.3 Vorkommen und Verbreitung

Innerhalb weniger Jahre breitete sich die Gumboro-Krankheit von Delaware (USA) über den gesamten amerikanischen Kontinent aus (LASHER und DAVIS, 1997).

In Deutschland traten 1965/66 Erkrankungen an der Bursa cloacalis auf (LANDGRAF et al., 1967). Innerhalb kurzer Zeit wurde die Erkrankung in Europa, Afrika, Asien, Südamerika und Australien nachgewiesen (FIRTH, 1974; VAN DEN SLUIS, 1999).

1984/85 konnten erstmals „variant“ Stämme in den USA nachgewiesen werden, die geimpfte Herden infiziert hatten (SNYDER et al., 1988). Impfstoffe auf der Basis von klassischen Stämmen schützten nicht vollständig gegen diese IBDV-Varianten (SNYDER, 1990). 1987 wurde ein hochvirulenter IBDV-Stamm (vvIBDV) in Belgien und den Niederlanden isoliert (VAN DEN BERG et al., 1991). Diese vvIBDV-Stämme verbreiteten sich in Europa, gelangten nach Asien (NAKAMURA et al., 1993), Südamerika (DI FABIO et al., 1999) und auch nach Afrika (ETERRADOSSI et al., 1999). Seit dieser Zeit ist vvIBDV in vielen Ländern isoliert worden. Von den 65 Mitgliedern des „Office International des Epizooties“ (OIE, 2000) berichten 62 Staaten von klinischen IBDV-Infektionen (VAN DEN BERG et al., 2000).

2.1.4 Ökonomische Bedeutung

IBD ist eine Erkrankung, die mit schweren wirtschaftlichen Einbußen für die Geflügelwirtschaft einhergehen kann, welches sich durch hohe Mortalitätsraten (LASHER und SHANE, 1994) und durch Immunsuppression zeigt. Die Immunsuppression führt nicht nur zu vermehrten Sekundärinfektionen, sie hemmt auch bei Vakzinationen gegen andere Erkrankungen den Aufbau von Impfschutz, die bei IBDV-infizierten Tieren durchgeführt wurden.

Die Mortalitätsrate, die durch vvIBDV verursacht wird, kann bis zu 100% betragen (VAN DEN BERG et al., 1991). Nach einer Studie aus Dänemark betragen die IBD-bedingten ökonomischen Verluste, Mortalität eingeschlossen, ca. 25 - 30 Eurocent pro Broiler. Untersuchungen zwischen 1988 und 1989 in den USA zeigten IBD-bedingte Schäden von 400 bzw. 550 Millionen US Dollar (DE WIT, 2001*).

2.2 Das Infektiöse Bursitis Virus (IBDV)

2.2.1 Struktur

Das IBD-Virus ist unbehüllt, besitzt eine ikosaedrische Struktur und hat einen Durchmesser von 55 - 60 nm (HIRAI et al., 1974; NICK et al., 1976 und JACKWOOD et al., 1982). Es gehört zum Genus *Avibirnavirus* der Familie *Birnaviridae* (COULIBALY et al., 2005). Das Genom besteht aus einer bisegmentierten (A, B), doppelsträngigen RNA. Das Virus kodiert für fünf virale Proteine (VP 1-5). VP1 wird durch das Segment B kodiert, und das Segment A kodiert für die vier viralen Proteine

VP2 - VP5. Auf dem Segment A werden die viralen Proteine VP2 - VP4 als Polyprotein exprimiert, das autoproteolytisch durch das VP4 gespalten wird (BIRGAHN et al., 2000). In einem kleineren Leserahmen, der den des Polyproteins in der N-terminalen Domäne überlappt, wird das VP5 kodiert. VP2 und VP3 bilden als Strukturproteine das virale Kapsid. Nach neueren Untersuchungen wird allerdings vermutet, dass ausschließlich das VP2 das Kapsid bildet und das VP3 innerhalb des Kapsides lokalisiert ist (COULIBALY et al., 2005). VP4 und VP5 sind bisher nicht in gereinigten viralen Kapsiden nachgewiesen worden (MUNDT und MÜLLER, 1995; GRANZOW et al., 1997) und werden deshalb als Nichtstrukturproteine bezeichnet. Das VP1 wird als multifunktionales Protein bezeichnet und stellt die RNA-abhängige RNA-Polymerase dar (VON EINEM et al., 2004). Darüber hinaus wird vermutet, dass dieses Enzym „capping“ Aktivitäten besitzt und ein „capping“ des 5'-Endes der transkribierten RNA realisiert (SPIES und MÜLLER, 1990).

Das VP2 induziert sowohl neutralisierende wie auch nichtneutralisierende Antikörper (SNYDER et al., 1988; HEINE et al., 1991; ÖPPLING et al., 1991; SCHNITZLER et al., 1993). Innerhalb des VP2 befindet sich eine variable Region (AZAD et al., 1987; FAHEY et al., 1989). Diese variable Region besitzt zwei größere und zwei kleinere hydrophile Regionen (BAYLISS et al., 1990; VAN DEN BERG et al., 1996). In diesen Regionen wurden Austausche von Aminosäuren gefunden, welche sehr wahrscheinlich mit dem antigenen Drift des Virus assoziiert sind (HEINE et al., 1991; SCHNITZLER et al., 1993; ETERRADOSSI et al., 1998). Aufgrund einer positiv geladenen, basischen carboxyterminalen Region hat VP3 das Potential, Nukleinsäuren zu binden (HUDSON et al., 1986; BÖTTCHER et al., 1997). Eine solche Bindung viraler RNA konnte für das VP3 gezeigt werden (TACKEN et al., 2002; KOCHAN et al., 2003).

Des Weiteren besitzt das VP3 serotyp- und gruppenspezifische Epitope (BECHT et al., 1988; JAGADISH und AZAD, 1991; MAHARDIKA, 1995). Ein Nachweis neutralisierender Epitope konnte bisher nicht erbracht werden (BECHT et al., 1988). VP4 ist die virale Protease des IBDV (JAGADISH et al., 1988; KIBENGE et al., 1997; SANCHEZ und RODRIGUEZ, 1999; BIRGHAN et al., 2000; LEJAL et al., 2000) und an der Prozessierung des auf dem Segment A kodierten Polyproteins beteiligt. VP5 besitzt sehr wahrscheinlich regulierende Funktionen während der viralen Replikation. Es wird vermutet, dass das VP5 eine wichtige Funktion bei der Virusfreisetzung und Verbreitung hat (VAKHARIA et al., 1994; MUNDT et al., 1997).

2.2.2 Evolution, Einteilung in Sero- und Pathotypen

Es werden zwei IBDV-Serotypen unterschieden; ein pathogener Serotyp 1 und ein nicht pathogener Serotyp 2. Serotyp 1 ist primär pathogen für Hühner. Puten können sich mit IBDV infizieren, aber die Rolle von IBDV als primärpathogener Erreger ist bei ihnen nicht endgültig geklärt. Kreuzimmunität bei mit Serotyp 2 infizierten Tieren zur Serotyp 1 Infektion besteht nicht (JACKWOOD et al., 1985). Innerhalb des Serotyps 1 werden die Stämme nach ihrer Virulenz als „mild“, „intermediär“, „klassisch virulent“, „very virulent“ oder „hyper virulent“ oder in Nord Amerika, als „variant – virulent“ klassifiziert (VAN DEN BERG et al., 2000). Die Verwandtschaft des „vIBDV“ Stammes mit dem „classic strain“ scheint hinsichtlich der Antigenität sehr eng zu sein. Die verschiedenen vIBDV-Isolate sind genetisch ebenfalls sehr eng verwandt, so dass man von einem gemeinsamen Ursprung ausgeht (VAN DEN BERG et al., 1991; CHEN et al., 1998; HOQUE et al., 2002). Die als „variant strain“ bezeichneten Stämme (ROSENBERGER und CLOUD, 1986) verursachten

überwiegend immunsuppressive Erkrankungen. Ausgeprägte klinische Erscheinungen traten nicht auf. Spätere Untersuchungen, die mit Hilfe monoklonarer Antikörper vorgenommen wurden, zeigten, dass für die Entstehung der „variant strains“ ein Antigendrift verantwortlich war (SNYDER et al., 1988).

2.2.3 Klinisches Bild

Die ersten klinischen Symptome der an IBD erkrankten Tiere sind wässriger, grünlich-weißer Durchfall, Mattigkeit, aufgeplustertes Gefieder, Futterverweigerung und Dehydration (COSGROVE, 1962). Das Erkrankungsbild ist abhängig von der genetisch bedingten Empfänglichkeit der Herde, dem passiven oder aktiven Schutz und der Virulenz des Erregers. Die Inkubationszeit beträgt zwei bis drei Tage. Das Allgemeinbefinden ist gestört, einige Tiere picken sich im Bauchbereich. Die ersten Todesfälle treten mit dem Auftreten der ersten klinischen Anzeichen auf. Die Mortalitätsrate kann bei vvIBDV bis zu 100 % betragen. Die Tiere, die eine Infektion überleben, erholen sich wieder, unterscheiden sich aber bezüglich der Gewichtsentwicklung von nicht infizierten Tieren (VAN DEN BERG et al., 1991).

Der Verlauf der Erkrankung ist altersabhängig. Am empfänglichsten sind Tiere im Alter zwischen 3 und 6 Wochen. Es wurden aber auch klinische Erscheinungen bei 1- 2 Wochen alten Tieren beschrieben (ONUNKWO, 1975; SCHMIDT, 1983). Frühe Infektion innerhalb der ersten Lebenstage mit dem IBDV führen vorwiegend zu Immunsuppression (LUKERT und SAIF, 2003).

2.2.4 Pathologie und Pathohistologie

Junge Hühner, die akut an der IBD erkrankt sind, zeigen Dehydration, flüssigen Kot und petechiale Blutungen im Bereich der Brust- und Schenkelmuskulatur (COSGROVE, 1962), die auf Störungen in der Blutgerinnung zurückzuführen sind (SKEELES et al., 1980). Das IBDV befällt vor allem die lymphatischen Organe, das Hauptzielorgan ist die Bursa cloacalis (HELMBOLDT und GARNER, 1964). Eine ödematöse Vergrößerung der Bursa cloacalis kann schon 36 Stunden nach der Infektion auftreten. Der Inhalt der Bursa ist anfänglich blutig schleimig und wird später käsig. Eine Atrophie des Bursagewebes tritt 5 - 8 Tage nach der Infektion auf. Zeitgleich zu den ersten Veränderungen der Bursa kommt es zur Hyperplasie der Milz und zu Veränderungen anderer lymphoiden Organe (LUKERT und SAIF, 2003). Nierenschwellung und verstärkte Zeichnung der Nierentubuli durch Uratkristalle sind zu beobachten (COSGROVE et al., 1962).

Die mikroskopischen Veränderungen der Bursa cloacalis, als Zielorgan des IBDV, sind charakteristisch. Die Degeneration der lymphozytären Follikel steht im Vordergrund. Die Läsionen, wie Apoptose oder Nekrose der lymphatischen Zellen beginnen in der Markregion der Bursafollikel. Zeitgleich kommt es zu Ödembildung und zur Einwanderung von Makrophagen und heterophilen Granulozyten. Es kommt bei virulenten Stämmen zum kompletten Verlust der Follikelstruktur, zu einer Zunahme des Bindegewebes und zur Bildung von Vakuolen. In der Erholungsphase erfolgt eine Repopulation der Bursafollikel mit lymphoiden Zellen (PETERS, 1967; VAN DEN BERG et al., 2000).

2.2.5 Pathogenese

Während der Infektion mit dem IBDV laufen verschiedene Stadien ab. Der Erreger wird nach oraler Aufnahme von Makrophagen im Intestinaltrakt phagozytiert und über den Blutstrom transportiert. Diese Zellen sind der Ort der ersten Virusvermehrung. In den eigentlichen Zielzellen, den B-Lymphozyten der Bursa cloacalis, erfolgt die weitere Virusvermehrung (BURKHARDT und MÜLLER, 1987; VASCONCELOS und LAM, 1994; LAM, 1997). Die Zerstörung der B-Lymphozyten der Bursa cloacalis tritt innerhalb von 24 Stunden post infectionem (p.i.) auf (MÜLLER et al., 1979). Die Schädigung der Bursafollikel führt zum vollständigen Strukturverlust und damit zur Beeinträchtigung der Antikörperproduktion. Von der Bursa cloacalis breitet sich das IBDV anschließend in Thymus, Milz, Zäkaltonsillen und andere lymphatische Gewebe aus (MÜLLER et al., 1979). Wie verschiedene Untersuchungen zeigen, wird zwei bis sieben Tage p.i. infektiöses IBDV über den Kot ausgeschieden (EDGAR und CHO, 1976). Die Dauer und das Erscheinungsbild der Veränderungen der Bursen cloacalis korrelieren mit der Virulenz der IBDV-Stämme. Das Auftreten von IBDV in der Bursa cloacalis führt neben der Infektion von IgM B-Lymphozyten zu einer Infiltration von T-Lymphozyten in die direkte Umgebung der Virusreplikation. Es wird vermutet, dass dieses auf aktivierte Makrophagen infizierter Tiere zurückzuführen ist. T-Lymphozyten und T-Zell-abhängige Mechanismen scheinen an der Eliminierung von IBDV, sowie an der Steuerung der Repopulation von Bursafollikeln mit lymphoiden Zellen beteiligt zu sein. Durch die Freisetzung von Zytokinen und durch zytotoxische Effekte verstärken T-Zellen möglicherweise die Schädigung des bursalen Gewebes und verzögern damit die Wiederbesiedlung des Organs mit B-Lymphozyten (RAUTENSCHLEIN et al., 2005).

2.2.6 Diagnose

Die Verdachtsdiagnose basiert auf der Anamnese, dem Erscheinungsbild der erkrankten Herde jeweils verbunden mit den pathologisch anatomischen und histologischen Befunden. Eine sichere Diagnose wird durch einen direkten oder indirekten Erregernachweis gestellt. Die Virusanzucht aus der Bursa cloacalis oder der Milz gelingt auf der Chorioallantoismembran des embryonierten Hühnereis (HITCHNER et al., 1970). Die Isolation und Vermehrung von IBDV in Zellkulturen gelingt nur nach langer Adaption oder bei Vakzinestämmen (BAYYARI et al., 1996). Durch die unterschiedlichen Eigenschaften der Virusstämme bei der Adaption, ist die IBDV Diagnostik in Zellkulturen nur bedingt einsetzbar. Mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik oder der Elektronenmikroskopie kann das Virus direkt in der Bursa cloacalis nachgewiesen werden (LUKERT et al., 1986). Die Verwendung des Virusneutralisationstests (VNT) ermöglicht durch den Einsatz monoklonarer Antikörper die Typisierung der Feldstämme (JACKWOOD, 1988). Mit Hilfe der reversen Transkriptase (RT), der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und der Restriktionsenzymanalyse (REA) können IBDV-Stämme im Gewebe detektiert und gruppiert werden. Eine anschließende Sequenzierung des PCR Produktes kann die Diagnose absichern (GIAMBRONE et al., 1994; JACKWOOD und JACKWOOD, 1994; NAKAMURA et al., 1994). Serologische Untersuchungsmethoden erfassen nicht den Unterschied zwischen Impf- und Feldinfektionen und können nur eingeschränkt zur Diagnose eingesetzt werden. Zum Einsatz kommen AGP, ELISA und VNT (HIRAI et al., 1972; WEISMAN und HITCHNER, 1978; MARQUARDT et al., 1980).

2.3 Bekämpfung

2.3.1 Möglichkeiten der Eradikation

Das stabile IBDV übersteht Temperaturen von 60 °C für 30 Minuten (LANDGRAF et al., 1967) sowie pH-Wert Änderungen zwischen zwei und elf (BENTON et al., 1967) und zeigt sich damit als extrem widerstandsfähig. Nur eine ausreichend hohe Konzentration an Formaldehyd oder Glutaraldehyd kann das Virus abtöten (BENTON et al., 1967; LÖHREN, 1994). Eine Eradikation ist, bedingt durch die hohe Erregerpersistenz, sehr schwierig (VAN DEN BERG et al., 2000). Ein konsequentes Hygienemanagement kann den Infektionsdruck senken und ein Ausbreiten auf andere Stallungen oder Betriebe verhindern (LANDGRAF et al., 1967).

2.3.2 Immunprophylaxe

2.3.2.1 Entstehung der IBD Vakzine

Nach dem ersten Auftreten der Gumboro-Krankheit wurde mit der Arbeit an einem Impfstoff begonnen. Die ersten Versuche Impfstoffe zu entwickeln, wurden mit Bursahomogenat der Bursa cloacalis durchgeführt, das erkrankten Tieren entnommen worden war. Mit diesen Impfstoffen konnte die IBD-bedingte Mortalität verhindert werden (LASHER und DAVIS, 1997), allerdings traten Fehlinterpretationen der Wirksamkeit der ersten Impfversuche durch das Vorhandensein unterschiedlich hoher neutralisierender maternaler Antikörper bei den geimpften Tieren auf (VIELITZ und LANDGRAF, 1967).

Bursaschäden, die durch die Virulenz des Impfstoffes entstanden, konnten später durch Attenuierung des Virus im embryonierten Hühnerei oder in Fibroblasten-Zellkulturen unterdrückt werden (GELENCZEI und LASHER, 1969).

2.3.2.2 Einteilung der IBD Vakzine

2.3.2.3 Lebendimpfstoffe

In der Broilermast und in der Aufzucht von Masteltern- und Legetieren werden IBD-Lebendimpfstoffe eingesetzt. Bei den Lebendimpfstoffen handelt es sich um IBD-Feldstämme, die unterschiedlich attenuiert wurden. Anhand der Läsionen der Bursa cloacalis nach der Impfung von SPF Legetieren wird die Einteilung der Lebendimpfstoffe in „mild“, „intermediär“ und „intermediär plus“ vorgenommen (OIE, 2000). Abhängig von dem IBDV-Antikörperstatus und dem Abbau der maternalen Antikörper werden zuweilen „milde“ Impfstoffe bei Zuchttier- und Legehennenaufzucht zwischen der vierten und achten Woche eingesetzt (VAN DEN BERG et al., 2000).

„Intermediär“ virulente Lebendimpfstoffe werden zur Immunisierung von Broilern, so wie Zucht- und Legetieren verwendet und können eine bestimmte Höhe neutralisierender maternalen IBDV-Antikörpertiter durchbrechen. IBD-Lebendimpfstoffe werden als Spray, über das Trinkwasser oder oculonasal appliziert. „Intermediär plus“ Impfstoffe werden in Situationen mit hohem IBD-Feldinfektionsrisiko eingesetzt. Sie können höhere neutralisierende maternale Antikörpertiter als „intermediär“ virulente Stämme durchbrechen, deshalb können die „intermediär plus“ Impfstoffe im Durchschnitt sechs bis sieben

Tage früher als die „intermediär“ virulenten Impfstoffe eingesetzt werden. Verabreicht werden „Intermediär plus“ Impfstoffe nur über das Trinksystem und werden bei Broilern ab dem siebten, bei Zucht- und Legetieren ab dem vierzehnten Lebenstag empfohlen. Untersuchungen zeigen, dass durch Anwendung von „intermediär plus“ IBD-Lebendimpfstoffen größere immunsuppressive Effekte zu erwarten sind (EZEOKOLI et al., 1990; VAN DEN BERG et al., 2000; RAUTENSCHLEIN et al., 2005).

2.3.2.4 Inaktivimpfstoffe

IBD-Inaktivimpfstoffe oder sogenannte „Totimpfstoffe“ werden bei Elterntieren zur Boosterung der Herden nach einer Impfung mit IBD-Lebendimpfstoff eingesetzt. Sie werden von geprüftem Saatvirus (EU) oder Bursahomogenat infizierter Tiere durch Vermehrung in Zellkulturen oder embryonierten Eiern gewonnen.

Die inaktivierten Erreger werden an ein Adjuvans mit Trägerfunktion (z.B. Aluminiumhydroxid) adsorbiert oder als Ölemulsionsimpfstoff aufbereitet bei Zuchttieren subkutan oder intramuskulär injiziert. Eine Impfung der sechzehn bis siebzehn Wochen alten Tiere, die mit Lebendimpfstoff vorgeimpft sind, führt zu einem gleichmäßig hohen Aufbau humoraler Antikörper (EIDSON et al., 1980; WYETH und CULLEN, 1997). Bei einer homogenen Verteilung der maternalen IBDV-Antikörper in den Nachkommenherden kann ein geeigneter Impftermin dieser Herde einfacher vorhergesagt werden, als bei Herden mit ungleichmäßiger Verteilung. Die Konzentration und die antigene Zusammensetzung der Inaktivimpfstoffe bestimmen die Dauer und die Höhe der maternalen Immunität. Die Angaben über die Persistenz

maternalen Antikörper bei den Nachkommen sind uneinheitlich. Es werden Zeiträume von 8 bis 30 Tagen genannt (WYETH und CHETTLE, 1990; VAN DEN BERG et al., 1991; ALAM et al., 2002).

2.3.2.5 Neuentwicklungen

Eines der Ziele bei der Neuentwicklung von IBD-Impfstoffen ist es, Schäden an der Bursa cloacalis, welche oft mit einer temporären Immunsuppression verbunden sind, zu vermeiden oder zu vermindern. Ein weiteres Ziel ist es, Impfstoffe zu entwickeln, welche nicht durch maternale Restantikörper in ihrer Wirksamkeit eingeschränkt werden. Folgende Neuentwicklungen sind experimentell getestet worden: Subunit-Vakzine (DUNHAM, 2002), DNA-Vakzine (BAYLISS et al., 1990; HEINE und BOYLE, 1993; DARTEIL et al., 1995) und rekombinant exprimierte VP2 Vakzine (RONG et al., 2005). Bisher konnte jedoch mit keinem dieser Impfstoffe ein ausreichender Schutz gegen eine Belastungsinfektion induziert werden. Zur Vermeidung einer Lebendimpfstoff-Interaktion mit maternalen Restantikörpern ist ein Immunkomplex-Impfstoff entwickelt worden und seit einigen Jahren auch in verschiedenen Ländern zugelassen (HADDAD et al., 1997; VAN DEN WIJNGAARD et al., 1998). Dieser wird entweder *in ovo* oder nach dem Schlupf bei Eintagsküken verabreicht. Ein „intermediär plus“ IBDV-Lebendvakzine wird komplexiert mit einem IBD-Hyperimmunserum eingesetzt. Man vermutet, dass durch diese Komplexierung das Lebendvirus nicht durch die maternalen Restantikörper neutralisiert, sondern langsam mit dem Abfall der maternalen Antikörper freigesetzt wird und so zur Induktion einer Immunantwort führt.

2.3.2.6 Probleme bei der IBD-Impfstoffanwendung

Ein sachgerechter Umgang mit dem IBD-Lebendimpfstoff ist für die Induktion einer Immunität von entscheidender Bedeutung. Die Gebrauchsinformationen der Impfstoffhersteller müssen sorgfältig befolgt werden. Bei der nachträglichen Betrachtung der Impfversager werden Fehler bei der Lagerung sowohl wie auch bei der Anwendung beschrieben (VAN DEN BERG et al., 2000). Die Trinkwasseranlagen in den Geflügelbetrieben müssen garantieren, dass alle Tiere innerhalb einer gewissen Zeit den Impfstoff aufnehmen können (VAN DEN BERG et al., 2000).

Die Überlebensfähigkeit des Lebendimpfstoffes im Trinkwasser ist nach der Resuspendierung auf zwei Stunden begrenzt.

Die Interferenz von maternalen IBDV-Antikörper mit dem IBD-Impfvirus ist bedingt durch fehlende oder unzureichende Bestimmung eines „optimalen“ Impfzeitpunktes eine der häufigsten Ursachen für Impfversagen (VAN DEN BERG et al., 2000).

2.3.2.7 Interferenzen von maternalen Antikörpern mit dem Impfvirus und Bestimmung des „optimalen“ Impfzeitpunktes

Der richtige Impfzeitpunkt für die IBD-Impfung hängt von folgenden Faktoren ab:

- Infektionsdruck im Feld
- Verteilung der maternalen IBDV-Antikörper innerhalb einer Herde
- Durchbruchtiter des Lebendvaccine
- Stichprobengröße
- Repräsentatives Untersuchungsmaterial
- Nutzungsrichtung

Die Höhe der maternalen Antikörper der Herde zum Zeitpunkt der Impfung ist von zentraler Bedeutung. Die Arbeiten zeigen, dass unterschiedliche hohe maternale Antikörper-Titer einen Einfluss auf den Impferfolg verschieden virulenter Impfstoffe besitzen (VAN DEN BERG und MEULEMANS, 1991; GODDARD et al., 1994; TSUKAMOTO et al., 1995; ALAM et al., 2002).

Andere Untersuchungen zeigen, dass bei Vorhandensein von hohen maternalen Antikörpern eine Impfung mit „intermediär“ virulentem Gumboro-Lebendimpfstoff keine humorale Immunität induziert (KUMAR et al., 2000; Kraemer, 2004).

Verschiedene Autoren beschreiben die Möglichkeit, den Impfzeitpunkt durch die Bestimmung der maternale Antikörper und die theoretische Berechnung ihres Abfalls zu bestimmen. Zur Bestimmung der maternalen Antikörper wird neben der ELISA-Technik auch der VN-Test angewendet (SOLANO et al., 1985; KOUWENHOVEN und VAN DEN BOS, 1992, 1994; GARDIN, 1994). Durch Untersuchungen zum Verlauf der maternalen IBD-Antikörpertiter konnte ein den logarithmischen Gesetzen

folgender Abbau von Antikörpern abgeleitet werden (KOUWENHOVEN und VAN DEN BOS, 1992).

Die durchschnittliche Quadratwurzel des Titers der maternalen Antikörper sinkt dabei täglich um 2,82. Der zu erwartende Titer zum Zeitpunkt der Impfung sollte niedriger als ein bestimmter Zieltiter sein, um so einen Impferfolg zu gewährleisten.

Der Abbau der Antikörpertiter verhält sich bei verschiedenen schnell wachsenden Nutzungsrichtungen der Hühnerlinien unterschiedlich. GARDIN (1994) untersuchte den Verlauf der maternalen Antikörpertiter und leitete daraus Halbwertszeiten ab. Bei Broilern betragen diese drei Tage, bei Legerassen fünf Tage und bei Elterntieren sechs Tage (GARDIN, 1994).

Von DE WIT (2001) wurde die von KOUWENHOVEN und VAN DEN BOS (1994) entwickelte Formel in Anlehnung an TSUKAMOTO et al. (1995) als endgültige „Deventer Formel“ (DE WIT, 2001) unter Berücksichtigung folgender Parameter veröffentlicht:

- Zeitpunkt der Probenentnahme
- Nutzungsrichtung der Tiere
- Herden mit gleichmäßigem und ungleichmäßigem Titer (CV-Wert)
- Anteil der impffähigen Tiere einer Herde
- „milde“, „intermediäre“ oder „intermediär plus“ Impfstoffe (Durchbruchtitler).

2.4 Fragestellung der eigenen Untersuchungen

Ziel dieser Arbeit war, die Impfantwort auf den intermediär-virulenten Gumboro-Lebendimpfstoff (AviPro® PRECISE) unter Feldbedingungen in Broilern zu untersuchen und die Bedeutung der Bestimmung eines „optimalen“ Impfzeitpunktes darzustellen.

Es wurden 2 Feldstudien durchgeführt. In der ersten Feldstudie wurden 16 Broilerherden zu einem nach der „Deventer Formel“ bestimmten „optimalen“ Zeitpunkt geimpft. In der zweiten Feldstudie mit 20 Broilerherden erfolgte die IBD-Impfung vergleichsweise zu früh, zum „optimalen“ und nach dem „optimalen“ Impfzeitpunkt. Folgende Aspekte wurden in den Feldstudien nach der IBD-Impfung untersucht:

- Induktion humoraler IBDV-Antikörper
- Histologische Bursaläsionen (nur Feldversuch 1)
- Detektion von IBDV-Genom in der Bursa cloacalis (nur Feldversuch 1)
- Entwicklung der Broilerherden und Produktionsparameter

Die Errechnung des „optimalen“ Impfzeitpunktes basiert auf der von KOUWENHOVEN entwickelten und von DE WIT verbesserten „Deventer Formel“ (DE WIT, 2001).

3. Material und Methoden

3.1 Tiere

3.1.1 Betriebe, Bestandsgrößen, Tiermaterial und Herkunft

An der Studie nahmen 36 bäuerliche Hähnchenmastbetriebe mit Bestandsgrößen von 20.000 bis 140.000 Tieren teil, wobei die Herdengröße, das heißt die Anzahl der Masthähnchen pro Stall, zwischen 14.000 und 48.000 variierte.

Die beschriebenen Feldversuche wurden im Zeitraum vom Oktober 2003 bis zum Juni 2004 durchgeführt. In die Feldversuche waren Betriebe aus den Landkreisen Cloppenburg, Emsland und Grafschaft Bentheim im Bundesland Niedersachsen einbezogen. Die Hähnchenmastbetriebe produzierten unter konventionellen Bedingungen Broiler und standen unter regelmäßiger tierärztlicher Betreuung. Sie hatten bereits die Impfung mit Lebendimpfstoff(en) gegen die Infektiöse Bursitis als festen Bestandteil der Immunprophylaxe für Masthähnchen etabliert. Eine einmalige IB-Sprayimpfung fand in den jeweiligen Brütereien statt. Die ND-Schutzimpfung wurde im Alter von 7 Tagen über Trinkwasser durchgeführt.

Die Tiere (Broiler) in den Mastbetrieben entstammten den kommerziellen Hybrid-Rassen Cobb 500, Ross 308 und Ross 508.

Das Impfprogramm der Mastelterniere der eingestellten Broiler, hinsichtlich der Immunprophylaxe gegen IBD, beinhaltete entweder eine

- Trinkwasserimpfung mit einem „intermediär“-virulenten IBD-Lebendimpfstoff (Nobilis Gumboro D78, Fa. Intervet oder TAD Gumboro vac Iyo, Fa. Lohmann Animal Health) in der vierten bis fünften Lebenswoche

oder eine

- Trinkwasserimpfung, wie oben beschrieben, sowie eine Boostervakzination mit inaktivierten, multivalenten Ölemulsionsimpfstoffen (Nobilis Reo+IB+G+ND, Nobilis IB+G+ND, Fa. Intervet) in der 16. bis 17. Lebenswoche.

Das Alter der Mastelterniere zum Zeitpunkt der Bruteigewinnung, die zur Bruteigewinnung für die ausgewählten Betriebe herangezogen wurden, lag im 1. Feldversuch zwischen der 28. und 55. Lebenswochen (Tabelle 1) sowie im 2. Feldversuch zwischen der 28. und 56. Lebenswoche (Tabelle 2).

Tabelle 1: Alter der Elterntiere zum Zeitpunkt der Bruteigewinnung und Impfregime in der Aufzucht (Feldstudie 1)

Herde	Alter	Elterntiere	
		Impfregime IBD-Impfstoffe	
		lebend	Inaktivat
1	38	+	+
2	31	+	+
3	31	+	+
4	52	+	+
5	53	+	+
6	31	+	-
7	52	+	+
8	41	+	-
9	28	+	+
10	37	+	+
11	35	+	+
12	28	+	-
13	39	+	+
14	44	+	-
15	54	+	+
16	55	+	+

+ = Impfung
- = keine Impfung

Tabelle 2: Alter der Elterntiere zum Zeitpunkt der Bruteigewinnung und Impfregime in der Aufzucht (Feldstudie 2)

Herde	Alter	Elterntiere	
		Impfregime IBD-Impfstoffe	
		lebend	Inaktivat
1	47	+	+
2	47	+	+
3	35	+	+
4	59	+	+
5	48	+	+
6	43	+	+
7	39	+	+
8	59	+	+
9	28	+	+
10	48	+	+
11	48	+	+
12	48	+	+
13	29	+	+
14	48	+	+
15	30	+	+
16	41	+	+
17	29	+	+
18	28	+	-
19	41	+	+
20	53	+	+

+ = Impfung
- = keine Impfung

3.1.2 Haltung und Versorgung der Broiler

Die Geflügelmastbetriebe, die an diesen Untersuchungen teilnahmen, mästen die Broiler nach Vorgaben der freiwilligen Hähnchenvereinbarung. Darin sind die detaillierten Anforderungen für eine tiergerechte Haltung der Hähnchen festgelegt. Diese Vereinbarung der Landwirte wurde gemeinsam mit den Tierschutzorganisationen und den Länderbehörden unter Führung des Bundesverbraucherschutzministeriums getroffen. Sie enthält die so genannten „bundeseinheitlichen Eckwerte zu Bestandsdichte, Beleuchtung, Luftqualität, Tränke und Fütterung“.

3.1.3 Angaben zum Impfstoff

Zur aktiven Immunisierung der Masthähnchen gegen IBD fand der „intermediär“-virulente Gumboro-Lebendimpfstoff AviPro® PRECISE Verwendung (bis 07.02.2003 als TAD Gumboro vac® Forte im Handel; Fa. Lohmann Animal Health).

AviPro® PRECISE lag als Impfstoffpellet in gefriergetrockneter Form vor. Er war zugelassen für Hühner zur oralen Verabreichung über das Trinkwasser. Eine Dosis enthielt mind. 10^3 Ei-infektiöse Dosis (EID)₅₀ IBD-Virus, Stamm LC75. Eine Wartezeit nach der Impfung war entsprechend den Angaben der Gebrauchsinformation nicht erforderlich. Folgende Chargen kamen im Rahmen dieser Untersuchung zum Einsatz (Tabelle 3).

Tabelle 3 : Angaben zum verwendeten Impfstoff

Impfstoffname	Chargen-Bezeichnung	Impfdosen/Flasche	Verwendbar bis:
TAD Gumboro vac [®]	0002054311	5000	31.12.2005
Forte*			
	0002030542	1000	30.06.2005
AviPro [®] PRECISE	0003038113	5000	31.05.2006
	0003065211	1000	31.07.2006

*Am 07.02.2003 erhielt Lohmann Animal Health für den Impfstoff TAD Gumboro vac[®] Forte die Zulassung mit dem geänderten Namen AviPro[®] PRECISE.

Die angegebene Haltbarkeitsdauer galt nur für verschlossene Flaschen unter Vakuum, bei konstanter Lagerung zwischen +2 °C und +8 °C und vor Licht geschützt. Einmal aufgelöst, war der Impfstoff innerhalb von 2 Stunden von den zu impfenden Tieren aufzunehmen, um Wirksamkeitsverluste zu vermeiden. Die Unschädlichkeit des Impfstoffes war für Tiere ab dem Alter von 7 Tagen belegt.

3.1.4 Impfstoffanwendung

Die Trinkwasserimpfung erfolgte nach Anweisungen in der Gebrauchsinformation des Herstellers. Vor der Impfung wurde die Impffähigkeit der Herde festgestellt und die Anzahl der benötigten Impfdosen ermittelt. Stimmte die Anzahl der Tiere nicht genau mit der Anzahl der Impfdosen überein, wurde immer die nächst höhere Anzahl von Impfdosen angewendet.

3.2 Untersuchungsmethoden

3.2.1 Gewinnung von Blutproben

Die Blutproben von vier Tage alten Küken wurden während der Sektion gewonnen.

Bei Broilern im Alter von 7 bis 42 Tagen erfolgte die Blutentnahme durch Einstich in die Vena ulnaris mittels eines chirurgischen Einmalskalpells (Cutfix® Surgical Disposable Scalpel, Fa. Aesculap). Das Blut wurde in Serumgewinnungsröhrchen aus Kunststoff aufgefangen (Sarstedt Röhre 4,4 ml, Fa. Sarstedt), bei Raumtemperatur aufrecht gelagert und nach 2 Stunden 10 min lang bei 3000 x g zentrifugiert (Zentrifuge Sepatech Megafuge 1.0, Fa. Heraeus). Abschließend wurde das Serum in sterile Reaktionsgefäße (Fa. MediQuick) abgefüllt, zur Identifizierung beschriftet und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank bei + 4°C gelagert.

3.2.2 Pathologisch-anatomische Untersuchungen

Im Rahmen der routinemäßigen tierärztlichen Bestandsbetreuung fanden Sektionen statt. Zur Sektion wurden die Broiler durch Kopfschlag betäubt und nach Durchtrennen der Vena jugularis durch Ausbluten getötet. Nach der äußerlichen Adspektion fand die Sektion in Anlehnung an SIEGMANN et al. (1993) statt.

3.2.3 Entnahme der Bursa cloacalis

Nachdem die Bursa cloacalis im Rahmen der Sektion freigelegt und mit steriler Schere und Pinzette zur makroskopischen Beurteilung auf eine sterile Petrischale verbracht worden war, erfolgte die gleichmäßige Teilung der Bursen in zwei Hälften. Eine Hälfte war für die RT-PCR Analyse bestimmt und wurde dazu in sterilen, verschließbaren und beschrifteten Plastikbeuteln gesammelt. Die jeweils andere Hälfte der Bursa war für die histologische Untersuchung bestimmt und in Kunststoff-Röhrchen mit Schraubverschluss, beschickt mit 10%iger neutraler gepufferter Formalinlösung, gegeben worden. Die Lagerung dieser Proben erfolgte bis zur weiteren Aufbereitung bei Raumtemperatur.

3.2.4 Histologische Untersuchung der Bursa cloacalis

Für die Aufbereitung der in Formalin fixierten Bursahälften standen die Laborgeräte der Histologie des Stichting Gezondheidsdienst voor Dieren in Deventer (NL) zur Verfügung. Die Aufbereitung der Bursaprobe erfolgte gemäß dem Standardprotokoll:

- Entwässern der Bursa cloacalis
- Alkoholreihe
- Paraffin- Einbettung
- Anfertigung von Bursaschnitten
- HE- Färbung.

Zuerst wurden die zu untersuchenden Bursen in 10 % Phosphat gepufferter Formalinlösung für mindestens 24 Stunden bei 4°C fixiert. Danach wurden die Bursen 10 Stunden gewässert und anschließend das Formalin über aufsteigende Ethanol- und Xylolreihen aus dem Gewebe gelöst und durch Paraffin ersetzt. In der Eingießstation wurden die Bursaprobe so in Paraffinblöcke eingefügt, dass im anschließenden Schneidevorgang Querschnitte der Proben angefertigt werden konnten. Die erhärteten Wachsblöcke wurden mit einem Mikrotom in 4 µm dicke Schnitte geschnitten, im Wasserbad geglättet, auf einem Objektträger aufgebracht und 5 min lang getrocknet. Zur HE-Färbung der histologischen Schnitte stand ein Leica Autostainer XL zur Verfügung. Die Proben wurden im Ofen für 10 min bei 65 °C getrocknet und anschließend wie folgt entparaffiniert, dehydriert und gefärbt (Tabelle 4). Die weitere Dehydrierung und Reinigung der Schnitte erfolgte durch Alkohol und Xylol (Tabelle 5).

Tabelle 4: Protokoll zur Färbung der histologischen Präparate

Dauer	Chemikalie
2 x 5 min	Xylol
2 x 2 min	Alkohol 100 %
2 min	Alkohol 96 %
2 min	Alkohol 70 %
1 min	Wasser ultrarein
7 min	Färbung mit Hämatoxylin
5 min	Spülen unter laufendem Leitungswasser
15 sec	Färbung mit Eosin

Tabelle 5: Protokoll zur Dehydrierung und Reinigung

Dauer (Minuten)	Chemikalie
10 sec	Alkohol 70 %
30 sec	Alkohol 96 %
2 x 2 min	Alkohol 100 %
5 min	Xylol

Der Robotic Coverslipper CV 5000 legte auf jeden Schnitt ein Deckgläschen, als Deckmedium kam Pertex® (Histolab. Göteborg, Schweden) zum Einsatz.

Der Beurteilung der histologischen Schnitte im Hinblick auf IBD-bedingte Bursa-Läsionen lag die Einteilung von MUSKETT et al. (1979) zugrunde, die den Grad der Bursaschäden im Einzelnen folgendermaßen einstuft (Tabelle 6):

Tabelle 6: Einstufungen der Läsionen (MUSKETT et al., 1979)

Score	Beschreibung der Veränderungen der Bursa cloacalis
0	Keine Läsionen
1	1-25 % der Follikel zeigten eine lymphoide Depletion (weniger als 50 % Depletion in befallenen Follikeln) Einwanderung heterophiler Granulozyten in die Läsionen
2	26-50 % der Follikel zeigten eine fast komplette lymphoide Depletion (mehr als 75 % Depletion in befallenen Follikeln) Nekrosen und Einwanderung heterophiler Granulozyten
3	51-75 % der Follikel zeigten eine fast komplette lymphoide Depletion betroffene Follikel zeigten Nekrosen und ausgeprägte Einwanderung heterophiler Granulozyten
4	76-100 % der Follikel zeigten eine fast komplette lymphoide Depletion Hyperplasie und Zystenstruktur betroffene Follikel zeigten Nekrosen und vermehrt Einwanderung heterophiler Granulozyten
5	100 % der Follikel zeigten eine fast komplette lymphoide Depletion kompletter Verlust der folliculären Struktur vergrößertes und gefaltetes Epithel und Fibrose der Bursa cloacalis

3.2.5 „Deventer Formel“

Für die Bestimmung des „optimalen“ Impfzeitpunktes fand die „Deventer Formel“ Anwendung (DE WIT, 2001).

Folgende Werte gingen in diese Bestimmung ein:

- Blutentnahmezeitpunkt (Alter)
 - Halbwertszeit der maternalen Antikörper
 - Durchbruchtiter „break through“ des Impfstoffes
 - Anteil der impffähigen Tiere zum Zeitpunkt der Impfung
-
- zu 1. Aufgrund der Resorption von Antikörpern aus dem Dottersack bleiben die maternalen Antikörper während der ersten vier Tage auf dem gleichen Niveau. Ab dem fünften Tag erfolgt der Abfall der maternalen IBDV-Antikörpertiter logarithmisch.
 - zu 2. Die „Deventer-Formel“ basiert auf der Halbwertszeit der maternalen IBDV-Antikörper. Bedingt durch die Nutzungsrichtung (Broiler) wurde eine Halbwertszeit von drei Tagen gewählt (Abb.1)
 - zu 3. Der Durchbruchtiter wurde vom Impfstoffhersteller für das angewandte ELISA-System IDEXX FlockChek[®] IBD ELISA als 125 vorgegeben (Abb.1)
 - zu 4. Für die Feldversuche wurde der Impftag festgelegt, an dem 75 % der zu impfenden Tiere einen IBDV-Antikörpertiter hatten, der unterhalb des „break through“-Titers lag.

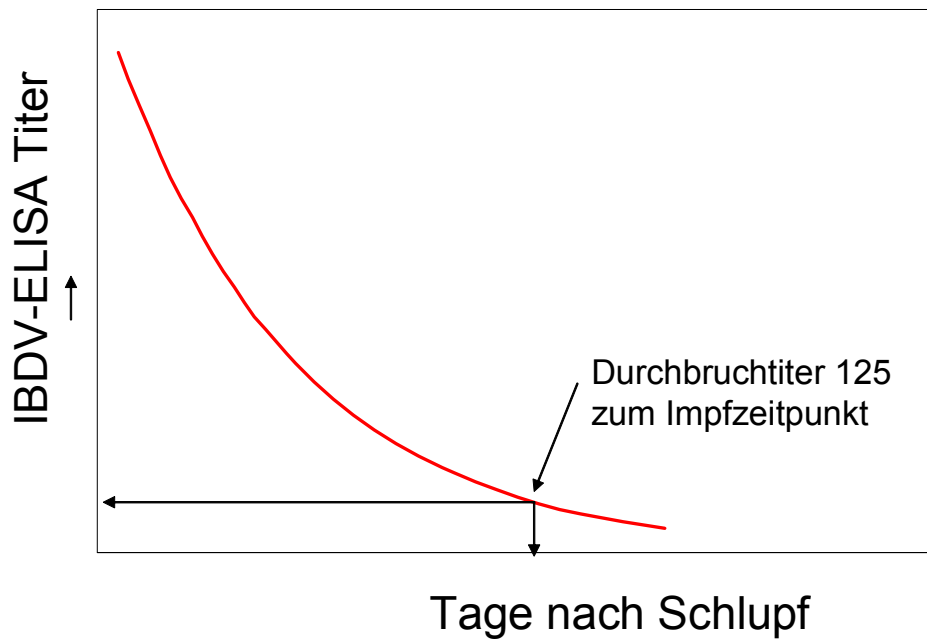


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Verlaufes maternaler IBDV-Antikörper mit dem Erreichen des Durchbruchtiters zum „optimalen“ Impfzeitpunkt

Die Berechnung des „optimalen“ Impfzeitpunkts erfolgt mit der Formel:

$$\text{Impfzeitpunkt} = \left\{ (\log_2 \text{Titer Broiler}(\%) - \log_2 \text{Durchbruch}) \times t_{1/2} \right\} + \text{BT} + \text{Korrelation 0-4}$$

- $\log_2 \text{Titer Broiler}(\%)$ = Titer der Tiere, die einen bestimmten Prozentsatz (%) der Herde repräsentieren.
- $\log_2 \text{Durchbruch}$ = der Durchbruch-Titer (FlockChek[®] IBD ELISA) der für den Impfstoff besteht (laut Hersteller für AviPro[®] PRECISE = 125)
- $t_{1/2}$ = Halbwertszeit (ELISA) der Antikörper (Broiler = 3 Tage)
- BT (Blutentnahmetag) = der Lebenstag an dem das Blut entnommen wurde.
- Korrelation 0-4 = Zusätzliche Tage, wenn die Blutentnahme zwischen dem Schlupf und dem 4. Tag erfolgte.

3.2.6 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR wurde genutzt, um IBDV nachzuweisen und um Impfstämme von Feldstämmen zu unterscheiden. Dies erforderte die Reverse Transkription der RNA in cDNA und deren anschließende Amplifizierung mittels PCR. Hierzu wurden die gepoolten Bursen in Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan/ Salzsäure/ Ethylen-diamin tetra-Essigsäure Puffer (Tris-HCl-EDTA-buffer) pH 8,0 (Molekulare Biologie: W 587) homogenisiert (aufschneiden, einfrieren bei -20 °C, auftauen und zweimal 1 min lang intensiv vortexen) und die Gesamt-RNA mittels des Tripure Isolat Reagent (Lösungsmittel-basierte Isolation; Phenol-Guanin-diniumthiocyanat; Fa. Roche: Artikelnummer 1 667 165) aus 100 µl 50%ige Bursa-Suspension isoliert. Dazu wurden in ein Eppendorf-Röhrchen 1000 µl Tripure Isolat Reagenz pipettiert, 100 µl Bursa-Suspension dazugegeben und gemischt (vortex). Nach Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 µl Chloroform dazugefügt und gemischt (vortex). Nach erneuter Inkubation (10 min bei Raumtemperatur) wurden die Röhrchen zentrifugiert (10 min, 12.000 x g, 4°C). Die wässrige Phase wurde in ein Röhrchen überbracht, mit 500 µl Isopropanol aufgefüllt und anschließend gemischt (vortex). Nach Inkubation (10 Minuten bei Raumtemperatur) und Zentrifugation (10 Minuten, 12.000 x g, 4°C) wurde der Überstand entfernt. Das Präzipitat wurde mit 1000 µl 75%igem Ethanol gewaschen. Nach dem Zentrifugieren (10 min, 12.000 x g, 4°C) wurde das Präzipitat an der Luft getrocknet (20 bis 30 min) und anschließend in DEPC (Diethylpyrocarbonate) Wasser aufgelöst.

Für die PCR-Reaktionslösung (30µl) in einem Reaktionsgefäß wurde folgende Zusammenstellung vorgenommen (Tabelle 7):

Tabelle 7:Protokoll der Reaktionslösungen (RNA Amplification Kit SYBR Green I)

Komponente	Menge
RT-PCR Reaction Mix SYBR Green I*	6,0 µl
RT-PCR Enzym Mix*	0,6 µl
H ₂ O, PCR grade*	13,8 µl
MgCl ₂ Stock (25 mM)*	3,6 µl
AC3 als Vorwärts-Primer (IBDV-F, 5'-GGT AGC CAC ATG TGA CAG-3') (BOOT et al.,1999)	1,5 µl
VP2R als Rückwärts-Primer (IBDV-R, 5'-CGC TCG AAG TTR CTC ACC C-3') (ISLAM et al., 2001)	1,5 µl
Ziel RNA (Proben)	3,0 µl

*: Komponenten aus dem LightCycler RNA Amplification Kit SYBR Green I (Roche, 2.015.137)

Das Umschreiben der RNA in cDNA und anschließend PCR erfolgte im LightCycler.

Der Programmablauf:

- 1) RT-Schritt: 52°C 30 min.
- 2) Denaturierung 30 sec 95°C
- 3) PCR (40 Zyklen mit 5 sec 95°C, 10 sec 57°C und 30 sec 72°C)
- 4) Schmelzkurvenanalyse (0 sec 95°C, 15 sec 65°C und dann 0,1 Grad pro sec nach 95°C).

Das amplifizierte Fragment (Amplicon) war 540 Basenpaare lang und besetzte die Positionen 710-1248 (BAYLISS et al., 1990). Die Sequenzierung des Amplicons basierte auf den beiden Primern IBDV-F Sequenzen 5'-GGT AGC CAC ATG TGA CAG-3' und IBDV-R Sequenzen 5'-CGC TCG AAG TTR CTC ACC C-3' und wurde von „BaseClear“ aus Leiden (NL) durchgeführt.

3.2.7 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zum quantitativen Nachweis von Antikörpern gegen das IBDV, diente der IDEXX FlockChek[®] IBD ELISA (Fa. IDEXX). Die Mikrotiterplatten der ELISA Kits waren mit inaktiviertem IBD-Virusantigen vom klassischen Typ beschichtet.

Die Durchführung der Untersuchungen erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. Um ein Verdünnungsverhältnis von 1:20 zu erzielen, wurden zunächst jeweils 10 µl einer jeden Serumprobe mit 190 µl Verdünnungspuffer (mit Hilfe einer Mikropipette) im Röhrchen gemischt. Im zweiten Schritt schloss sich eine weitere Verdünnung im Verhältnis von 1:25 an. Somit war die Endverdünnung von 1:500 erreicht. Die Belegung der Mikrotiterplatten erfolgte nach folgendem Schema:

- -100 µl unverdünnte negative Kontrolle
- -100 µl unverdünnte positive Kontrolle
- -100 µl verdünnte Probandenserumproben

Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 22°C erfolgte das dreimalige Waschen der Platten und die Zugabe von 100 µl Ziegen-Anti-Huhn-Antikörper (HRPO) Konjugatlösung pro Vertiefung. Darauf folgte eine erneute Inkubation bei 22°C für 30 min.

Der Waschvorgang wurde dann wiederholt und im Anschluss 100 µl Tetramethylbenzidin-Substratlösung pro Vertiefung aufgetragen. Nach weiteren 15 min bei 22°C wurde die Reaktion durch Aufbringen von 50 µl Stopplösung beendet. Die photometrische Messung der Extinktionswerte erfolgte bei einer Wellenlänge von 650 nm.

Berechnung des Antikörpertiters:

a) Der S/P-Wert (Serum zu Positiv-Kontroll-Wert) für jede Probe errechnete sich mittels folgender Formeln:

Mittelwert der negativen Kontrolle (OD_{NK}):

$$OD_{NK} = \frac{\text{Vertiefung A1} + \text{Vertiefung A2}}{2}$$

Mittelwert der positiven Kontrolle (OD_{PK}):

$$OD_{PK} = \frac{\text{Vertiefung A3} + \text{Vertiefung A4}}{2}$$

S/P Verhältnis:

$$S/P = \frac{OD_{\text{Probe}} - OD_{\text{NK}}}{OD_{\text{PK}} - OD_{\text{NK}}}$$

S = Probe

P = PK = Positiv-Kontrolle

NK = Negativ-Kontrolle

OD = optische Dichte

b) Bei einer Verdünnung von 1:500 berechneten sich die Endpunkt-Titer aus den S/P-Verhältnissen über die Gleichung: $\text{Log}_{10} \text{Titer} = 1,09 \times (\text{Log}_{10} \text{S/P}) + 3,36$.

Unterschreitet der S/P-Wert den vom Hersteller für jeden Kit angegebenen cut-off Wert (0,2), so wird die Probe als negativ angesehen.

3.3 Produktionsparameter

Die Daten für die Produktionsparameter wurden von den Mästern zur Verfügung gestellt. Für die Vergleichbarkeit der Produktionsdaten wurde die Produktionskennzahl (PKZ) für die jeweiligen Herde berechnet.

Bei der Berechnung flossen folgende Parameter ein:

Verluste_{ges} (Gesamtverluste) = Verluste (%) + Verluste Schlachthof (%)

TGZ (Tägliche Gewichtszunahmen) = Mastendgewicht (g) / Masttage

FVW (Futterverwertung) = Futterverbrauch gesamt / abgeliefertes
Lebendgewicht

Die Berechnung der Produktionskennzahl erfolgt nach folgender Formel:

$$\text{PKZ} = \frac{(100 - \text{Verluste}_{\text{ges}} (\%)) \times \text{TGZ}}{\text{FVW} \times 10}$$

3.4 Versuchsaufbau

3.4.1 Feldversuch 1

In dem ersten Feldversuch wurden 16 Broilerherden zum „optimalen“ Impfzeitpunkt nach der „Deventer Formel“ (DE WIT, 2001) mit AviPro® PRECISE nach Vorgaben des Herstellers geimpft. 30 Serumproben pro Herde wurden zur Ermittlung des maternalen Antikörperstatus sowie zur Überprüfung des Impferfolges entnommen:

- in der 1. - 2. Lebenswoche
- 4- 7 Tage vor der Impfung
- wöchentlich bis zur Schlachtung

Die Bestandskontrollen der einzelnen Herden fanden wöchentlich statt. Bei diesen Besuchen sind je Herde fünf Tiere, die dem Herdendurchschnitt entsprachen, zur pathologisch-anatomischen Untersuchung entnommen worden (Tabelle 8).

Proben der Bursa cloacalis wurden bei der Sektion der Tiere am Impftag und den nachfolgenden Untersuchungen bis zur Schlachtung entnommen. Die Bursen wurden histologisch untersucht. Weiterhin wurde Bursamaterial zur IBDV-Detektion in der RT-PCR aufbereitet.

Tabelle 8: Zeitschema bezüglich der Gewinnung der Serumproben, Entnahme der Bursa cloacalis und Sektionsintervalle

	4-12	3-5		7	14	21
	d.p.hatch	d.prä.vacc	vacc	d.p.vacc	d. p.vacc	d. p.vacc
IBD-AK *	X	X		X	X	X
IBDV-Detektion**			X	X	X	X
Bursahistologie**			X	X	X	X
Sektion**	X	X	X	X	X	X

* n = 30

** n = 5

d.p.hatch/ vacc: Tage nach dem Schlupf/ Vakzination

d.prä.vacc: Tage vor der Impfung

vacc: Vakzinationstag

3.4.2 Feldversuch 2

Dieser Versuch umfasste 20 Broilerherden, wobei im Gegensatz zum Aufbau des ersten Feldversuches die Festlegung des Impfzeitpunktes nach Empfehlungen der Zuchtunternehmen oder der Brütereien erfolgte. Die Berechnung des „optimalen“ Impfzeitpunktes, wie unter Teil 1 beschrieben, wurde zum Abgleich retrospektiv durchgeführt. Von jeweils 24 Tieren eines Mastdurchganges wurden zwischen dem vierten und siebten Lebenstag Blutproben entnommen (Tabelle 9). Der Impfzeitpunkt wurde anhand oben genannter Empfehlungen festgelegt. Die Impfung erfolgte über das Trinkwasser, unter Verwendung des intermediär-virulenten Gumboro-Lebendimpfstoffes. Zur retrospektiven Bestimmung des „optimalen“ Impfzeitpunktes (nach der „Deventer Formel“), sowie der Dokumentation und Auswertung des Verlaufes der weiteren Antikörperentwicklung, wurden zusätzliche Blutproben gewonnen; jeweils am Tag der Impfung sowie weiterhin im Abstand von 7 Tagen bis zur Schlachtung. Bei den wöchentlichen Bestandskontrollen kamen jeweils 5 Tiere, die dem Herdendurchschnitt entsprachen, zur Sektion. Zum Mastende wurden die aktuellen Produktionsdaten der 20 Herden dokumentiert.

Tabelle 9: Darstellung der Gewinnung von Serumproben zur Bestimmung der IBDV-Antikörper und Sektionsintervalle

	4-12		7	14	21
	d.p.hatch	vacc	d.p.vacc	d. p.vacc	d. p.vacc
IBD-AK *	X	X	X	X	X
Sektion**	X	X	X	X	X

* n = 30

** n = 5

d.p.hatch/ vacc: Tage nach dem Schlupf/ Vakzination

d.prä.vacc: Tage vor der Impfung

vacc: Vakzinationstag

3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarbeitung der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover.

Bei der Deskription der Ergebnisse wurden Titerwerte und Mittelwerte verwendet.

Zum Nachweis statistisch signifikanter Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen einzelnen Gruppen innerhalb eines Versuches kam der Multiple Vergleichs-Test „REGW“ (Ryan, Einot, Gabriel, Welsch) zum Einsatz.

Die Residien der Daten über alle Herden wurden durch visuelle Betrachtung auf Normalverteilung (QQ-plots) geprüft. Die Daten entsprachen einer logarithmischen Normalverteilung. Deshalb wurden die Daten durch Exponieren retransformiert.

Die grafische Darstellung der Ergebnisse der ELISA-Werte erfolgte mit Hilfe der WinSTAT[®] für Microsoft[®] Excel.

Für die Beurteilung der Box & Whisker Diagramme sind folgende Angaben von Bedeutung:

Die kurze Linie innerhalb des Rechtecks stellt den Median der Variablen dar. Die Ränder oben und unten entsprechen den 25. bzw. 75. Perzentilen. So fallen 50% der Daten innerhalb des Rechtecks und 50% ausserhalb. Die Whiskers markieren die 5. und 95. Perzentilen.

Minimal- und Maximalwerte werden mit einem + Zeichen gekennzeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse des 1. Feldversuches

Im Feldversuch 1 sollte die Impfantwort auf den „intermediär“-virulenten Gumboro-Lebendimpfstoff (AviPro® PRECISE) unter Feldbedingungen in Broiler untersuchen und die Bedeutung der Bestimmung eines „optimalen“ Impfzeitpunktes dargestellt werden.

Folgende Aspekte wurden in den Feldstudien nach der IBD-Impfung untersucht:

- Induktion humoraler IBDV-Antikörper
- Histologische Bursaläsionen (nur Feldversuch 1)
- Detektion von IBDV-Genom in der Bursa cloacalis (nur Feldversuch 1)
- Entwicklung der Broilerherden und Produktionsparameter

4.1.1 Bestimmung des „optimalen“ Impfzeitpunktes

In die Versuche gingen 16 Broilerherden ein. Diese stammen von Elterntieren die einmalig gegen IBD über Trinkwasser geimpft oder von Elterntieren die zusätzlich mit IBD-Inaktivimpfstoff nachgeimpft waren. Zur Bestimmung des „optimalen“ Impfzeitpunktes nach der „Deventer Formel“ wurden je Broilerherde 30 Blutproben zwischen dem 6. und 12. Tag nach Einstellung entnommen und die maternale Antikörper-Titer im ELISA gemessen. In den ersten Lebenstagen sind die Küken durch maternale Antikörper gleichmäßig geschützt. Die Titerwerte der maternalen Antikörper sind bei über 73 % der untersuchten Tiere aller Herden über dem „cut-off“-Wert des IDEXX ELISA Tests („cut-off“ = Titer kleiner als 396). Anhand der ermittelten IBD- Antikörpertiter wurden „optimale“ Impfzeitpunkte festgelegt, die je nach Broilerherde zwischen dem 17. und 23. Lebenstag lagen (Tabelle 10).

4.1.2 Abfall der maternalen Antikörper und Bestätigung des „optimalen“ Impfzeitpunktes

30 weitere Serumproben wurden je Herde 2-5 Tage vor dem errechneten Impfzeitpunkt entnommen, um den Abfall der maternale Antikörper zu kontrollieren und den „optimalen“ Impfzeitpunkt zu bestätigen. Die Titerwerte der maternalen Antikörper (Tabelle 11) im Vergleich mit den Titerwerten aus Tabelle 10 zeigten deutlich den berechneten Abfall der maternale Antikörper. Bei der Herde 13 sind die Titerwerte der maternale Antikörper 5 Tage vor der Schlachtung niedriger als bei vergleichbaren Herden. Bei zwei Herden konnten die Kontrollproben nicht untersucht werden, da das Serum nicht verwertbar war.

Tabelle 10: Verteilung der maternale Antikörper je Herde und Bestimmung des „optimalen“ Impfzeitpunktes

Broilerherde	Tag der 1. Blutentnahme	Range IBD-mAk * (% Tiere mit IBD-AK getestet)	Impftag
1	3	1149-11346 (100)	21
2	6	202-6327 (96,7)	21
3	6	42-5131 (93,3)	21
4	7	679-7129 (100)	21
5	7	206-2892 (80)	17
6	7	303-5606 (93,3)	21
7	7	949-4960 (100)	21
8	7	458-4001 (100)	21
9	7	455-6970 (100)	22
10	8	186-4905 (93,3)	21
11	7	1112-6595 (100)	22
12	6	49-3233 (86,7)	17
13	6	1107-8688 (100)	22
14	7	129-5324 (73)	17
15	12**	108-1585 (83)	20
16	8	462-7133 (100)	23

n = 30

* = ELISA-maternale Antikörper

** = Blutproben vom Tag 7 nicht verwertbar

Tabelle 11: Verlauf der maternalen IBDV Antikörper

Herde	Tag der Blutentnahme	Range IBDV-ELISA-Titer (% Tiere mit IBD-AK getestet)	Berechneter Impftag
1	17	83-2205 (60)	21
2	18	49-1052 (43,3)	21
3	18	11-1606 (66,7)	21
4	18	58-1133 (30)	21
5	15	7-575 (10,0)	17
6	17	18-643 (16,7)	21
7	18	12-755 (16,7)	21
8	18	29-1949(40)	21
9	17	13-709 (23,3)	22
10	16	3-833 (26,7)	21
11	17	25-869 (40,0)	22
12**			17
13	17	19-570 (10,0)	22
14**			17
15	18	45-491 (10,0)	20
16	18	50-1466(10,0)	23

n = 30

** = Blutproben nicht verwertbar

4.1.3 Induktion von IBDV-Antikörpern nach der IBD-Impfung

Die Induktion von IBDV-Antikörpern wurde serologisch am 7., 14. und 21. Tag nach der Vakzination untersucht (Tabelle 12). Im Vergleich zeigten alle Herden im Verlauf der Untersuchung eine Serokonversion. Eine Woche nach der IBD-Impfung zeigte nur Herde 13 einen signifikanten Anstieg der IBDV-Antikörper im Vergleich zu den maternalen Antikörper-Titern, die 5 Tage vor der Impfung detektiert worden waren ($p < 0,05$). Auch zeigte sich ein signifikant höherer IBDV-Antikörpertiter in Herde 13 im Vergleich zu den anderen Herden ($p < 0,05$; Abbildung 2a). Bei 50 % der Herden lagen die IBDV-Antikörpertiterwerte aller Proben, sieben Tage nach der Impfung, unterhalb des „cut-off“ des IDEXX ELISA Test („cut-off“ = Titer < 396). Bei der Auswertung der Serumproben, die 14 Tage nach der Impfung genommen worden waren, zeigten alle untersuchten Herden einen Ak-Titeranstieg im Vergleich zum 7. Tag p.vacc (Tabelle 12). Die Herden 1, 4, 6, 7, 10 und 14 hatten am 14. Tag p.vacc. statistisch vergleichbare IBDV-Antikörpertiter (Abbildung 2b). Die Herden 8, 12 und 16 hatten zu diesem Zeitpunkt signifikant höhere IBDV-Antikörpertiter als die Herden 2, 3, 5, 9, 11, 13 und 15 ($p < 0,05$; Abbildung 2b).

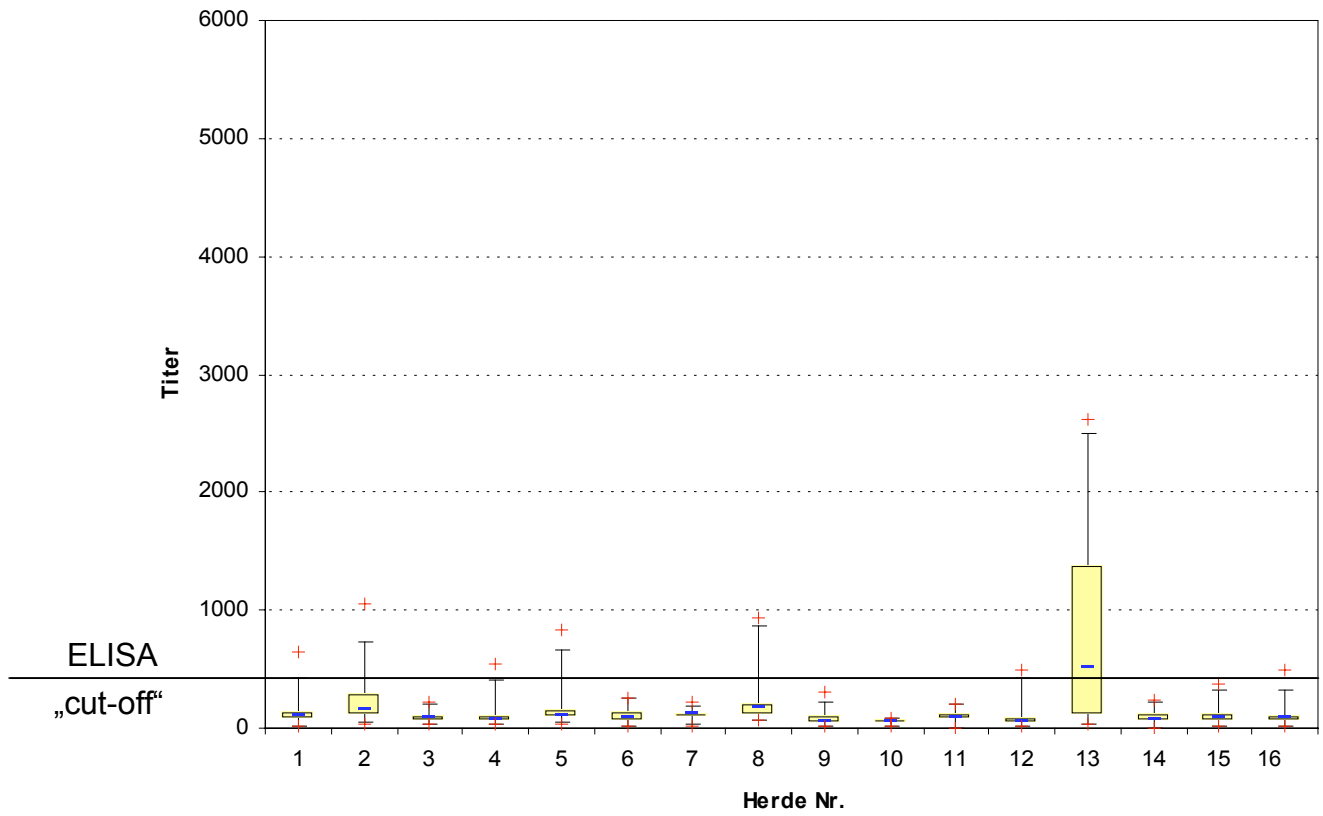
Da vier Herden vor der letzten Blutentnahme der Schlachtung zugeführt worden waren, konnten nur die Serumproben der verbleibenden 12 Herden ausgewertet werden. Alle Herden mit Ausnahme von Herde 13 zeigten drei Woche nach der IBDV- Impfung einen signifikanten Anstieg der Antikörpertiter im Vergleich zum den Werten am 7. Tag p.vacc. (Abbildung 2c).

Tabelle 12: Nachweis von IBDV-Antikörpern nach der IBD-Impfung

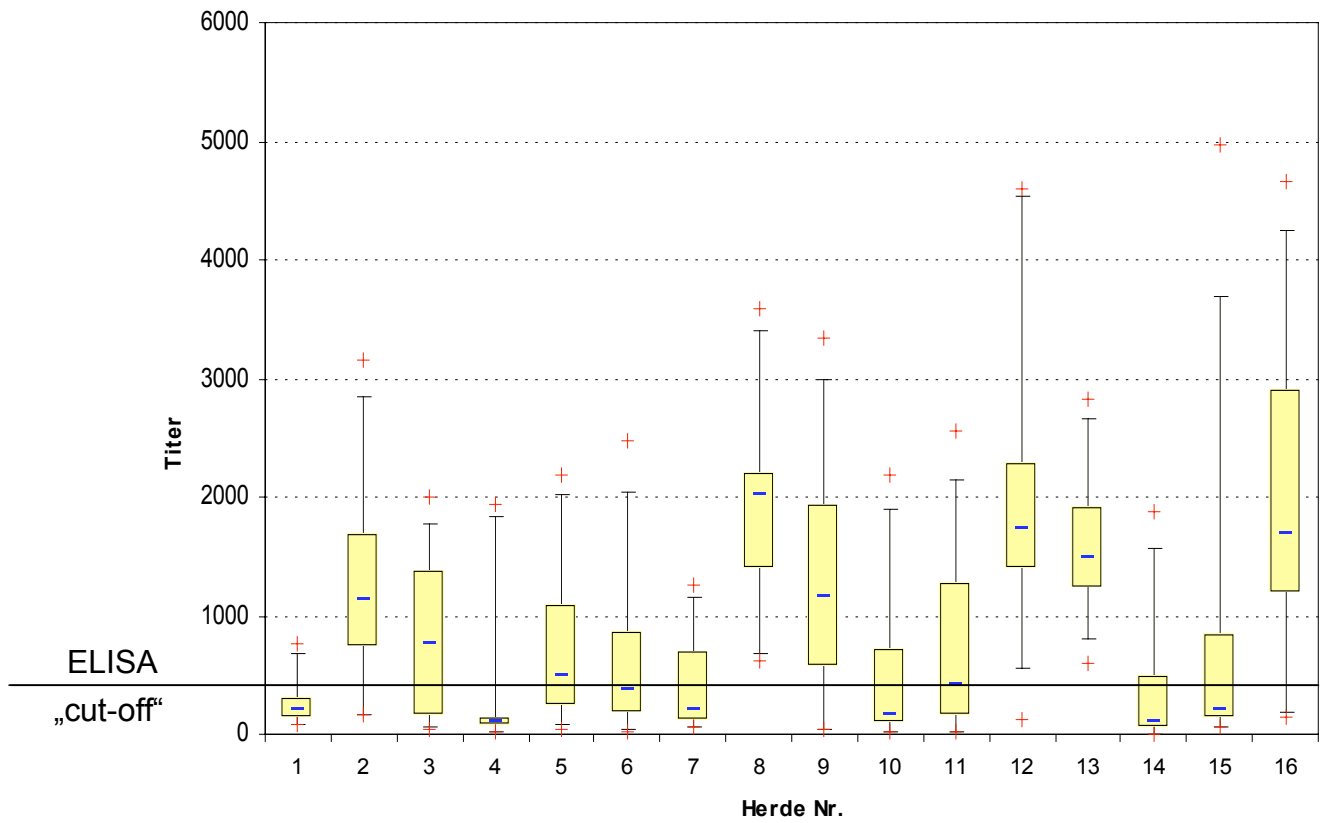
% Tiere mit ELISA IBDV-AK an ...Tagen nach der IBD-Impfung (range IBD-Titer)			
Herde	7 p. vacc	14 p. vacc	21 p. vacc
1	3,3 (21-652)	13,3 (85-764)	100 (1387-4543)
2	13,3 (42-1056)	80 (164-3158)	96,7 (213-5672)
3	0 (26-220)	60 (46-2010)	*
4	3,3 (26-537)	13,3 (24-1945)	93,3 (97-4027)
5	16,7 (33-827)	56,7 (33-2190)	96,7 (389-3863)
6	0 (9-255)	46,7 (15-2482)	100 (721-4715)
7	0 (20-221)	33,3 56-1250	100 (972-5041)
8	6,7 (67-942)	100 (614-3597)	*
9	0 (12-313)	83,3 (40-3345)	*
10	0 (18-83)	36,7 (18-2176)	100 (710-3243)
11	0 (6-208)	53,3 (27-2557)	100 1010-3841)
12	6,7 (16-487)	96,7 (126-4604)	100 (719-3475)
13	60 (26-2620)	100 (594-2824)	96,7 (42-3275)
14	0 (5-239)	33,3 (3-1883)	96,7 (110-4034)
15	0 (13-376)	36,7 (53-4961)	100 (1210-4815)
16	3,3 (18-493)	90 (141-4658)	*

n = 30 Serumproben/ Herde

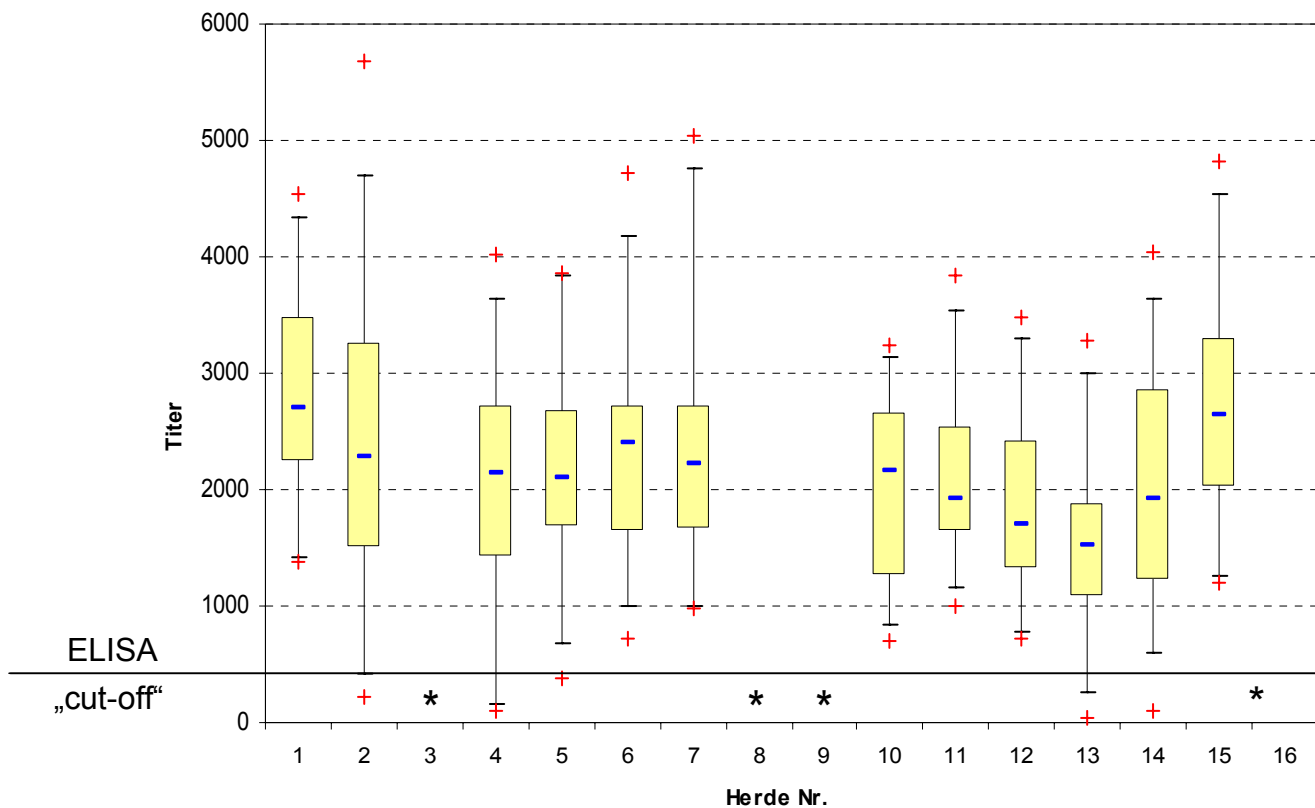
* = Herde zur Schlachtung



(a)



(b)



(c)

*= Herde zur Schlachtung

Abbildung 2 : (a); IBDV-Antikörpertiter sieben Tage nach der IBD-Impfung

(b); IBDV-Antikörpertiter 14 Tage nach der nach der IBD-Impfung

(c); IBDV-Antikörpertiter 21 Tage nach der nach der IBD-Impfung

4.1.4 Klinische Untersuchungen

Während der gesamten Untersuchungsdauer konnten in keiner der 16 Herden klinische Erscheinungen wie aufgeplustertes Gefieder, Mattigkeit, Depressionen oder Koordinationsstörungen beobachtet werden. Sporadisch konnten bei einzelnen Tieren unterschiedlicher Herden pathologische Veränderungen nachgewiesen werden. Es waren jedoch keine Unterschiede in der Inzidenz und Läsionen zwischen

den Herden zu detektieren. Die Untersuchungen von je 5 Broilern einer Herde, die bis zum Zeitpunkt der Impfung durchgeführt worden waren, zeigten bei je einem Broiler eine Perikarditis (Herden 1; 7) oder eine Polyserositis (Herde 11). Es konnten geringgradige pathologische Veränderungen des Verdauungstraktes, wie leichte katarrhalische Enteritis, bei je einem von fünf untersuchten Broilern festgestellt werden (Herden 1; 2; 4; 9; 15). Die Kokzidien-Untersuchung ergab einen geringgradigen bis mittelgradigen Befund mit *E. acervulina*, bei je zwei von fünf Broilern (Herden 2; 9; 13) zwischen dem 25. und 29. Tag. Es gab keine Indikationen für weiterführende bakteriologische Untersuchungen.

Keines der seziierten Tiere zeigte pathologisch-anatomische Befunde, die auf das Vorliegen einer IBDV-Infektion hingewiesen hätten.

4.1.5 Produktionsergebnisse

In Tabelle 13 sind die Produktionsergebnisse der Mastdurchgänge zusammengefasst. Die Produktionskennzahlen (PKZ) lagen im Mittel bei 311,3 (286,3-352,9). Die durchschnittliche Mastdauer betrug 40 Tage (36-43) bei einer täglichen Gewichtszunahme (TGZ) von 55,30 g (51,88g-61,95 g). Geschlachtet wurde bei einem Mastendgewicht (MEG) von 2218 Gramm (1900g-2348g). Die Gesamtverluste lagen im Mittel bei 4,9 % (2,2-6,2). Die Futtermittelverwertung (FVW) durchschnittlich bei 1,691 (1,608-1,766).

Tabelle 13: Produktionsparameter

Herde	Masttage	MEG(g)	TGZ (g)	Verluste		
				(%)	FVW	PKZ
1	42	2204	52,48	4,9	1,663	300,1
2	42	2318	55,19	5,7	1,687	308,5
3	40	2198	55,65	5,3	1,747	301,6
4	42	2179	51,88	4,3	1,723	288,2
5	38	2257	59,39	4,2	1,667	341,3
6	42	2269	54,02	5,1	1,743	294,1
7	42	2264	53,90	6,2	1,766	286,3
8	38	2203	58,75	5,9	1,684	328,3
9	36	1900	52,63	5,4	1,71	291,2
10	42	2200	52,38	4,3	1,665	301,1
11	43	2327	54,12	5,5	1,73	295,6
12	38	2348	61,95	4,7	1,673	352,9
13	43	2240	52,09	2,2	1,638	311,0
14	38	2275	59,87	5,5	1,668	339,2
15	41	2245	54,76	5,3	1,678	309,0
16	37	2065	55,81	4,4	1,608	331,8

MEG (g) = Mastendgewicht in Gramm

TGZ (g) = tägliche Gewichtszunahmen in Gramm

FVW (Futtermittelverwertung) = Futtermittelverbrauch gesamt/ Lebendgewicht abgeliefert

PKZ = Produktionskennzahl

4.1.6 Histologische Untersuchungen Vakzine-induzierter Bursaläsionen

Aus jeder geimpften Herde wurden am Impftag sowie am 7., 14. und 21. Tag p. vacc. Bursen von je fünf Tieren pro Herde histologisch untersucht. Am Tag der Impfung zeigte keines der Tiere aus den 16 Herden histologische Veränderung der Bursa cloacalis. Sieben Tage nach der Impfung zeigten Tiere aus 14 der 16 Herden histologische Veränderungen an der Bursa cloacalis (Tabelle 14). In Herde 12 zeigten drei und in Herde 13 vier von fünf untersuchten Tiere Bursa-Läsionen Score von 4. Bei Herde 13 zeigten die Bursen der seziierten Tiere am 7. Tag p.vacc. die schwersten Läsionen im Vergleich zu den anderen Herden ($p < 0,05$). Bei Untersuchungen von Bursen 14 Tage nach der Impfung wiesen Herde 2, 3, 5, 8, und 9 signifikant schwere und Herde 16 leichtere Läsionen auf als die Herden 1, 4, 6, 7, und 10-15 ($p < 0,05$). Da vier Herden vor der letzten Probeentnahme der Schlachtung zugeführt worden waren, konnten nur die Bursaprobe der verbliebenen 12 Herden ausgewertet werden. 21 Tage nach der Impfung wurden bei den untersuchten 12 Herden schwere Läsionen der Bursa cloacalis festgestellt. Signifikante Unterschiede der Läsionscore waren nicht festzustellen (Tabelle 14).

Tabelle 14: Untersuchung der Läsionen an der Bursa cloacalis nach der IBD-Impfung

Herde	Herdenmittelwerte der Bursaläsionscore		
	an Tagen nach der IBD-Impfung		
	7	14	21
1	0,2	2,8	4,00
2	1,0	4,2	4,0
3	0,2	4,0	*
4	0,2	1,6	3,4
5	0,2	3,4	4,0
6	1,4	3,2	3,6
7	1,8	3,6	4,0
8	0,2	4	*
9	0,4	4	*
10	2,0	3,4	4,0
11	0	2,4	4,0
12	2,4	3,4	3,4
13	3,6	4	3,4
14	1,8	1,8	3,6
15	0	2,8	4,0
16	2,4	2,2	*

n = 5

* = Herde zur Schlachtung

4.1.7 Detektion des IBDV-Genoms in Bursa-Proben nach der IBD-Impfung

Am Tag der Impfung war kein IBDV in Bursaprobe n der untersuchten Tiere der 16 Herden nachweisbar. Bei allen Herden wurde bis zum 14. Tag p.vacc. IBDV durch RT-PCR nachgewiesen. IBDV-RNA wurde in den gepoolten Bursagewebe n in sieben von 16 Beständen eine Woche nach Impfung detektiert (Tabelle 15). 14 Tage p.vacc. testeten die Proben von 15 Beständen positiv. Bei 2 von 16 Herden konnte nur am 14. Tag p. vacc. und bei einer Herde nur am 7. Tag p. vacc IBDV detektiert werden.

Bei den Herden, 8 und 9 wurde am 7. und 14 Tag p.vacc. und bei der Herde 5 am 14. Tag p.vacc. nach der Anzüchtung im embryonierten SPF-Hühnereiern und anschließenden RT-PCR IBDV detektiert.

Tabelle 15: IBDV Nachweis durch RT-PCR

Herde	Nachweis von IBDV - Genom in gepoolten Bursaproben entnommen an Tagen nach der IBD-Impfung		
	7	14	21
1	-	+	+
2	+	+	+
3	-	+	*
4	-	+	+
5	-	+**	-
6	+	+	+
7	-	+	-
8	+**	+**	*
9	+**	+**	*
10	+	-	-
11	-	+	+
12	+	+	-
13	+	+	-
14	-	+	+
15	-	+	+
16	-	+	*

n = 5 (gepoolt)

+ = positiv

- = negativ

* = Herde zur Schlachtung

** = Virus-Vermehrung im embryonierten SPF- Hühnereier

4.1.8 Detektion von Impfvirus in der Bursa cloacalis

Die Sequenzierung der RT-PCR-Produkte bestätigte den Nachweis des Impfvirus. Es konnte kein IBD-Feldvirus nachgewiesen werden.

Die aus den Nukleinsäure-Sequenzen der RT-PCR-Produkte abgeleiteten Aminosäuren-Sequenzen der RT-PCR zeigen 100 %ige Übereinstimmung mit denen der ursprünglich eingesetzten IBD-Lebendvakzine. Nach Anzucht des Virus aus Bursahomogenat und embryonierten SPF-Hühnereiern zeigte sich bei der Sequenzierung der RT-PCR Produkte eine 99,7 % Übereinstimmung mit dem Ausgangsvirus des IBD-Lebendimpfstoffes. Abweichungen waren auf den Positionen 316 (Arg ≠ Lys) und auf der Position 325 (Ile ≠ Met).

4.2 Ergebnisse des 2. Feldversuches

4.2.1 Bestimmung des Impfzeitpunktes

Die Festsetzung der Impftage bei den 20 Broilerherden in Feldversuch 2 erfolgte nach praxisüblichen Empfehlungen der Brütereien und der Zuchtorganisationen. Die Impfung fand dementsprechend terminiert statt (Tabelle 17).

4.2.2 Retrospektive Bestimmung des „optimalen“ Impfzeitpunktes der Broilerherden

Bei den entsprechenden Broilerherden wurde der „optimale“ Impfzeitpunkt retrospektiv nach Beendigung der Mastdurchgänge ermittelt. Durch die Ermittlung der IBDV-Antikörpertiter jener Blutproben, die zwischen dem dritten und siebten Lebenstag entnommen worden waren, konnte in Verbindung mit der „Deventer Formel“ der „optimale“ Impfzeitpunkt ermittelt werden. Der Durchbruchtitel für den „intermediär“ virulenten Lebendimpfstoff lag bei 125. Es wurde eine Halbwertszeit von drei Tagen für Broiler vorgegeben. Die nachträglich berechneten „optimalen“ Impftage der Herden lagen zwischen dem 14. und 24. Lebenstag. Anhand des retrospektiv bestimmten Impfzeitpunktes wurden die Herden in drei Gruppen eingeteilt. Wie in Tabelle 16 dargestellt wird, repräsentiert die erste Gruppe („Gruppe 1“) Herden, die einen, drei und acht Tage zu früh geimpft wurden (Differenz -8, -3, -1). Bei den Herden der „Gruppe 2“ liegt eine Übereinstimmung von errechnetem und tatsächlichem Impfzeitpunkt vor (Differenz 0). „Gruppe 3“ beinhaltet Herden, die einen bis sechs Tage nach dem errechneten Impftag geimpft worden waren (Differenz +1 - +6).

Tabelle 17: Retrospektive Bestimmung der Impftage mit Hilfe der „Deventer Formel“

Einteilung						
nach dem	Untergruppe	Antikörpertiter				
„optimalen“	Differenz zum	Herden-	Tag der	75% Wert**	Errechneter	Tatsächlicher
Impfzeitpunkt	Impftag	Nummer	1.Blutentnahme	1. Blutentn.	Impftag	Impftag
	-8	9	7	4554	22	14
Gruppe 1	-3	3	7	4864	24	21
zu früh	-3	4	7	7081	24	21
geimpft	-1	12	4	8014	22	21
	0	1	7	1894	18	18
Gruppe 2	0	5	7	6535	21	21
„optimal“	0	6	7	1831	19	19
geimpft	0	8	7	2231	20	20
	0	10	7	2559	20	20
	1	15	6	4279	21	22
	2	18	3	7235	21	23
	2	19	3	7763	21	23
	3	2	7	1464	18	21
Gruppe 3	3	11	4	7321	21	24
zu spät	4	7	7	680	14	18
geimpft	4	13	4	5087	20	24
	4	16	5	2404	18	22
	5	14	6	1767	17	22
	6	17	3	3005	17	23
	6	20	3	2592	17	23

n = 24

** Dieser IBDV-Antikörperwert ist Bezugspunkt für die „Deventer Formel“.

4.2.3 Maternale IBDV-Antikörpertiter zum Zeitpunkt der IBD-Impfung

Am Tag der Impfung waren die maternalen Antikörper-Titer im Vergleich zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme gesunken.

Die Auswertung der Proben im ELISA-Test (Tabelle 18) zeigte, dass die Titerwerte aller Herden, die früher als am „optimalen“ Impftag (Gruppe 1: zu früh geimpft) geimpft worden waren, zum Zeitpunkt der Impfung einen signifikant höheren maternalen Antikörper-Titer aufwiesen als jene Gruppen, die zum „optimalen“ Impfzeitpunkt (Gruppe 2: „optimal“ geimpft) oder nach dem „optimalen“ Impfzeitpunkt (Gruppe 3: zu spät geimpft) geimpft worden waren ($p < 0,05$). Bei Herde 9, die acht Tage vor dem „optimalen“ Impfzeitpunkt geimpft wurde, lag der Anteil bei 92 % über dem „cut-off“ Wert von 396. Bei den anderen Herden dieser Gruppe lagen die Titerwerte bei 50 % der Proben oberhalb des „cut-off“.

Innerhalb der zweiten Gruppe, die zum „optimalen“ Zeitpunkt geimpfte Herden enthielt, zeigte eine der fünf Herden dieser Gruppe (Herde 1) signifikant höhere maternale Antikörper-Titer als jene, die in den Herden 5, 6, 8, und 10 detektiert worden waren.

54 % der Proben der Herde 1 wiesen zum Zeitpunkt der Impfung IBDV-Antikörper-Titer über dem „cut-off“ von 396 auf. Die Titerwerte der anderen Herden dieser Gruppe „optimal“ geimpft waren statistisch niedriger. Die Proben der Herde 10 wiesen keine IBDV-Ak-Titer über dem „cut-off“ Wert des ELISA auf (Tabelle 18).

In der Gruppe mit den Herden, die später geimpft worden waren, als der errechnete Impftag, waren die Titerwerte statistisch niedriger, als in den anderen Gruppen (zu früh geimpft; „optimal“ geimpft). Die maternalen Antikörper-Titer der Herden 7, 13, 14, 16 und 20 lagen unterhalb der Nachweisgrenze („cut-off“ des IDEXX ELISA < 396) des ELISA-System.

Tabelle 18: Maternale IBDV-Antikörpertiter zum Zeitpunkt der Impfung

(Gruppe) Herde	empfohlener Impftag	Range IBD-mAk * (% Tiere mit IBD-AK getestet)	theoretisch errechneter Impftag
(zu früh geimpft)			
9	14	151-2985 (92)	22
3	21	125-576 (54)	24
4	21	25-6590 (54)	24
12	21	143-2057 (50)	22
(„optimal“ geimpft)			
1	18	75-3126 (54)	18
5	21	6-377 (4)	21
6	19	11-638 (13)	19
8	20	46-535 (21)	20
10	20	6-294 (0)	20
(zu spät geimpft)			
15	22	36-460 (8)	21
18	23	2-949 (17)	21
19	23	20-527 (13)	21
2	21	24-1096 (8)	18
11	24	61-624 (17)	21
7	18	6-284 (0)	14
13	24	8-180 (0)	20
16	22	7-249 (0)	18
14	22	2-104 (0)	17
17	23	2-2680 (13)	17
20	23	3-259 (0)	17

n = 24

* = ELISA-Antikörper

4.2.4 Verlauf der IBDV-Antikörperbildung nach IBD-Impfung

Für die vergleichende statistische Bewertung der IBDV-Antikörperbildung wurde die Methode GLM (REGW) eingesetzt. Herden, bei denen die Abweichung des Impftages mit dem nachträglich ermittelten Impftag übereinstimmte, wurden zusammengefasst. Die Verteilung der Ak-Titerwerte am Impftag, so wie am 7., 14. und am 21. d.p.vacc. sind in Tabelle 19 dargestellt. Ein signifikanter Anstieg im Vergleich aller Herden ($p < 0,05$) der IBDV-Antikörper 7 Tage p.vacc. zeigte sich nur bei den Herden, die fünf Tage zu spät geimpft worden waren.

Am Tag 14 nach der Impfung war ein signifikanter ($p < 0,05$) Anstieg, im Vergleich zum Impftag der Antikörpertiter bei Herden, die 1, 4 oder 6 Tage zu spät geimpft worden waren, nachweisbar. Bei den Herden, die 8, 3 und 1 Tage zu früh geimpft wurden, zeigten die IBDV-Ak-Titer einen statistisch signifikant ($p < 0,05$) niedrigeren Anstieg. Am 21. d.p.vacc. zeigten die Herden, die 8 und 3 Tage zu früh geimpft worden waren, signifikant ($p < 0,05$) niedrigere Ak-Titer als die Herden, die am oder nach dem „optimalen“ Impfzeitpunkt geimpft worden waren.

Tabelle 19: Verlauf der IBDV-Antikörper nach der Impfung

Gruppe	Differenz Impftag/ Empfehlung	% Tiere mit ELISA IBDV-AK an ... Tagen nach der IBD- Lebendimpfung. (range IBD-Titer)			
		Impftag	7	14	21
1*	-8	92 (79-5812)	29 (3-677)	8 (41-1625)	29 (32-2846)
	-3	54 (25-6590)	12 (19-739)	10 (3-883)	70 (147-3705)
	-1	50 (143-2057)	0 (27-331)	25 (27-1445)	100 (743-4547)
2*	0	18 (6-3126)	9 (6-3180)	60 (12-8563)	93 (39-4410)
	1	8 (36-460)	0 (11-270)	100 (551-4917)	100 (940-4733)
	2	14 (2-949)	18 c (6-1446)	47 (18-4335)	**
3*	3	12 (24-1096)	2 (16-446)	83 (142-4723)	98 (233-4748)
	4	0 (6-284)	4 (8-1501)	95 (35-4304)	97 (162-5331)
	5	0 (2-310)	29 (13-2722)	75 (28-3788)	100 (426-3581)
	6	6 (2-2680)	19 (17-2651)	81 (18-5100)	**

1* = zu früh

2* = „optimal“

3* = zu spät

n = 24 Serumproben/Herde

** = Herde zur Schlachtung

4.2.5 Klinische Untersuchung

Während der gesamten Untersuchungsdauer konnten in keiner der 20 Herden klinische Erscheinungen wie aufgeplustertes Gefieder, Mattigkeit, Depressionen oder Koordinationsstörungen beobachtet werden.

4.2.6 Pathomorphologische Untersuchungen

Die pathomorphologischen Untersuchungen von je fünf Broilern einer Herde, die bis zum Zeitpunkt der Impfung durchgeführt worden waren, zeigten keine Abweichungen.

Sporadisch konnten bei einzelnen Tieren unterschiedlicher Herden geringe pathologische Veränderungen des Verdauungs- und Atmungsapparates am 7., 14. und 21. Tag nach der IBD-Lebendimpfung festgestellt werden. Sieben Tage nach der Impfung konnte bei zwei der fünf untersuchten Tiere (Herden 9; 14) eine geringgradige katarrhalische Enteritis diagnostiziert werden. Untersuchungen des Verdauungsapparates 14 d.p.vacc. zeigten leichte katarrhalische Enteritis bei je einem oder zwei von fünf untersuchten Tieren (Herde 1; 7; 11; 15; 19), sowie in Herde 20 einen gering- bis mittelgradigen Kokzidienbefall mit *E. acervulina*. Bei zwei Herden zeigten je zwei Tiere eine geringgradige Aerosacculitis (Herde 2; 12). 21 Tage nach der Impfung ergab die Kokzidien-Untersuchung bei drei von fünf untersuchten Tieren der Herde 11 geringgradigen Kokzidienbefall mit *E. acervulina*. Keines der seziierten Tiere zeigte pathologisch-anatomische Befunde, die auf das Vorliegen einer IBDV-Infektion hingewiesen hätten.

4.2.7 Produktionsergebnisse

In Tabelle 20 sind die Produktionsergebnisse der Mastdurchgänge zusammengefasst. Die Produktionskennzahlen (PKZ) lagen im Mittel bei 305,5 (267,1 - 326,8). Die durchschnittliche Mastdauer betrug 41 Tage (36-45), bei einer täglichen Gewichtszunahme (TGZ) von 53g (49,2g-57,9g), geschlachtet wurde bei einem Mastendgewicht (MEG) von 2178g (1934g-2508g). Die Gesamtverluste lagen im Mittel bei 3,8 % (1,9-5,6). Die Futtermittelverwertung (FVW) durchschnittlich bei 1,763 (1,609-1,859).

Tabelle 20: Produktionsparameter

Herde	Masttage	MEG(g)	TGZ (g)	Verluste(%)	FVW	PKZ
1	39	2004	51,4	4,9	1,763	277,2
2	42	2067	49,2	4,0	1,769	267,1
3	42	2134	50,8	4,1	1,609	302,8
4	42	2278	54,2	2,9	1,741	302,5
5	42	2311	55,0	4,3	1,819	289,5
6	40	2099	52,5	3,4	1,776	285,4
7	39	1983	50,8	2,4	1,804	275,1
8	41	2065	50,4	3,2	1,769	275,6
9	36	1947	54,8	5,2	1,754	296,4
10	43	2394	55,9	4,7	1,859	286,7
11	45	2508	55,7	5,6	1,752	300,3
12	42	2126	50,6	4,2	1,794	270,3
13	45	2456	54,6	4,7	1,777	292,7
14	43	2334	54,3	5,3	1,729	297,3
15	43	2488	57,9	4,8	1,795	306,9
16	43	2124	49,4	1,9	1,758	275,6
17	39	1934	49,6	3,5	1,751	273,3
18	38	2153	56,7	2,5	1,777	310,9
19	39	1972	50,6	2,2	1,703	290,4
20	40	2189	54,7	2,4	1,751	305,0

MEG (g) = Mastendgewicht

Verluste = Gesamtverluste

FVW (Futtermittelverwertung) = Futtermittelverbrauch gesamt / Lebendgewicht abgeliefert

PKZ = Produktionskennzahlen

5 Diskussion

Diese Studie untersuchte den Einfluss maternaler IBDV-Antikörper auf eine Impfung von Broilern mit dem „intermediär“-virulenten Gumboro- Lebendimpfstoff

AviPro® PRECISE. Experimentelle Studien, aber auch Beobachtungen im Feld haben gezeigt, dass maternale Restantikörper mit dem Impferfolg interferieren können.

Ziel dieser Arbeit war es darzustellen, dass eine IBD-Lebendimpfung unter Feldbedingungen nur dann zu einer möglichst schnellen und gleichmäßige Induktion einer humoralen Immunität führt, wenn sie zu einem „optimalen“ Zeitpunkt durchgeführt wird. Der „optimale“ Impfzeitpunkt lässt sich durch die Anwendung der „Deventer Formel“ bestimmen und beschreibt den Zeitpunkt, zu dem ein gewünschter Teil der Herde impffähig ist. Unterschiede zwischen den unterschiedlichen genetischen Linien in der Impfantwort konnten in diesen Studien nicht nachgewiesen werden. Es wurden zwei Feldstudien durchgeführt; in der ersten Studie erfolgte die IBD-Impfung zu einem nach der „Deventer Formel“ ermittelten „optimalen“ Impfzeitpunkt, zu dem angenommen wird, dass die Vakzine den maternalen Restantikörpertiter in einem Teil der Herde durchbricht und eine Induktion mit entsprechender Immunantwort stattfinden kann. In der zweiten Studie wurden Tiere vergleichsweise vor, zum oder nach dem „optimalen“ Impfzeitpunkt geimpft und die Induktion einer IBDV-Antikörperantwort untersucht.

In der ersten Feldstudie konnte gezeigt werden, dass die IBD-Impfung mit einem „intermediär“-virulenten Stamm zum „optimalen“ Impfzeitpunkt eine detektierbare Antikörperantwort bis zum 14. Tag nach der Vakzination induziert hat. Der Antikörperanstieg korrelierte mit der Induktion von IBD-spezifischen Bursaläsionen

und dem Nachweis des Impfvirus in der Bursa cloacalis. In der zweiten Feldstudie konnte diese Beobachtung bestätigt werden. Weiterhin hat sie gezeigt, dass sich bei Tieren, die mehr als drei Tage vor dem „optimalen“ Zeitpunkt geimpft werden, die Ak-Ausbildung mindestens eine Woche verzögert bzw. bis zum Schlachtzeitpunkt nicht detektierbar war. Eine Impfung nach dem „optimalen“ Impfzeitpunkt erhöht das Risiko einer Feldinfektion, da ein Großteil der Herde für einen längeren Zeitraum ohne maternale Antikörper und somit empfänglich für Feldvirus ist.

Parameter, wie die Höhe der maternalen IBDV-Antikörper zum Zeitpunkt der Impfung waren von besonderem Interesse (VAN DEN BERG et al., 1991; GODDARD et al., 1994; TSUKAMOTO et al., 1995; ALAM et al., 2002). Durch die histologischen Untersuchungen sollte der Grad der Veränderungen der Bursa cloacalis während der Feldstudie bestimmt werden. Damit sollten das Angehen der Impfung sowie eventuelle Feldinfektionen detektiert werden (EZEOKOLI et al., 1990; VAN DEN BERG et al., 2000; RAUTENSCHLEIN et al., 2005). Die Detektierbarkeit des Impfstoffes in der Bursa cloacalis sollte untersucht und zwischen Broilerherden, die mit unterschiedlich hohem maternalen Restantikörpern vakziniert worden waren, verglichen werden.

Das Impfvirus wurde mittels RT-PCR im Bursahomogenat nachgewiesen. Eine anschließende Sequenzierung der RT-PCR-Produkte konnte eine Infektionen mit IBD-Feldvirus ausschließen.

Basierend auf frühere Erfahrungen im Feld und Hinweisen in der Literatur wurde angenommen, dass maternale IBDV-Antikörper eine erfolgreiche Vakzination behindern. Entsprechende Feldstudien zur Bestätigung dieser Annahme lagen jedoch nicht vor.

5.1 Bestimmung des „optimalen“ Impfzeitpunktes und Untersuchung des Verlaufes der maternalen IBD-Antikörpertiter

Die „Deventer Formel“ ist ein Hilfsmittel zur Bestimmung des „optimalen“ Impfzeitpunktes. In den Feldstudien wurden Blutproben (n=30) innerhalb der ersten Lebenswochen auf maternale IBD-Antikörper untersucht. Anhand der ermittelten IBD-Ak-Titer konnte der Abfall der maternalen Antikörper der Herden vorhergesagt und der „optimale“ Impfzeitpunkt mit den entsprechenden Vorgaben (Halbwertszeit = 3 Tage; Impffähigkeit der Herde = 75%; Durchbruchtitel (ELISA-Wert) des Impfstoffes = 125) berechnet werden. Der Variations-Koeffizient (CV-Wert), der eine Aussage über die Homogenität der maternale Antikörper-Titerwerte der Herde gibt, lag bei allen Broilerherden in einem zu tolerierenden Bereich, so dass eine einmalige Impfung in beiden Versuchen ausreichend war. Die Annahme, dass der Abbau der maternalen Antikörper logarithmischen Gesetzen folgt, konnte anschließend durch die Bestimmung des Titerverlaufes in Serumproben bis zum Impfzeitpunkt bestätigt werden (SOLANO et al., 1985; KOUWENHOVEN und VAN DEN BOS, 1992, 1994; GARDIN, 1994; DE WIT, 2001).

Durch die retrospektive Auswertung der Serumproben in der zweiten Feldstudie konnte eine nachträgliche Einstufung der Impftermine durch die Bestimmung der IBD-Ak mit Hilfe der „Deventer Formel“ vorgenommen werden.

Diese Ergebnisse dieser Feldstudie bestätigten, dass die „Deventer Formel“ unter Feldbedingungen eine rechnerische Bestimmung des Abfallens der maternalen Antikörper zulässt und sich -wie gezeigt - zur Bestimmung eines „optimalen“ Impfzeitpunktes eignet (DE WIT, 2001).

5.2 Induktion einer aktiven humoralen Immunantwort nach

IBD-Impfung

Im Feldversuch 1, in dem alle Herden zum „optimalen“ Impfzeitpunkt vakziniert worden waren, konnte eine Serokonversion bei allen Herden nachgewiesen werden. Anhand dieser Ergebnisse bestätigt sich die Annahme, dass am „optimalen“ Impftag ein Großteil der Tiere impffähig war. Es wird vermutet, dass der Anteil der Herden, der am Impftag noch maternale IBDV-Antikörper über dem Durchbruchtiters hat, durch das in der Herde zirkulierende Impfvirus „nachgeimpft“ wird (DE WIT, 2001).

Es kann aber auch spekuliert werden, dass das Impfvirus sich erst nach dem Abfall der maternalen Antikörper, unterhalb des Durchbruchtiters, vermehrt und die Immunität etwas verzögert ausgebildet wird (KRAEMER, 2004).

Bei einer Herde fand im Vergleich zu den anderen 15 Herden bereits ein statistisch signifikanter ($p < 0,05$) Anstieg der IBDV-Antikörper sieben Tage nach der Impfung statt. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass möglicherweise zum Impfzeitpunkt maternale Antikörper-Titer in der gesamten Herde unterhalb des Vakzine-Durchbruchtiters lagen. Ob hier die variierenden Haltungsbedingungen oder unterschiedliche genetische Einflüsse für den unterschiedlichen Abbau der maternalen Antikörper verantwortlich sind, konnte hier nicht geklärt werden. Durch die nachträgliche Einstufung der Herden im Feldversuch 2, konnte die Notwendigkeit der Impfzeitpunktbestimmung mit Hilfe serologischer Bestimmung bestätigt werden. Wie im Feldversuch 1, zeigten die Herden der Gruppe, bei denen der Impftag mit dem errechneten „optimalen“ Impftag übereinstimmte, eine Serokonversion nach der IBD-Impfung zwischen dem 7. und 14. d.p.vacc.

Bei 5 der 11 Herden, die nach dem „optimalen“ Impftag geimpft wurden, konnte ein statistisch signifikanter ($p < 0,05$) Anstieg der Ak-Titerwerte schon 7 d.p.vacc. nachgewiesen werden. Daneben zeigten die anderen drei Herden wie erwartet eine Serokonversion am 14. d.p.vacc.

Bei allen Herden waren die IBD Ak-Titer am Tag der Impfung statistisch signifikant niedriger, als bei den Herden, die zum „optimalen“ Zeitpunkt geimpft worden waren. Ein großer Teil der Tiere einer Herde hatte zum Zeitpunkt der Impfung sehr niedrige maternale Antikörpertiter und im Falle eines IBDV-Felddrucks, die Gefahr einer Feldinfektion bestand. Diese Herden waren über einen längeren Zeitraum für eine Feldvirusinfektion empfänglich (VAN DEN BERG et al., 1991; KOUWENHOVEN und VAN DEN BOS, 1992; DE WIT, 1999). Ziel der Impfzeitpunktbestimmung mit der „Deventer Formel“ ist es, diesen Zeitraum so kurz wie möglich zu halten (DE WIT, 2001).

Dagegen zeigte die Herde, die acht Tage vor dem errechneten Impfzeitpunkt geimpft wurden war, noch keine Serokonversion zum Zeitpunkt der Schlachtung. Durch die Neutralisation des Impfvirus durch hohe maternale IBDV-Antikörper wurde der Aufbau humoraler Immunität verhindert bzw. verzögert (VAN DEN BERG und MEULEMANS, 1991; GODDARD et al., 1994; TSAKUMOTO et al., 1995; KUMAR et al., 2000; ALAM et al., 2002). Diese Herde war, nach dem die maternalen IBDV-Antikörper abgebaut waren, hinsichtlich der humoralen Immunität ungeschützt gegen eine Infektion mit einem IBD-Feldvirus. Ob hier eine lokale oder systemisch zelluläre Immunität (Rautenschlein et al., 2005) gegen IBD vorlag, wurde in dieser Feldstudie nicht untersucht.

Bei den Herden, die drei Tage zu früh geimpft worden waren, kam es erst zu einer Serokonversion zum Ende der Mastperiode (Mittelmast). Dieser verzögerte Beginn der Serokonversion zum Ende der Mast ist als problematisch zu bewerten, weil keine belastbare humorale Immunität in der Mastperiode aufgebaut werden konnte.

5.3 Korrelation zwischen IBD-Virusgenomdetektion und Läsionen der Bursa cloacalis sowie IBDV-Antikörperproduktion

In dieser Studie konnte erstmalig gezeigt werden, dass eine Korrelation zwischen der Detektion von IBD-Virusgenom, dem Auftreten von Läsionen in der Bursa cloacalis und dem Aufbau von IBDV-Antikörper im Feld besteht.

Die Detektion des IBD-Virusgenoms und das Auftreten der Bursaschäden fand zum gleichen Zeitpunkt mit dem Anstieg der IBDV-Antikörpertiter statt (Abbildung 3 a, b).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch bei hohen maternalen Antikörpertitern keine vollständige Neutralisierung des Impfvirus, wie auch bei RAUTENSCHLEIN et al. (2005) experimentell gezeigt, stattfindet.

Impfviruspezifische RNA konnte in 47,3% der untersuchten Herden am siebenten Tag nach der Impfung mit der RT-PCR aus der Bursa cloacalis detektiert und bis zum 14. Tag nach der Impfung in allen Herden bestätigt werden. 21 Tage nach der Impfung konnte in 58,3% der untersuchten Herden impfviruspezifische RNA aus der Bursa cloacalis detektiert werden. Die molekularbiologischen Untersuchungen der Bursen cloacalis nach der IBD-Impfung in der Mastperiode zeigten, dass das IBD-Impfvirusgenom vom siebten Tag nach der Impfung in einigen Herden detektiert wurde. Bei der Untersuchung der Bursa am 14. Tag nach der Impfung wurde in 15 der 16 Herden das Virusgenom detektiert.

Bei der Ausnahmeherde 10 wurde jedoch nur bei der Untersuchung am siebten Tag nach der IBD-Impfung das IBD-Impfvirusgenom detektiert (Abbildung.3c). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die molekularbiologischen Untersuchungen falsch negativ ausfielen. Es ist auch zu bedenken, dass es sich um Sammelproben von Tieren aus jeweils einer Herde und nicht um eine fortlaufende Untersuchung gleicher Tiere handelte. Möglich ist, dass hierdurch die Methode nicht sensitiv und an die Grenzen der Detektierbarkeit angekommen ist.

Außerdem gibt es individuelle Varianten im Infektionsverlauf. Die gleichzeitigen histologischen Untersuchungen der Bursen dieser Tiere zeigten die gleichen Läsionen, wie sie bei den Herden auftraten, in denen IBD-Genom detektiert wurde. Vermutlich war IBD-Genom zum Zeitpunkt der Untersuchung vorhanden, konnte aber nicht festgestellt werden.

Die ersten histologischen Veränderungen der Bursa cloacalis traten sieben Tage nach der IBD-Impfung auf. Zwei Herden zeigten zum Teil schwere Bursaläsionen. Die Veränderungen der Bursen zeigten sich 14 Tage nach der Impfung bei allen untersuchten Proben. Nach weiteren sieben Tagen (21 d.p.vacc) waren alle untersuchten Bursen schwer geschädigt. Eine Regeneration des Bursagewebes konnte bis zum 21. Tag nach der Vakzination nicht festgestellt werden.

Untersuchungsergebnisse mit SPF-Tieren lassen erwarten, dass die Bursaläsionen innerhalb der ersten fünf Tage nach Inokulation mit einem „intermediär“-virulenten IBDV-Stamm auftreten und nach 14 Tagen die Regeneration beginnt (Kim et al., 1999). Die Untersuchungsergebnisse der Feldstudien weichen davon ab.

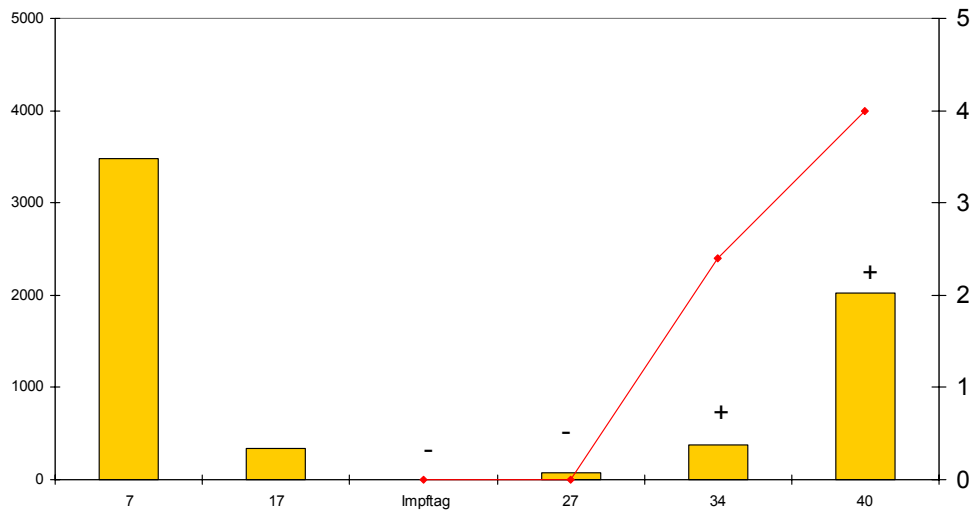
Die Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen an SPF-Tieren lassen sich also nicht unbesehen auf Broilerbestände in konventioneller Bodenhaltung übertragen.

Es ist unter Feldbedingungen nicht kontrollierbar, wann es im einzelnen Tier tatsächlich zur IBD-Impfvirus-Vermehrung und somit zur Entwicklung von Bursaläsionen kommt. Auch muss der Einfluss von zirkulierendem Impfvirus berücksichtigt werden.

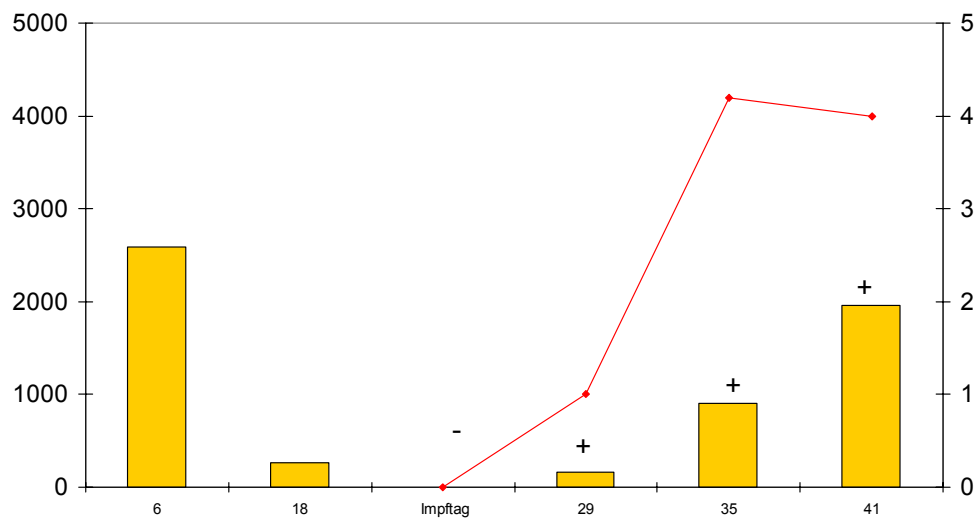
Die Detektion von impfviruspezifischer RNA 21 Tage nach der Impfung und das Auftreten schwerer Bursaläsionen 21 Tage nach der Impfung wurden nicht erwartet, da Laboruntersuchungen an Broilern, die mit „intermediär“-virulentem IBD-Lebendvakzin geimpft wurden, nur leichte Bursaschädigungen zeigten und eine Regeneration der Bursa cloacalis ab dem 14. d.p.vacc. zu detektieren war (Kraemer, 2004). Auch konnte impfviruspezifische RNA bei den Broilern, die mit einem „intermediär“-virulenten IBD-Vakzine geimpft waren, nur vereinzelt in der Bursa cloacalis detektiert werden. Bei der Impfung von Broilerherden wird der Lebendimpfstoff den Tieren in einem Zeitraum von zwei Stunden über das Trinkwasser zur Aufnahme bereitgestellt. In dieser Zeit müssen alle Tiere unabhängig von deren individuellen maternalen Antikörper-Titern den Impfstoff aufnehmen. Zu dieser Zeit sind aber nicht alle Tiere impffähig, da sie maternale Antikörper oberhalb des Vakzine-Durchbruchtiters besitzen. Zusätzlich kann der Impfstoff laut Herstellerangaben mindestens neun Tage über den Kot ausgeschieden werden. Möglicherweise ein Hinweis, dass das Impfvirus ständig zirkuliert und so auch Tiere nachgeimpft werden, die eventuell keinen Impfstoff am eigentlichen Impftag aufgenommen haben (DE WIT, 2001).

5.4 Nachweis von IBD-Impfvirus

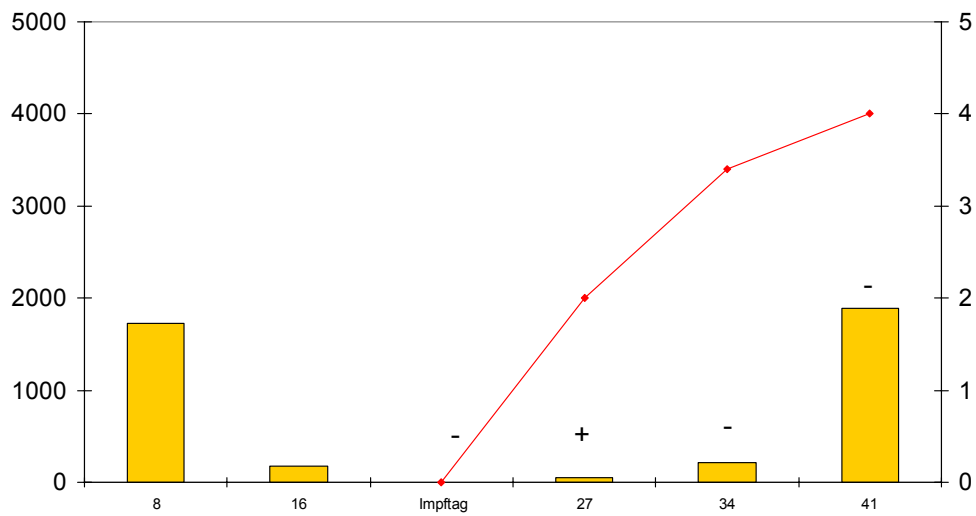
Die Untersuchungen der Bursaprobe zum Zeitpunkt der Impfung auf IBDV verliefen alle negativ. Die Sequenzierung der RT-PCR Produkte aus der Feldstudie 1, die am 7. 14. und am 21 d.p.vacc. positiv waren, zeigte eine 99,7% Übereinstimmung der IBD-Probensequenzen mit dem angewandten „intermediär“-virulenten Gumboro-Lebendimpfstoff. IBD-Feldvirus konnte in keiner der untersuchten Proben festgestellt werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass auf den untersuchten Betrieben kein IBD-Feldvirus vorhanden war oder die Impfung mit dem „intermediär“-virulenten Lebendimpfstoff zum „optimalen“ Zeitpunkt eine Infektion mit einem IBD-Feldvirus in diesen Herden erfolgreich verhindert hat. Zum Zeitraum der IBD-Impfung ist auch am „optimalen“ Impftag die Gefahr einer Infektion besonders hoch, da sich zu diesem Zeitpunkt impffähige und nicht impffähige Tiere in einer Herde befinden (DE WIT, 2001).



3a.



3b.



3c.

Abbildung 3a: Herde 11

3b: Herde 10

3c: Herde 2

Darstellung der Korrelation zwischen IBD-Virusgenomdetektion und Läsionen der Bursa cloacalis und IBD-Antikörper einiger Herden:

Die Balken zeigen den Verlauf der maternalen Antikörper und den Beginn der Serokonversion.

Die Linien zeigen den Lesionscore der Bursaprobe

Die Zeichen + und - stellen das positive oder negative Ergebnis des IBDV-Nachweises dar.

5.5 Entwicklung der Broilerherden nach der Gumboroimpfung

Wie die Produktionsparameter, das klinische Bild und die pathologisch-anatomischen Untersuchungen zeigen, entwickelten sich die untersuchten Broilerherden entsprechend den Erfahrungen aus der Praxis. Die Einzelbefunde der pathologisch-anatomischen Untersuchungen wiesen nicht auf Erkrankungen der gesamten Herde hin. Weiterführende bakteriologische Untersuchungen wurden deshalb nicht eingeleitet.

Fazit

Auf Grund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann festgestellt werden, dass der „intermediär“-virulente Gumboro-Lebendimpfstoff (AviPro® PRECISE) am „optimalen“ Impfzeitpunkt verabreicht eine Serokonversion induziert. Bei einer zu frühen Impfung ist die Antikörperbildung deutlich verzögert. Eine zu späte Impfung erhöht die Gefahr einer Feldinfektion, da ein hoher Anteil der Tiere bis zum Zeitpunkt der Impfung ungeschützt ist. Die „Deventer Formel“ (DE WIT, 2001) ist ein geeignetes Hilfsmittel, um unter Feldbedingungen den „optimalen“ Impfzeitpunkt zu bestimmen. IBD-Feldvirus konnte in unserer Feldstudie nicht nachgewiesen werden. Zur Festlegung eines geeigneten Impfzeitpunktes muss jedoch immer der IBDV-Feldruck berücksichtigt werden. In Abhängigkeit davon wird bestimmt, wie viele Tiere zum Zeitpunkt der Impfung keine maternalen Antikörpertiter mehr haben sollten und welcher Impfstoff verwendet wird.

Der Anstieg der Zellschädigungen und die ausbleibende Regeneration des Bursagewebes zeigten, dass die Impfvirus-bedingten Läsionen innerhalb einer Herde länger als erwartet andauern können. Eine Unterscheidung von Impfvirus- und

Feldvirusinfektionen kann nur eindeutig durch eine Sequenzierung des vorliegenden Virus vorgenommen werden.

Aufgrund dieser Feldstudie stellt sich die Frage, ob und wie lange das Impfvirus in einer geimpften Herde zirkuliert und möglicherweise zu einer Nachimpfung von nicht geimpften Tieren führen könnte. Weiterhin bleibt die Frage offen, ob zellvermittelte Immunitätsmechanismen in zu früh geimpften Herden, trotz fehlender Detektion humoraler Immunität, zu einem Schutz gegen eine Feldinfektion führen können.

6 Zusammenfassung

Hermann Block (2006)

Feldstudien zum Einfluss maternaler Antikörper auf den Vakzinationserfolg eines intermediär-virulenten Gumboro-Lebendimpfstoffes bei Broilern

Die richtige Strategie zur Kontrolle der infektiösen Bursitis und ihre Erfolgsrate hängen im Wesentlichen vom IBD-Infektionsdruck im Feld, von maternalen Antikörpertitern und dem IBD-Impfstoffen ab. Die Anwendung der „Deventer Formel“ kann dabei helfen, basierend auf der Höhe der maternalen Antikörper und des anzuwendenden IBD-Impfstammes, den geeigneten Impfzeitpunkt zu bestimmen. Im Rahmen von zwei Feldstudien wurde der intermediär-virulente IBD-Impfstoff entweder vor, während oder nach dem durch die „Deventer Formel“ ermittelten, am „optimalen“ Impfzeitpunkt eingesetzt. Die Studien zeigen, dass Broiler von Herden, die zwischen einem Tag vor und drei Tagen nach dem ermittelten, „optimalen“ Zeitpunkt zur Impfung vakziniert wurden, innerhalb von 14 Tagen post vaccinationem nachweislich eine humorale Immunität entwickelten. Tiere, die mehr als drei Tage vor dem ermittelten, „optimalen“ Zeitpunkt geimpft wurden, entwickelten eine verzögerte oder eine bis zur Schlachtung nicht nachweisbare humorale Immunität. Interessanterweise korrelierte die Induktion der humoralen Immunität mit der Inzidenz von Bursaläsionen und dem Nachweis von IBDV mittels RT-PCR in der Bursa cloacalis. Unter Feldbedingungen können Bursaläsionen später auftreten, als nach experimentellen Erfahrungen mit spezifisch pathogen-freien Hühnern, obgleich diese üblicherweise zur Impfstoffbewertung herangezogen werden.

7 Summary

Field studies on the influence of maternal antibodies on vaccination of broilers with an intermediate Gumborovirus vaccine

The right strategy for infectious bursal disease control and its success rate largely depends on the IBD-field pressure, maternal IBD antibody levels and the IBD vaccine strain. The employment of the “Deventer formular” may help to estimate the “optimal” time point for vaccination based on the level of maternal antibodies and the IBD-vaccine strain to be used. Two field studies were conducted applying an intermediate IBD-vaccine before, at the best, and after the estimated the “optimal” vaccination time determined by the “Deventer formular”. The studies show that broilers from flocks, which had been vaccinated between one day before and up to three days after the estimated “optimal” time for IBD-vaccination, developed detectable humoral immunity at 14 days post vaccination. If birds had been vaccinated more than three days prior to the calculated “optimal” vaccination date, the humoral immune response was delayed or non-detectable until slaughter. Interestingly, the induction of humoral immunity correlated with the incidence of bursa lesions and IBDV-detection by RT-PCR. Under field conditions bursa lesions may occur later than on experimental experiences made with specific pathogen-free birds, although these are normally used for the evaluation of IBDV-vaccines.

8 Literaturverzeichnis

ALAM, J., M.M. RAHMAN, B.K. SIL, M.S.R. KHAN, GIASUDDIN und M.S.K.

SARKER (2002):

Effect of maternally derived antibody on vaccination against infectious bursal disease (Gumboro) with live vaccine in broiler.

Poult. Sci. 1, 98-101

ALLAN, W.H., J.T. FARAGHER und G.A. CULLEN (1972):

Immunosuppression by the infectious bursal agent in chicken immunized against Newcastle disease.

Vet. Rec. 90, 511-512

AZAD, A.A., M.N. JAGADISH, M.A. BROWN und P.J. HUDSON (1987):

Deletion mapping and expression in Escherichia coli of the large genomic segment of a birnavirus.

Virology. 161, 145-152

BAYLISS, C. D., U. SPIES, K. SHAW, R.W. PETERS, A. PAPAGEORGIOU und M.E. BOURSNEILL (1990):

A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strain and identification of a variable region in VP2.

Gen. Virol. 71, 1303-1312

BAYYARI, G.R., J.D. STORY, J.N. BEASLEY und J.K. SKEELES (1996):

Pathogenicity studies of an Arkansas variant infectious bursal disease virus.

Avian Dis. 40, 516-532

BECHT, H., H. MÜLLER und H.K. MÜLLER (1988):

Comparative studies on structural and antigenic properties of two serotypes of infectious bursal disease virus.

J Gen. Virol. 69, 631-640

BENTON, W.J., M.S. COVER und J.K. ROSENBERGER (1967):

Physico-chemical properties of the infectious bursal agent (IBA).

Avian Dis. 11, 438-45

BIRGHAN, C., E. MUNDT und A.E. GORBALENYA (2000):

A non-canonical Ion proteinase lacking the ATPase domain employs the ser-Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus.

EMBO J. 19, 114-123

BOOT, H.J., A.A. TER HUURNE, B.P. PEETERS, und A.L. GIELKENS(1999):

Efficient rescue of infectious bursal disease virus from cloned cDNA: evidence for involvement of the 3'-terminal sequence in genome replication.

Virology 265, 330-341

BÖTTCHER, B., N.A. KINSELEV, V.Y. STEL'MASHCHUK, N.A.

PEREVOZCHIKOVA, A.V. BORISOV und R. A. CROWTHER (1997):

Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron microscopy.

J of Virol. 71, 325-330

BURKHARDT, E. und H. MÜLLER (1987):

Susceptibility of chicken blood lymphoblasts and monocytes to IBDV.

Arch. Virol. 94, 297-303

CHEN, H.Y., Q. ZHOU, M.F. ZHANG und J.J. GIAMBRONE (1998):

Sequence analysis of the VP 2 hypervariable region of nine infectious bursal disease virus isolates from mainland China.

Avian Dis. 42, 762-769

CHO, Y. und S.A. EDGAR (1969):

Characterization of the infectious bursal agent.

Poult. Sci. 48, 2102-2109

COSGROVE, A.S. (1962):

An apparently new disease of chickens-avian nephrosis.

Avian Dis. 6, 385-689

COULIBALY, F., C. CHEVALIER, I. GUTSCHE, J. POUS, J. NAVAZA, S.

BRESSANELLI, B. DELMAS und F.A. REY(2005):

The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses.

Cell. 120, 761-772

DARTEIL, R., M. BUBLLOT, E. LAPLACE, J.F. BOUQUET, J.C. AUDONNET und M.

RIVIERE (1995):

Herpesvirus of turkey recombinant viruses expressing infectious bursal disease virus (IBDV) VP2 immunogen induce protection against an IBDV virulent challenge in chickens.

Virology. 211, 481-490

DE WIT, J.J. (1999):

Gumboro disease estimation of optimal time of vaccination by the Deventer formula.
Animal Health Service, Deventer; International blood testing workshop.
Amsterdam, 8. / 9. July 1999

DE WIT, J.J. (2001*):

Counting the cost of IBDV
World Poultry, Gumboro Spezial 6-7

DE WIT J. J. (2001):

Gumboro Disease: estimation of optimal time of vaccination by the Deventer formula.
Annual report and proceedings of costaction 839
Immunosuppressive viral diseases 170-178

DI FABIO, J., L.I. ROSSINI, N. ETERRADOSSI, D. TOQUIN und Y. GARDIN (1999):
European-like pathogenic infectious bursal disease viruses in Brazil.
Vet. Rec. 145, 203-204

EDGAR, S.A. und Y. CHO (1976):

The epizootiology of infectious bursal disease and prevention of it by immunization.
Dev. Biol. Stand. 33, 349-356

EIDSON, C.S., J. GELB, P. VILLEGAS, R.K. PAGE, P.D. LUKERT und S.H.

KLEVEN (1980):

Comparison of inactivated and live infectious bursal disease virus vaccines in White
leghorn breeder flock.
Poult. Sci. 59, 2708-2716

ETERRADOSSI, N., C. ARNAULD, D. TOQUIN und G. RIVALLAN (1998):
Amino acid changes in VP2 variable domain are associated with typical and atypical antigenicity in very virulent infectious bursal disease viruses.
Arch. Virol. 143, 1627-1636

ETERRADOSSI, N., C. ARNAULD, D. TEKAIA, D. TOQUIN, H. LE COQ, G. RIVALLAN, M. GUITTET, J. DOMENECH, T.P. VAN DEN BERG und M. A. SKINNER (1999):
Antigenic and genetic relationship between European very virulent infectious bursal disease viruses and an early West African isolate.
Avian Pathol. 28, 36-46

EZEOKOLI, C.D., E.A. ITYONDO, A.I. NWANNENNA und J.U. UMOH (1990):
Immunosuppression and histological changes in the bursa of fabricius associated with infectious bursal disease vaccination in chicken.
Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 13, 181-188

FAHEY, K.J., K. ERNY und J. CROOKS (1989):
A conformational immunogen on VP-2 of infectious bursal disease virus that induces virus-neutralizing antibodies that passively protect chickens.
J Gen. Virol. 70, 1473-1481

FARAGHER, J.T., W.H. ALLAN und C.J. WYETH (1974):
Immunsuppressive effect of infectious bursal agent on vaccination against Newcastle disease.
Vet. Rec. 95, 385-388

FIRTH, G.A. (1974):

Occurrence of an infectious bursal syndrome within an Australian poultry flock.

Aust. Vet. J. 50, 128-130

GARDIN, Y. (1994):

Application of an invasive vaccine under controlled conditions to solve

Gumboro problems in France.

Proceedings of International Symposium on Infectious Bursal Disease and Chicken

Infectious Anaemia. Rauschholzhausen. June 1994, 286-304

GARDNER, H., K. KERRY, M. RIDDLE, S. BROUWER und L. GLEESON (1997):

Poultry virus in Antarctic penguins.

Nature 387, 245

GAUNDRY, D. (1993):

Experiences with very virulent IBDV.

Proceedings of the 130th Annual Meeting of the American Veterinary Medical

Association. Minneapolis, Minnesota 156

GELENCZEI, E.F. und H.N. LASHER (1969):

Immunity response to cell-culture-propagated infectious bursal agent.

Sterwin Laboratories, Inc. (international research report)

GIAMBRONE, J.J., HUNG JEN LIU und T. DORMITORIO (1994):

Genetic variations in infectious bursal disease virus using restrictions fragment length polymorphism and sequence comparisons of polymerase chain reaction generated cDNA.

Proceedings of International Symposium on Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anaemia. Rauischholzhausen. June 1994, 71-82

GODDARD, R.D., P.J. WYETH und W.C. VARNEY (1994):

Vaccination of commercial layer chicks against infectious bursal disease with maternally derived antibodies.

Vet. Rec. 135, 273-274

GOUGH, R.E., S.E DRURY, D.D.B. WELCHMAN, J.R. CHITTY und G.E.S SUMMERHAYS (2002):

Isolation of Birnavirus and Reovirus-Like Agents from Penguins in the United Kingdom.

Vet. Rec. 151, 422-424

GRANZOW, H., C. BIRGHAN, T.C. METTENLEITER, J. BEYER, B. KOLLNER und E. MUNDT (1997):

A second form of infectious bursal disease virus-associated tubule contains VP4.

J of Virol. 71, 8879-8885

HADDAD, E.F., C.E. WHITFILL, A.P. AVAKIAN, C.A. RICKS, P.D. ANDREWS, J.A. THOMA und P.S. WAKENELL (1997):

Efficacy of a novel infectious bursal disease virus immune complex vaccine in broiler chickens.

Avian Dis. 41, 882-889

HEINE, H.G. und D.B. BOYLE (1993):

Infectious bursal disease virus structural protein VP2 expressed by a fowlpox virus recombinant confers protection against disease in chickens.

Arch. Virol. 131, 277-292

HEINE, H.F., M. HARITOU, P. FAILLA, K. FAHEY und A. AZAD (1991):

Sequence analysis and expression of the host-protective immunogen VP 2 of variant strain of infectious bursal disease virus which can circumvent with standard type I strains.

J Gen. Virol. 72, 1835-1843

HELMBOLDT, C. W., R.N. BREWER und S. A. EDGAR (1980):

Experimentally induced Gumboro disease (IBD).

Avian Dis. 8, 561- 575

HELMBOLD, C.F. und E. GARNER (1964):

Experimentally induced Gumboro disease (IBD)

Avian Dis. 8, 561-575

HIRAI, K., S. SHIMAKURA und M. HIROSE (1972):

Immunodiffusion reaction to avian infectious bursal virus.

Avian Dis. 16, 961-964

HIRAI, K., E. KAWAMOTO, und S. SHIMAKURA (1974):

Some properties of precipitating antigens with infectious bursal disease virus.

Infect. Immun., 10, 1235-1240

HITCHNER, S.B. (1964):

Infectivity of infectious bursal disease virus for embryonating eggs.

Poult. Sci. 49, 511-516

HITCHNER, S.B. (1970):

Infectivity of infectious bursal disease virus for embryonating eggs.

Poult. Sci. 49, 511-516

HOQUE, M.M., A.R. OMAR, M. HAIR-BEJO und I. AINI (2002):

Sequence and phylogenetic analysis of the VP2 gene of very virulent infectious bursal disease virus isolates.

J. Biochem. Mol. Biol. Biophys. 6, 93-99

HUDSON, P.J., N.M. MCKERN, B.E. POWER und A.A. AZAD (1986):

Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus.

Nucleic Acids Res. 14, 5001-5012

ISLAM, M.R., K. ZIERENBERG und H. MÜLLER (2001):

The genome segment B encoding the RNA-dependent RNA polymerase protein VP1 of very virulent infectious bursal disease virus (IBDV) is phylogenetically distinct from that of all other IBDV strains.

Arch. Virol. 146, 2481-2492

JACKWOOD, D.J., Y.M. SAIF und J.H. HUGHES (1982):

Characteristics and serological studies of two serotypes of infectious bursal disease virus in turkeys.

Avian Dis. 26, 871-882

JACKWOOD, D.J., Y.M. SAIF und P.D. MOORHEAD (1985):
Immunogenicity and antigenicity of infectious bursal disease virus serotypes I and II
in chickens.
Avian Dis. 29, 1184-1194

JACKWOOD, D.J. (1988):
Detection of infectious bursal disease virus using nucleic acid probes.
J Am Vet Med Assoc. 192, 1779

JACKWOOD, D.J und R.J. JACKWOOD (1994):
Infectious Bursal Disease Viruses: Molecular Differentiation of Antigenic Subtypes
Among Serotype 1 Viruses.
Avian Dis. 38, 531-537

JACKWOOD, D.J., R.E. GOUGH und S.F. SOMMER (2005):
Nucleotide and amino acid sequence analysis of birnavirus isolated from penguins.
Vet. Rec.156, 550-552

JAGADISH, M.N., V.J. STATON, P.J. HUDSON und A.A. AZAD (1988):
Birnavirus precursor polyprotein is processed in Escherichia coli by its own virus-
encoded polypeptide.
J of Virol. 62, 1084-1087

JAGADISH, M.N. und A.A. AZAD (1991):
Localization of a VP3 epitope of infectious bursal disease virus.
Virology 184, 805-807

KAUFER, I. und E. WEISS (1980):

Significance of Bursa of Fabricius as target organ in infectious bursal disease of chickens.

Infect. Immun. 27, 364-367

KIBENGE, F.S., B. QIAN, J.R. CLEGHORN und C.K. MARTIN (1997):

Infectious bursal disease virus polyprotein processing does not involve cellular proteases.

Arch. Virol. 142, 2401-2419

KIM, I. J., M. GAGIC und J.M. SHARMA (1999):

Recovery of antibody-producing ability and lymphocyte repopulation of bursal follicles in chickens exposed to infectious bursal disease virus.

Avian Dis. 43, 401-413

KOCHAN, G., D. GONZALEZ und J.F. RODRIGUEZ (2003):

Characterization of the RNA-binding activity of VP3, a major structural protein of infectious bursal disease virus.

Arch. Virol. 148, 723-744

KOUWENHOVEN, B. und J. VAN DEN BOS (1992):

Control of very virulent infectious bursal disease (Gumboro disease) in the Netherlands with more virulent vaccines.

Proceedings of the World's Poultry Congress.

Amsterdam, The Netherlands, 465-468

KOUWENHOVEN, B. und J. VAN DEN BOS (1994):
Control of very virulent infectious bursal disease (Gumboro disease)
in the Netherlands with more virulent vaccines.
Proceedings of International Symposium on Infectious Bursal Disease
and Chicken Infectious Anaemia.
Rauischholzhausen, June 1994, 262-279

KRAEMER, C.H. (2004):
Untersuchung zu Restpathogenität, Wirksamkeit und immunsuppressiver
Eigenschaften verschiedener Gumboro-Virus Impfstoffe.
[Dissertation med. vet.]. Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover.

KUMAR, K., K.C. SINGH und C.B. PRASAD (2000):
Immune responses to intermediate strain IBD vaccine at different levels of maternal
antibody in broiler chickens.
Trop. Anim. Health Prod. 32, 357-360

LAM, K.M. (1997):
Morphological evidence of apoptosis in chickens infected with infectious bursal
disease virus.
J Comp. Pathol. 116, 367-377

LANDGRAF, H., E. VIELITZ und R. KIRSCH (1967):
Untersuchungen über das Auftreten einer infektiösen Erkrankung mit Beteiligung der
Bursa Fabricii.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 74, 6-10

LASHER, H.N und S.M. SHANE (1994):

Infectious bursal disease.

World's Poult. Sci. J. 50, 133-166

LASHER, H.N. und V.S. DAVIS (1997):

History of infectious bursal disease in the USA-the first two decades.

Avian Dis. 41, 11-19

LEJAL, N., B. DA COSTA, J.C. HUET und B. DELMAS (2000):

Role of Ser-652 and Lys-692 in the protease activity of infectious bursal disease virus VP4 and identification of its substrate cleavage sites.

J Gen. Virol. 81, 983-992

LÖHREN, U. (1994):

Infectious bursal disease: Current situation and control by vaccination.

Proceedings of International Symposium on Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anaemia.

Rauischholzhausen, June 1994, 229-234

LUKERT, P.D. (1986):

Serotyping recent isolates of infectious bursal disease.

Proc 21st Natl Meet Poult Health Condemn. Ocean City, MD, 71-75

LUKERT, P.D. und Y.M. SAIF (2003):

Infectious bursal disease.

Diseases of Poultry, 11th edition, 161-180

MAHARDIKA, I.G. (1995):

Untersuchungen über die genetische Grundlage der Antigenverwandtschaft zwischen den beiden Serotypen des Virus der infektiösen Bursitis [Dissertation med. vet.]. Univ. Gießen

MARQUARDT, W.W., R.B. JOHNSON, W.F. ODENWALD und B.A.

SCHLOTTHOBER (1980):

An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring antibodies in chickens infected with infectious bursal disease virus.

Avian Dis. 24, 375-385

MCFERRAN, J.B., M.S. MCNULTY, E.R. MCKILLOP, T.J. CONNOR, R.M.

MCCRACKEN, D.S. COLLINS und G.M. ALLAN (1980):

Isolation and serological studies with infectious bursal disease virus from fowl, turkeys and ducks demonstration of a second serotype.

Avian Pathol. 9, 395-404

MÜLLER, R., I. KAUFER, M. REINMACHER und E. WEISS (1979):

Immunofluorescent studies of early virus propagation after oral infection with infectious bursal disease virus (IBDV).

Zentralblatt für Veterinärmedizin B 26, 345-352

MUNDT, E., B. KÖLLNER und D. KRETZSCHMAR (1997):

VP5 of infectious bursal disease virus is not essential for viral replication in cell culture.

J of Virol. 71, 5647-5651

MUNDT, E. und H. MÜLLER (1995):

Complete nucleotide sequences of 5'- and 3', noncoding regions of both genome segments of different strains of infectious bursal disease virus.

Virology 209, 209-218

Muskett, J.C., I.G. Hopkins, K.R. Edwards und D.H. Thornton (1979):

Comparison of two infectious bursal disease vaccine strains: efficacy and potential hazards in susceptible and maternally immune birds.

Vet. Rec. 14, 332-334.

NAKAMURA, T., Z. LIN, A. KATO, Y. OTAKI, T. SASMAZ und S. UEDA (1993):

Sequence comparison of a highly virulent bursal disease virus prevalent in Japan.

Avian Dis. 37, 315-523

Nakamura, T., Y. Otaki, Z. Lin, T. Nunoya, S. Hoshi und A. Kato (1994):

Direct correlation between the titre of infectious bursal disease virus VP2- specific antibody and protection.

Avian Dis. 38, 251-255

NICK, H., D. CURSIEFEN und H. BECHT (1976):

Structural and growth characteristics of infectious bursal disease virus.

J of Virol. 18, 227-234

OGAWA, M., T. WAKUDA, T. YAMAGUCHI, K. MURATA, A. SETIYONO, H.

FUKUSHI und K. HIRAI (1998):

Seroprevalence of infectious bursal disease virus in free-living wild birds in Japan.

J Vet. Med. Sci. 60, 1277-1279

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, OIE (2000):
Manual of standards for diagnostic test and vaccines.
4th Ed. OIE, Paris

ONUNKWO, O. (1975)
An outbreak of infectious bursal disease of chickens in Nigeria.
Vet. Rec. 97, 433

ÖPPLING, V., MULLER, H. und H. BECHT (1991):
Heterogeneity of the antigenic site responsible for the induction of neutralizing
antibodies in infectious bursal disease virus.
Arch. Virol. 119, 211-223

PEDERSEN, K.A., E.C. SADASIV, P.W. CHANG und V.J. YATES (1990):
Antibodies to avian viruses in humans.
Epidemiol. Infect. 104, 519

PETERS, G. (1967):
Die Histologie der Gumboro-Krankheit.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 80, 394-396

RAUTENSCHLEIN, S., Ch. KRAEMER, J. VANMARCKE und E. MONTIEL (2005):
Protective efficacy of intermediate and intermediate plus infectious bursal disease
virus (IBDV) vaccines against very virulent IBDV in commercial broilers.
Avian Dis. 49, 231-237

RONG, J., T. CHENG, X. LIU, T. JIANG, H. GU und G. ZOU (2005):
Development of recombinant VP2 vaccine for the prevention of infectious bursal
disease of chicken.
Vac. 23, 4844-4851

ROSENBERGER, J.K. und S.S. CLOUD (1986):
Isolation and characterization of variant infectious bursal disease virus.
J Am Vet Med Assoc. 189, 357

SANCHEZ, A.B. und J.F. RODRIGUEZ (1999):
Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the
polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis.
Virology 262, 190-199

SCHMIDT, U. (1983)
Bursaatrophien, ihre möglichen Ursachen und ihre Bedeutung für die
industriemäßige Hühnerproduktion.
Mh. Vet.-Med. 38, 112-117

SCHNITZLER, D., F. BERNSTEIN, H. MÜLLER und H. BECHT (1993):
The genetic basis for the antigenicity of the VP2 protein of the infectious bursal
disease virus.
J of Gen. Virol. 74, 1563-1571

SIEGMANN, O., K.H.HINZ, E.F. KALETA, J.M. KÖSTERS, H. LÜDERS und G.
MONREAL (1993):
Kompendium der Geflügelkrankheiten, 5. Auflage, 85-87

SHARMA, J.M., I.J. KIM, S. RAUTENSCHLEIN und H.Y. YEH (2000):
Infectious bursal disease virus of chicken, pathogenesis and immunosuppression.
Dev. Comp. Immunol. 24, 223-235

SKEELES, J.K., M. SLAVIK, J.N. BEASLEY, A.H. BROWN, C.F. MEINECKE, S.
MARUCA und S. WELCH (1980):
An age-related coagulation disorder associated with experimental infection with
infectious bursal disease virus.
Am J Vet Res. 41,1458-1461

SNYDER, D.B. (1990):
Change in the field status of infectious bursal diseases virus.
Avian Pathol. 19, 419-423

SNYDER, D.B., W.W. MARQUARDT, E.T. MALLINSON, E. RUSSEK-COHEN, P.K.
SAVAGE. und D.C. ALLEN (1988):
Differentiation of infectious bursal disease virus directly from infected tissues with
neutralizing monoclonal antibodies: Evidence of a major antigenic shift in recent field
isolates.
Avian Dis. 32, 535-539

SOLANO, W., J.J. GIAMBRONE und V.S. PANANGALA (1985):
Comparison of a kinetic-based enzyme-linked immunosorbent assay
(KELISA) and virus-neutralization test for infectious bursal disease virus.
I. Quantitation of antibody in white leghorn hens.
Avian Dis. 29, 662-671

SPIES, U., H. MÜLLER und H. BECHT (1987):

Properties of RNA polymerase activity associated with infectious bursal disease virus and characterization of its reaction products.

Virus Res. 8, 127-140

SPIES, U. und H. MÜLLER (1990):

Demonstration of enzyme activities required for cap structure formation in infectious bursal disease virus, a member of the birnavirus group.

J Gen. Virol. 71, 977-981

TACKEN, M.G., B.P. PEETERS, A.A. THOMAS, P.J. ROTTIER und H.J. BOOT (2002):

Infectious bursal disease virus capsid protein VP3 interacts both with VP1, the RNA-dependent RNA polymerase, and with viral double-stranded RNA.

J of Virol. 76, 11301-11311

TACKEN, M., P.J. ROTTIER, A.L. GIELKENS und B. P. PEETERS (2000):

Interaction in vivo between the proteins of infectious bursal disease virus: capsid protein VP3 interacts with the RNA-dependent RNA polymerase, VP1.

J Gen. Virol. 81, 209-218

TORRENTS, D., J. MALDONADO, N. SAUBI und A. PAGES-MANTE (2004):

Dogs as potential carriers of infectious bursal disease virus.

Avian Pathol. 33, 205-209

TSUKAMOTO, K., N. TANIMURA, S. KAKITA, K. OTA, M. MASE, K. IMAI und H. HIHARA (1995):
Efficacy of three live vaccines against highly virulent infectious bursal disease virus in chickens with or without maternal antibodies.
Avian Dis. 39, 218-229

VAKHARIA, V.N., J. He, B. AHAMED und D.B. SNYDER (1994):
Molecular basis of antigenic variation in infectious bursal disease virus.
Virus Res. 31, 265-273

VAN DEN BERG, T.P., M. GONZE und G. MEULEMANS (1991):
Acute infectious bursal disease in poultry, isolation and characterisation of a highly virulent strain.
Avian Pathol. 20, 133-143

VAN DEN BERG, T. P., M. GONZE, D. MORALES und G. MEULEMANS (1996):
Acute infectious bursal disease in poultry: immunological and molecular basis of antigenicity of a highly virulent strain.
Avian Pathol. 25, 751-768

VAN DEN BERG, T.P., N. ETERRADOSSI, D. TOQUIN und G. MEULEMANS (2000):
Infectious bursal disease (Gumboro disease).
Rev. Sci. Tech. 19, 509-543

VAN DEN WIJNGAARD, J.C., J.F. HEIJMANNS, A.R.W. ELBERS, F.G. DAVELAAR, P.R. LEHRBACH, D. BAINES, A. AVAKIAN, C.F. WHITFILL und E.E. HADDAD (1998):

Bursamune in ovo: Safety and efficacy trails in European broiler birds.

World's Poultry Science Association, Jerusalem

VAN DER SLUIS, W. (1999):

1999 World Poultry Diseases Update.

World Poult. 15, 30-32

VASCONCELOS, A.C. und K.M. LAM (1994):

Apoptosis induced by infectious bursal disease virus.

J. Gen. Virol. 75, 1803-1806

VIELITZ, E. und H. LANDGRAF (1976):

Comparative tests on safety and potency of IBD vaccines.

Dev. Biol. Stand. 33, 332-339

VON EINEM, U.I., A.E. GORBALENYA, H. SCHIRRMIEIER, S.E. BEHRENS, T. LETZEL und E. MUNDT (2004):

VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase.

J Gen. Virol. 85, 2221-2229

WEISMAN, J. und S.B. HITCHNER (1978):

Virus neutralization versus agar-gel precipitin tests for detecting serological response to infectious bursal disease virus.

Avian Dis. 22, 598-603

WILCOX, G.E., R.L.P. FLOWER, W. BAXENDALE und J.S. MACKENZIE (1983):
Serological survey of wild birds in Australia for the prevalence of antibodies to EDS-76 and infectious bursal disease virus.
Avian Pathol. 12, 135-139

WINTERFIELD, R.W. und S.B. HITCHNER (1962):
Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens.
Am J Vet Res. 23, 1273-1279

WINTERFIELD, R.W., S.B. HITCHNER, G.S. APPLETON und A.S. COSGROVE (1962):
Avian nephrosis, nephritis and Gumboro disease.
L&M News Views 3, 103

WINTERFIELD, R.W. (1969):
Immunity responses to the infectious bursal agent.
Avian Dis. 13, 584-587

WYETH, P.J. und G.A. CULLEN (1997):
The use of an inactivated infectious bursal disease oil emulsion vaccine in commercial broiler parent chickens.
Vet. Rec. 104, 188-193

WYETH, P.J. und N.J. CHETTLE (1990):
Use of infectious bursal disease vaccines in chickens with maternally derived antibodies.
Vet. Rec. 126, 577-578

